

Sara Agustina Sancho Knapik

# Caracterización y regulación nutricional de la Sinaptotagmina 1 hepática de ratón

Departamento  
Bioquímica y Biología Molecular y Celular

Director/es  
Osada García, Jesús de la  
Guillén Monzón, Natalia

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>

---

© Universidad de Zaragoza  
Servicio de Publicaciones

ISSN 2254-7606



**Universidad**  
Zaragoza

Tesis Doctoral

# CARACTERIZACIÓN Y REGULACIÓN NUTRICIONAL DE LA SINAPTOTAGMINA 1 HEPÁTICA DE RATÓN

Autor

Sara Agustina Sancho Knapik

Director/es

Osada García, Jesús de la  
Guillén Monzón, Natalia

**UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA**  
Bioquímica y Biología Molecular y Celular

2015



# CARACTERIZACIÓN Y REGULACIÓN NUTRICIONAL DE LA SINAPTOTAGMINA 1 HEPÁTICA DE RATÓN

Memoria presentada por  
SARA A. SANCHO KNAPIK  
para optar al grado de Doctor  
por la Universidad de Zaragoza

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular

Universidad de Zaragoza

Abril 2015



*ciberobn*



**Universidad**  
Zaragoza





**Universidad**  
Zaragoza

El Doctor Jesús de la Osada García, Catedrático del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular de la Universidad de Zaragoza y la Doctora Natalia Guillén Monzón, investigadora y profesora ayudante doctor del Departamento de Anatomía Patológica Medicina Legal y Forense y Toxicología de la Universidad de Zaragoza.

INFORMAN: que la Licenciada **Sara A. Sancho Knapik** ha realizado bajo nuestra dirección el trabajo que presenta como memoria de doctorado con el título: “CARACTERIZACIÓN Y REGULACIÓN NUTRICIONAL DE LA SINAPTOTAGMINA 1 HEPÁTICA DE RATÓN”, y que el mismo se ajusta a la propuesta de tesis aprobada por la comisión.

Este trabajo se ha llevado a cabo durante los años 2010-2015 en este departamento.

Zaragoza, 9 de Abril de 2015.

Fdo: Jesús de la Osada García

Fdo: Natalia Guillén Monzón





Este trabajo ha sido financiado por la beca para la  
formación de personal investigador de la  
Fundación Cuenca Villoro (BE 203/2009), la red  
CIBER de Fisiopatología de la Obesidad y  
Nutrición, como iniciativa ISCIII, FEDER-  
CICYT (SAF 2010-14958 y SAF2013-41651-R),  
*Red FSE- DGA (B-69).*



## AGRADECIMIENTOS

Aquí finaliza una pequeña etapa de mi vida, una etapa en la que me he caído y levantado varias veces, pero que me ha hecho madurar y crecer, y que sobre todo he disfrutado como nadie. He disfrutado oyendo hablar a Jesús con pasión sobre este trabajo, de los mil experimentos que podíamos hacer, de las posibilidades que tenía. He disfrutado con Natalia poniéndolas en práctica y resolviendo los pequeños obstáculos del día a día porque la ciencia es caprichosa y unas veces no y otras tampoco... hasta que un día sin saber porqué todo tiene más sentido. Gracias a los dos por enseñarme, compartir y tratar de entender este trabajo conmigo.

El camino no es fácil pero he estado muy bien rodeada estos años, Cris B. cuánto sabes y que paciencia has tenido conmigo, me acordaré de ti cuando reciba ese gran premio, no lo dudes. Clara sigo sin entender porque cuando quedábamos a tomar algo nos ponías excusas... cuando te fuiste llegó la buena música al labo. Música y buenas tardes es lo que he compartido contigo Carol, ánimo! Juan, Noe, Edith, Marta (jajaja) no puedo evitarlo, sois unos grandes compañeros de departamento. Sonia gracias por tu paciencia y dedicación a mi trabajo. Angie, Manu, Roberto, Mamen, Tere, Pepín siempre intentando dar buenos consejos, gracias.

¿Cuántas veces habéis intentado explicar en que consiste vuestra tesis a gente que se interesa? Los que me conocéis sabréis la cara que puedo poner cuando me hacen esa pregunta, pero creo que la mayoría de las veces esa cara se ha transformado en una sonrisa, esa gente te quiere y te pregunta porque realmente les interesa. Ellos son los que realmente te hacen seguir adelante, a mis Mochis: Patri, Paula, Luchi, Ainhoa, Sira, Marta, Iris y Hester, mis viajeras, sin vosotras estoy perdida. Sofía, Elena, Isa, Cris, sé que estáis ahí aunque nos veamos poco. Durante estos años mi otro “trabajo” me ha permitido despejarme cuando en el laboratorio había nubes, Miguel, Bea, Estaún, Alfonso compartís conmigo algo especial que poca gente entiende. A mis niñas, las de antes y las de ahora, a los verdes, qué fácil es este otro “trabajo”, una buena etapa, sí señor. Los que más me han preguntado y menos se han interesado, pero que sabes que lo hacen porque confían en ti son los que sin duda más años han pasado conmigo y con los que más historietas compartes: Cris, Elisa, Tere, Ana, Mike y Domi. Gracias a todos por estar.

Este trabajo es por vosotros y para vosotros. Sobre todo por y para mis padres, sin ellos no estaría escribiendo esto. Qué fácil es ser su hija, qué suerte tengo.



## ABREVIATURAS

ABCA1	Proteína con dominio de unión a ATP tipo A1
ADDE	Agua destilada y desionizada
AIN	American Institute of Nutrition
AO	Ácido oleanólico
AOVE	Aceite de oliva virgen extra
Apo	Apolipoproteína
ATP	Adenosín trifostato
BLAST	Herramienta de búsqueda de alineamientos básicos locales
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario
CE	Éster de colesterol
CETP	Proteína transferidora de ésteres de colesterol
COL/CHO	Colesterol
CLA	Ácido linoleico conjugado
DEPC	Dietil pirocarbonato
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	Desoxirribonucleótidos trifosfato
EDTA	Acido etilendiaminotetraacético
EHGNA	Enfermedad del hígado graso no alcohólico
FAO	Organización de agricultura y alimentación
FPLC	Separación rápida de lipoproteínas por cromatografía líquida de filtración por gel
HDL	Lipoproteínas de alta densidad
HFD	Dieta alta en grasa
HepG2	Línea celular derivada de hepatocarcinoma
HRP	Peroxidasa de rábano picante
IDL	Lipoproteínas de densidad intermedia
LCAT	Lecitina: colesterol aciltransferasa
LD	Gotas lipídicas
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
LDLR	Receptor de las LDL
LPL	Lipoproteína lipasa
mRNA	RNA mensajero
MUFA	Ácidos grasos monoinsaturados

NCBI	Centro nacional de información biotecnológica.
OMS	Organización Mundial de la Salud
PBS	Tampón fosfato salino
PC	Fosfatidil colina
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PL	Fosfolípidos
PLTP	Proteína transferidora de fosfolípidos
PPAR	Receptor activado de proliferación de los peroxisomas
PUFA	Ácidos grasos poliinsaturados
Qm	Quilomicrones
Qmr	Quilomicrones remanentes
RNA	Ácido ribonucleico
RCT	Transporte reverso de colesterol
RT	Retrotranscripción
qPCR	PCR cuantitativa a tiempo real
SCARB1	Receptor scavenger clase B tipo I
SD	Desviación estándar
SFA	Ácidos grasos saturados
SNARE	Receptor SNAP (Proteína soluble adjunta al factor sensible de N-etil-maleimida)
SYT1	Sinaptotagmina 1
TG	Triglicérido
UTR	Región no traducida/Untranslated region
VLDL	Lipoproteínas de muy baja densidad
WT	Tipo salvaje

<b>INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>1 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b>	3
<b>1.1 Fusión de membranas en eucariotas</b>	5
1.1.1 Proteínas involucradas en la fusión de membranas	6
1.1.2 Balsas lipídicas	6
1.1.3 Vesículas sinápticas	7
1.1.3.1 Estructura de las vesículas sinápticas	7
1.1.3.1 a) Composición proteica	7
1.1.3.1 b) Composición lipídica	8
1.1.3.2 El ciclo de las vesículas sinápticas	9
1.1.4 Apertura del poro de fusión	9
1.1.4.1 Teoría lipídica	10
1.1.4.2 Teoría proteica	10
1.1.4.3 Hipótesis del tallo	11
<b>1.2 Sinaptotagminas</b>	11
1.2.1 La gran familia de las sinaptotagminas	12
1.2.1.1 Aspectos estructurales	12
1.2.1.2 Distribución de las distintas sinaptotagminas	13
1.2.1.3 Función de las sinaptotagminas	14
1.2.1.3 a) Sensores de calcio	14
1.2.1.3 b) Funciones de las isoformas que no ligan calcio	15
1.2.1.4 Interacciones moleculares	15
1.2.2 Sinaptotagmina 1	16
1.2.2.1 Localización	16
1.2.2.2 Funciones en cerebro	16
1.2.2.2 a) Exocitosis	17
1.2.2.2 b) Endocitosis	17
1.2.2.2 c) Otras funciones	18
1.2.2.3 SYT1 en otros tejidos	18
1.2.2.3 a) Intestino	18
1.2.2.3 b) Riñón	19
1.2.2.3 c) Hígado	19

<b>1.3 Enfermedad no alcohólica del hígado graso</b>	19
1.3.1 Prevalencia	20
1.3.2 Etiología	20
1.3.2.1 EHGNA primaria	20
1.3.2.2 EHGNA secundaria	21
<b>1.4 Dieta</b>	21
1.4.1 Lípidos de la dieta	22
1.4.1.1 Digestión y absorción de lípidos	23
1.4.1.2 Metabolismo de lipoproteínas	23
1.4.2 Dieta occidental	26
1.4.2.1 Dietas altas en grasas	29
1.4.2.2 Efecto del colesterol en la dieta	30
1.4.3 Dieta mediterránea	31
1.4.3.1 Aceite de oliva	31
1.4.3.1 a) Categorías del aceite de oliva	32
1.4.3.1 b) Composición química del aceite de oliva	33
1.4.3.2 Propiedades del aceite de oliva	34
1.4.3.2 a) Escualeno	35
1.4.3.2 b) Ácido oleanólico	36
<b>1.5 Nutrigenómica</b>	37
1.5.1 Interacción gen-dieta	38
<b>1.6 Sobreexpresión de genes</b>	38
1.6.1 Aplicaciones de la sobreexpresión	39
1.6.2 Mecanismos resultantes de la sobreexpresión de un gen	40
1.6.2.1 Mecanismos de inhibición	40
1.6.2.2 Mecanismos de activación	40
1.6.3 Relevancia de la sobreexpresión	41
<b>1.7 Modelos animales</b>	41
1.7.1 El ratón carente de apolipoproteína E	41
1.7.2 El ratón normal	42
1.7.3 Influencia del sexo en el transcriptoma hepático	42
<b>1.8 Modelos celulares de estudio</b>	43
1.8.1 Células HepG2	43



<b>2 OBJETIVOS</b>	45
<b>3 MATERIAL Y MÉTODOS</b>	49
<b>3.1 Caracterización y clonaje de la secuencia hepática de <i>Syt1</i> de ratón</b>	51
3.1.1 Extracción de RNA hepático	51
3.1.2 Purificación del RNA	52
3.1.3 Retrotranscripción a DNA complementario	53
3.1.4 Diseño de los cebadores	54
3.1.5 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR a tiempo final)	55
3.1.6 Amplificación rápida de los extremos del cDNA (RACE)	55
3.1.7 Electroforesis	57
3.1.8 Purificación de las muestras de PCR	57
3.1.9 Extracción de bandas del gel	57
3.1.10 Identificación de los fragmentos obtenidos por PCR y análisis de las secuencias	57
3.1.11 Clonaje de la secuencia codificante de <i>Syt1</i> de hígado en pCRII	58
3.1.12 Clonaje de la secuencia codificante de <i>Syt1</i> hepática en el vector de expresión pLIVE	61
<b>3.2 Cultivo celular</b>	62
3.2.1 Manejo y condiciones de cultivo	62
3.2.2 Mantenimiento de la línea celular HepG2	63
3.2.3 Tripsinización de los cultivos	63
3.2.4 Siembra de las células	64
3.2.5 Congelación de las células	64
3.2.6 Descongelación de células	64
3.2.7 Transfección de las células con el vector de expresión hepático pLIVE clonado con <i>Syt1</i>	65
<b>3.3 Material biológico</b>	66
<b>3.4 Estudios experimentales</b>	66
3.4.1 Influencia de la sobreexpresión de <i>Syt1</i> en ratones wild-type alimentados con una dieta normal	66
3.4.2 Influencia de la sobreexpresión de <i>Syt1</i> en ratones deficientes en APOE alimentados con una dieta occidental	67

3.4.3 Influencia de componentes de la dieta y hormonas sobre la expresión de <i>Syt1</i> en ratones deficientes en APOE	67
3.4.3.1 Influencia del colesterol	67
3.4.3.2 Influencia de una dieta occidental	67
3.4.3.3 Influencia del ácido oleanólico	68
3.4.3.4 Influencia del escualeno	68
3.4.3.5 Influencia del sexo	68
3.4.3.6 Influencia de la castración	69
<b>3.5 Sacrificio de los animales</b>	70
<b>3.6 Estudio de la expresión génica</b>	70
<b>3.7 Determinaciones analíticas y estudio histológico en hígado</b>	71
3.7.1 Extracción y determinación de lípidos hepáticos	71
3.7.1.1 Determinación del colesterol hepático	72
3.7.1.2 Determinación de los triglicéridos hepáticos	73
3.7.2 Estudio histológico hepático	73
3.7.3 Localización de SYT1 mediante técnicas inmunohistoquímicas	74
<b>3.8 Detección inmuno-específica de proteínas</b>	75
3.8.1 Extracción de proteínas mediante fraccionamiento subcelular	75
3.8.1.1 Obtención de la fracción de membrana plasmática utilizando un gradiente de sacarosa	76
3.8.1.2 Obtención de lisosomas y grandes vesículas mediante bifase	76
3.8.1.3 Obtención de proteínas microsomales	77
3.8.2 Cuantificación de proteínas	77
3.8.3 Análisis de Western-Blot	78
3.8.3.1 Electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida- SDS	78
3.8.3.2 Transferencia y detección inmuno-específica de proteínas	79
<b>3.9 Parámetros plasmáticos</b>	81
3.9.1 Determinación del colesterol total en plasma	81
3.9.2 Determinación de los triglicéridos totales en plasma	81
3.9.3 Determinación de glucosa en plasma	82
3.9.4 Separación rápida de lipoproteínas por cromatografía líquida de filtración por gel (FPLC)	82
3.9.4.1 Colesterol total y libre en las fracciones separadas por FPLC	83
3.9.4.2 Fosfatidilcolina en fracciones separadas por FPLC	84

3.9.4.3 Esfingomiélinea en fracciones separadas por FPLC	84
3.9.4.4 Determinación de apolipoproteínas mediante ELISA	85
<b>4. RESULTADOS</b>	89
<b>4.1 Cloning and expression of hepatic synaptotagmin 1 in mouse</b>	91
<b>4.2 Hepatic Syt1 is involved in selective intracellular cholesterol transport</b>	102
<b>4.3 Dietary components and ovarian hormones are important regulators of hepatic synaptotagmin 1 mRNA expression in mice</b>	137
<b>5. DISCUSIÓN</b>	157
<b>6. CONCLUSIONES</b>	173
<b>7. BIBLIOGRAFÍA</b>	177







## INTRODUCCIÓN

La enfermedad del hígado graso no alcohólica (EHGNA) es la forma más común de las enfermedades hepáticas, llegando a tener una prevalencia superior a un 25% en algunos grupos étnicos en la sociedad occidental [7]. La sobrealimentación, la baja actividad física, la resistencia a la insulina y los factores genéticos [8] son los principales factores de riesgo de una enfermedad cuya prevalencia va en aumento y donde los mecanismos moleculares desencadenantes por los cuales el hígado se vuelve esteatósico siguen sin aclararse [9].

Usando modelos nutricionales (dieta occidental enriquecida con los isómeros c9, t11-CLA o t10, c12-CLA o dietas normales suplementadas con un 10% de aceite de oliva) y genéticos de esteatosis hepática en ratones (ratones *ApoE*- y *Cbs*-deficientes, estos últimos hiperhomocisteinémicos), donde los niveles y la composición de lipoproteínas están alterados, junto con el análisis de microarray y su confirmación por técnicas de qPCR miembros del grupo encontraron asociación entre la expresión de *Sinaptotagmina 1* (*Syt1*), una proteína vesicular involucrada en procesos de endo/exocitosis en tejidos neuroendocrinos [10, 11], y esteatosis hepática [12].

El presente trabajo pretende demostrar la presencia de sinaptotagmina 1 en hígado y dilucidar la relación con la movilización de lípidos y con los mecanismos mediante los cuales el hígado se vuelve esteatósico. El efecto de la sobreexpresión de *Sinaptotagmina 1* en el hígado se ha utilizado como una herramienta para inferir su papel en la esteatosis hepática, para ello se utilizaron dos modelos experimentales de ratón, un modelo normal alimentado con una dieta normal y un modelo de ratón carente de apolipoproteína E alimentado con una dieta alta en grasa que desarrolla esteatosis espontánea en un corto periodo de tiempo, para valorar los efectos de la proteína SYT1 hepática sobre el desarrollo de la esteatosis y otros parámetros relacionados. Puesto que la dieta es uno de los reguladores metabólicos más determinante y modificable en cuanto a su composición, en esta tesis doctoral se ha estudiado el efecto que tienen ciertos compuestos suplementados en la dieta así como la influencia del sexo y la castración sobre la expresión génica de *Sinaptotagmina 1* para intentar explicar de qué manera la expresión de *Sinaptotagmina 1* está afectada por diferentes factores involucrados en la esteatosis hepática y su relación con la enfermedad.

## *INTRODUCCIÓN*

Esta tesis se estructura en un resumen bibliográfico de la información relativa al tema de estudio, así como los objetivos que con ella se pretenden cumplir, los métodos empleados para llevarlos a cabo, los resultados obtenidos, la discusión de los mismos y las referencias bibliográficas consideradas.

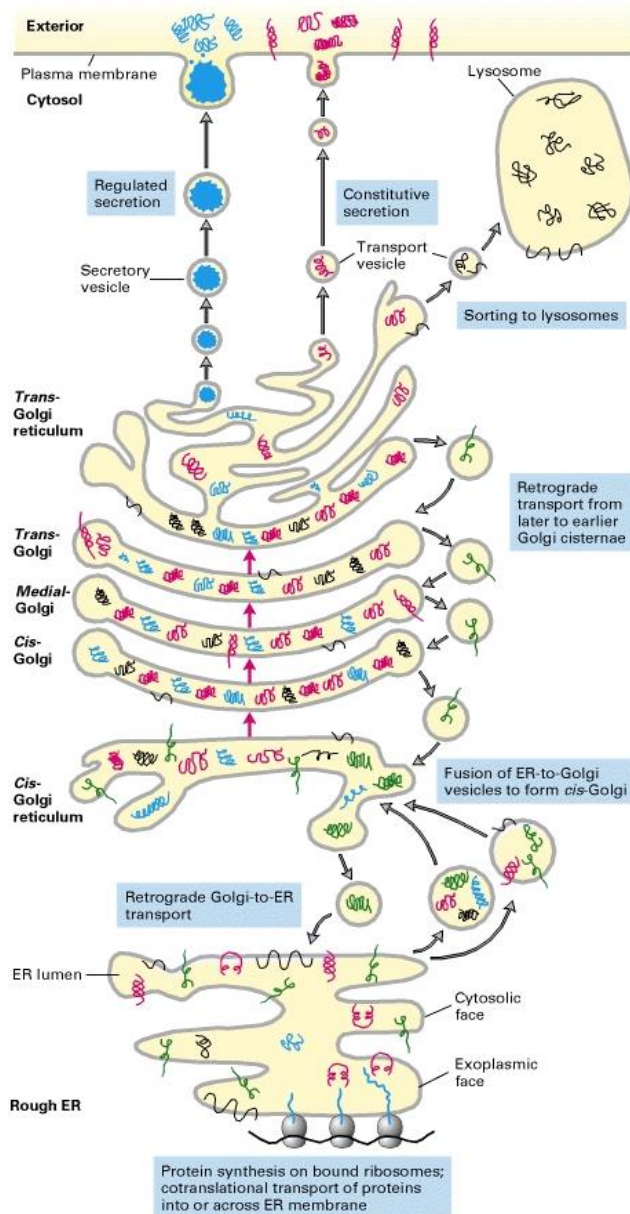


# **1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**



## 1.1 Fusión de membranas en eucariotas

La compartimentación en orgánulos membranosos es uno de los principios fundamentales de las células eucariotas. Sin embargo, macromoléculas embebidas en membranas y dentro de dichos orgánulos tienen que ser transportadas entre compartimentos y dentro y fuera de las células sin comprometer la integridad de las



**Figura 1: Rutas secretoras en la síntesis de proteínas.**  
Fuente [3]

membranas [13]. Con el fin de lograr esto, los organismos eucariotas han desarrollado mecanismos complejos como la secreción. La secreción es un proceso celular fundamental utilizado para insertar proteínas en la membrana plasmática y transportar moléculas de señalización y proteínas intravesiculares al espacio extracelular [14]. Existen dos rutas de secreción, constitutiva y regulada. La constitutiva la encontramos en todo tipo de células y es el modo de transporte fundamental entre el retículo endoplásmico (RE), Golgi y membrana plasmática, por el contrario la secreción regulada se encuentra principalmente en neuronas y células endocrinas, donde el tráfico de membranas está sincronizado mediante señales intracelulares tales como el flujo

de calcio [15]. La apertura de los canales de calcio en las neuronas desencadena la fusión de vesículas sinápticas con la membrana plasmática, la liberación de

neurotransmisores (NTs) en la hendidura sináptica y la recuperación de las vesículas mediante endocitosis. El proceso de secreción requiere la fusión de dos bicapas de fosfolípidos dentro de la célula, un proceso energéticamente desfavorable. Las membranas biológicas utilizan proteínas de fusión especializadas para lograr este objetivo. Cómo estas proteínas logran fusionar membranas es una de las cuestiones fundamentales de la biología celular.

### **1.1.1 Proteínas involucradas en la fusión de membranas**

Existen tres clases de proteínas involucradas en todos los procesos de fusión intracelulares en vertebrados:

- Proteínas SNARE (soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment protein receptor). Son proteínas unidas a membrana distribuidas en dos grupos en función de si el residuo central del SNARE motif [16-18] es arginina o glutamina:
  - Q-SNARES: incluye a proteínas como la familia de las syntaxinas [19].
  - R-SNARES: incluye a proteínas como la familia de las sinaptobrevinas [20].
- Proteínas SM. Son proteínas solubles donde se incluyen proteínas homólogas a Munc18 [21]. Estas se unen a las Q-SNARES.
- Proteínas Rab. Son pequeñas GTPasas [22].

### **1.1.2 Balsas lipídicas**

Las balsas lipídicas son dinámicos microdominios lipídicos en las membranas capaces de reorganizar, incluir y excluir proteínas y lípidos [23] con alto contenido de colesterol, esencial para la retención de lípidos y proteínas [24] involucrados en la biogénesis de vesículas y la fusión de membranas [5, 25]. La concentración de colesterol en las vesículas cambia la estructura de las proteínas modificando las propiedades de la membrana como la curvatura favorable para la fusión, por lo que la reducción del colesterol impide la exocitosis de las vesículas sinápticas [26]. No sólo es necesaria una adecuada concentración de colesterol para cambiar las propiedades intrínsecas de fusión, los fosfolípidos también contribuyen directamente y pueden

reclutar y activar un gran número de proteínas para crear las condiciones óptimas para la exocitosis [27].

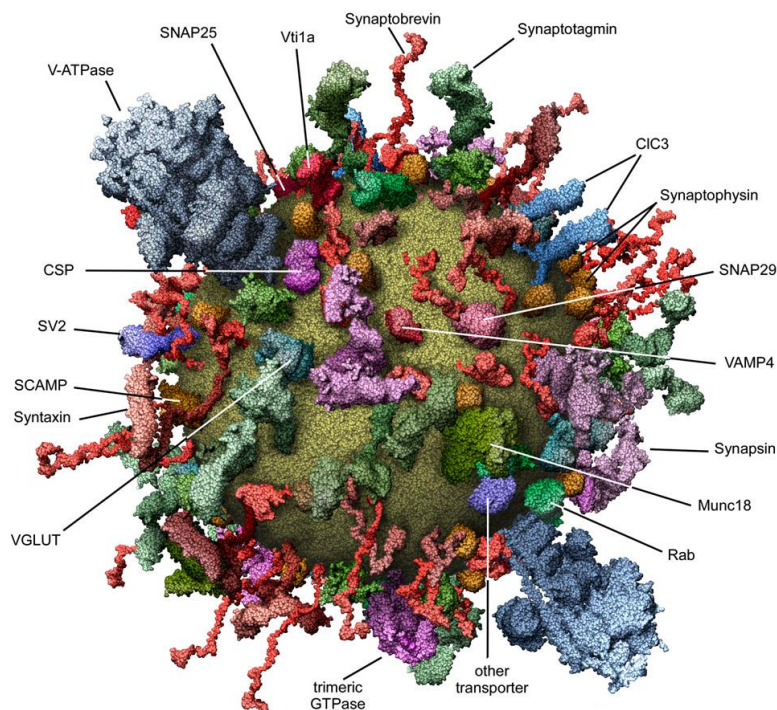
### 1.1.3 Vesículas sinápticas

El transporte entre diferentes organelas normalmente implica vesículas especializadas de transporte. Estas vesículas están consideradas como la unidad menor básica del tráfico de membranas [14], se escinden de un compartimento precursor, se dirigen a otro compartimento o a la membrana plasmática donde contactan y se produce la fusión de membranas y la liberación de su contenido. Las vesículas sinápticas (VSs) se concentran en las terminales de las neuronas presinápticas y son un modelo de este tipo de organelas de transporte.

#### 1.1.3.1 Estructura de las vesículas sinápticas

##### 1.1.3.1 a) Composición proteica

Las VSs contienen toda la maquinaria necesaria para la captación y almacenamiento de neurotransmisores como son proteínas transportadoras, canales



iónicos y la ATPasa de  $H^+$  necesaria para hacer funcionar los transportadores [28], además de las proteínas mediadoras de la fusión de membranas durante la exocitosis así como para la recuperación de las vesículas tras la sinapsis [29]. La composición proteica de las VSs es la más estudiada y mejor

**Figura 2: Modelo 3D de la composición proteica de una vesícula sináptica. Fuente [5]**

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

conocida de las organelas partícipes en el tráfico vesicular.

Las vesículas sinápticas son muy heterogéneas en cuanto a su composición proteica, se han identificado hasta 80 proteínas diferentes [5], aunque cada sinapsis y cada vesícula presenta una composición diferente siempre contiene alguna isoforma de cada una de las familias involucradas [30] pudiendo concluir que comparten un grupo común de proteínas básicas presentes en todas las VSs. El siguiente cuadro resume el porcentaje de las proteínas más representativas en la composición de las VSs respecto al total.

**Tabla 1: Cantidades de las proteínas principales de las VSs. Fuente [5]**

Proteínas	% de proteína vesicular respecto al total
Sinaptofisina	10,20 ± 1,54 <sup>[5]</sup>
Sinaptobrevina 2	8,60 ± 1,55 <sup>[5]</sup>
Sintaxina 1	2,00 ± 0,27 <sup>[5]</sup>
SNAP 25	0,40 ± 0,06 <sup>[5]</sup>
Sinapsinas	6 <sup>[31, 32]</sup>
Rab3A	2,5 <sup>[31]</sup>
Sinaptotagmina 1	7 <sup>[32]</sup>
Sinaptogrina 1	0,5 <sup>[31]</sup>
SV2	1,4 <sup>[31]</sup>
SCAMP	0,3 <sup>[31]</sup>
CSP	0,6 <sup>[31]</sup>
VGLUT1	5,36 ± 1,11 <sup>[5]</sup>
VGLUT2	9,01 ± 2,31 <sup>[5]</sup>
V-ATPasa V1 subunidad B	1,15 ± 0,21 <sup>[5]</sup>

Varias de las proteínas identificadas en VSs son además miembros de familias de proteínas involucradas en la secreción constitutiva del tráfico vesicular [30], incluso en organismos tan primitivos como las levaduras [33].

### 1.1.3.1 b) Composición lipídica

La sinapsis puede verse afectada por los lípidos [34] en al menos dos formas:

- Al actuar como ligandos para proteínas efectoras.
- Mediante la modificación de las propiedades fisicoquímicas y la organización molecular de las membranas sinápticas como se ha comentado anteriormente en el punto 1.1.2.

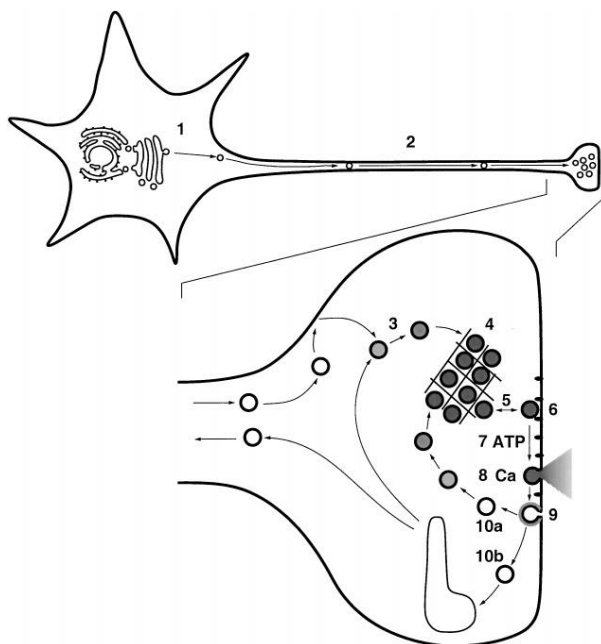
**Tabla 2: Composición lipídica de VSs. Fuente [5]**

Lípidos de membranas	ng / $\mu$ g de proteína
Fosfatidilcolina	186 $\pm$ 37
Fosfatidiletanolamina	
1-éster	120 $\pm$ 18
1-éter (plasmalógeno)	96 $\pm$ 14
Fosfatidilserina	68 $\pm$ 7,2
Fosfatidilinositol	9,73
Esfingomielina	37 $\pm$ 5,1
Colesterol	215 $\pm$ 25
Hexilceramida	8,6 $\pm$ 4,0
Ceramida	1,2 $\pm$ 0,1
Ratio proteína: fosfolípido (p/p)	1,94 $\pm$ 0,23

El colesterol es un componente estructural esencial de las membranas plasmáticas que se enriquece en gran medida en las membranas de las sinapsis y las vesículas sinápticas, jugando un papel importante en el reclutamiento y la organización de las proteínas.

Representa aproximadamente el 30% de los lípidos totales y es el lípido más abundante después de los fosfolípidos. Se estima que los fosfolípidos cubren el 70% de la superficie de las VSs, además de la contribución del colesterol que sigue siendo aproximada [5]. La regulación de los niveles de colesterol y de lípidos puede por lo tanto influir en las interacciones y actividad de las proteínas sinápticas específicas, y tienen un fuerte impacto en las funciones sinápticas [34].

### 1.1.3.2 El ciclo de las vesículas sinápticas



**Figura 3: Ciclo de la vesícula sináptica. Fuente [4]**

La sinapsis es la principal forma de comunicación de célula a célula en el sistema nervioso. La liberación de neurotransmisores se produce a través del proceso de exocitosis regulada, donde una vesícula sináptica libera su contenido en respuesta a un aumento de calcio [35].

El ciclo de las vesículas sinápticas comienza con la síntesis de lípidos y proteínas asociadas a las vesículas en el RE y su posterior

## *REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA*

maduración en el Golgi (etapa 1), seguido de su transporte a las terminales sinápticas (etapa 2) donde sufren un proceso de maduración en el que se cargan de neurotransmisores (etapa 3) y pasan a formar parte de la reserva de vesículas (etapa 4). Las vesículas son movilizadas (etapa 5) del reservorio, se dirigen a la membrana plasmática hasta situarse a una distancia de 2 nm de la zona activa de la membrana y se produce el acoplamiento mediante la formación de complejos proteicos que unen las dos membranas (etapa 6). La exocitosis requiere gasto de ATP [36] (etapa 7) como requisito previo a la entrada de calcio para la fusión de las membranas (etapa 8). Tras la liberación de los NTs las membranas y proteínas de las VSs son recicladas por endocitosis mediada por clatrina (etapa 9). Las vesículas pueden volver a captar NTs para comenzar un nuevo ciclo (etapa 10a) o sus componentes (etapa 10b) pueden reciclarse totalmente [37]. Muchas etapas de la exocitosis de vesículas sinápticas son generalizables a otras etapas del tráfico vesicular que ayudan a establecer y mantener la compartimentación de la membrana celular en especies que van desde levaduras a los seres humanos.

### **1.1.4 Apertura del poro de fusión**

Las membranas no se fusionan espontáneamente, de hecho la fuerza de repulsión entre dos bicapas lipídicas situadas a 2 nm de distancia es muy grande. Cómo las proteínas llegan a fusionar las bicapas lipídicas sigue siendo una de las cuestiones fundamentales en la biología celular. Existen dos teorías extremas que sugieren que la fusión de las membranas que origina el poro inicial sea principalmente lipídica o proteica.

#### **1.1.4.1 Teoría lipídica**

En la teoría lipídica la fusión de las membranas se realiza de acuerdo a las leyes físicas [38], la fusión está mediada por fosfolípidos y el papel de las proteínas se restringe a la reducción de la energía de activación y a la organización del sitio de fusión.

#### **1.1.4.2 Teoría proteica**



## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

En la teoría proteica el poro de fusión inicial se produce por la interacción de proteínas de ambas membranas formando un donut proteico que es invadido a posteriori por fosfolípidos y que se expande hasta formar una estructura de anillo oligomérico [39]. El modelo implica que los estados de transición previos a la fusión de las membranas se rigen por las interacciones proteína-lípido tanto hidrófilas como hidrófobas donde las proteínas guiarían a los lípidos para la fusión de las membranas y que en su ausencia esta no podría llevarse a cabo [40].

### 1.1.4.3 Hipótesis del tallo

Es una teoría experimental, actualmente la única coherente que describe los estados de transición durante la fusión de las membranas. Bajo condiciones experimentales adecuadas, es posible la fusión de las monocapas proximales conectadas por un tallo y donde las monocapas distales forman un hoyuelo [41, 42] y el poro de fusión puede abrirse y cerrarse antes de la dilatación del poro en función del tipo de lípidos en la zona de contacto que se reorganizarían tras la fusión modificando las propiedades de la bicapa así como de las proteínas existentes en ese estadio de transición [43]. Esta teoría reforzaría y completaría los estados de transición de la anteriormente citada teoría proteica de fusión de membranas [40]. El mecanismo por el cual el poro se dilata concluiría con la liberación de los NT. La única proteína que se conoce actualmente que es esencial para la apertura del poro de fusión es sinaptotagmina [44, 45].

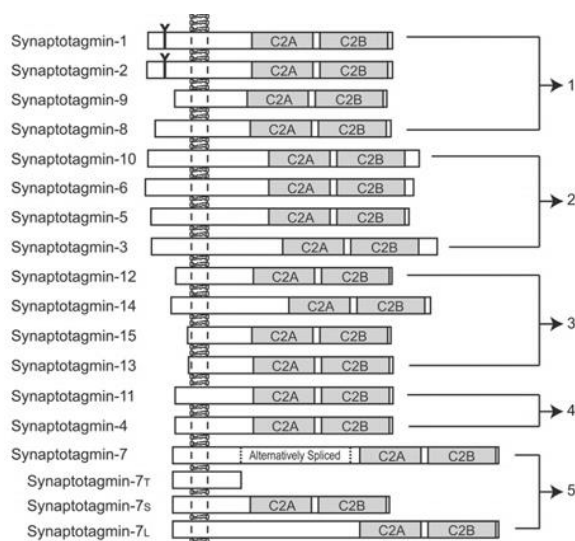
## 1.2 Sinaptotagminas

Las sinaptotagminas (SYTs) constituyen una familia de proteínas partícipes en el tráfico en las membranas [46], caracterizadas por un grupo amino (N) terminal, una región variable central y dos dominios carboxilo (C) terminales, C<sub>2</sub>A y C<sub>2</sub>B [47], destinados a unir Ca<sup>2+</sup> y fosfolípidos [10], con una gran similitud estructural al dominio C<sub>2</sub> de la proteína quinasa C [48]. La familia de las sinaptotagminas participan en el acoplamiento y la fusión de membranas de vesículas en células neuronales y no neuronales como macrófagos [49], células β secretoras de insulina [50], osteoblastos y

osteoclastos [51], y células caliciformes secretoras de mucina de las vías respiratorias [52].

### 1.2.1 La gran familia de las sinaptotagminas

Al menos 15 isoformas de la familia de las sinaptotagminas han sido identificadas y clonadas. Se ha descrito a las proteínas STREP14 y B/K como los dos últimos miembros de la familia, sinaptotagminas-16 y -17 respectivamente [53, 54];

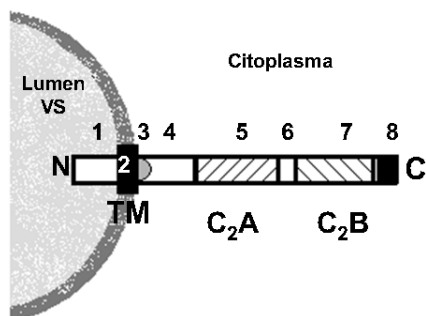


**Figura 5: Estructura y clasificación de las isoformas en función de su secuencia. Fuente [2]**

pese a que presentan similitudes como los dominios C-terminal  $C_2$  carecen del dominio transmembrana N-terminal y no deberían clasificarse como tal. El gran número de parálogos sugiere que la familia de genes diversificó antes de la actual diversificación de especies euterias, por lo que debía haber seis copias ancestrales en el linaje de los metazoos [55]. Basándose en las similitudes de sus secuencias la familia se ha dividido en cinco grupos [2] como

se indica en la Figura 5, que se corresponde con lo descrito anteriormente y donde el sexto grupo sería el formado por sinaptotagminas 16 y 17 y correspondería a una de las seis copias ancestrales antes de la divergencia de las especies.

#### 1.2.1.1 Aspectos estructurales



**Figura 4: Representación de los dominios de las isoformas de las SYTs.**

La estructura de las sinaptotagminas (Fig.4) está conservada en vertebrados e invertebrados [47, 56]. Las sinaptotagminas tienen un pequeño dominio N-terminal intraluminal (dominio 1) muy variable entre las distintas isoformas que puede estar glicosilado [48], está conectado a un segmento transmembrana (dominio 2) y a una región rica

en cisteínas (dominio 3) palmitoilada en algunas isoformas [57, 58]. El gran segmento citoplasmático contiene los dos dominios C<sub>2</sub> [56, 59]. El dominio C<sub>2</sub>A (dominio 5) está conectado a la región rica en cisteínas y transmembrana a través de un segmento muy hidrofílico (dominio 4) y al segundo dominio C<sub>2</sub>B (dominio 7) a través de una pequeña región bisagra (dominio 6). La estructura termina con una región altamente conservada entre isoformas (dominio 8) destinada a interactuar con miembros de la familia de las neurexinas [60].

### **1.2.1.2 Distribución de las distintas sinaptotagminas**

Genes parálogos que surgen de la duplicación de genes a menudo divergen unos de otros, ya sea porque una copia es redundante, y por lo tanto se somete a la deriva neutra, o porque hay selección para una función nueva y divergente como es el caso de la familia de las sinaptotagminas [61]. Las 17 isoformas son comunes para los vertebrados y que los ortólogos estén altamente conservados entre especies se debe probablemente a que experimentaron una selección positiva para la nueva función en un genoma ancestral y fueron conservados posteriormente a través de la selección [55].

A pesar de que todas las sinaptotagminas están enriquecidas en el sistema nervioso, su abundancia y distribución es específica estrictamente de la isoforma. Muchas Syts juegan un papel en la secreción de neurotransmisores actuando como sensores de Ca<sup>2+</sup> durante la exocitosis o en la liberación de hormonas en células endocrinas [62] o ambos. En la última década se ha visto que no sólo se expresan en tejidos neuroendocrinos sino que también en otro tipo de tejidos donde el rol de muchas de estas isoformas aún está por determinar. Se han propuesto dos grandes subfamilias basándose en el patrón de expresión. El primer subgrupo, incluye a las sinaptotagminas 1-5, 10-12, se expresan principalmente en el sistema nervioso y en otros órganos endocrinos [63-67]. Las sinaptotagminas restantes 6-9 muestran una expresión más ubicua y no se enriquecen en el sistema nervioso [68-70]. Sinaptotagmina 14 y 16 se expresan en corazón y testículos [71], la isoforma 15 en pulmón y testículos [72] y la isoforma 17 aparte de en cerebro se ha descrito en riñón y retina [73, 74]. Sorprendentemente, no todas las sinaptotagminas se encuentran únicamente en vesículas. Tanto Sinaptotagmina 3 como 6 se han encontrado en otros compartimentos celulares, como la membrana plasmática [75]. Sinaptotagmina 7 se ha encontrado en los lisosomas [76], mientras que la Sinaptotagmina 4 no sólo se ha encontrado en las

vesículas sinápticas [77, 78], sino también en el aparato de Golgi [79].

### 1.2.1.3 Función de las sinaptotagminas

#### 1.2.1.3 a) Sensores de calcio

La dilatación del poro de fusión de dos membranas está facilitada por la presencia de sinaptotagmina que actúa como sensor de  $Ca^{2+}$  durante la exocitosis a través de una región conservada en los dominios  $C_2$  [80]. Sinaptotagmina 1 fue la primera isoforma en la que se detectaron la unión de tres iones  $Ca^{2+}$  al dominio  $C_2A$  vía

Isoform	C2A					C2B					Predicted to stimulate fusion
	Ca <sup>2+</sup> ligands					Ca <sup>2+</sup> ligands					
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	
I	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
II	+	+	+	+	+	+	+	+	+	E	+
III	+	+	+	+	+	+	+	+	+	E	+
IV	+	+	S	+	+	+	+	+	E	E	+
V	+	+	+	+	+	+	+	+	+	E	+
VI	+	+	+	+	+	+	+	+	+	E	+
VII	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
VIII	E	+	+	K	E	-	E	A	G	E	-
IX	+	+	+	+	+	+	+	+	+	E	+
X	+	+	+	+	+	+	+	+	+	E	+
XI	+	+	S	+	+	+	N	+	+	E	-
XII	E	S	G	+	V	N	+	E	S	+	-
XIII	H	+	T	+	S	Q	+	L	Q	C	-
XV	S	-	H	N	Q	E	S	L	T	K	-

**Figura 5:** Conservación de residuos en los dominios  $C_2$  destinados a unir  $Ca^{2+}$  en las distintas isoformas. Los números corresponden al orden de residuos  $D^{172}$ ,  $D^{178}$ ,  $D^{230}$ ,  $D^{232}$ ,  $D^{238}$  en el dominio  $C_2A$  y a  $D^{303}$ ,  $D^{309}$ ,  $D^{363}$ ,  $D^{365}$ ,  $D^{371}$  en  $C_2B$ . Las letras corresponden a los residuos sustituidos en las isoformas, (+) conservación de Asp, (-) indica ausencia de ese residuo. La última columna predice cuales Syts estimulan (+) o no estimulan (-) *in vitro* la fusión mediada por las proteínas SNARES en respuesta al  $Ca^{2+}$ . Fuente [6]

cinco residuos de aspartato y uno de serina :  $D^{172}$ ,  $D^{178}$ ,  $D^{230}$ ,  $D^{232}$ ,  $S^{235}$  y  $D^{238}$  y dos iones  $Ca^{2+}$  al dominio  $C_2B$  a través de los residuos:  $D^{303}$ ,  $D^{309}$ ,  $D^{363}$ ,  $D^{365}$ ,  $D^{371}$  [81, 82]. La Figura 5 muestra la sustitución de estos residuos en algunas de las isoformas. No todas las isoformas ligan calcio, de hecho, basándonos en las similitudes de secuencia, sólo ocho sinaptotagminas lo hacen: -1, -2, -3, -5, -6, -7, -9 y -10 [6]. Aunque el dominio  $C_2B$  de Syt4 y 11 poseen los cinco residuos ácidos, no unen  $Ca^{2+}$  debido a que la orientación espacial de los residuos no es

propicia para la formación de los sitios de unión de los iones [83]. Las ocho isoformas que unen calcio se clasifican en tres grupos en función de su cinética de desensamblaje. Syts -1, -2, -9, constituyen el grupo más rápido y son las responsables de la exocitosis rápida de vesículas y fusión de membranas; Syts -3, -5, -6, y -10 pertenecen al grupo medio y Syt7 exhibe la cinética de desensamblaje más lenta. Así pues, las isoformas con una cinética más lenta que Syt1 podrían funcionar como sensores de calcio para la liberación asincrónica, la cual tiene lugar pasados de diez a cien milisegundos tras el colapso de los dominios que unen calcio [61, 84].

### 1.2.1.3 b) Funciones de las isoformas que no ligan calcio

Siete isoformas no actúan como sensores de calcio (-4, -8, -11, -12, -13, -14 y -15) pese a que algunas se expresen en abundancia en tejido neuronal y endocrino [84, 85]. Se cree que estas isoformas podrían inhibir la formación del complejo SNARE que media la fusión de membranas tanto en presencia como en ausencia de calcio [6], Syt4 colocaliza con Syt1 y compiten por proteínas SNARE lo que disminuye la formación de complejos en neuronas durante la exocitosis. Aunque también juega un papel positivo en la secreción de células de la glía [86]. Pese a que la distribución de estas isoformas en tejidos neuroendocrinos y no neuronales se conoce, poco se sabe acerca de su función en la fusión de membranas y exocitosis.

### 1.2.1.4 Interacciones moleculares

Varias moléculas pueden actuar como ligandos de las sinaptotagminas en presencia o ausencia de calcio viéndose involucrados distintos dominios de la proteína. Los ligandos podrían dividirse a nivel molecular en dos categorías: proteínas y lípidos.

Las interacciones de Syts más estudiadas son aquellas con liposomas artificiales que contienen fosfatidilserina (FS). FS se une al dominio C<sub>2</sub>A y es promovida por iones calcio [32]. Syts presentan mayor afinidad por este lípido que por otros como el ácido fosfatídico o fosfatidilinositol. Syt 1 se une de forma dependiente de calcio a través de su dominio C<sub>2</sub>B a los fosfoinosítidos más fosforilados con gran afinidad y eficiencia incluso cuando estos no están en las bicapas lipídicas [87].

Las sinaptotagminas se unen en presencia de calcio durante la fusión de membranas a las proteínas de los complejos SNARE a través de sus dominio C<sub>2</sub> promoviendo la exocitosis rápida [88, 89], aunque también lo hacen en ausencia de calcio para el acoplamiento de las vesículas a las membranas.

Además de estas interacciones, sinaptotagmina también se une a numerosas proteínas neuronales en ausencia de calcio como a canales de calcio [90], canales de sodio [91], al complejo de adaptadores de clatrina [92], a proteínas  $\beta$ -SNAP [93], neurexinas [94], calmodulinas [60], inositol polifosfatos [95], SYNCRIP [96] y polifosfoinosítidos [87].

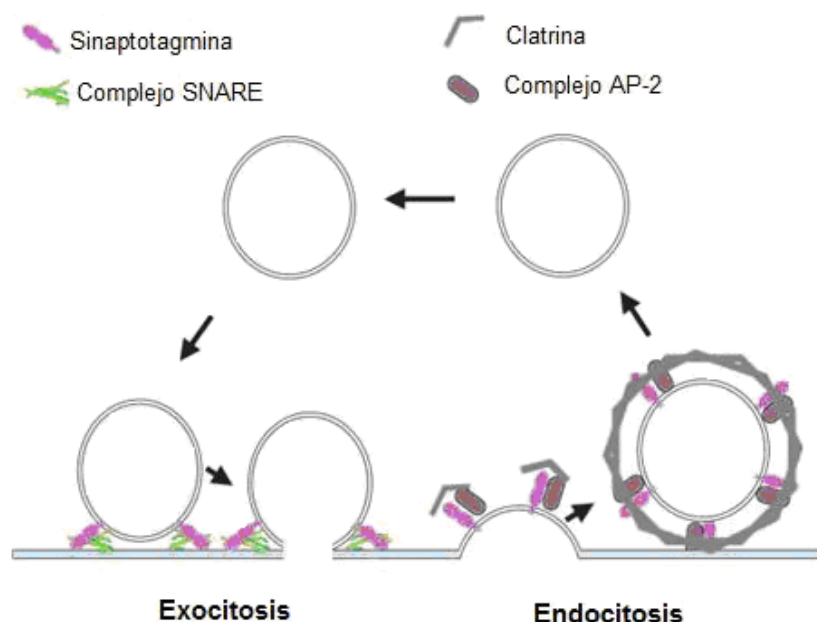
## 1.2.2 Sinaptotagmina 1

### 1.2.2.1 Localización

Sinaptotagmina 1 (SYT1) fue identificada por primera vez usando un anticuerpo monoclonal para la detección de proteínas sinápticas [97]. Es una proteína integral de membrana de 65 kDa, asociada a balsas lipídicas [98] a través de su dominio transmembrana palmitoilado [57] en vesículas sinápticas y gránulos secretores, actúa como sensor de calcio durante la exocitosis [99], además de estar involucrada en endocitosis, interactuando con el complejo proteico AP2, a través de su dominio C<sub>2</sub>B [92, 100] antes de la internalización de las membranas.

### 1.2.2.2 Funciones en cerebro

SYT1 es la proteína más ampliamente estudiada en las neuronas por la función que desempeña actuando como el sensor de calcio principal durante la exocitosis de las vesículas sinápticas, su importancia radica en que el calcio desencadena la fusión rápida de las vesículas [101-104].

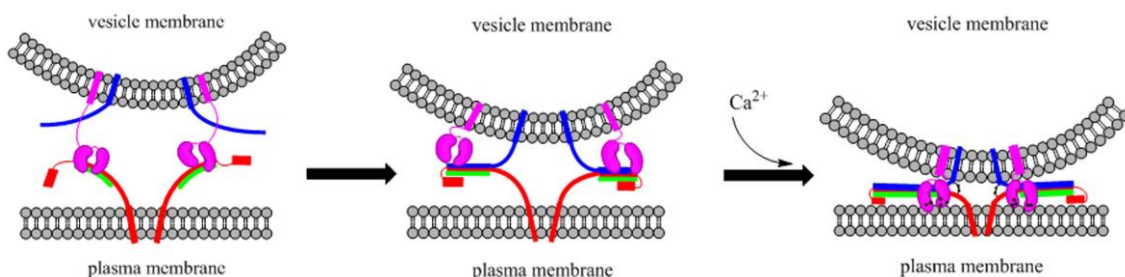


**Figura 6:** Durante la exocitosis, sinaptotagmina 1 interactúa con las proteínas del complejo SNARE: snap25, syntaxina y sinaptobrevina, mediando la fusión de la vesícula con la membrana presináptica. En la endocitosis, sinaptotagmina 1 se une al complejo AP-2 y recluta clatrina. Adaptada de [105].

### 1.2.2.2 a) Exocitosis

La despolarización de la membrana da lugar a la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  que se une a SYT1 a través de sus dominios C<sub>2</sub>A y C<sub>2</sub>B provocando la fusión de la vesícula con la membrana presináptica y la consecuente liberación rápida de neurotransmisores [106]. SYT1 requiere el anclaje a la membrana [107, 108] para estimular la fusión de vesículas y la dilatación del poro de fusión a niveles fisiológicos de  $\text{Ca}^{2+}$  [109]. En la Figura 7 se muestra el anclaje a través de la interacción de SYT1 con:

- Proteínas del complejo SNARE en las balsas lipídicas de membranas: SYT1 se une primero a las proteínas Syntaxina y Snap25 [110] promoviendo el acercamiento de las membranas y a continuación los dominios N-terminal de dichas proteínas se unen al de Sinaptobrevina/VAMP2 [111, 112].
- Fosfolípidos aniónicos en los microdominios de las membrana [113]; en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  las cabezas de los fosfolípidos complementan los sitios de unión de  $\text{Ca}^{2+}$ , incrementando la afinidad de los dominios C<sub>2</sub>AB por el  $\text{Ca}^{2+}$ . SYT1 también interactúa con fosfolípidos en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$ , preferiblemente con fosfatidilinositol 4,5-bifosfato a través de una región polibásica conservada rica en residuos de lisinas en el dominio C<sub>2</sub>B provocando un incremento de la atracción por iones  $\text{Ca}^{2+}$  [114].



**Figura 7:** Unión de SYT1 (rosa) a la membrana plasmática a través de proteínas SNARE: syntaxina-1A (rojo), SNAP-25 (verde) y VAMP2 (azul) y los fosfolípidos de la membrana. Adaptada de [110]

### 1.2.2.2 b) Endocitosis

El dominio C<sub>2</sub>B [108] de SYT1 actúa además como un receptor con gran afinidad por el complejo adaptador proteico AP-2 [92] promoviendo la endocitosis y reciclado de las proteínas de las vesículas sinápticas, de esta forma SYT1 participa a ambos lados de la membrana durante el ciclo de las vesículas sinápticas en la sinapsis

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

neuronal [105]. La maquinaria endocítica requiere una compleja unión de lípidos y proteínas implicados en el proceso [115], las fosas recubiertas de clatrina se forman bajo condiciones específicas que implican el anclaje del complejo AP-2 a la membrana a través del dominio C<sub>2</sub>B de SYT1 [116] el cual actúa como un sensor de los cambios intracelulares en neuronas y células neuroendocrinas y activa una señal de internalización [100].

Exocitosis y endocitosis son procesos que tienen lugar simultáneamente, sin embargo, la proporción con que tiene lugar cada proceso sigue siendo desconocida y pueden variar debido a cambios en los lípidos, a la disociación de las proteínas de unión o a cambios conformacionales en las proteínas [117].

### 1.2.2.2 c) Otras funciones

LRP1b es miembro de la familia de receptores de lipoproteínas de baja densidad en cerebro; Se ha visto que SYT1 podría actuar como potencial ligando uniéndose al dominio extracelular del receptor. Poco se sabe de la función de este receptor, pero se cree que podría estar implicado en procesos postsinápticos [118].

Las apolipoproteínas transportan colesterol y triglicéridos a los tejidos periféricos por lo que sus receptores son necesarios para la captación de los lípidos requeridos para la síntesis y el mantenimiento de las membranas en cerebro. Se ha encontrado que ciertas apolipoproteínas y el colesterol presentan una función sinaptogénica, puesto que regulan la síntesis de proteínas implicadas en la sinapsis como SYT1 en cultivos celulares tratados con ApoD, ApoE3 y colesterol respecto a células no tratadas así como de ciertos receptores de la familia de los rLDL [119, 120].

### 1.2.2.3 SYT1 en otros tejidos

En la última década se ha visto que SYT1 podría estar jugando un papel importante en tejidos no neuronales.

#### 1.2.2.3 a) Intestino

SYT1 se expresa en la membrana apical y en la región subapical de las células



epiteliales intestinales regulando el transportador  $\text{Na}^+\text{-H}^+$  (NHE3) en la membrana apical [121]. El papel en intestino de SYT1 fue además demostrado en células Caco2BBE [122] donde la estimulación del AMPc promueve la unión directa de SYT1 con el transportador NHE3 dirigiéndolo al complejo AP-2-clatrina, necesario para la endocitosis en las células epiteliales intestinales.

Además se ha visto que la expresión de *Syt1* intestinal podría estar modulada por la suplementación con ácido linoleico conjugado (CLA) el cual podría tener un papel relevante en la respuesta inmunitaria de las mucosas en edades tempranas [123].

### 1.2.2.3 b) Riñón

Los podocitos poseen estructuras similares a las neuronas. SYT1 participa en la regulación homeostática en células renales [124], donde la expresión de *Syt1* en los podocitos glomerulares parece estar asociada con el proceso regulador de la creatinina en plasma, el biomarcador más importante para evaluar el correcto funcionamiento del riñón [125].

### 1.2.2.3 c) Hígado

Usando modelos nutricionales y genéticos de esteatosis hepática en ratones, donde los niveles y la composición de lipoproteínas están alterados, junto con el análisis de microarray y su confirmación por técnicas de qPCR se ha encontrado que la expresión de *Syt1* está asociada a esteatosis [126].

## 1.3 Enfermedad del hígado graso no alcohólica

La enfermedad del hígado graso no alcohólica (EHGNA) se define como una acumulación excesiva de grasa en el citoplasma de los hepatocitos en forma de triglicéridos como consecuencia de un desequilibrio entre su síntesis y su secreción al torrente sanguíneo resultado de una mayor disponibilidad plasmática de ácidos grasos, de la lipogénesis de novo de ácidos grasos provenientes de la oxidación de carbohidratos, de la oxidación de ácidos grasos y la menor secreción de triglicéridos en lipoproteínas de baja densidad (VLDL) [127]. La EHGNA es una condición crónica e

incluye un espectro de patologías desde la esteatosis hepática simple (acumulación de grasa hepática superior al 5,5% medido por resonancia magnética [128] o superior al 5% de la masa total del hígado valorado por biopsia [129]) hasta la esteatosis con inflamación (esteatohepatitis o EHNA o NASH), la cirrosis y, finalmente, el carcinoma hepatocelular [130].

### **1.3.1 Prevalencia**

La prevalencia de la enfermedad de hígado graso no alcohólica oscila en un rango entre 9-36,9% de la población en diferentes partes del mundo [131, 132]. La EHGNA es la forma más común de las enfermedades hepáticas en la sociedad occidental, la prevalencia en la población occidental general se estima en un 20-30% llegando a ser del 90-95% en pacientes obesos [133]. En los Estados Unidos el 20% de la población sufre de esta patología y su prevalencia va en aumento [134], llegando a ser superior a un 25% en la población hispana [135]. La enfermedad es más común entre los hombres que entre las mujeres en todos los grupos de edad hasta los 60 años, debido a la naturaleza protectora de los estrógenos [136]. En niños, la prevalencia es menor que en adultos, 10-15% [137], no obstante se incrementa en presencia de obesidad hasta un 30-80% [138]. Alrededor del 15-30% de los casos más benignos progresa hacia una esteatohepatitis, en la que la infiltración grasa se acompaña de intensa actividad necro-inflamatoria y puede progresar a fibrosis y cirrosis hepática [112] y finalmente a insuficiencia hepática y hepatocarcinoma [139].

### **1.3.2 Etiología**

En función de las causas que provoquen el inicio de la lesión se diferencian dos grupos fisiopatológicos de EHGNA, primaria y secundaria.

#### **1.3.2.1 EHGNA primaria**

La causa exacta de EHGNA sigue sin aclararse aunque se desarrolla por varias razones [140], está generalmente asociada con la obesidad, la resistencia a la insulina y la hiperlipidemia, todos ellos componentes del síndrome metabólico [141]. La EHGNA primaria se caracteriza por la presencia de al menos 3 factores de los siguientes [142,

143]:

- Obesidad central con una circunferencia abdominal mayor de 102 cm en hombres y 88 cm en mujeres.
- Tasa de triglicéridos en sangre igual o mayor a 150 mg/dl.
- HDL-colesterol menor de 40 mg/dl en hombres y menor de 50 mg/dl en mujeres.
- Tensión arterial igual o mayor a 130/85 mmHg.
- Glucemia basal en ayunas igual o superior a 110 mg/dl.

La acumulación de grasa hepática es el resultado por una parte de un desequilibrio entre la síntesis, catabolismo y la secreción de los triglicéridos en las lipoproteínas [144] y por otro lado representa al inicio un mecanismo protector frente a la toxicidad resultante de un aumento del flujo de ácidos grasos no esterificados hacia el hígado [145]. La mayor parte de este exceso de lípidos hepáticos deriva de una mayor lipólisis periférica [146], que es causada por la resistencia a la insulina del tejido adiposo [147] y es una característica típica de la obesidad. Otros factores que contribuyen son una mayor lipogénesis inducida por hiperinsulinemia o directamente por la dieta. De hecho, el principal factor de riesgo para la EHGNA es la resistencia a la insulina debido a la obesidad central y al síndrome metabólico [141, 148]. El hígado graso se considera la manifestación hepática del síndrome metabólico [149-151].

#### **1.3.2.2 EHGNA secundaria.**

En este grupo se incluyen lesiones de EHGNA que cursan con causas diversas como anastomosis, derivación biliopancreática, lipodistrofia [152], así como aquellas EHGNA originadas por factores tales como tratamientos con antirretrovirales [153], hábitos nutricionales incorrectos, embarazo, ingesta de ciertos fármacos (aspirina, glucocorticoides, estrógenos sintéticos...), hepatoxinas ambientales, celiaquía [154].

### **1.4 Dieta**

Se denomina dieta al conjunto de alimentos que tomamos y a las cantidades de nutrientes respectivos que contienen dichos alimentos. La dieta debe cubrir las

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

necesidades diarias de todos los nutrientes del organismo. Una dieta equilibrada contiene según la FAO (Helsinki, 1988) las siguientes proporciones de los macronutrientes:

- 10-15% del aporte calórico total proveniente de proteínas.
- 50-55% del aporte calórico total de carbohidratos, de los cuales menos del 10% de la energía total de azúcares libres [155, 156]. Se recomienda aumentar el consumo de frutas, verduras, legumbres, nueces y granos enteros. Por lo menos 400 g (5 porciones) de frutas y verduras al día [155].
- Menos del 30% de la energía total proveniente de la grasa [155, 157, 158], proporción discutible según la fuente de grasa tras el estudio PREDIMED [159].
- Menos de 5 g de sal por día [160] y el uso de la sal yodada.

La nutrición está empezando a destacar como un factor determinante modificable de las enfermedades crónicas, con evidencias científicas que apoyan cada vez más la opinión de que las alteraciones en la dieta tienen fuertes efectos, tanto positivos como negativos, en la salud durante toda la vida. Una buena nutrición (una dieta suficiente y equilibrada combinada con el ejercicio físico regular) es un elemento fundamental de la buena salud. Una mala nutrición puede reducir la inmunidad, aumentar la vulnerabilidad a las enfermedades, alterar el desarrollo físico y mental, y reducir la productividad.

### 1.4.1 Lípidos de la dieta

En base a la prevención de enfermedades cardiovasculares la FAO recomienda [158] que:

- Las grasas monoinsaturadas constituyan un 15-20% del total de las calorías ingeridas a base de una reducción a un 5% de las poliinsaturadas. Las grasas no saturadas se encuentran en los aceites de pescado, aguacate, nueces, girasol y oliva.
- Las grasas saturadas (carnes grasas, mantequilla, palma y aceite de coco, crema, queso, manteca y manteca de cerdo) deben constituir menos de un 7-8% del total.
- El consumo de colesterol se reduzca hasta 300 mg/día. Un huevo contiene todo el colesterol necesario para el organismo.

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

- Grasas *trans* industriales (se encuentran en los alimentos procesados, comida rápida, bocadillos, comida frita, pizza congelada, pasteles, galletas, margarinas y pastas para untar) no son parte de una dieta saludable y deberían suponer menos del 1% de la dieta.

Una amplia gama de lípidos polares y apolares conforman las grasas de la dieta [161]. Los triacilglicéridos son los lípidos predominantes contribuyendo en un 90-95% de la energía total derivada de la grasa de la dieta. Los lípidos ingeridos también incluyen fosfolípidos, esteroides como el colesterol, vitaminas liposolubles...

### 1.4.1.1 Digestión y absorción de lípidos

La digestión de los lípidos comienza con la hidrólisis de triglicéridos en la cavidad oral a través de exposición a la lipasa lingual, en el estómago actúa también la lipasa gástrica, y es donde comienza la emulsión de las grasas [162]. La bilis y el jugo pancreático proporcionan sales biliares y las enzimas: lipasa pancreática, colesterol esterasa y colipasa, que funcionan en conjunto para garantizar la hidrólisis [163] de los triglicéridos y ésteres de colesterol a ácidos grasos libres, monoglicéridos y colesterol libre para su correcta absorción [164]. El colesterol libre es solubilizado en micelas mixtas en el lumen intestinal en presencia de concentraciones suficientes de ácidos biliares, fosfolípidos y sustancias anfipáticas como monoglicéridos y ácidos grasos. Las micelas mixtas facilitan el movimiento de lípidos a través de la capa de agua que separa la gruesa fase acuosa intraluminal de la membrana del borde en cepillo de los enterocitos [165, 166]. En el interior de estos se empaquetarán como quilomicrones.

### 1.4.1.2 Metabolismo de lipoproteínas

Lípidos como el colesterol y triglicéridos, son insolubles en el plasma por lo que son transportados junto a una fracción proteica denominada apolipoproteínas (Apo) en partículas conocidas como lipoproteínas [167]. Estos complejos macromoleculares de lípidos y proteínas se forman en el intestino y en el hígado y transportan los lípidos a diversos tejidos para:

- La obtención de energía
- Almacenaje de lípidos

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

- Producción de hormonas esteroideas
- Síntesis de membranas
- Formación de ácidos biliares

Las lipoproteínas se componen de un núcleo hidrofóbico compuesto por triglicéridos y ésteres de colesterol y una cubierta constituida por colesterol libre cuyo grupo hidroxilo queda orientado hacia el exterior e interacciona con las cabezas polares de los fosfolípidos [168] y apolipoproteínas, cuyas cadenas polipeptídicas con residuos hidrófobos interaccionan con los lípidos apolares del interior de las lipoproteínas, las proteínas son las responsables del reconocimiento de las partículas por parte de los receptores de los tejidos. Basándose en las características fisicoquímicas, las lipoproteínas han sido clasificadas en 5 grupos atendiendo a su densidad y composición:

• **Quilomicrones (Qm)**: son partículas de origen intestinal con una densidad inferior a 0,96 g/ml y de gran tamaño que transportan lípidos provenientes de la dieta hacia los tejidos y el hígado [169]. Están constituidos principalmente por triglicéridos, junto a cantidades menores de colesterol libre, fosfolípidos, colesterol esterificado y proteínas [170], [169, 171]. Durante su recorrido por el torrente linfático y sanguíneo (ruta exógena) los Qm interaccionan con las HDL produciéndose un intercambio de apolipoproteínas (APO): se enriquecen en APOC2, cofactor de la lipoproteína lipasa (LPL), y APOE. Tras ser modificado, el Qm va a contactar con la LPL anclada en el endotelio vascular, que produce la hidrólisis de los triglicéridos que componen su núcleo [172]. La hidrólisis progresiva conduce a la formación de unas partículas más pequeñas llamadas quilomicrones remanentes (Qmr). Los ácidos grasos que se liberan pasan al tejido muscular para su consumo o al adiposo para su almacenamiento. El Qmr se elimina en el hígado [173, 174].

• **Lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL)**: son partículas de origen fundamentalmente hepático, con una densidad comprendida entre 0,96 y 1,006 g/ml y de un tamaño inferior al de los Qm. El colesterol y los ácidos grasos que llegan al hígado, junto con los que éste sintetiza, se utilizan en la formación de las VLDL. Su función más importante es la de transporte de lípidos desde el hígado a

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

los tejidos periféricos (ruta endógena). En el plasma, estas partículas van a sufrir un proceso de maduración en el que van a adquirir apolipoproteínas de las HDL, como APOC1, C2, C3 y E, e interaccionan seguidamente con la LPL de forma similar a los Qm. La hidrólisis de sus triglicéridos y la transferencia de colesterol no esterificado y apolipoproteínas desde las VLDL a HDL, y de ésteres de colesterol desde las HDL a VLDL, da lugar a que las VLDL se transformen primero en lipoproteínas de densidad intermedia (IDL) [175] y posteriormente en LDL [176, 177] posiblemente a través de la lipasa hepática [178]. Las VLDL también pueden ser degradadas directamente por el hígado [179].

- **Lipoproteínas de densidad intermedia (IDL):** provienen de las VLDL. Tienen menor contenido en triglicéridos. La LPL transforma las VLDL maduras en VLDL remanentes (IDL), que son degradadas por la lipasa hepática para generar LDL [180].

- **Lipoproteínas de baja densidad (LDL):** provienen principalmente del metabolismo de las partículas IDL y tienen una densidad comprendida entre 1,019 y 1,063 g/ml y un diámetro de 20-25 nm [180]. Las LDL consisten en un núcleo hidrófobo que contiene triglicéridos y ésteres de colesterol y una cubierta hidrófila formada por fosfolípidos, colesterol libre y proteínas, predominantemente la apolipoproteína B-100, que actúa de ligando con receptores de la membrana celular [180]. Su función principal es la de hacer llegar el colesterol a los tejidos periféricos, mediante un proceso de endocitosis mediada por los receptores de LDL [181].

- **Lipoproteínas de alta densidad (HDL):** tienen una densidad entre 1,063 y 1,21 g/ml. Son un grupo heterogéneo de partículas discoidales (partículas nacientes, pequeñas y pobres en lípidos) y esféricas (partículas maduras de mayor tamaño) que difieren en sus propiedades fisicoquímicas, su metabolismo intravascular y su actividad biológica. Las HDL discoidales contienen fosfolípidos, APOA1, APOA2 y APOE. Se forman en el hígado y el intestino e interactúan con los quilomicrones remanentes y la lecitina: colesterol aciltransferasa (LCAT) para formar las HDL<sub>3</sub>. Estas a su vez interaccionan con las membranas plasmáticas celulares para extraer el colesterol libre, el cual se esterifica mediante la LCAT.

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Con esta reacción, las HDL<sub>3</sub> se convierten en HDL<sub>2a</sub>. Las HDL<sub>2a</sub> ricas en ésteres de colesterol se convierten en HDL<sub>2b</sub> ricas en triglicéridos por transferencia de ésteres de colesterol desde las HDL a las VLDL, y de los triglicéridos de las VLDL a HDL [182]. Las partículas HDL tienen múltiples actividades antiaterogénicas ya que son las encargadas del transporte reverso de colesterol [183, 184], llevan el colesterol desde los macrófagos periféricos hasta el hígado desde donde se excretará en forma de ácidos biliares y colesterol. Además las HDL presentan otras acciones ateroprotectoras tales como antioxidativas [167, 185], antiinflamatorias [186-188], antiapoptóticas, antiinfecciosas y vasodilatadoras [183].

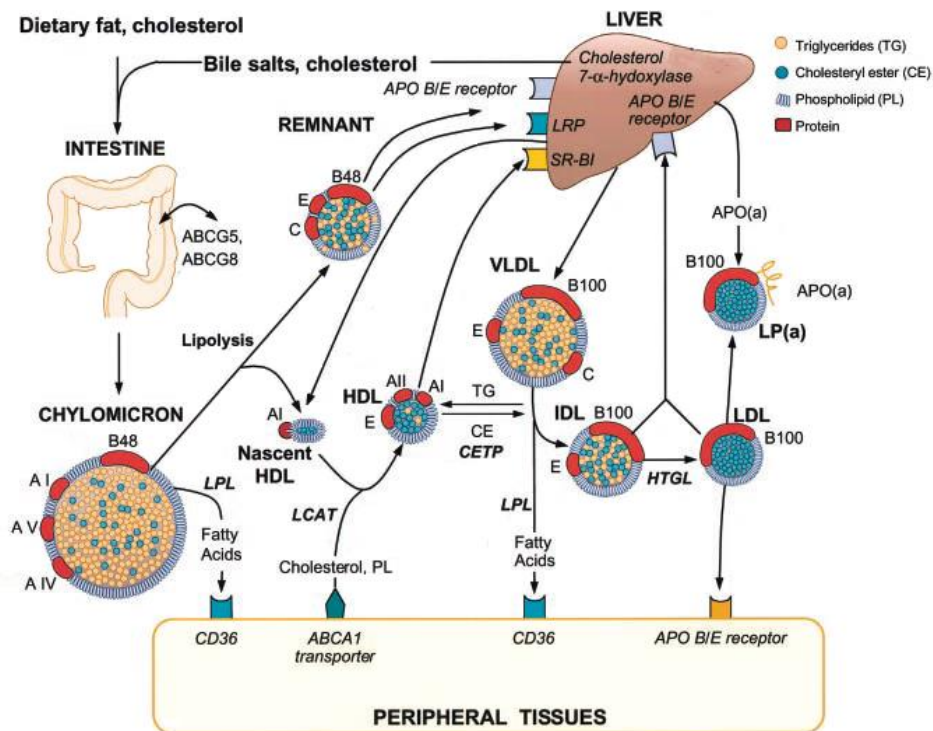


Figura 8: Metabolismo de las lipoproteínas. Adaptada de [189]

### 1.4.2 Dieta occidental

La colisión de nuestro genoma antiguo con las nuevas condiciones de vida, entre ellas las cualidades nutricionales de los alimentos introducidos recientemente, puede ser la base de muchas de las enfermedades crónicas de la civilización occidental [190]. Los nuevos alimentos introducidos como alimentos básicos durante el neolítico (lácteos y cereales) y la revolución industrial (cereales refinados, azúcares refinados, aceites vegetales refinados, carnes grasas, sal, y combinaciones de estos alimentos) alteraron



## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

varias características nutricionales clave de las dietas de homínidos ancestrales con efectos de largo alcance sobre la salud y el bienestar. Estos alimentos desplazaron gradualmente los alimentos vegetales y animales mínimamente procesados en la dieta de los cazadores-recolectores, que han ido afectando negativamente a los siguientes indicadores dietéticos:

- **Carga glucémica:** considera la velocidad de elevación de la glucemia producto de la ingesta de un alimento teniendo en cuenta el contenido de hidratos de carbono del alimento [191]. En los últimos veinte años se ha demostrado que el consumo a largo plazo de los carbohidratos de alta carga glucémica puede afectar negativamente al metabolismo y la salud [191-193]. La hiperglucemia e hiperinsulinemia crónica inducida por carbohidratos de alta carga glucémica puede provocar una serie de cambios hormonales y fisiológicos que promueven la resistencia a la insulina. Azúcares y cereales refinados con alta carga glucémica representan un elemento dominante de la dieta urbana moderna, hasta un 39% de la energía total consumida que hace 200 años raramente se consumían y promueve las cuatro causas de la resistencia a insulina: el aumento en plasma de partículas VLDL [194], ácidos grasos libres [195], glucosa [142] e insulina [196].

- **Composición de ácidos grasos:** los ácidos grasos se dividen en 1 de las 3 grandes categorías: ácidos grasos saturados (SFA), ácidos grasos monoinsaturados (MUFAs), y ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs). Las dietas occidentales con frecuencia contienen excesivos ácidos grasos saturados y *trans* y menos n-3 PUFAs que n-6 PUFAs [197], esto conlleva un aumento de las concentraciones en plasma del colesterol LDL [197, 198] y a un aumento del riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares. En la actual dieta occidental americana las 6 principales fuentes de SFA son las carnes grasas, productos de panadería, queso, leche, margarina y mantequilla [199], además el ratio de n-6 respecto a n-3 PUFAs ha aumentado en una proporción 10:1 [200]. El proceso de hidrogenación en 1987 [201] introdujo un nuevo ácido graso *trans* en la dieta humana, que eleva las concentraciones de colesterol en sangre y conduce a un mayor riesgo de enfermedad cardiovascular. Los ácidos grasos *trans* en la dieta estadounidense constituyen el 7,4% de la ingesta total de ácidos grasos [202]. Para prevenir el riesgo de enfermedades crónicas, la cantidad absoluta de grasa en la dieta es menos importante que la calidad de la grasa [197, 203] de la dieta.

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

- **Composición de macronutrientes:** una dieta típica occidental americana contiene un 51,8 % de carbohidratos, un 32,8% de grasas y un 15,4% de proteína [204] valores poco recomendados por la FAO (Helsinki, 1988) para una dieta equilibrada.

- **Densidad de micronutrientes:** El desplazamiento de los alimentos más ricos en nutrientes (frutas, verduras, carnes magras, pescados y mariscos) por alimentos menos densos (azúcares refinados, cereales, aceites vegetales y productos lácteos) con la consiguiente disminución de vitaminas y minerales en la dieta tiene consecuencias de largo alcance, no sólo el desarrollo de enfermedades por carencia de dichos nutrientes, sino también desarrollo de enfermedades infecciosas y crónicas [205].

- **Equilibrio ácido-base:** los adultos sanos que consumen una dieta occidental presentan una acidosis metabólica crónica que empeora con la edad a medida que disminuye la función renal [206]. Una dieta alcalina proporciona beneficios para la salud conocidos como prevención de la osteoporosis [207], de pérdida de masa muscular relacionada con la edad [208], de cálculos renales de calcio [209], de la hipertensión [210], y el asma inducida por el ejercicio [211], además de retrasar la progresión de la insuficiencia renal crónica relacionada con la edad y con la enfermedad [212].

- **Proporción de sodio-potasio:** El consumo de potasio en las dietas occidentales es sustancialmente menor al de sodio, esto se debe a que:

- El 90% del sodio ingerido en una dieta occidental viene de sal manufacturada, el sodio ingerido de productos naturales es muy bajo.
- Azúcares refinados y aceites vegetales suponen un 36% de la energía ingerida total, la inclusión de estos alimentos han desplazado alimentos naturales ricos en potasio de la dieta.
- Desplazamiento de las verduras y frutas por granos integrales y productos lácteos reduce aún más el consumo de potasio. Las concentraciones de potasio en las verduras son 4 y 12 veces superiores a las de la leche y los granos enteros, respectivamente, mientras que en la fruta la concentración de potasio es de 2 y 5 veces que en la leche y los granos enteros.

La inversión de las concentraciones de sodio y potasio en la dieta [213] (dietas bajas en potasio y con alto contenido de sodio) puede subyacer o exacerbar una variedad de dolencias y enfermedades crónicas, como la hipertensión, los accidentes cerebrovasculares, los cálculos renales, osteoporosis, cáncer del tracto gastrointestinal, el asma, el asma inducida por el ejercicio, insomnio y mareo [214-216].

• **Contenido de fibra:** El contenido de fibra (~15,1 g / d) en las dietas occidentales es considerablemente menor que los valores recomendados (25-30 g) [217]. Los granos refinados, empobrecidos en fibra contienen 400% menos fibra que los granos enteros. Con respecto a la misma cantidad de energía la fruta fresca contiene dos veces la cantidad de fibra que los cereales integrales y las verduras sin almidón contienen casi 8 veces más la cantidad de fibra que los cereales integrales. Las fibras solubles que se encuentran principalmente en frutas y verduras reducen ligeramente las concentraciones de colesterol total y LDL más allá de los logrados por una dieta baja en grasas saturadas y fibra, ralentizando el vaciado gástrico, reducen el apetito y ayudan a controlar la ingesta de calorías [218]. Las dietas ricas en fibra dietética previenen el estreñimiento, la apendicitis, las hemorroides, la trombosis venosa profunda, venas varicosas, hernia de hiato y reflujo gastroesofágico [219].

La dieta es uno de los reguladores metabólicos a largo plazo más determinante y modificable en cuanto a su composición que influye en el metabolismo [220]. Los patrones alimentarios de la sociedad occidental están causando la aparición y un aumento de la prevalencia de enfermedades como la EHGNA. Diversos estudios han planteado la relación entre el incremento en la incidencia de eventos cardiovasculares en pacientes con EHGNA comparado con la incidencia en la población general [221-223], por lo que el grado de esteatosis podría ser considerado como un nuevo factor de riesgo cardiovascular [224-228], y un fuerte predictor de la aterosclerosis [229, 230]. Sin embargo, hay poca información de la expresión génica hepática o transcriptómica, que clarifique los eventos moleculares asociados con la implicación del hígado en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares [231]. Parece ser que las diferencias cuantitativas en la abundancia de transcritos específicos son en parte responsables de las diferencias fenotípicas entre los individuos [232].

#### **1.4.2.1 Dietas altas en grasas**

Está ampliamente estudiada la relación entre la administración a largo plazo de las dietas altas en grasas (HFD) y el desarrollo de enfermedad hepática no alcohólica (EHGNA) o la resistencia a la insulina [233], así como la asociación entre ambas enfermedades [234]. Las dietas altas en grasas estimulan mecanismos inflamatorios [235, 236]. Su administración ha sido utilizada en animales para generar dichas

situaciones metabólicas y estudiar los mecanismos moleculares que generan dichas patologías, aunque la respuesta a la dieta con frecuencia difiere entre las distintas cepas de ratones [237] e incluso dentro de una misma cepa genéticamente homogénea se pueden presentar distintos fenotipos en respuesta a un mismo tratamiento [238], esto se debe a la flexibilidad del genoma para hacer frente a diferentes circunstancias. Además de la calidad de la grasa [203], la fuente y la cantidad de grasa pueden desempeñar un papel importante en los resultados [239]. La alimentación con dietas enriquecidas en grasa es también el modelo experimental para estudiar la influencia de otros compuestos mediante su inclusión en dichas dietas y revertir los cambios fenotípicos que las dietas altas en grasas causan [240] [241].

#### **1.4.2.2 Efecto del colesterol en la dieta**

El colesterol es una sustancia grasa que se encuentra en todo el organismo, necesaria en pequeñas cantidades para el buen funcionamiento del cuerpo. El colesterol desempeña un papel fundamental como elemento clave en el mantenimiento de la estructura y la función de las membranas de las células [242]. El colesterol es precursor de sales biliares [243], hormonas de la corteza suprarrenal [244], las hormonas sexuales (testosterona y estrógenos) [245], las hormonas de la placenta, la vitamina D y otras sustancias implicadas en diversas e importantes funciones del organismo.

El colesterol en el cuerpo es el resultado de la síntesis endógena (producida en el hígado y tejidos periféricos) en un 75% y su absorción en el intestino proveniente de fuentes dietéticas en un 25% [246], por lo que el cuerpo es capaz de sintetizar el colesterol que necesita sin necesidad de adquirirlo en la dieta. El consumo de colesterol medio de un adulto en la dieta es de unos 400 mg al día, y el hígado segrega 1 g al día [164, 247], además aproximadamente el 50% del colesterol en el intestino se absorbe, el resto se excreta en las heces [248]. Los niveles de colesterol total pueden verse aumentados por los trastornos del hígado y por su ingesta excesiva con los alimentos, siempre de origen animal; o a causa de otros factores externos como el tabaco, la obesidad, la diabetes, la vida sedentaria, o algunos medicamentos.

Puesto que una parte del colesterol en el organismo proviene de alimentos ricos en colesterol, un exceso de colesterol en la dieta o la ingesta de grasas saturadas que estimulan su síntesis endógena, provocan la acumulación de lípidos en el hígado provocando esteatosis [249, 250]. La inclusión de colesterol en la dieta en animales de

experimentación es una estrategia para inducir la enfermedad del hígado graso no alcohólico y abordar los mecanismos biomoleculares que provocan el desarrollo de la enfermedad [251-253]. Además, los cambios inducidos por el colesterol se han utilizado para probar la influencia de otras sustancias que reviertan dichos efectos adversos [254].

### **1.4.3 Dieta mediterránea**

Estudios llevados a cabo durante los últimos treinta años pusieron de manifiesto que los países de la cuenca mediterránea tenían un menor porcentaje de infartos de miocardio y una menor tasa de mortalidad por cáncer. Se llegó a la conclusión que la dieta tenía un papel fundamental como un factor a tener en cuenta en la prevención de estas enfermedades. A finales del año 2010, la UNESCO declaró la dieta mediterránea como patrimonio inmaterial de la humanidad [255].

Los pilares fundamentales de la dieta mediterránea son los siguientes [256]:

- Abundancia de alimentos vegetales: pan, pasta, arroz, verduras, legumbres, frutas y frutos secos.
- Aceite de oliva como fuente principal de grasa.
- Consumo moderado de pescado, carnes rojas, productos lácteos y huevos.
- Especies como ajo, orégano, pimienta y buen vino consumido con moderación.

En el año 2013 se publicó el estudio PREDIMED (Prevención con Dieta Mediterránea, realizado en España). Se seleccionaron individuos con alto riesgo de enfermedad cardiovascular y se dividieron en tres grupos. Durante cinco años a un grupo se le dio una dieta baja en grasa, a otro se le suplementó la alimentación con aceite de oliva virgen extra y al tercer grupo con frutos secos. Los grupos a los que se les había suplementado la alimentación con aceite de oliva virgen extra o frutos secos tuvieron menor incidencia de enfermedades cardiovasculares. Se llegó a la conclusión de que no sólo es importante identificar los alimentos ricos en grasa saturada, sino aumentar el consumo de grasas de calidad como la procedente del aceite de oliva virgen extra o frutos secos [159].

#### **1.4.3.1 Aceite de oliva**

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

El aceite de oliva constituye la principal fuente de lípidos de la dieta mediterránea y es una importante fuente de grasa monoinsaturada debido al alto contenido de ácido oleico, 80% frente al 14% de ácidos grasos saturados [257]. Los ácidos grasos monoinsaturados hacen aumentar la proporción entre el colesterol HDL y el LDL [258]. Por ello, y en base a los efectos beneficiosos del aceite de oliva sobre factores de riesgo cardiovascular, en noviembre de 2004, la “Food and Drug Administration” estadounidense autorizó el uso de “health claims” o alegaciones nutricionales en las etiquetas de los aceites de oliva indicando “los beneficios sobre el riesgo de cardiopatía coronaria de tomar dos cucharadas (23 g) de aceite de oliva a diario, debido a que es una fuente de grasa monoinsaturada” [259].

### 1.4.3.1 a) Categorías del aceite de oliva

Los diferentes tipos de aceite de oliva se clasifican en función de su variedad, calidad, grado de acidez, métodos de extracción y características sensoriales: sabor, olor, color. Dentro de los aceites de oliva se pueden distinguir varias categorías [260, 261], pero sólo existen cuatro categorías comerciales de aceite de oliva reconocidas en la legislación de la Unión Europea (Reglamento CE 1019/2002):

- Aceite de Oliva Virgen Extra: sinónimo de máxima calidad, es aquel que conserva intactas todas sus características sensoriales y propiedades para la salud. Se puede considerar zumo de aceitunas sin aditivos ni conservantes, ha de tener una acidez menor de 0,8% y presentar unas características sensoriales agradables e identificables.
- Aceite de Oliva Virgen: presenta una acidez libre aunque debe ser menor al 2%, se sigue considerando un zumo de aceituna sin aditivos ni conservantes.
- Aceite de Oliva: es un aceite de menor calidad al ser resultado de mezcla de aceites refinados y aceites vírgenes. Parte de esta mezcla se obtiene de refinar aceite de oliva virgen con acidez mayor del 2% por lo que el aceite de oliva no es zumo de aceituna. Aun así es apto para el consumo y debe tener un grado de acidez no superior al 1%.
- Aceite de Orujo de Oliva: es el aceite de consumo apto de menor calidad. Este aceite no puede ser considerado *de Oliva* ya que es resultado de la mezcla de

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

aceite de orujo refinado con aceite de oliva virgen. Debe tener un grado de acidez no superior al 1%.

### 1.4.3.1 b) Composición química del aceite de oliva

En dos grandes grupos pueden dividirse los constituyentes del aceite de oliva: uno mayoritario, la fracción saponificable, y otro en menor proporción, los componentes minoritarios o fracción insaponificable [262-264].

#### Fracción saponificable

Representa entre el 98,5 y 99,5% de los constituyentes del aceite, la mayor parte de los cuales son triglicéridos y en menor medida, ácidos grasos libres junto con otros componentes minoritarios como monoglicéridos o diglicéridos, fosfolípidos, ceras y ésteres de esteroides [263-265]. En la Tabla 3 se muestran los distintos ácidos grasos que contiene el aceite de oliva. Esta composición de ácidos grasos así como la de otros componentes puede variar de una muestra a otra, dependiendo de la variedad, zona de producción, el clima y el grado de madurez de las aceitunas [265, 266].

**Tabla 3: Porcentaje de los diferentes ácidos grasos presentes en el aceite de oliva. Adaptada de [1], [261].**

Nombre común (Símbolo)	Porcentaje
Mirístico (14:0)	0,0 - 0,05
Palmítico (16:0)	7,5 - 20,0
Palmitoleico (16:1n7)	0,3 - 3,5
Margárico (17:0)	0,0 - 0,3
Heptadecenoico (17:1)	0,0 - 0,3
Esteárico (18:0)	0,5 - 5,0
Oleico (18:1n9)	55,0 - 83,0
Linoleico (18:2n6)	3,5 - 21,0
$\alpha$ -Linolénico (18:3n3)	0,0 - 0,9
Araquídico (20:0)	0,0 - 0,6
Eicosenoico (20:1n9)	0,0 - 0,4
Behénico (22:0)	0,0 - 0,2
Lignocérico (24:0)	0,0 - 0,2

### Fracción insaponificable

Son los componentes minoritarios del aceite de oliva y se pueden obtener tras la saponificación del aceite [267]. Se encuentran la mayoría de estas sustancias en

**Tabla 4: Componentes minoritarios del aceite de oliva virgen extra. Fuente: [1]**

Componentes minoritarios	Concentración (mg/kg)
Hidrocarburos	1500-8000
Escualeno	1250-8000
Luteína	3-15
Carotenos	0,5-5
Compuestos terpénicos	1000-3000
Esteroles	800-2600
Compuestos fenólicos	20-900
Alcoholes alifáticos	100-200
Tocoferoles	50-300
Clorofilas A y B	0,2-5
Feofitinas A y B	0,2-20

los aceites de oliva vírgenes o, en concentraciones menores, en los aceites mezcla de refinados y vírgenes puesto que se pierden en el proceso de refinado. Sólo representa el 2% del peso del aceite [268]. Aportan muchas de sus características principales, tales como su color, su aroma y su sabor; aparte de otras propiedades beneficiosas para la salud como capacidad antioxidante y antiinflamatoria

[269].

#### 1.4.3.2 Propiedades del aceite de oliva

A pesar de la compleja composición de nutrientes de la dieta mediterránea, el aceite de oliva virgen extra (AOVE) ha emergido como su principal componente beneficioso. Estudios recientes han demostrado que el AOVE podría tener efectos antiinflamatorios, antiproliferativos y antiapoptóticos [262, 269, 270]. Su consumo contribuye a mantener una población sana y relativamente libre de enfermedades [271], debido a su alta calidad nutricional (especialmente el virgen extra) [272], asociándose con la reducción de lípidos sanguíneos y la protección del sistema cardiovascular [273-278], con la disminución del estrés metabólico en una manera dependiente de la dosis [279, 280]. Los beneficios de su consumo se han atribuido a su alto contenido en ácidos grasos monoinsaturados como el oleico y a compuestos minoritarios de la fracción insaponificable como tocoferoles, carotenoides, fenoles, escualeno y compuestos triterpénicos [262].



#### 1.4.3.2 a) Escualeno

El escualeno es un hidrocarburo poliinsaturado acíclico cuyo nombre se debe a su aparición en grandes cantidades en el aceite de hígado de tiburón (*Squalus spp.*), sin embargo es sintetizado por plantas y animales. Ampliamente extendido en la naturaleza, se encuentra en cantidades razonables en el aceite de oliva, aceite de palma, aceite de germen de trigo, aceite de amaranto y el aceite de salvado de arroz. Es un precursor metabólico del colesterol, de otros esteroides [281] y de más de 200 triterpenos diferentes [282]. El escualeno es una molécula esencial y es sintetizado por el organismo desde el comienzo de nuestra vida, siendo su concentración elevada en los recién nacidos jugando un papel importante en el desarrollo del sistema inmunológico [283]. A partir de los 25 años, aproximadamente, comienza a disminuir la proporción de escualeno en nuestro cuerpo, por ello, es necesario un aporte extra de esta sustancia que permita paliar esa pérdida y garantice la protección de nuestro organismo. El aporte medio de una dieta de tipo occidental es de unos 30 mg por cada 2.000 calorías, en los países mediterráneos esta cantidad se sitúa en torno a los 200-400 mg/día [284], pudiendo llegar hasta 1 g/día [285] en las poblaciones que consumen dietas ricas en aceite de oliva o hígado de tiburón [286]. Se ha estimado la ingesta mínima apropiada de escualeno en 400 mg/día para asegurarnos los beneficios terapéuticos que esta sustancia aporta [287].

#### Propiedades del escualeno

- Compuesto bioactivo con propiedades antioxidantes y antitumorales [67] que podrían contribuir al efecto beneficioso que supone la ingesta de aceite de oliva en la dieta mediterránea sobre la salud.
- Eliminador de radicales libres de oxígeno en retina y piel [288, 289].
- Agente quimioprotector [290] contra el cáncer inducido químicamente [284, 291].
- Papel anti-tumoral en diversos modelos animales [291-293].
- En los tejidos, el escualeno parece ser un secuestrador del radical oxígeno singlete y precursor indispensable en la síntesis de dolicol y ubiquinona (coenzima Q<sub>10</sub>) [294].
- Efecto antioxidante capaz de proteger la retina del daño inducido por etanol en pollos [295].
- Aunque la administración oral de escualeno parece disminuir los niveles en suero e hígado de esteroides vegetales [296], su impacto sobre el metabolismo del colesterol en

los seres humanos no está claro.

- Disminución de la lesión aterosclerótica en ratones macho carentes de *ApoE* [297] y reversión de la esteatosis hepática no alcohólica. Este trabajo evidenció claramente que el escualeno era transportado al hígado independientemente de la apolipoproteína E aunque su mecanismo de acción podría ser complejo.

#### 1.4.3.2 b) Ácido oleanólico

El ácido oleanólico (AO) es un triterpeno ampliamente distribuido en el reino vegetal y presente en una concentración de 420 mg/kg en la piel de la aceituna [298, 299]. Su cantidad en el aceite de oliva depende de la calidad del aceite y la variedad del fruto, estando en una concentración de unos 57,2 mg/kg en el aceite de oliva virgen extra [300] y en concentraciones más altas en el aceite de orujo de oliva [301]. Debido a su estabilidad térmica, se ha propuesto como un contribuyente importante en la acción biológica del aceite de oliva virgen [302].

#### Propiedades del ácido oleanólico

- Se ha demostrado *in vivo* que la suplementación con dosis bajas del ácido oleanólico presenta propiedades hepatoprotectoras, mientras que dosis más altas o el uso a largo plazo producen daño hepático [303-306].
- Propiedades antiinflamatorias al inhibir la producción de citoquinas pro inflamatorias por células mononucleares periféricas de la sangre [307] e induciendo la liberación de prostaglandina I<sub>2</sub>. La inhibición de reacciones inflamatorias por administración oral de oleanólico es menos eficaz que su inyección intraperitoneal o subcutánea, ya que la biodisponibilidad oral absoluta es menor, por su baja absorción y una elevada excreción [308].
- Propiedades antioxidantes, protegiendo contra la peroxidación lipídica [309, 310], suprimiendo la generación de aniones superóxido [311], y reduciendo la muerte por apoptosis de células de músculo liso vascular inducida por peróxido de hidrógeno [312].
- Presenta un potencial terapéutico interesante como medicamento cardiovascular, ya que actúa como agente vaso relajante en la aorta de rata [313], como antitumoral [314, 315], anti-VIH [316, 317] y anti-hiperlipidémico [318, 319].
- Tratamiento eficaz frente a la diabetes [320].

## 1.5 Nutrigenómica y nutrigenética

La revolución genómica se basa en las diversas y nuevas tecnologías [321] que tienen aplicaciones en las ciencias nutricionales [322]. Unidas, la genómica, la transcriptómica, la proteómica y la metabolómica constituyen lo que conocemos como “genómica funcional” o “biología de sistemas” [323]. La genómica nutricional estudia las interacciones funcionales de los alimentos y sus componentes con el genoma a nivel molecular, celular y sistémico, con el objetivo de prevenir o tratar enfermedades a través de la dieta.

La ingesta alimenticia es el factor ambiental al que todos estamos permanentemente expuestos. Los hábitos dietéticos son un factor ambiental clave para la modulación de la expresión génica a través de los diferentes estadios vitales. Hace ya varias décadas que fue propuesta por primera vez la existencia de un componente genético responsable de las diferencias en la respuesta dietética [324], pero sólo recientemente se han empezado a examinar las interacciones gen-nutriente a escala molecular. La nutrición puede ejercer su impacto en la salud afectando directamente a la expresión de genes en rutas metabólicas críticas y/o indirectamente al afectar a la incidencia de mutaciones génicas o a nivel cromosomal, causando alteraciones en la regulación y la expresión génica [325]. Los efectos de los nutrientes y nutriomas (combinaciones de nutrientes) sobre la salud dependen de las variantes genéticas heredadas que alteran la absorción y metabolismo de los nutrientes. Por ello es importante tener en cuenta la diferencia entre los términos nutrigenómica y nutrigenética.

La **nutrigenética** pretende esclarecer cómo la composición genética de un individuo determina su respuesta a la dieta [326], considerando la identificación y caracterización de las variantes génicas responsables de las respuestas diferenciales a los nutrientes [325], y relacionando esta variación con los estados de enfermedad [327], por lo que el objetivo de la nutrigenética es generar recomendaciones específicas para la persona relacionadas con los riesgos y beneficios de las dietas o componentes dietéticos.

La **nutrigenómica** en cambio, se centra en el uso de herramientas de biología molecular y celular, bioquímica y genética [328] para estudiar los efectos de la dieta sobre:

- La estabilidad del genoma (daños en el DNA a nivel molecular y cromosómico).

- Las alteraciones en el epigenoma (metilación del DNA).
- La expresión de RNA y micro-RNAs (transcriptómica).
- La expresión de proteínas (proteómica).
- Cambios en los metabolitos (metabolómica).

Y así comprender cómo las moléculas nutricionales afectan a las rutas metabólicas y al control homeostático [329].

Sin embargo, sólo el daño en el DNA es un biomarcador claro de patología, ya que los cambios en el epigenoma, transcriptoma, proteoma y metaboloma pueden reflejar simplemente una respuesta homeostática adaptativa a los cambios en los patrones dietéticos o factores de estilo de vida asociados (como por ejemplo el ejercicio) [330], y no son suficientes en sí mismos para indicar una patología irreversible concreta a nivel del genoma [325].

### **1.5.1 Interacción gen-dieta**

Las interacciones gen-dieta reflejan el hecho de que las variaciones genéticas pueden predisponer a los individuos al desarrollo de una enfermedad mientras que la dieta puede disminuir o exacerbar este riesgo [331]. Los nutrientes de la dieta regulan la expresión de genes en distintas etapas, incluyendo la transcripción, procesamiento, estabilidad del mRNA, y la traducción y las modificaciones postraduccionales. Las tres primeras etapas afectan directamente a la cantidad de mRNA de los genes correspondientes, y en concreto la regulación a nivel transcripcional es la más ampliamente estudiada de las tres [328].

### **1.6 Sobreexpresión de genes**

El planteamiento en la genética clásica para explorar las rutas biológicas comenzó mediante la identificación de mutaciones que causaban un fenotipo de interés. La sobreexpresión o expresión errónea de un producto génico, sin embargo, también pueden causar fenotipos mutantes, proporcionando a los genetistas una herramienta alternativa poderosa para identificar componentes de las rutas indetectables mediante el análisis tradicional de pérdida de función [332].

Los primeros indicios sobre la importancia de un adecuado nivel de expresión de un gen para el desarrollo normal de la función que desempeña, surgieron de un análisis

de cariotipo donde se mostró que las aneuploidías eran las responsables de síndromes genéticos humanos [333] y de fenotipos mutantes en *Drosophila* y plantas [334].

### 1.6.1 Aplicaciones de la sobreexpresión

Las primeras aplicaciones de la sobreexpresión de un gen para detectar interacciones y nuevas rutas biológicas se basan en su simplicidad, en la sobreexpresión de un gen normal en un fondo genético normal, enfoque que sigue siendo productivo en la actualidad. Nuevas estrategias surgieron con éxito aplicando técnicas de sobreexpresión como:

- Supresores. Una estrategia clásica para identificar interacciones génicas, donde la supresión de un gen mutado se debe a la sobreexpresión de otro gen que actúa como supresor del efecto de la mutación [335].
- Potenciadores. Al contrario que los supresores, los potenciadores son genes que se sobreexpresan para potenciar el fenotipo de un gen mutado [336].
- Sobreexpresión de genes mutantes. La creación de mutaciones puntuales o derivados de delección que inactivan la función de una proteína todavía conservan la capacidad para interactuar con otras macromoléculas provocando fenotipos mutantes; la sobreexpresión de dicho gen para recuperar la función perdida puede provocar la competencia de ambas isoformas generando a su vez otro fenotipo mutante [337]. Para estudiar estos nuevos fenotipos mutantes y la competencia de isoformas se sobreexpresaron genes mutantes en organismos que expresaban a su vez el gen normal. Estas técnicas fueron más adelante reemplazadas por el uso de RNA de interferencia que suprime la expresión del gen de interés.
- Sobreexpresión en hospedadores heterólogos. Consiste en la sobreexpresión de una proteína de interés en una especie distinta a la que dicha proteína pertenece y así facilitar su purificación [338]. La sobreexpresión puede proporcionar información valiosa cuando se aplica a través de especies, ya sea proporcionando información complementaria a su función o causando efectos nocivos que pueden ser utilizados posteriormente.
- Sobreexpresión combinada. Consiste en la sobreexpresión de múltiples genes para obtener información sobre un determinado fenotipo [339].
- Uso de la sobreexpresión para conseguir un fenotipo como punto de partida para encontrar modificadores genéticos [340].

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

- Aplicación a tests de epistasis. Las mutaciones que causan fenotipos opuestos pueden ser utilizadas en las pruebas de epistasis para inferir el orden de la acción de los productos de los genes dentro de una vía. Pruebas de epistasis también se pueden realizar cuando uno de los fenotipos es causado por la sobreexpresión [341].

### 1.6.2 Mecanismos resultantes de la sobreexpresión de un gen

La sobreexpresión de un gen puede causar la inhibición o activación de otra proteína, de un complejo o de una ruta metabólica por diferentes mecanismos moleculares [332].

#### 1.6.2.1 Mecanismos de inhibición

- La sobreexpresión de un gen puede inhibir a otra proteína provocando simplemente una reducción de su síntesis a diferentes niveles incluyendo la transcripción o la traducción, incluso incrementando su velocidad de degradación [342].
- La sobreexpresión de un gen produce la inhibición a un nivel funcional, que implica con frecuencia la competencia con otras macromoléculas. La sobreexpresión de una subunidad que contacta a su vez con otras para formar un complejo multiproteico provoca la formación de subcomplejos no funcionales por competencia interrumpiendo la formación del complejo funcional [343].
- La sobreexpresión de una proteína que participa en dos complejos proteicos distintos provoca la competición de las otras subunidades por unirse a ella con la consiguiente inhibición de la función de uno de los complejos por su menor formación por competencia [344].
- La sobreexpresión de una proteína mutante que aún puede unirse a macromoléculas o a su sustrato compete con la proteína normal impidiendo la función normal de la misma e inhibiendo la ruta original por un mecanismo de dominancia negativa [337].
- La sobreexpresión de una proteína puede inhibir la función de otras. La proteína sobreexpresada modifica post traduccionalmente a otra, inactivando una subunidad o proteína del complejo [345].

#### 1.6.2.2 Mecanismos de activación

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

La sobreexpresión genera fenotipos activando mecanismos en una ruta metabólica.

- El ejemplo más sencillo es aquel donde la sobreexpresión de una proteína de una etapa reguladora clave puede desencadenar la activación de la vía [346].
- La sobreexpresión de un gen que se expresa de forma basal bajo unas condiciones pero de forma limitada puede aumentar su actividad total [347].
- La sobreexpresión de un gen puede contrarrestar la acción de un represor por varios mecanismos, incluyendo la degradación del represor, la inactivación por modificación postraduccional o por competencia directa provocando la activación de una vía [348].
- Una proteína sobreexpresada puede modificar post traduccionalmente a otra provocando un aumento de su actividad total [349].
- La sobreexpresión de una proteína puede originar nuevos fenotipos y activar nuevas rutas metabólicas [350].

### 1.6.3 Relevancia de la sobreexpresión

Los estudios de sobreexpresión tienen varias implicaciones para la salud humana ayudándonos a comprender las causas y tratamientos de las enfermedades. Existen numerosos ejemplos en los que las enfermedades humanas son causadas directamente por el aumento de la expresión génica [351], destacando la importancia de comprender, al menos, en términos generales, los mecanismos por los que la sobreexpresión puede causar fenotipos mutantes. Incluso cuando la sobreexpresión no causa enfermedades manifiestas, los cambios en los patrones de expresión de genes pueden contribuir a la variación fenotípica, la diversidad y la evolución [352]. Además la aplicación exitosa de la sobreexpresión sistemática en organismos como las levaduras, *Drosophila* y *Arabidopsis* de genes humanos análogos servirá de valiosa herramienta de investigación en sistemas de cultivo celular para revelar aplicaciones terapéuticas adicionales de la sobreexpresión de genes [339]. La comprensión de que la sobreexpresión puede causar fenotipos, incluyendo enfermedades en los seres humanos, acentúa la importancia de establecer niveles correctos de expresión en estrategias de terapia génica [353].

## 1.7 Modelos animales

### 1.7.1 El ratón carente de apolipoproteína E

La ausencia de la APOE impide la eliminación de las partículas remanentes de los quilomicrones y las lipoproteínas de muy baja densidad por el hígado, por lo que se acumulan en el plasma y finalmente se depositan en el espacio subendotelial de las paredes arteriales [354]. Por ello, el ratón deficiente en apoE alimentado con una dieta normal, desarrolla una extensa aterosclerosis fibroproliferativa espontánea [355] que presenta la misma secuencia de formación que la lesión establecida en otros modelos animales y en humanos. Además, este ratón es propenso al desarrollo del hígado graso por lo que también es un modelo para verificar diversas intervenciones sobre este aspecto [356].

### **1.7.2 El ratón normal**

El ratón normal está considerado como un animal HDL, puesto que carece de la proteína CETP y la mayoría de su colesterol en plasma se transporta en estas lipoproteínas [357]. Entre las diferentes cepas de ratón, el fondo genético C57BL/6J es un modelo ampliamente utilizado debido a su mayor predisposición al desarrollo de aterosclerosis [358].

### **1.7.3 Influencia del sexo en el transcriptoma hepático**

El hígado es el órgano que responde principalmente a la dieta y es crucial en el control de los niveles de carbohidratos, proteínas y lípidos plasmáticos. Además, es el principal responsable de la transformación de los xenobióticos, cuya biodisponibilidad y eliminación está influenciada por la variación individual en la expresión de las principales enzimas metabolizadoras de fármacos [359].

La diferenciación hepática de género comienza temprano en el desarrollo, pero la mayor divergencia se produce en la pubertad [360]. En machos, la testosterona es aromatizada dentro del sistema nervioso central para iniciar una cascada endocrina que resulta en la liberación periódica de la hormona de crecimiento desde la pituitaria anterior [361]. Receptores de la hormona de crecimiento en hepatocitos desencadenan una vía de señalización que se traduce en la activación de STAT5B, la cual migra al núcleo y junto con cofactores conocidos y no conocidos aumenta la transcripción de genes masculinos y la represión de genes femeninos [362]. En hembras, la hormona de



crecimiento se secreta a niveles más bajos pero de manera continua en la pituitaria, STAT5B permanece sin fosforilar en el citoplasma de los hepatocitos, y el programa predeterminado de la transcripción femenina se mantiene [360]. Existen rutas distintas que también contribuyen a la diferenciación hepática de género, aunque éstas no están bien definidas [363].

El dimorfismo sexual de la expresión génica del hígado es bastante extenso y afecta a más de 1.000 genes individuales en ratas y ratones [364], incluyendo genes implicados en el metabolismo de lipoproteínas [172, 365], proteínas de unión a feromonas [366], reguladores de la homeostasis de ácidos grasos [367, 368], receptores nucleares (como PPAR $\alpha$ ) [369] y otros factores de transcripción como proteínas reguladoras de elementos de unión a esteroides (SREBPs) [370]. La medida en la que se producen estas diferencias en el hígado humano según el sexo es en gran parte desconocida. Sin embargo, estas diferencias de expresión en los genes pueden contribuir a las diferencias sexuales observadas en la fisiopatología hepática [371], incluidas las diferencias en la susceptibilidad al desarrollo de carcinoma hepatocelular visto tanto en modelos animales como en la clínica [372, 373].

La deficiencia de hormona sexual inducida por la castración se traduce en obesidad y aumento de los niveles de colesterol y triglicéridos plasmáticos [374], algunas de las causas típicas de hígado graso no alcohólico, lo que sugiere que los animales castrados son modelos adecuados para el estudio de los efectos de las hormonas sexuales en el desarrollo EHGNA.

## **1.8 Modelos celulares de estudio**

### **1.8.1 Células HepG2**

La línea celular HepG2, derivada de hepatoblastoma humano, es un modelo de estudio *in vitro* comúnmente empleado [375], ya que en las células persisten una gran parte de las funciones celulares de los hepatocitos normales [376], como la expresión de receptores de superficie celular específicos del hepatocito y la síntesis y secreción de proteínas plasmáticas [377, 378]. Además, se ha demostrado recientemente que el transcriptoma hepático humano tiene una gran correlación ( $r= 0,791$ ) con el de las células HepG2 [379].



## **2. OBJETIVOS**



## OBJETIVOS

Teniendo en cuenta los antecedentes y resultados obtenidos por miembros del grupo, los objetivos del presente trabajo fueron los siguientes:

1. Caracterización de sinaptotagmina 1 hepática de ratón. Obtención e identificación de la secuencia nucleotídica y aminoacídica.
2. Clonaje de la secuencia codificante de la sinaptotagmina 1 de ratón en un vector de expresión hepático y transfección como herramienta para estudiar los efectos de la sobreexpresión de sinaptotagmina 1 en ratones macho carentes de APOE y *wild-type* y su función en la movilización de lípidos hepáticos y plasmáticos.
3. Estudio del efecto de componentes de la dieta y del sexo sobre la expresión hepática de sinaptotagmina 1 en ratones carentes de APOE y su relación con parámetros plasmáticos y hepáticos de esteatosis.



### **3. MATERIAL Y MÉTODOS**





### 3.1 Caracterización y clonaje de la secuencia hepática de *Syt1* de ratón

Para la caracterización de la secuencia hepática de *Syt1* se utilizó una muestra de hígado de ratón carente de *ApoE* conservada a -80 °C.

#### 3.1.1 Extracción de RNA hepático

##### Reactivos

- Agua tratada con dietilpirocarbonato (DEPC) al 0,05% (v/v), autoclavada durante 1 hora a 1 atmósfera
- Cloroformo
- Isopropanol
- Solución de etanol al 75%
- 10xTBE: Tris base 0,9 M, EDTA 0,5 M (pH 8) y ácido bórico 0,9 M
- 1xTE (pH 8): Tris/HCl 10 mM, (pH 8) y EDTA 1 mM (pH 8)
- Tampón de carga de RNA: Azul de bromofenol 0,25% (p/v), xileno cianol 0,25% (p/v), glicerol 50% (p/v) y EDTA 1 mM
- Reactivo de extracción de RNA: Tri-Reagent (Sigma)
- Bromuro de etidio a una concentración de 10 mg/ml
- Agarosa en polvo

##### Procedimiento

La extracción de RNA se llevó a cabo con material estéril libre de RNasas y sobre nieve carbónica, manteniendo el tejido congelado, con el fin de evitar la degradación del RNA. El procedimiento de extracción de RNA a seguir fue el mismo tanto para los diferentes tipos de tejidos utilizados como para las células en cultivo.

Se tomó para cada muestra una alícuota de hígado congelado de unos 100 mg y se introdujo en un tubo de polipropileno estéril que contenía 1 ml del reactivo de extracción. Se homogenizó inmediatamente, se transfirió el contenido a un tubo Eppendorf y se dejó 5 minutos a temperatura ambiente. Se añadieron 200 µl de cloroformo a cada tubo, se agitaron las muestras por inversión, y se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente. A continuación se centrifugaron a 4 °C durante 15 minutos a 10.000 g, y la fase superior acuosa se transfirió a un nuevo tubo, al que se

## MATERIAL Y MÉTODOS

añadieron 0,5 ml de isopropanol. Se mezcló vigorosamente por inversión, se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos, pasados los cuales se centrifugó durante 8 minutos a 10.000 g y 4 °C. Se decantó el sobrenadante, y el precipitado obtenido se lavó con 1 ml de etanol al 75% y se centrifugó a continuación a 7.000 g durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se decantó de nuevo el sobrenadante y, tras dejar secar el precipitado brevemente, se disolvió en agua tratada con DEPC.

Seguidamente se midió la concentración del RNA en el espectrofotómetro Nanodrop ND-1000 UV/Vis por absorbancia a 260 y 280 nm. La concentración se calculó en base a que 1 A<sub>260</sub> corresponde a una concentración de 40 µg/ml. Se comprobó que la relación entre las dos longitudes de onda se encontrase entre 1.8 y 2.0. Un ratio inferior puede indicar presencia de contaminantes, lo que podría disminuir la eficiencia de la reacción, mientras que un ratio superior indica la presencia de RNA degradado o un exceso de nucleótidos libres.

La calidad del RNA extraído se verificó por electroforesis de 500 ng de RNA de cada muestra en un gel de agarosa al 1% en 1xTBE que contenía bromuro de etidio, a 80 V durante 30 minutos. La visualización de las dos bandas características del RNA ribosómico (18S y 28S) se efectuó mediante un transiluminador de UV.

Las muestras se mantuvieron en hielo para evitar su degradación en el procesado posterior. En caso de que no se fuesen a utilizar en el momento, se congelaron a -80 °C.

### 3.1.2 Purificación del RNA

#### Reactivos

- 1 µl de Turbo Dnase AMBION (2 U/µl)
- 5 µl de Turbo Dnase Buffer 10x
- 5 µl de Dnase Inactivation Reagent
- Agua libre de RNasas

#### Procedimiento

Para eliminar la potencial contaminación por DNA genómico que podría interferir en las determinaciones posteriores, las muestras de RNA extraídas se trataron con el kit Turbo DNA-Free AM1907 de Ambion.

Para ello se incubaron 5 µg de RNA de cada muestra con 1 µl de la enzima DNasa y 5 µl de tampón de reacción en un volumen final de 45 µl que se completó con

## MATERIAL Y MÉTODOS

agua libre de RNasas. Se homogeneizó la mezcla y se incubó en el termociclador durante 30 minutos a 37 °C. A continuación se añadieron 5 µl del agente inactivador de la DNasa, se mezcló y se incubó 2 minutos a temperatura ambiente, tras lo cual se centrifugó la muestra a 10.000 g durante 90 segundos. Se transfirió el sobrenadante que contenía el RNA libre de DNA a un tubo estéril, con cuidado de no arrastrar restos del precipitado, que contiene el DNA precipitado y otros cationes divalentes tales como el magnesio y el calcio, que podrían interferir en etapas posteriores.

La concentración del RNA purificado se cuantificó por medida en el Nanodrop, tal y como se ha indicado en el apartado anterior.

### 3.1.3 Retrotranscripción a DNA complementario

La retrotranscripción es el proceso empleado para generar DNA complementario o cDNA a partir del RNA purificado. Este proceso se llevó a cabo con uno de los siguientes kits comerciales: SuperScript™ II Reverse Transcriptase (Invitrogen), o First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas).

#### Mezcla de reacción SuperScript™ II Reverse Transcriptase

- 1 µl Random primers 50 ng/µl (Invitrogen)
- 1 µl de la mezcla de desoxirribonucleótidos trifosfato 10 mM (Invitrogen)
- El volumen correspondiente a 500 ng de RNA purificado
- Agua hasta un volumen final de 12 µl

Se incubó la mezcla a 65 °C durante 5 minutos y se enfrió inmediatamente en hielo. A continuación se añadió:

- 4 µl 5X tampón de primera hebra (Tris-HCl 250 mM pH 8,3, KCl 375 mM y MgCl<sub>2</sub> 15 mM)
- 2 µl 0,1 M DTT

Se agitó suavemente y se incubó a 25 °C durante 2 minutos y se añadió la enzima retrotranscriptasa:

- 1 µl SuperScript™ II RT (200 U/µl)

Se incubó a 25 °C durante 10 minutos, a 42 °C durante 50 minutos y finalmente se inactivó la reacción por calentamiento a 70 °C durante 15 minutos.

### Mezcla de reacción First Strand cDNA Synthesis Kit

- 1 µl Random primers cebador 0,5 µg/µl
- El volumen correspondiente a 500 ng de RNA purificado
- Agua hasta un volumen final de 11 µl

La mezcla se incubó a 65 °C durante 5 minutos. A continuación se añadieron:

- 4 µl 5X tampón de reacción (Tris-HCl 250 mM (pH 8,3), KCl 250 mM, MgCl<sub>2</sub> 20 mM y DTT 50 mM)
- 1 µl del inhibidor RiboLock RNase (20 U/µl)
- 2 µl de la mezcla de desoxirribonucleótidos trifosfato 10 mM
- 2 µl de transcriptasa reversa M-MuL V (20 U/µl)

Se mezcló y se incubó a 37 °C durante 60 minutos. La reacción se terminó al calentar a 70 °C durante 5 minutos.

#### 3.1.4 Diseño de los cebadores

Debido al desconocimiento de la secuencia hepática de *Syt1*, el diseño de cebadores se hizo en base al transcrito de cerebro variante 2 (NM\_009306.3) recogida en la base de datos del NCBI (*National Center of Biotechnology*) y se utilizaron en las posteriores técnicas desarrolladas (PCR y RACE) para la caracterización del gen de interés.

Los cebadores se diseñaron sobre las secuencias de mRNA de los genes de interés con el programa “Primer Express” o con la base de datos del NCBI, y se adquirieron en la casa comercial Invitrogen. Se diseñaron atendiendo a una serie de criterios: tamaño de los cebadores (18-24 nucleótidos), fragmento amplificado (80-250 pares de bases), temperatura de separación de 60 °C, óptimo porcentaje de nucleóticos CG, mínima complementariedad de la pareja de cebadores y que al menos uno de los cebadores hibridase en dos exones diferentes, para limitar la amplificación de una potencial contaminación por DNA genómico.

Para confirmar la especificidad de los cebadores, se realizó una búsqueda en la base de datos BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) del NCBI para asegurar que cada pareja sólo reconocía la secuencia objeto de estudio.

Con cada pareja de cebadores se efectuaron las rectas de calibrado para

## MATERIAL Y MÉTODOS

determinar su eficiencia de amplificación (una eficiencia óptima estaría comprendida entre el 90-110%) y la dilución de trabajo óptima en cada caso.

Las secuencias de oligonucleótidos utilizadas se indican en el apartado de resultados según las normas MIQUE [380].

### 3.1.5 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR a tiempo final)

Para la caracterización de *SytI* se empleó PCR a tiempo final cuyo fundamento consiste en la propiedad natural de las DNA polimerasas para replicar hebras de DNA, para lo cual emplean ciclos de altas y bajas temperaturas. Todas las etapas de la PCR están automatizadas por un termociclador.

El proceso se llevó a cabo con el Kit de Fermentas TrueStart™ *Taq* DNA Polymerase, se utilizó 1 µl de cDNA y 24 µl del siguiente mix:

- 2,5 µl 1 de 10X TrueStart™ *Taq* Búffer
- 0,2 µl dNTP Mix, 25 mM cada uno
- 0,8 µl cebador directo 10 µM
- 0,8 µl cebador reverso 10 µM
- 2 µl de MgCl<sub>2</sub> 25 mM
- 0,125 µl de la enzima TrueStart™ *Taq* DNA Polymerase
- 17,5 µl de agua libre de nucleasas

La PCR se realizó en un termociclador PTC-100™ Programable Thermal Controller cyler, el programa utilizado fue 5 minutos a 95 °C, 40 ciclos de 40 segundos a 95 °C, 1 minuto de hibridación a 60 °C y una fase de extensión a 72 °C durante 2 minutos, seguido de una extensión final de 5 minutos a 72 °C.

### 3.1.6 Amplificación rápida de los extremos del cDNA (RACE)

El RACE es una técnica usada para obtener la secuencia completa de un transcrito de RNA encontrado en una célula. Esta técnica puede proporcionar la secuencia de un transcrito de RNA a partir de una pequeña secuencia conocida hacia el extremo 5' (5' RACE) o hacia el extremo 3' (3' RACE) del RNA. Se utilizaron 2 kits, para la obtención del extremo 5' se utilizó el Kit de Ambion®, FirstChoice® RLM-

## MATERIAL Y MÉTODOS

RACE, mientras que el kit BD SMART<sup>TM</sup> RACE de Clontech fue el utilizado para la obtención del extremo 3'.

### 5'RACE

El kit FirstChoice<sup>®</sup> RLM-RACE de Ambion<sup>®</sup> (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) fue utilizado para amplificar el cDNA del extremo 5' del transcrito hepático de *Syt1*. El RNA total del hígado fue retrotranscrito a cDNA utilizando la transcriptasa reversa M-MLV durante 1 hora a 42 °C en presencia de un adaptador comercial 5'RACE (5'-GCUGAUGGCGAUGAUGAACCUGCGUUUGCUGGCUUUGAUG-AAA-3') suministrado en el kit que se une al RNA en posición 5'. El 5'cDNA se genera mediante una reacción de PCR. Esta reacción utiliza un cebador específico para el adaptador 5'RACE, el cebador 5'RACE outer (5'-GCTGATGGCGATGAATGAACA-CTG-3') y un cebador específico de *Syt1* (5'-TTGGCTTCCAGAATGACAACA-3'). La PCR se llevó a cabo a 94 °C durante 20 segundos, 35 ciclos de 40 segundos a 94 °C, 40 segundos a 60 °C y 1 minuto a 72 °C, finalmente una extensión de 3 minutos a 72 °C. Se llevó a cabo una PCR interna utilizando de molde el producto anterior para obtener una amplificación del extremo 5'. Para esta PCR se utilizaron 2 cebadores internos en el producto previamente amplificado, uno suministrado por el kit el 5' inner primer (5'-CGCGGATCCGAACACTGCGTTTGCTGGCTTTGATG-3') y otro específico de la secuencia a amplificar (5'-ATTGAGGGTTTTCCGGTGGA-3').

### 3'RACE

El kit BD SMART<sup>TM</sup> RACE de Clontech (BD Biosciences, Madrid, Spain) fue utilizado para obtener el cDNA en 3' del transcrito hepático de *Syt1*. El RNA total fue retrotranscrito usando la transcriptasa reversa BD PowerScript durante 90 minutos a 42 °C en presencia de un oligo(dT) especial 3'-CDS primer (5'-AAGCAGTGGTATCAA-CGCAGAGTAC(T)<sub>30</sub>V N-3'; donde N = A, C, G, o T y V = A, G, o C) que se une al extremo 3'. La reacción emplea un cebador reverso específico para el oligo(dT), BD SMART II A oligo (una mezcla de 5'-CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCA GTGGTATCAACGCAGAGT-3' y 5'-CTAATACGACTCACTATAGGGC-3') y un cebador directo específico para amplificar *Syt1* (5'-TACAACAGCACCGGCGCAGA-

GCT-3'). La PCR consistió en 35 ciclos de 40 segundos a 95 °C, 40 segundos a 65 °C y 2 minutos a 72 °C. Una PCR interna usando un cebador interno suministrado en el kit y otro específico del gen fue necesaria para obtener la secuencia hepática de *Syt1* en 3'.

### **3.1.7 Electroforesis**

Para verificar que la PCR ha generado el fragmento de DNA previsto, se emplean técnicas de electroforesis. El término electroforesis se usa para describir la migración de una partícula cargada bajo la influencia de un campo eléctrico. Los productos de PCR fueron visualizados con bromuro de etidio en un gel de agarosa al 1% por electroforesis.

### **3.1.8 Purificación de las muestras de PCR**

Los fragmentos obtenidos por PCR, se purifican del resto de componentes del mix de reacción, para evitar que enzima y demás componentes interfieran en la secuenciación. Se utilizó para ello el kit QIAGEN, MinElute PCR Purification kit. El sistema combina la tecnología de las columnas de sílice con las propiedades selectivas de unión del DNA a estas membranas.

### **3.1.9 Extracción de las bandas del gel**

Recurrimos a la extracción del fragmento del gel tras la electroforesis, en las ocasiones en las que la PCR proporciona más de un fragmento de DNA de distinto tamaño. Es entonces cuando se utiliza como alternativa a la purificación del fragmento de reacción la extracción de la banda de interés cortando con un bisturí directamente del gel. Se utiliza el kit de QIAGEN, MinElute Gel Extraction, basado en los mismos principios que rigen el kit anterior de purificación.

### **3.1.10 Identificación de los fragmentos obtenidos por PCR y análisis de las secuencias**

Los fragmentos de PCR obtenidos y purificados son secuenciados en la *UNIDAD DE GENÓMICA, PARQUE CIENTÍFICO DE MADRID-U.C.M.* Las

## MATERIAL Y MÉTODOS

secuencias obtenidas fueron verificadas y analizadas usando el programa BLAST del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) para encontrar las similitudes con la secuencia conocida de *SytI* en cerebro.

### Herramientas bioinformáticas

Se utilizaron bases de datos online para el análisis de los ortólogos y parálogos del transcrito hepático de *SytI*.

NCBI BLAST: utilizado para alinear el fragmento secuenciado y buscar similitudes con las distintas variantes descritas hasta la fecha ([www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST)).

ENSEMBL: Utilizada para la busca de polimorfismos ([www.ensembl.org](http://www.ensembl.org)).

REBASE: Base de datos con todas las enzimas de restricción descritas. Alojada en la web de una de las empresas que comercializa enzimas de restricción y modificación del DNA, permite realizar mapas de restricción y elaborar geles virtuales (<http://rebase.neb.com/rebase/rebase.html>).

UNIPROT (Swiss-Prot and TrEMBL): operado por el Swiss Institute of Bioinformaticas y el European Bioinformatic Institute, contiene la mayoría de las secuencias de proteínas conocidas. Base de datos utilizada para el alineamiento de residuos aminoacídicos de secuencias proteicas (<http://www.uniprot.org/blast>).

Genome Expressed Omnibus data bank (GEO): es una base de datos pública de genómica funcional que compila datos basados en arrays y secuencias, proporciona a los usuarios información de los experimentos y los perfiles de expresión génica (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>).

### 3.1.11 Clonaje de la secuencia codificante de *SytI* de hígado en pCRII

Una vez obtenida la secuencia de la zona codificante se procede al clonaje de dicha secuencia en un vector. Para clonar el gen de interés en pCR®II se debe generar primero un producto de PCR, ligar este producto de PCR con el vector y posteriormente transformar células competentes.

El fundamento de este kit (TA cloning kit de INVITROGEN) se basa en la adición de una deoxiadenosina (A) al extremo 3' de los productos de PCR por una Taq polimerasa. El vector linealizado del kit presenta residuos 3' deoxitimidina (T). Esto permite una ligación eficiente de los insertos de PCR con el vector.



## MATERIAL Y MÉTODOS

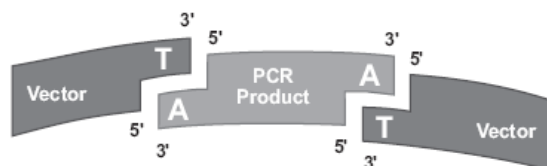


Figura 9: Diagrama del concepto en el que se basa el kit TA Cloning

### Procedimiento

#### • Amplificación del producto de PCR usando Taq polimerasa

La reacción de PCR se llevó a cabo en condiciones de tiempo y temperaturas óptimas. Se diseñaron 2 cebadores que amplificaran la secuencia desde el inicio hasta el codón de terminación, además como peculiaridad, estos cebadores contienen una secuencia *BamHI* en el cebador directo y una secuencia *XhoI* en el cebador reverso para introducir un sitio de restricción en el amplicón.

. En el diseño de cebadores se tuvo en cuenta el inicio del marco de lectura puesto que no debe modificarse, ni tampoco las secuencias de Kozak, importantes en el inicio de la traducción. El producto de PCR se visualizó en gel de agarosa y se purificó para incrementar la eficiencia del clonaje. Su concentración se midió mediante medida espectrofotométrica de la absorbancia a 260 nm en el Nanodrop.

#### • Ligación del producto con el vector

Se utilizó un producto de PCR fresco para una ligación eficiente. Para estimar la cantidad de producto de PCR a ligar con 50 ng (20 pmoles) del vector pCR®II se aplicó la siguiente fórmula:

$$X \text{ ng producto PCR} = \frac{(Y \text{ pb del producto PCR})(50 \text{ ng pCR}^{\circledR}\text{II vector})}{\text{Tamaño en pb del pCR}^{\circledR}\text{II vector: } \sim 3900}$$

Donde X son los ng del producto de PCR de Y pares de bases necesario para ligar en la proporción molar 1:1 (vector: inserto). Se incubó la siguiente reacción de ligación a 14 °C durante toda la noche:

- X µl del producto PCR
- 1 µl 10X Ligation Buffer
- 2 µl pCR®II vector (25 ng/µl)
- Hasta 9 µl de agua estéril

## MATERIAL Y MÉTODOS

- 1  $\mu$ l T4 DNA Ligase (4.0 Weiss units), mantener en hielo

### • Transformación de *E.coli* competentes con la reacción de ligación

El vector ligado con el inserto se transformó por choque térmico en células competentes *E.coli* en un ambiente estéril.

Se descongeló un vial de 50  $\mu$ l de One Shot® Competent Cells para cada transformación. Se pipeteó 2  $\mu$ l de cada reacción de ligación directamente en el vial de células competentes, se mezcló suavemente con la pipeta y se incubaron los viales en hielo durante 30 minutos.

Se sometieron a las células a un choque de calor durante 30 segundos a 42 °C sin agitar. Inmediatamente se transfirieron los viales al hielo y se añadió 250  $\mu$ l de medio S.O.C. atemperado a cada vial. Los viales se incubaron a 37 °C durante 1 hora a 225 rpm en un incubador agitador.

Se extendieron de 10  $\mu$ l a 200  $\mu$ l de cada vial de transformación en placas de LB agar que contenían 40  $\mu$ l X-Gal (40 mg/ml) y 50  $\mu$ g/ml de kanamicina o 100  $\mu$ g/ml ampicilina y se incubaron las placas toda la noche a 37 °C. Posteriormente se almacenaron las placas a 4 °C durante 2-3 horas para permitir el desarrollo adecuado del color.

### • Selección de los transformantes

Se seleccionaron al menos 10 colonias blancas para el aislamiento de plásmidos. En las placas de agar con antibiótico sólo crecen aquellas bacterias que tienen el plásmido que les otorga la resistencia al antibiótico. De entre las bacterias resistentes se seleccionan aquellas colonias aisladas y blancas, puesto que son las que contienen inserto en el plásmido, interrumpiendo el fragmento  $\alpha$  del gen LacZ y reprimiendo así la actividad  $\beta$  galactosidasa.

Se crecerán las colonias toda la noche en un volumen de entre 2 a 5 ml de medio LB líquido que contenga 50  $\mu$ g/ml de kanamicina.

### • Aislamiento de los plásmidos con el gen de interés

Los plásmidos se aislaron de las bacterias con el kit GenElute Plasmid Miniprep de SIGMA mediante la utilización de columnas de sílice.

Las bacterias recombinantes están sujetas a un proceso de lisis alcalina con SDS seguido por la adsorción del DNA en la columna de sílice en presencia de una alta

## MATERIAL Y MÉTODOS

concentración de sales. Todo aquello que no es DNA plasmídico es eliminado por centrifugación con un lavado de la columna. Finalmente es eluido con agua. Una vez aislados los plásmidos su concentración se mide mediante medida de absorbancia a 260 nm.

Se llevaron a cabo PCR interna y electroforesis en gel de agarosa para confirmar que el inserto de interés estaba dentro del plásmido aislado de las bacterias. Los plásmidos positivos a la amplificación se mandaron a secuenciar. Una alícuota de las bacterias competentes con el inserto se almacenó con 15% de glicerol a -80 °C para posteriores usos.

### 3.1.12 Clonaje de la secuencia codificante de *Syt1* hepática en el vector de expresión pLIVE

El vector pLIVE (Liver In Vivo Expression) de la casa MIRUS (Mirus Bio Corporation, Madison, WI, USA), está diseñado para un alto nivel de expresión de los transgenes en el hígado del ratón durante períodos prolongados de tiempo (3-5 días tras inyección del vector en sangre del ratón).

#### Procedimiento

##### • Análisis de restricción del fragmento de interés y del vector pLIVE, digestión y ligación

Se hizo un análisis de restricción en la base de datos online, ReBase, para seleccionar las enzimas con las que se cortaría el vector y el fragmento para que la ligación pudiera llevarse a cabo. Las enzimas escogidas BamHI y XhoI sólo cortan las secuencias:

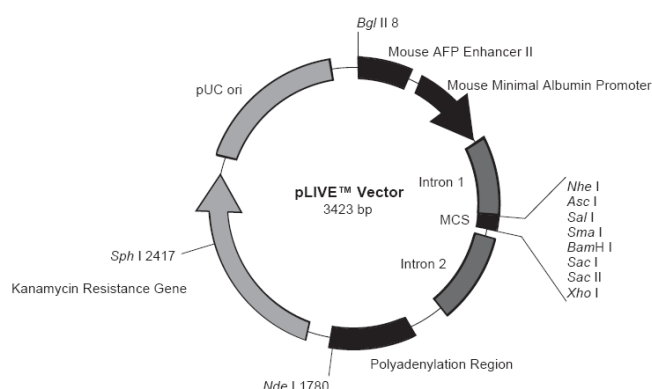
<i>Bam</i> HI	G <sup>↓</sup> GATC <sup>↓</sup> C
<i>Xho</i> I	C <sup>↓</sup> TCGA <sup>↓</sup> G

Tanto el vector de expresión pLIVE como el vector pCRII clonado con la secuencia de *Syt1* fueron digeridos con las enzimas seleccionadas para crear extremos cohesivos.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Mix de reacción para la digestión con las enzimas seleccionadas:

- 1 µg total DNA
- 2 µl Búffer B
- 0,5 µl de BamHI
- 0,5 µl de XhoI
- Agua hasta 20 µl



**Figura 10: Esquema del vector de expresión pLIVE**

El mix se incubó a T<sup>a</sup> óptima durante 4 horas. Para evitar la recircularización del vector se trató con fosfatasa alcalina que elimina los grupos fosfato en 5'. Como fue descrito anteriormente se purificaron y analizaron por electroforesis los productos digeridos antes de llevar a cabo la ligación del vector: inserto en una proporción 2:1.

### • Transformación en células competentes, selección de los transformantes y aislamiento de plásmidos

Una vez ligado el inserto en el vector, se transformó en bacterias *E.coli* competentes según lo descrito anteriormente, se seleccionaron aquellas bacterias capaces de crecer en placas con kanamicina, sólo aquellas que han incorporado el plásmido adquirieron dicha resistencia al antibiótico.

Los plásmidos se aislaron de las bacterias con el kit comercial QIAGEN Endofree Plasmid Purification, para la eliminación de endotoxinas *E.coli*. Una vez aislados los plásmidos se llevó a cabo un análisis de restricción y una PCR interna para verificar que el vector pLIVE contuviese el fragmento de interés y se mandó a secuenciar.

## 3.2 Cultivo celular

### 3.2.1 Manejo y condiciones de cultivo

Todos los trabajos de cultivo celular se llevaron a cabo en campana de flujo laminar y en las más estrictas condiciones de asepsia. Las células se mantuvieron a 37 °C en una atmósfera de 95% de aire y 5% de CO<sub>2</sub>.

### **3.2.2 Mantenimiento de la línea celular HepG2**

#### **Reactivos**

- Medio esencial Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) con glucosa (Gibco Invitrogen, Paisley, Reino Unido)
- SFB: Suero Fetal Bovino (Lonza). Previo a su utilización, se sometió a una temperatura de 56 °C durante 30 minutos en un baño termostatzado para inactivar las proteínas del complemento
- Penicilina (10000 U/ml) (Gibco)
- Estreptomicina (10000 µg/ml) (Gibco)
- L-glutamina 4 mM (Gibco)
- Piruvato de sodio 1 mM (Lonza)
- Aminoácidos no esenciales 10 mM (Gibco)
- Material de cultivo celular estéril (Sarstedt)

La línea celular humana HepG2 se mantuvo en crecimiento a 37 °C y atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% con el medio esencial Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con suero fetal bovino al 10%, penicilina al 1%, estreptomicina al 1%, L-glutamina 4 mM, aminoácidos no esenciales al 1% y piruvato de sodio 1 mM en botellas de plástico para cultivos de 25 cm<sup>2</sup>. El medio de cultivo se cambió cada dos días.

### **3.2.3 Tripsinización de los cultivos**

#### **Reactivos**

- Medio de cultivo (DMEM)
- PBS (pH 7,4) (NaCl 136 mM, KCl 0,2 g/l, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,44 g/l y KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,24 g/l).
- Agua destilada
- Tripsina 2,5%, 10X (Gibco)
- EDTA 10 mM

Cada 7 días aproximadamente, cuando las células ocupaban un 90% de la superficie de cultivo, se procedió a su individualización. Para ello se aspiró el medio de cultivo y se incubaron durante 5-10 minutos a 37 °C con 1 ml de una solución de tripsina (50 ml de agua destilada; 5,5 ml de PBS 10X; 7,7, ml de tripsina 10X; 7,7 ml de

## *MATERIAL Y MÉTODOS*

EDTA). Pasado este tiempo, las células se homogeneizaron en 5 ml de medio de cultivo.

### **3.2.4 Siembra de las células**

En una caja de 25 cm<sup>2</sup> se sembraron las células para el mantenimiento de la línea celular a una confluencia del 20% (1.000.000 de células aproximadamente), con un volumen de 5 ml de medio de cultivo. En placas de 60 mm de diámetro se sembraron las células a una confluencia del 60% por pocillo para los experimentos de extracción de RNA celular, que se añadieron en un volumen de un 3 ml de medio por placa. Tras este periodo, se aspiró el medio y las células se recogieron en la solución Tri-reagent (Ambion, Austin, TX, USA), y se procedió a aislar el RNA tal y como se indica en el apartado 3.1.1.

### **3.2.5 Congelación de las células**

#### **Reactivos**

- SFB (Lonza)
- DMSO

Se procedió como en el procedimiento de la tripsinización, los 5 ml de células resuspendidas se centrifugaron a 300 g durante 5 minutos, se aspiró el medio y al sedimento celular que se le añadió 0,5 ml de SFB con DMSO al 10% gota a gota muy frío. La mezcla se guardó en viales y la congelación se efectuó de manera progresiva en un contenedor con isopropanol y etanol (5100 Cryo 1 °C Freezing Container, Mr. Frosty) en un congelador de -80 °C durante 24 h. Posteriormente, los tubos se almacenaron en nitrógeno líquido hasta su utilización.

### **3.2.6 Descongelación de células**

Se sacó el vial del contenedor del nitrógeno líquido y se atemperó a 37 °C en un baño termostático durante 2 minutos. El contenido del vial se mezcló con 5 ml de medio de cultivo y se centrifugó a 300 g durante 5 minutos para retirar el DMSO, se aspiró el medio y se resuspendió en 5 ml de medio de cultivo, se sembró en una caja de 25 cm<sup>2</sup> y se mantuvo en crecimiento a 37 °C en atmósfera de CO<sub>2</sub>.

### 3.2.7 Transfección de las células con el vector de expresión hepático pLIVE con el gen de interés *Syt1*

#### Reactivos

- FuGENE® HD Transfection Reagent (Promega Corporation, Madison, WI, USA)
- Plásmido de expresión clonado pLIVE-Syt1 en agua libre de endotoxinas

#### Procedimiento

Para el experimento las células HepG2 se sembraron en placas de 60 mm Ø, a una confluencia del 60% por placa. Tras unos días de crecimiento en el que se alcanzó el 80% de confluencia se cambió el medio y se transfectó cada pocillo con 500 µl del siguiente mix:

- En 480 µl de medio DMEM añadir 5 µg del constructo pLIVE-Syt1
- Añadir 15 µl de FuGENE® HD reagent gota a gota. Ratio reactivo: vector utilizado 3:1
- Mezclar cuidadosamente con pipeta o vórtex
- Incubar durante 15 minutos a temperatura ambiente.
- Añadir el mix gota a gota en suave agitación.

Para cada una de las condiciones de transfección se sembró una placa control. Las células HepG2 fueron recogidas a las 24, 48, 72 y 96 horas tras la transfección para probar el funcionamiento y los niveles de expresión del plásmido. Tras este tiempo se aspiró el medio de cultivo, y las células se recogieron con el reactivo Tri-reagent (Ambion, Austin, TX, USA). Tras 5 minutos a temperatura ambiente se procedió a la extracción del RNA celular y la síntesis del DNA complementario, tal y como se indica en el apartado 3.1.1.

### 3.3 Material biológico

Los ratones se mantuvieron en el Servicio de Biomedicina y Biomateriales de la Universidad de Zaragoza. Todos los animales se alojaron en jaulas con tapa de filtro estériles en habitaciones con un microclima controlado, con una temperatura máxima de 23 °C y mínima de 20 °C, humedad máxima del 60% y mínima del 50% y con una relación de ciclo luz-oscuridad de 12 horas para cada una de las fases y acceso ad libitum a alimentos y agua. Todas las dietas se prepararon semanalmente y se mantuvieron en atmósfera de N<sub>2</sub> a -20 °C. Se proporcionó comida fresca a diario durante el tiempo que duró cada experimento. Las dietas fueron bien toleradas.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Para establecer los grupos de animales de estudio con un nivel similar de colesterol basal en plasma, se tomaron muestras sanguíneas a animales de dos meses de edad (tras 4 horas de ayuno) de la vena facial en ratones y de la vena de la cola en ratas. En el plasma obtenido se determinó la concentración de colesterol.

En todos los estudios realizados los animales se manipularon de acuerdo a las condiciones sobre protección de animales utilizados para la experimentación y otros fines científicos (Real Decreto 53/2013) y los procedimientos fueron aprobados por el Comité de Ética para la Experimentación Animal de la Universidad de Zaragoza.

### 3.4 Estudios experimentales

La composición de las dietas base usadas en los diferentes estudios quedan descritas en la Tabla 5.

#### 3.4.1 Influencia de la sobre expresión de *Syt1* en ratones wild-type alimentados con una dieta normal

Se emplearon quince ratones macho wild-type de tres meses de edad con un fondo genético C57BL/6J, obtenidos de Charles River (Charles River Laboratories, Barcelona, España) y criados en el Servicio de Biomedicina y Biomateriales de la Universidad de Zaragoza. Todos los animales recibieron la misma



**Figura 11: Inyección en cola en ratón. La flecha indica el lugar donde se realiza la inyección en la vena caudal.**

dieta normal. Se establecieron dos grupos de estudio: a) un grupo ( $n = 8$ ) fue inyectado con 50  $\mu\text{g}$  del plásmido pLIVE-Syt1 diluido en un volumen de suero salino (0,9% NaCl) equivalente al 10% del peso del animal de forma hidrodinámica en la vena caudal durante 5 segundos como está descrito [381, 382], y b) otro grupo ( $n = 7$ ), inyectado con suero salino.



### **3.4.2 Influencia de la sobreexpresión de *Syt1* en ratones deficientes en APOE alimentados con una dieta occidental**

Se emplearon veintidós ratones macho homocigotos deficientes en APOE de tres meses de edad con un fondo genético C57BL/6J, obtenidos de Charles River (Charles River Laboratories, Barcelona, España) y criados en el Servicio de Biomedicina y Biomateriales de la Universidad de Zaragoza. Se establecieron dos grupos: a) un grupo ( $n = 11$ ) fue inyectado en la vena caudal con 15  $\mu\text{g}$  del plásmido pLIVE-*Syt1* diluido en un volumen de suero salino (0,9% NaCl) equivalente al 10% del peso del animal [381, 382], b) el otro grupo ( $n = 11$ ) fue inyectado solo con suero salino. La inyección fue repetida por segunda vez transcurridos cuatro días de la primera inyección. Los animales fueron alimentados durante 12 días con una dieta occidental purificada que contenía un 0,15% de colesterol y un 20% de aceite de palma refinado.

### **3.4.3 Influencia de componentes de la dieta y hormonas sobre la expresión de *Syt1* en ratones deficientes en APOE**

#### **3.4.3.1 Influencia del colesterol**

Se emplearon catorce ratones macho homocigotos deficientes en APOE de dos meses de edad con un fondo genético C57BL/6JxOla129, proporcionados generosamente por la Dra. Nobuyo Maeda de la Universidad de Carolina del Norte y criados en el Servicio de Biomedicina y Biomateriales de la Universidad de Zaragoza. Los ratones fueron distribuidos en uno de los siguientes grupos experimentales: a) grupo control ( $n = 7$ ) alimentados con una dieta normal (B & K Universal Ltd, Humberside, UK) y b) un grupo colesterol ( $n = 7$ ) alimentados con la misma dieta suplementada con 0,1% (p/p) de colesterol. Los animales recibieron dichas dietas durante 10 semanas [383].

#### **3.4.3.2 Influencia de una dieta occidental**

Se emplearon veintidós ratones macho homocigotos deficientes en APOE de tres meses de edad con un fondo genético C57BL/6J, obtenidos de Charles River (Charles River Laboratories, Barcelona, España) y criados en el Servicio de Biomedicina y Biomateriales de la Universidad de Zaragoza. Se establecieron dos grupos: a) un grupo

## MATERIAL Y MÉTODOS

( $n = 13$ ) recibió una dieta normal y b) otro grupo ( $n = 9$ ) recibió una dieta occidental que contenía un 0,15% de colesterol y un 20% de aceite de palma refinado (Gustav Heess, S.L., Barcelona, Spain) [384].

### 3.4.3.3 Influencia del ácido oleanólico

Se emplearon diecisiete ratones macho homocigotos deficientes en APOE de dos meses de edad con un fondo genético C57BL/6J, obtenidos de Charles River (Charles River Laboratories, Barcelona, España) y criados en el Servicio de Biomedicina y Biomateriales de la Universidad de Zaragoza. Se establecieron dos grupos de estudio: a) un grupo ( $n = 8$ ) recibió una dieta semipurificada tipo occidental (Gustav Heess, S.L.) y b) el otro grupo ( $n = 9$ ) recibió la misma dieta pero suplementada con ácido oleanólico al 0,01% (Extrasynthese, Genay, Francia), equivalente a una dosis de 10 mg/kg de ratón asumiendo una ingesta diaria de 3 g por ratón [385].

### 3.4.3.4 Influencia del escualeno

Se emplearon diecinueve ratones macho homocigotos deficientes en APOE de dos meses de edad con un fondo genético C57BL/6J, obtenidos de Charles River (Charles River Laboratories, Barcelona, España) y criados en el Servicio de Biomedicina y Biomateriales de la Universidad de Zaragoza. Se establecieron dos grupos de estudio: a) un grupo control ( $n = 9$ ) recibió una dieta semipurificada tipo occidental (Gustav Heess, S.L.) y b) otro grupo tratamiento ( $n = 10$ ) que recibió la misma dieta pero suplementada con escualeno al 1% (Sigma-aldrich, Madrid, España), equivalente a una dosis de 1 g/kg ratón asumiendo una ingesta diaria de 3 g por ratón [386].

### 3.4.3.5 Influencia del sexo

Se emplearon ratones machos y hembras homocigotos deficientes en APOE de dos meses de edad con un fondo genético C57BL/6J, obtenidos de Charles River (Charles River Laboratories, Barcelona, España) y criados en el Servicio de Biomedicina y Biomateriales de la Universidad de Zaragoza.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Con dieta normal

Se establecieron dos grupos: a) uno de machos ( $n = 13$ ) y b) un segundo grupo de hembras ( $n = 13$ ). Todos recibieron la misma dieta normal durante 11 semanas.

### Con dieta occidental

Se establecieron dos grupos de estudio: a) un grupo de machos ( $n = 9$ ) y b) un grupo de hembras ( $n = 10$ ), ambos grupos recibieron una dieta occidental durante 11 semanas.

**Tabla 5:** Composición de las dietas usadas en los diferentes estudios basadas en las recomendaciones AIN-93 para dietas de roedores en laboratorios [387].

Ingredientes	Semipurificada normal (g%)	Semipurificada occidental (g%)
Almidón de maíz	46,57	37,2
Caseína	14,0	11,2
Maltodextrina	15,5	12,4
Sacarosa	10,0	8,0
Aceite soja	4,0	3,2
Celulosa	5,0	4,0
Minerales	3,5	2,8
Vitaminas	1,0	0,8
Colina	0,25	0,2
Cistina	0,18	0,1
Colesterol	--	0,15
Grasa de palma	--	20

### 3.4.3.6 Influencia de la castración

Se emplearon ratones machos y hembras homocigotos deficientes en APOE de dos meses de edad con un fondo genético C57BL/6J, obtenidos de Charles River (Charles River Laboratories, Barcelona, España) y criados en el Servicio de Biomedicina y Biomateriales de la Universidad de Zaragoza. Recibieron una dieta occidental durante 11 semanas.

#### En machos

Se establecieron dos grupos de machos: a) un grupo control ( $n = 9$ ) y b) un grupo orquiectomizados ( $n = 9$ ).

#### En hembras

Se establecieron dos grupos de hembras: a) un grupo control ( $n = 9$ ) y b) un grupo ovariectomizadas ( $n = 9$ ).

### **3.5 Sacrificio de los animales**

#### **Reactivos:**

- PBS (pH 7,4) (NaCl 136 mM, KCl 0,2 g/l, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,44 g/l y KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,24 g/l).
- EDTA 0,5 M.
- Formaldehído al 10%.
- Paraformaldehído al 4%

Tras ese período experimental se mantuvieron en ayuno durante 4 horas, tras lo cual se anestesiaron con CO<sub>2</sub>. A continuación se inmovilizaron en posición de decúbito supino, se cortó y rebatió la piel abdominal, y se procedió a la extracción de la sangre por aspiración intracardiaca. Por centrifugación de la sangre se obtuvieron el suero y el plasma (recogido con EDTA), que se emplearon para las determinaciones bioquímicas correspondientes. A continuación se perfundió con PBS el sistema circulatorio del animal. Rápidamente, se extrajo el hígado, se pesó y una parte se conservó en formaldehído y/o paraformaldehído al 4% para el análisis histológico. El resto se congeló en N<sub>2</sub> líquido y posteriormente se almacenó a -80 °C hasta el momento de su análisis.

### **3.6 Estudio de la expresión génica**

Para el estudio de la expresión génica se utilizó la técnica cuantitativa de PCR a tiempo real sobre muestras de los distintos estudios experimentales obtenidas siguiendo los protocolos anteriores descritos para la extracción del RNA (3.1.1), limpieza (3.1.2) y retrotranscripción (3.1.3). El diseño de cebadores utilizados queda descrito en el apartado 3.1.4.

#### **PCR cuantitativa a tiempo real**

La amplificación de las secuencias de DNA por qPCR se llevó a cabo con parejas de secuencias cortas de oligonucleótidos complementarios a una determinada secuencia de la hebra del cDNA sintetizado. Estos cebadores o primers permiten amplificar de forma exponencial la secuencia que delimitan mediante una DNA polimerasa termoestable y repetidos ciclos de apertura de hebras y polimerización.

La cuantificación de la reacción en tiempo real se efectuó por la medida en un termociclador (ABI Prism 7700 Sequence detector o Step One Real-Time PCR System,

## MATERIAL Y MÉTODOS

Applied Biosystems) de la emisión de fluorescencia del fluorocromo Sybr Green, el cual se une inespecíficamente al DNA y permite medir en cada ciclo la generación exponencial de DNA.

Para ello empleamos el reactivo Sybr Green Master Mix (Applied Biosystems) dentro de un volumen de reacción de 12,5 µl que contenía los siguientes reactivos:

- 1 µl del cDNA en la dilución óptima en cada caso
- 6,25 µl de la mezcla de Sybr Green Master
- 0,25-0,5 µl del primer directo (concentración final de 100-200 nM)
- 0,25-0,5 µl del primer reverso (concentración final de 100-200 nM)
- Agua hasta un volumen final de 12,5 µl

Se llevaron a cabo 40 ciclos de amplificación en el termociclador, que constaban de las siguientes etapas: desnaturalización de la doble hebra de DNA a 95 °C durante 15 segundos, hibridación a 60 °C de los cebadores al extremo 3' de cada una de las hebras y extensión de la cadena durante 1 minuto mediante la actividad de la DNA polimerasa.

### **Elección del gen óptimo de referencia**

La cuantificación final de la qPCR se refirió a un gen de referencia. Este gen debe tener una expresión invariable en la especie, el tejido y las condiciones que vayamos a valorar. En el caso del ratón, se eligió como gen de referencia la *ciclofilina B*, ya que es un gen muy estable en hígado, como se ha podido comprobar en estudios precedentes de nuestro grupo de investigación [12, 388]. La cantidad relativa de todos los mRNAs se expresó en relación con la expresión del gen de referencia mediante la ecuación  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  [389].

## **3.7 Determinaciones analíticas y estudio histológico en hígado**

### **3.7.1 Extracción y determinación de lípidos hepáticos**

#### **Reactivos**

- PBS (pH 7,4) (NaCl 136 mM, KCl 0,2 g/l, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,44 g/l y KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,24 g/l)
- Cloroformo: metanol en proporción 2:1
- Isopropanol
- Tubos de vidrio
- Reactivos colorimétricos para determinación de triglicéridos y colesterol

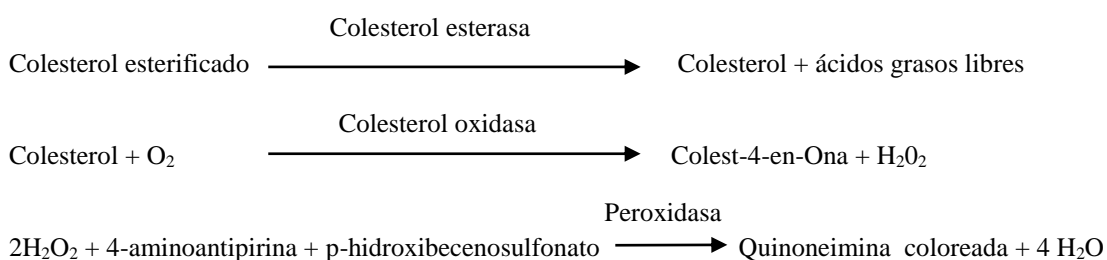
## MATERIAL Y MÉTODOS

Se tomó una muestra de hígado (10 mg aproximadamente) cuyo peso se registró para ajustar los resultados posteriormente. A continuación se añadió 1 ml de PBS y se homogeneizó hasta la completa disgregación del tejido y se transfirió a un tubo de vidrio. La extracción de lípidos se inició con la adición de 3 ml de cloroformo: metanol en proporción 2:1, se mezcló y se centrifugó a 500 g durante 5 minutos siguiendo el método de Folch [390].

Los lípidos solubilizados en la fase orgánica se recogieron con pipeta Pasteur y se transfirieron a otro tubo de vidrio. Se volvió a repetir el proceso de extracción con 1,5 ml de la mezcla cloroformo: metanol y se centrifugó en las mismas condiciones. Se tomó de nuevo la fase orgánica y se combinó con la extraída en la centrifugación anterior. Finalmente se evaporó el cloroformo en un baño a 50 °C bajo corriente de nitrógeno para evitar la oxidación de los lípidos y éstos se solubilizaron en 100 µl de isopropanol. Con los extractos lipídicos disueltos en isopropanol se determinaron los triglicéridos y el colesterol.

### 3.7.1.1 Determinación del colesterol hepático

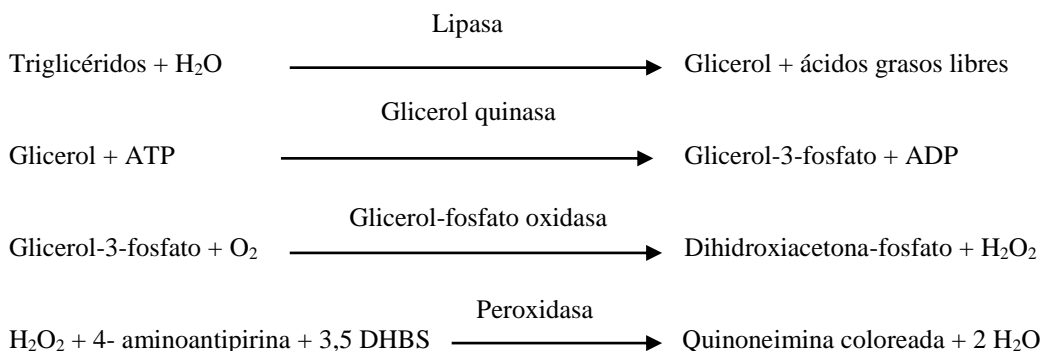
El colesterol hepático se cuantificó por colorimetría con el Kit Infinity™ Cholesterol (Thermo Scientific) por hidrólisis de los ésteres de colesterol mediante la enzima colesterol esterasa y la posterior oxidación del colesterol por la colesterol oxidasa. El peróxido de hidrógeno liberado se utilizó para formar una quinona coloreada cuya absorbancia máxima corresponde a 550 nm.



Para efectuar la reacción, se incubaron 2 µl de muestra con 100 µl de reactivo durante 30 minutos a temperatura ambiente, se incluyeron muestras sin colesterol como blanco y un calibrador de colesterol cuya concentración fue 200 mg/dl. La lectura de las absorbancias se llevó a cabo en un lector Tecan Spectra Fluor Plus para placas equipado con un filtro de 550 nm.

### 3.7.1.2 Determinación de los triglicéridos hepáticos

Los triglicéridos hepáticos se cuantificaron por colorimetría con el Kit Infinity™ Triglycerides (Thermo Scientific), basado en la hidrólisis enzimática de los triglicéridos y la subsiguiente fosforilación y oxidación del glicerol liberado, para dar un compuesto coloreado cuya absorbancia se determina a 550 nm, y es proporcional a la concentración de triglicéridos presentes en la muestra.



El lector empleado fue el Tecan Spectra Fluor Plus con un filtro de 550 nm. Para efectuar la determinación se mezclaron 2 µl de muestra y 100 µl del reactivo y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. En cada placa se incluyeron un blanco y una recta de calibrado de glicerol, en un rango de concentraciones desde 0,1 a 10 mM.

### 3.7.2 Estudio histológico hepático

Las muestras de hígado tomadas en paraformaldehído al 4% se utilizaron para realizar su estudio histológico en todos los animales incluidos en los estudios. Para ello se incluyeron en parafina según la técnica convencional, mediante un proceso de deshidratación con alcoholes de graduación creciente, aclaramiento con xileno y finalmente inclusión en parafina (punto de fusión de 56 °C), todo ello llevado a cabo en un inclusor automático. Se separaron los bloques de parafina y se realizaron cortes histológicos de 4 µm de espesor que fueron desparafinados mediante aplicación de calor durante 30 minutos a 60 °C, seguido de dos lavados de 5 minutos en un baño de xileno. Se transfirieron los cortes en las siguientes soluciones para proceder a su hidratación durante 3 minutos a temperatura ambiente: etanol 100% dos veces; etanol 95%, 90%, 85%, 70%, 50% y 30%; y finalmente 2 lavados en agua destilada. Los cortes se tiñeron con hematoxilina-eosina (H-E) y a continuación se observaron con un microscopio

óptico Nikon (Eclipse E200) y se fotografiaron con una cámara digital Nikon (DS-Fi1) acoplada al microscopio.

Este estudio tenía 2 finalidades. La primera comprobar la idoneidad de los hígados para incluirlos en los agrupamientos de los plasmas procesados por el FPLC; o en caso contrario no incluirlos si presentaban patologías hepáticas que pudieran ocasionar datos anómalos así como la utilización de cortes en técnicas inmunohistoquímicas. En segundo lugar, a partir de las fotografías obtenidas evaluar y valorar el contenido de grasa en el hígado mediante un programa de procesamiento de imágenes (Adobe PhotoShop CS2) que nos permitió medir la superficie de las gotas lipídicas. El resultado se expresó como porcentaje del área de la sección ocupada por las gotas lipídicas.

### **3.7.3 Localización de SYT1 mediante técnicas inmunohistoquímicas**

El tejido hepático incluido en parafina fue cortado con un grosor de 4- $\mu$ m usando un microtomo, desparafinado e hidratado como se ha descrito anteriormente. Se procedió a la recuperación del antígeno mediante la incubación de los cortes en buffer citrato (10 mM Tris-citrato de sodio, 1,9 mM ácido cítrico, pH 6.0) calentándolos a media potencia en un microondas durante 15 minutos. A continuación, la peroxidasa endógena fue inactivada incubando las secciones 3 minutos en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> con metanol al 3% (suministrado en el kit de DAKO EnVision+System-HRP (DAB)), seguido del bloqueo de las reacciones inespecíficas durante 1 hora a temperatura ambiente en TBS (Trizma base 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7.6) con BSA al 5%. La inmunohistoquímica se llevó a cabo usando un anticuerpo policlonal anti-ratón SYT1 generado en conejo (1451-1-AP, Proteintech Group, Inc., Manchester, UK, diluido 1/500 en TBS) incubando durante toda la noche a 4 °C las secciones. Para la detección de la señal peroxidada se usó un kit comercial de DAKO (DAKO Corporation, Carpinteria, CA, USA), EnVision+System-HRP (DAB) generado para su uso con anticuerpos primarios de conejo. Finalmente las secciones fueron contrastadas con hematoxilina durante 2 minutos. Para evaluar la especificidad de la técnica, se llevaron a cabo controles incubando las secciones de hígado en TBS sin anticuerpo primario. Además se realizaron controles positivos bajo las mismas condiciones en tejido neuronal.



### 3.8 Detección inmuno-específica de proteínas

#### 3.8.1 Extracción de proteínas mediante fraccionamiento subcelular

##### Reactivos

- Buffer de homogenización: se utilizó una solución de sacarosa 0,25 M a la que se añadió 1 pastilla de inhibidor de proteasas (Roche) cada 10 ml.
- Soluciones de sacarosa para el gradiente:
  - \* 0,25 M con  $\rho=1,05$  g/ml. Se pesaron 4,27 g de sacarosa y se disolvieron en 50 ml de agua.
  - \* 1,33 M con  $\rho=1,18$  g/ml. Se pesaron 4,55 g de sacarosa y se disolvieron en 10 ml de agua.
  - \* 2 M con  $\rho=1,26$  g/ml. Se pesaron 27,37 g de sacarosa y se disolvieron en 40 ml de agua.
- Soluciones para la obtención de fracciones lisosomales y mitocondriales
  - \* Buffer de resuspensión para obtención fracciones lisosomales y mitocondriales  
Sorbitol 0,32 M  
EDTA 0,1 mM  
Tampón fosfato/amonio 5 mM pH 8
  - \* Bifase polietilenglicol-dextrano (7 g). Se preparó el día anterior y se pesó en el siguiente orden:
    - Dextrano T-500 6.6% (p/p): se pesaron 2,64 g de una solución stock al 20%.
    - Polietilenglicol 4000 6.6% (p/p): se pesaron 1,32 g de una solución al 40%.
    - Manitol 0,32 mol/Kg.: se pesaron 2,24 g de una solución stock de 1 mol/kg.
    - Tampón amonio/fosfato 5 mM pH 7.8: se pesaron 0,2 g de una solución 0,2 M pH 7.8.
    - EDTA disódico 0,1 mM: se pesaron 0,1 g de una solución stock de EDTA 10 mM.
    - Cloruro amónico 1 mM: se añadieron 40  $\mu$ l de una solución stock 1 M.
    - Se añadió agua hasta 7 g y se dejó la bifase toda la noche a 4 °C.
- PBS. Como se ha descrito anteriormente.
- Tampón PBS TritónX100 al 0,2%, glicerol al 10%. Utilizado para romper membranas una vez obtenidas las distintas fracciones subcelulares. Se añade previamente a 500 ml

de PBS, 1 ml de TritónX100 (0,2%). De esta solución se toman 9 ml y se añade 1 ml de glicerol.

## **Procedimiento**

### **3.8.1.1 Obtención de la fracción de membrana plasmática utilizando un gradiente de sacarosa**

Tras la homogenización en un potter de cristal de 180 mg de hígado con 1 ml de buffer de homogenización se centrifugaron las muestras a 280 g durante 5 minutos. Se recogió el sobrenadante y se resuspendió el pellet con 500 µl del buffer de homogenización y se volvió a centrifugar en las mismas condiciones. A continuación se mezcló el primer y segundo sobrenadante y se centrifugó a 1.500 g durante 10 minutos a 4 °C. Tras la centrifugación, el sobrenadante con mitocondrias, lisosomas, grandes vesículas, fracción microsómica y citosol se guardó para ser utilizado posteriormente mientras que el pellet se resuspendió en 665 µl de solución de sacarosa 0,25 M para separar núcleos de membrana plasmática mediante un gradiente de sacarosa siguiendo el método de Hubbard [391]. El pellet resuspendido se volcó en un tubo de ultracentrífuga al que a continuación se le añadió 2,83 ml de solución de sacarosa 2 M y 655 µl de la solución 1,33 M, para crear el gradiente de sacarosa y se centrifugó a 82.000 g durante 60 minutos a 4 °C. Se colectó la fracción de membrana plasmática que equilibraba entre las densidades 1,05 y 1,18 g/ml de las soluciones 0,25 y 1,33 M de sacarosa, y se lavó con sacarosa 0,25 M centrifugando a 48.000 g durante 20 minutos a 4 °C. La fracción de membrana plasmática enriquecida se resuspendió en 200 µl de buffer PBS con TritónX100 al 0,2%, glicerol al 10% y se dejó en hielo durante 30 minutos, tras el cual se sonicó con ultrasonidos para conseguir la rotura total de las membranas.

### **3.8.1.2 Obtención de lisosomas y grandes vesículas mediante bifase**

El sobrenadante guardado anteriormente en la obtención de la fracción de membrana plasmática fue centrifugado a 20.000 g durante 15 minutos a 4 °C. El sobrenadante con proteínas microsomales y citosólicas se guardó y el pellet con mitocondrias, lisosomas y grandes vesículas se lavó con 1 ml de buffer de resuspensión

## MATERIAL Y MÉTODOS

(Sorbitol 0,32 M, EDTA 0,1 mM, tampón fosfato/amonio 5 mM pH 8.0) para la obtención de la fracción de lisosomas y grandes vesículas y se centrifugó a 19.000 g durante 20 minutos a 4 °C. El sobrenadante se decantó y se volvió a resuspender en 1 ml de buffer de resuspensión y se volcó sobre la bifase [392]. Se mezcló 20 veces por inversión y se centrifugó a 600 g durante 2 minutos a 4 °C en rotor basculante. Se recogieron separadamente las dos fases, la inferior de dextrano con las mitocondrias y la superior de polietilenglicol con lisosomas y grandes vesículas, se rompió el polímero con sacarosa 0,25 M y se centrifugó a 19.000 g durante 20 minutos a 4 °C. Se lavó el pellet con sacarosa 0,25 M y se centrifugó a 19.000 g durante 20 minutos a 4 °C, finalmente el pellet con lisosomas y grandes vesículas se resuspendió en 100 µl de buffer PBS con TritónX100 al 0,2% y glicerol al 10%, se dejó en hielo durante 30 minutos y se sonicó con ultrasonidos para conseguir extracción total de las proteínas de la fracción.

### 3.8.1.3 Obtención de proteínas microsomales

El sobrenadante guardado durante la obtención de la fracción lisosomal fue centrifugado a 100.000 g durante 1 hora a 4 °C. El sobrenadante obtenido contenía proteínas citosólicas mientras que el pellet con la fracción microsómica se resuspendió en 150 µl de buffer PBS con TritónX100 al 0,2%, glicerol al 10% y se dejó en hielo durante 30 minutos, tras el cual se sonicó con ultrasonidos para conseguir la rotura total de las membranas.

### 3.8.2 Cuantificación de proteínas

La determinación de las concentraciones de proteínas en las fracciones hepáticas se realizó siguiendo el protocolo de Biorad Protein Assay (Biorad, Munich, Germany), que se fundamenta en el método Bradford [393], el cual se basa en el cambio de color del azul brillante de Coomassie al interactuar con los aminoácidos aromáticos y con los residuos de arginina.

Para ello se creó una recta patrón de albúmina de suero bovino (BSA) con concentraciones comprendidas entre 0 y 1.300 µg/ml. Las diluciones de las muestras se hicieron de forma que entraran dentro del rango de la recta de calibrado. En cada pocillo de una placa multipocillo para 96 muestras se depositaron 2 µl de muestra y 100 µl de

## MATERIAL Y MÉTODOS

reactivo de Bradford (Biorad) diluido 1/5 de acuerdo con las instrucciones del fabricante, y se dejó actuar durante 10 minutos a temperatura ambiente para completar la reacción. La lectura de la absorbancia se realizó a 595 nm con un aparato Tecan Spectra Fluor Plus. Todas las determinaciones se realizaron por duplicado.

### 3.8.3 Análisis de Western-Blot

Es una técnica analítica usada para detectar proteínas específicas en una muestra determinada, mediante el uso de anticuerpos marcados conjugados directa o indirectamente [394].

#### 3.8.3.1 Electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida- SDS

La electroforesis es la técnica más utilizada para separar un amplio rango de moléculas biológicas y permite diferenciarlas de acuerdo con sus propiedades físicas de tamaño y de carga. Esta técnica se basa en una corriente eléctrica continua que pasa a través de un material conductor, que en nuestro caso ha sido un gel de poliacrilamida con SDS, que es el más utilizado y en el que se separan las proteínas de acuerdo a su peso molecular recorriendo una distancia mayor las moléculas más ligeras. El tamaño de poro del gel lo va a determinar la proporción de acrilamida/bisacrilamida que hace cruzamientos entre la acrilamida y la bisacrilamida. La distancia recorrida depende del porcentaje de acrilamida del gel.

#### Reactivos

- Tampón de electroforesis, Tris/HCl (pH 8,3) 25 mM, glicina 192 mM y SDS al 0,1%
- Solución de acrilamida al 30%, acrilamida 29,2% y bisacrilamida 0,8%.
- Tampón del gel Inferior, Tris/HCl (pH 8,8) 1,39 mM, EDTA 8 mM y SDS al 0,4%.
- Tampón del gel Superior, Tris/HCl (pH 6,8) 0,45 M, EDTA 8 mM y SDS al 0,4%.
- Solución de persulfato amónico (APS) al 10%.
- Temed.
- Tampón de carga, Tris/HCl (pH 6,8) 45 mM, EDTA 0,8 mM, glicerol al 10% (v/v),  $\beta$ -mercapto etanol (v/v) al 5%, azul de bromofenol al 0,004% y SDS al 3%.
- Marcador de pesos moleculares (Biorad).
- Isopropanol.

## MATERIAL Y MÉTODOS

- Agua destilada desionizada y estéril (ADDE).

### Procedimiento

Los geles de poliacrilamida se forman por la polimerización de la acrilamida por acción de un agente entrecruzador ('cross-linking') la bis-acrilamida en presencia de un iniciador TEMED (N,N,N,N'-tetrametilnediamina) y un catalizador, el ión persulfato que se añade en forma de persulfato amónico. La electroforesis desnaturizante, la más común, es la que somete a las proteínas a migración asegurando su completa desnaturización (pérdida de la estructura tridimensional). El agente desnaturizante más empleado es el sodiododecilsulfato o SDS, un detergente que provoca la ruptura de los enlaces que mantienen la estructura de las proteínas proporcionándoles además una carga neta negativa, por lo que éstas se separan en función de su peso molecular.

Los geles de poliacrilamida se realizaron con cristales de 10,2 x 8,1 cm de longitud y espaciadores de 1,5 mm, utilizando el sistema de Biorad Mini-Protean II y una fuente de electroforesis de Pharmacia Biotech EPS-200. Los geles utilizados se hicieron al 8% añadiéndose en último lugar el Temed y el persulfato amónico al 10%, que son los responsables de la polimerización, según las siguientes cantidades:

Gel inferior	8%
Acrilamida 30%	2 ml
Tampón del gel inferior	1,875 ml
Agua	3,625 ml
Temed	6 µl
Persulfato amónico 10%	51 µl

Se añadió isopropanol para evitar la desecación y se dejó polimerizar el gel durante media hora, transcurrido el tiempo se añadió el mix con las siguientes cantidades para la formación del gel superior:

Gel superior	
Acrilamida 30%	666 µl
Tampón del gel superior	1 ml
Agua	2,4 ml
Temed	14 µl
Persulfato amónico 10%	40 µl

A las muestras se les añadió tampón de carga en un volumen correspondiente al 20% del volumen final de muestra para aumentar su densidad y facilitar su depósito en el gel. Se desnaturizaron a 95-100 °C durante 5 minutos para romper los puentes

## MATERIAL Y MÉTODOS

disulfuro, se incubaron en hielo 2 minutos para evitar que se renaturalizasen y se centrifugaron brevemente. Cuando finalizó la polimerización del gel superior se procedió a cargar entre 10-20 µg por pocillo de las distintas fracciones subcelulares hepáticas para la detección de SYT1 y 40 µg por pocillo de la fracción de membrana plasmática para la detección de SCARB1. La electroforesis se llevó a cabo durante 110 minutos a 90 V. Para visualizar en todo momento el estado de la electroforesis y comparar el tamaño de las proteínas se utilizó un marcador coloreado de pesos moleculares (Fermentas).

### 3.8.3.2 Transferencia y detección inmuno-específica de proteínas

#### Reactivos

- Tampón de transferencia 25 mM Tris base, con metanol al 10%.
- Tampón PBS (NaCl 136mM, KCl 0,2g/l, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,44g/l y KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,24 g/l).
- Solución de Bloqueo: Tampón PBS (pH 7,4) con BSA al 5%.
- Tampón PBS (pH 7,4) con BSA al 2,5% y Tween 20 al 1% utilizado para la dilución de los anticuerpos.
- Tampón PBS (pH 7,4) con Tween 20 al 1% utilizado para los lavados.
- Anticuerpo policlonal anti SYT1 de ratón generado en conejo (1451-1-AP, Proteintech Group, Inc., Manchester).
- Anticuerpo policlonal anti SCARB1 de ratón generado en conejo (NB 400-101, Abcam, Cambridge, UK).
- Anticuerpo policlonal anti HSC70 de ratón generado en cabra (K-19 SC-1059, Santa Cruz, Biotechnology).
- Anticuerpo polyclonal anti FLOT2 de ratón generado en cabra (A-16 SC-30750, Santa Cruz, Biotechnology).
- Anticuerpo secundario de cabra anti conejo IgG (H&L) DyLight 800 (SA5-35575, Thermo-scientific).
- Anticuerpo secundario de mono anti cabra IgG (H&L) DyLight 680 (SA5-10090, Thermo-scientific)

#### Procedimiento

Las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF (Millipore, Madrid) utilizando un aparato de transferencia (Biorad) durante 30 minutos a 20 V y a 1.5

## MATERIAL Y MÉTODOS

mA/cm<sup>2</sup> de membrana. A continuación se procedió al bloqueo de los sitios de unión inespecíficos, introduciendo la membrana entre 1-3 horas a temperatura ambiente en la solución de bloqueo y con agitación moderada. Posteriormente se incubaron las membranas durante toda la noche a 4 °C y al día siguiente 2 horas a temperatura ambiente con el anticuerpo primario. La expresión de SYT1 se evidenció diluyendo los anticuerpos primarios en PBS con BSA al 2,5% y Tween20 al 1% a una dilución 1/1000 y se utilizó HSC70 como control de carga diluido 1/1000 en el mismo buffer. Se lavaron 3 veces las membranas con PBS con Tween20 al 0,1% (10 minutos/ lavado) y a continuación se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario diluido en PBS con BSA al 2,5% y Tween20 al 1%. Para la detección de SYT1 y SCARB1 se utilizó un anticuerpo secundario anti conejo DyLight 800 generado en cabra a una dilución 1/50.000 y para la detección de HCS70 y FLOT2 se incubaron las membranas a una dilución de 1/20.000 con un anticuerpo secundario anti cabra DyLight 680 generado en mono. Después de la incubación se lavó 3 veces con PBS con Tween20 al 0,1% (10 minutos/ lavado) y tras un cuarto lavado con agua destilada se procedió a la captura de las imágenes usando el aparato Odyssey® Clx (LI-COR).

### 3.9 Parámetros plasmáticos

#### 3.9.1 Determinación del colesterol total en plasma

Los sueros de los animales deficientes en APOE se diluyeron ¼ para esta determinación, factor corregido en los cálculos posteriores para determinar la concentración final, mientras que los animales *wild-type* se usaron sin diluir. Se incubaron 2 µl de la muestra con 100 µl de reactivo, el análisis se hizo por individual mediante técnicas colorimétricas usando el Kit Infinity™ Cholesterol (Thermo Scientific), método enzimático descrito en el punto 3.7.1.1.

#### 3.9.2 Determinación de los triglicéridos totales en plasma

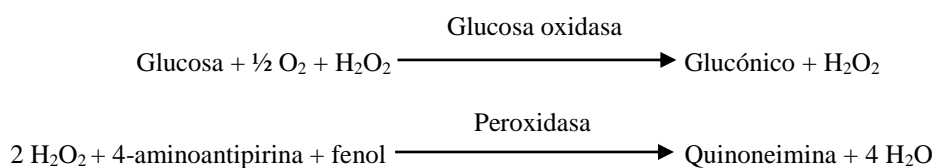
Los sueros de los animales deficientes en APOE se diluyeron ¼ para esta determinación, factor corregido en los cálculos posteriores para determinar la concentración final, mientras que los animales *wild-type* se usaron sin diluir. Se incubaron 2 µl de la muestra con 100 µl de reactivo, el análisis se hizo por individual

## MATERIAL Y MÉTODOS

mediante técnicas colorimétricas usando el Kit Infinity™ Triglycerides (Thermo Scientific), método enzimático descrito en el punto 3.7.1.2.

### 3.9.3 Determinación de glucosa en plasma

La glucosa presente en la muestra de plasma origina, según las reacciones descritas a continuación, un compuesto coloreado que se cuantifica por espectrofotometría a 500 nm.



Para ello se incubaron 2 µl de la muestra con 100 µl del reactivo provisto en el kit Glucose (Biosystems, Spain) durante 5 minutos a 37 °C, y la concentración de glucosa se determinó a partir de la absorbancia medida a 500 nm en el lector Tecan Spectra Fluor Plus de un patrón de glucosa con concentración de 100 mg/dl.

### 3.9.4 Separación rápida de lipoproteínas por cromatografía líquida de filtración por gel (FPLC)

#### Reactivos

- Tampón de elución de la columna PBS pH 7,4 (NaCl 136 mM, KCl 0,2 g/l, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,44 g/l y KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,24 g/l)
- Tampón de almacenamiento PBS pH 7,4 con NaN<sub>3</sub> al 0,1%
- Columna cromatográfica de Superose 6B (GE Healthcare)
- Equipo de FPLC (GE Healthcare)
- Colector de fracciones (GE Healthcare)
- Tubos Centricon nº 10 (Amicon Inc. Beverly, MA, USA)

#### Procedimiento

La técnica de FPLC se utilizó para la separación de las lipoproteínas de las muestras de plasma según su tamaño. La matriz de la columna está formada por pequeñas esferas porosas formadas por un polímero entrecruzado de agarosa, con poros



## MATERIAL Y MÉTODOS

de tamaño seleccionado para un rango de separación óptima de  $5 \times 10^3$ – $5 \times 10^6$  de peso molecular. Esto permite la entrada de proteínas de un cierto tamaño las cuales son retenidas temporalmente, mientras que las moléculas mayores no pueden penetrar y son eluidas más rápidamente.

La salida de las proteínas de la columna se detecta normalmente por absorción de la luz, a una longitud de onda de 280 nm. Debido a la composición de sus aminoácidos, las proteínas absorben dicha radiación y utilizando un espectrofotómetro se puede detectar las proteínas eluidas. Los datos se registran en lo que se denomina diagrama de elución indicando la posición de las proteínas que se han separado.

### **Análisis del perfil lipoproteico**

Para analizar el perfil lipoproteico del plasma, se cargaron 100  $\mu$ l de muestra procedente de un pool de los animales de cada grupo. La filtración se realizó con un volumen de flujo de 0,3 ml/min y se recogieron fracciones de 0,5 ml en un colector.

#### **3.9.4.1 Colesterol total y libre en las fracciones separadas por FPLC**

El colesterol total y libre de las fracciones obtenidas por FPLC se determinó por fluorimetría con el Kit Amplex Red Reagent.

#### **Reactivos**

- Enzimas: Peroxidasa de rábano (HRP) 1 U/ml, colesterol oxidasa 1 U/ml y colesterol esterasa 0,1  $\mu$ M
- Amplex Red (ARr) 150  $\mu$ M (Molecular Probes)
- Buffer de reacción 1x
- Agua destilada y desionizada (ADDE)

#### **Procedimiento**

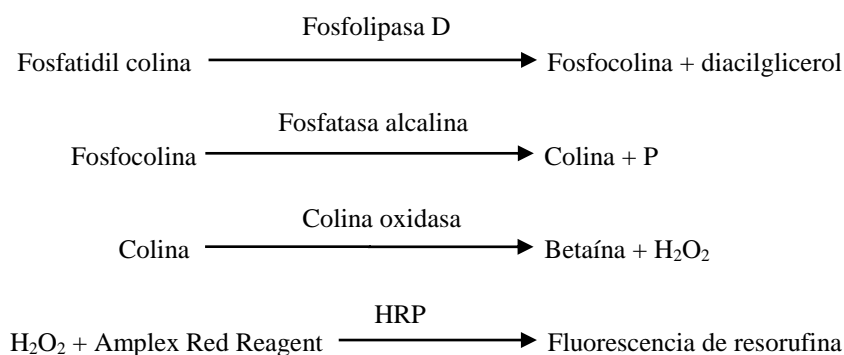
Se realizó una recta patrón de colesterol en un rango de 0,3 a 10  $\mu$ M. En cada placa se añadieron 50  $\mu$ l de los estándares de colesterol y de las muestras diluidas según el rango óptimo y 50  $\mu$ l de la mezcla de reacción. Se incubaron 30 minutos a 37 °C y se midió la fluorescencia usando un filtro de excitación de 550 nm y un filtro de 595 nm para la emisión. Se corrigió la fluorescencia del blanco y el factor de dilución de la muestra y se interpoló en la recta de calibración para conocer la concentración del

## MATERIAL Y MÉTODOS

colesterol total en cada una de las fracciones lipoproteicas obtenidas. El colesterol libre se cuantificó con el mismo ensayo fluorimétrico, pero omitiendo la enzima colesterol esterasa, obteniendo el valor de colesterol esterificado como la diferencia entre el colesterol total y el colesterol libre.

### 3.9.4.2 Fosfatidil colina en fracciones separadas por FPLC

La determinación de fosfatidil colina de las fracciones obtenidas en el FPLC se realizó también con la técnica fluorimétrica y el reactivo Amplex Red Reagent (Molecular Probes). En este caso, la reacción previa se basó en la hidrólisis de dos enzimas, primero la fosfatidil colina-fosfolipasa C convierte la fosfatidil colina en fosfocolina y diacilglicerol, y después la fosfatasa alcalina hidroliza la fosfocolina a colina, y ésta a su vez es oxidada por la colina oxidasa a betaína con producción de  $H_2O_2$  [395, 396]. Finalmente el  $H_2O_2$  se detectó usando 10-acetil-3,7-dihidroxifenoxazina (Amplex Red Reagent), y se siguió a continuación el mismo proceso que para la determinación del colesterol.

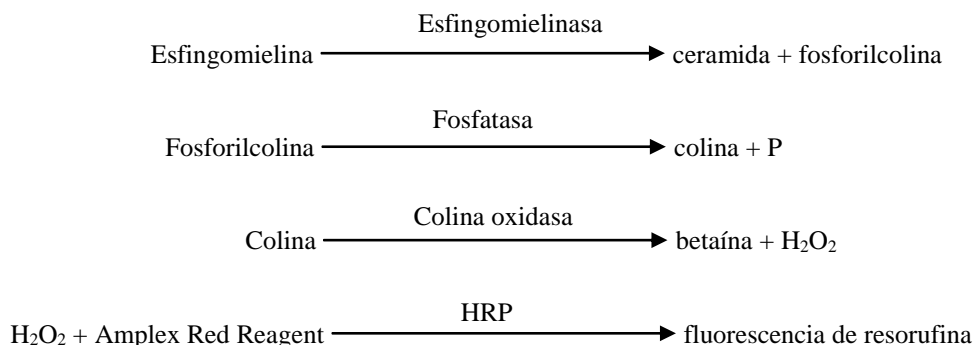


### 3.9.4.3 Esfingomielina en fracciones separadas por FPLC

La determinación de la esfingomielina de las fracciones obtenidas en el FPLC se realizó también con la técnica fluorimétrica empleando el reactivo Amplex Red Reagent (Molecular Probes). En este caso, la reacción previa se basó en la hidrólisis de dos enzimas, la esfingomielinasa hidroliza la esfingomielina a ceramida y fosforilcolina, después la fosfatasa alcalina hidroliza la fosforilcolina a la colina que es oxidada por la colina oxidasa a betaína con liberación de  $H_2O_2$ . A continuación se sigue el mismo procedimiento descrito en los apartados anteriores para la determinación del

## MATERIAL Y MÉTODOS

colesterol y fosfatidil colina de fracciones separadas por FPLC, con la diferencia de que no es necesario diluir ninguna fracción.



### 3.9.4.4 Determinación de apolipoproteínas mediante ELISA

ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay) es una técnica de inmunoensayo cuantitativa basada en la unión de un antígeno inmovilizado, que se une selectivamente y con gran especificidad a un anticuerpo. Una vez fijado este anticuerpo específico al antígeno, se le une otro anticuerpo con un marcador, lo que permite obtener una señal proporcional a la cantidad de antígeno presente en la muestra.

#### Reactivos

- Agua ADDE
- PBS
- Tampón bicarbonato 0,2 M (pH 9.6)
- Tampón de dietanolamina al 10% con MgCl<sub>2</sub> 0,5 mM (pH 9.8)
- TPBS: PBS con Tween 20 al 0,2% (pH 7.4)
- Solución de bloqueo: PBS con leche en polvo desnatada al 5% y pH 7.4
- Anticuerpo primario a la concentración optimizada para la muestra y disuelto en TPBS
- Anticuerpo secundario unido a fosfatasa alcalina, a la concentración optimizada para la muestra y disuelto en TPBS
- Solución de revelado: p-nitrofenilfosfato al 0,1% en tampón de dietanolamina
- Placas de 96 pocillos de poliestireno MAXISORB (Nunc)

#### Procedimiento

Se dispusieron 100 µl por pocillo de la muestra diluida en tampón bicarbonato y se incubaron toda la noche a 4 °C. Se invirtió la placa para eliminar la muestra no fijada,

## MATERIAL Y MÉTODOS

se añadieron 200 µl por pocillo de la solución de bloqueo y se dejó a temperatura ambiente durante 30 min. Posteriormente se eliminó la solución de bloqueo, se lavó tres veces con 200 µl de TPBS por pocillo durante 5 minutos con agitación a temperatura ambiente por cada lavado y a continuación se añadieron 100 µl por pocillo del anticuerpo primario correspondiente diluido en TPBS. Se incubó durante 1 hora y 30 minutos a 37 °C. Una vez terminada la incubación se realizó un lavado igual que el anterior.

*Tabla 6:* Diluciones del plasma y anticuerpos utilizadas para la determinación de las distintas lipoproteínas.

Tipo de muestra	Fracciones FPLC	
Apolipoproteína ensayada	APOA1	APOB
Dilución de la muestra	1/40.000	1/700
Dilución del anticuerpo primario	1/2.000	1/2.500
Dilución del anticuerpo secundario	1/10.000	1/10.000
Origen del anticuerpo primario	Conejo	Conejo

A continuación, se incubó con 100 µl por pocillo de anticuerpo secundario unido a fosfatasa alcalina diluido en TPBS durante 90 minutos a 37 °C. Una vez realizado el lavado se añadieron 200 µl a cada pocillo de la solución de revelado y se incubó durante 1 h a 37 °C protegido de la luz para que se desarrollase el color. La lectura de la señal se realizó a 405 nm con el Tecan Spectra Fluor Plus, y se expresó en unidades de absorbancia.





## **4. RESULTADOS**





## 4.1 Cloning and expression of hepatic synaptotagmin 1 in mouse<sup>♣</sup>

---

### Abstract

Mouse hepatic synaptotagmin 1 (SYT1) cDNA was cloned, characterized and compared to the brain one. The hepatic transcript was 1807 bp in length, smaller than the brain, and only encoded by 9 of 11 gene exons. In this regard, 5'-and 3'-untranslated regions were 66 and 476 bp, respectively; the open reading frame of 1266 bp codified for a protein of 421 amino acid, identical to the brain, with a predicted molecular mass of 47.4 kDa and highly conserved across different species. Immunoblotting of protein showed two isoforms, one with higher molecular mass than the theoretical prediction based on amino acid sequence suggesting posttranslational modifications. Subcellular distribution of protein isoforms corresponded to plasma membrane, lysosomes and microsomes and was identical between brain and liver. Nonetheless, the highest molecular weight isoform was smaller in liver, irrespective of subcellular location. Quantitative mRNA tissue distribution showed that it was widely expressed and that the highest values corresponded to the brain, followed by liver, spleen, abdominal fat, intestine and skeletal muscle. These findings indicate tissue-specific splicing of the gene and posttranslational modification and the variation in expression in the different tissues might suggest a different requirement of SYT1 for the specific function in each organ.

*Keywords:* Synaptotagmin 1; Mouse; Hepatic expression; *Syt1*

♣ The nucleotide sequence reported in this paper has been submitted to the Gen Bank™/ EBI Data Bank with accession number **FR827897**

---



## 1. Introduction

Synaptotagmins (SYTs) constitute a family of membrane trafficking proteins that are characterized by an N-terminal, a variable linker, and two C-terminal C<sub>2</sub>-domains, C<sub>2</sub>A and C<sub>2</sub>B [47], designed to bind Ca<sup>2+</sup> and phospholipids [10], both with a considerable structural similarity with the C<sub>2</sub> domain of protein kinase C [48]. SYTs are recognized to participate in the docking and fusion of membrane vesicles in neuronal and nonneuronal cells including macrophages [49], insulin-secreting β-cells [50], osteoblasts, and osteoclasts [51], and airway and gastric mucin-secreting goblet cells [52] and muscle cells [397].

Synaptotagmin 1 (SYT1), was identified using a monoclonal antibody screening for synaptic proteins [97]. It is a 65 kDa integral membrane protein of synaptic vesicles and secretory granules in neuronal cells which serves as a Ca<sup>2+</sup> sensor in synaptic exocytosis [99], it is also involved in the endocytic process, interacting with the adaptor protein 2 complex via the C<sub>2</sub>B domain [92, 100] before membrane internalization. The mechanism by which SYT1 performs its function in the brain is known [11], but recently SYT1 seems to have an important role in other tissues. In the intestine, SYT1 appears to be expressed

in the apical membrane and subapical region of intestinal epithelial cells. The role of SYT1 in regulating the apical membrane Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> exchanger (NHE3) was demonstrated in Caco2BBE cells [122] and the cAMP stimulation promotes direct binding of NHE3 with SYT1 directing it to the adaptor protein 2-clathrin complex, which is necessary for regulated endocytosis in intestinal epithelial cells [121]. Also intestinal *Syt1* was modulated by conjugated linoleic acid (CLA) supplementation that might have a role on mucosal immune responses in early life [123]. The pancreatic and duodenal homeobox 1, stimulates insulin secretion in response to high glucose through the positive induction of *Syt1* expression [398]. SYT1 was found to be localized on the insulin secretory granules and plays an essential role in insulin vesicle exocytosis through its Ca<sup>2+</sup> dependent phospholipid-binding activity [399, 400]. In kidneys, it also appears to participate in the regulation of podocyte homeostasis [124]. Renal podocytes possess structures similar to synaptic vesicles, glomerular podocytes express *Syt1* gene product and it seems to be associated with the serum creatinine regulatory processes, the most important biomarker for a quick non invasive assessment of kidney function [125].

## RESULTADOS

Using nutritional (Western diet enriched in the c9, t11-CLA or t10, c12-CLA isomers or chow diets containing 10% olive oil) and genetic (*ApoE*- and *Cbs*-deficient mice, these last hyperhomocysteinemic) models of hepatic steatosis in mice together with microarray analysis and its confirmation by qPCR, our group found that *Syt1* gene was involved in fatty liver development [12]. In this regard, *ApoE*-deficient mice, fed a Western-type diet enriched with linoleic acid isomers, showed significant associations among *Syt1* expression levels and hepatic steatosis. Their involvement was also analyzed in hyperhomocysteinemic mice lacking *Cbs* gene and *Syt1* hepatic expression was also associated with steatosis. *ApoE*-deficient mice consuming an olive oil-enriched diet displayed reduction of the fatty liver, and *Syt1* expression was found increased. Thus, *Syt1* expression was highly associated with hepatic steatosis in a genetic disease such as *Cbs* deficiency and in two common situations such as Western diets containing CLA isomers or a Mediterranean-type diet. The precise molecular mechanism by which SYT1 works in liver is not known but seems to have an important role in fatty liver disease development, a common disease in Western society. In addition, the possibility that the liver may express a

different mRNA to display an organ-specific regulation is an interesting hypothesis to test. Therefore, the aim of this work was to characterize SYT1 in mouse liver.

## 2. Materials and methods

### 2.1. RNA isolation

Hepatic samples of *ApoE*-knockout mice, fed a 10% olive oil-enriched diet [401] preserved at -80°C, were used for RNA extraction, using Tri Reagent from Ambion® (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) following the manufacturer's instructions. DNA contamination was removed using TURBO DNase treatment and removal kit from Ambion® (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). RNA was quantified by absorbance at A<sub>260/280</sub> (ratio was greater than 1.75) with NanoDrop ND-100 Spectrophotometer (Wilmington, DE, USA). Integrity of the 28S and 18S ribosomal RNAs was verified by 1% agarose gel electrophoresis followed by ethidium bromide staining.

### 2.2. Primer design and synthesis

All primers (Table 1 and table 2) used in this study were designed with Primer Express Applied Biosystems®

## RESULTADOS

program (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) from highly conserved regions of brain sequence (NM\_009306) and checked by BLAST analysis (National Centre for Biotechnology Information) to verify gene specificity and selective amplification of cDNA vs. genomic DNA. All primers were purchased from Invitrogen (Madrid, Spain).

### 2.3. Reverse transcriptase and polymerase chain reaction.

Total RNA (500 ng) was reverse transcribed using the Super Script™ II RT Kit from Invitrogen (Madrid, Spain). For PCR amplification of the target, *Syt1*, the reaction mixture contained 1 µL of cDNA, 0.625 U TrueStart™ *Taq* DNA Polymerase (Fermentas, USA), 1 X reaction buffer, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM of each dNTPs, and 0.32 µM of each specific primer in a final volume of 25 µL.

PCR was performed in the PTC-100™ Programmable Thermal Controller cycler (MJ Research, Watertown, MA, USA). The thermal cycling profile was 95°C for 5 min, 40 cycles of denaturation at 95°C for 40 sec, annealing at 60°C for 1 min and extension at 72°C for 2 min followed by a final extension at 72°C for 5 min. Non template controls were included. PCR products were analysed by agarose gel electrophoresis followed by ethidium bromide staining, visualized under ultraviolet (UV) light. Molecular size was estimated by using Step Ladder 1Kb, (Fermentas, USA). PCR products were purified using MinElute PCR Purification kit, Qiagen N.V. (Venlo, The Netherlands) according to the manufacturer's instructions and were utilized to sequence both strands by the dideoxy chain termination procedure in an automatic sequencer (GE Healthcare) at *Parque Científico de Madrid*

Table 1: Sequences of polymerase chain reaction (a) and RACE (b) primers used for sequence analysis

Primer	Primer Sequence 5'→3'	Length (bp)	T <sub>A</sub> (°C)	Use
2SytD	Fw 2: CAGCAGAACATTCCGCTTGA	636	60	a
2SytR	Rv 2: ATTGAGGGTTTTCCGGTGGA			
3SytD	Fw 3: ATAACCAGCTGCTGGTGGGAAT	838	60	a
3SytR	Rv 3: TATGTGGGCAGACGCAGAAA			
4SytD	Fw 4: CTGCTGCTTCTGTGTCTGTAA	672	60	a
4SytR	Rv 4: TTGGCTTCCAGAATGACAACA			
2Xho Syt1	Rv 5: CTCGAGTATGTGGGCAGACGCAGAAA	1352	60	a
3BamHI Syt1	Fw 5: GGATCCAAC TGTGTGTGCAGTCTGTGT			
4SytR	Rv outer: TTGGCTTCCAGAATGACAACA	955	60	b
2SytR	Rv inner: ATTGAGGGTTTTCCGGTGGA	675	60	b
D3race	Fw outer: TACAACAGCACCGGCGCAGAGCT	587	65	b
3aDrace	Fw inner: CACACTCTGCAGGTAGAGGA	512	63	b

## RESULTADOS

(Madrid).

### 2.4. 5'-RACE

To obtain the total coding sequence, FirstChoice<sup>®</sup> RLM-RACE Kit, Ambion<sup>®</sup> (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) was used to amplify the cDNA containing the entire 5' end of the *Syt1* hepatic transcript according to the manufacturer. Basically, total liver RNA was reverse transcribed into cDNA using M-MLV reverse transcriptase for 1 h at 42°C in presence of the 5'RACE Adapter (5'-GCUGAUGGCGAUGAAUGAACCG-CGUUUGCUGGCUUUGAUGAAA-3'). By PCR reaction, the 5' cDNA fragment was generated. This reaction used a specific oligo for the RNA adapter, 5'RACE outer primer (5'-GCTGATGGCGATGAATGAACACTG-3') and a gene-specific primer (5'-TTGGCTTCCAGAATGACAACA-3') corresponding to the *Syt1* transcript. PCR was performed at 94°C for 20 sec, then at 94°C for 40 sec 60°C for 40 sec 72°C for 1 min for 35 cycles, and finally 72°C for 3 min. PCR products were visualized with ethidium bromide agarose gel electrophoresis and a nested PCR was required to amplify the discrete previous band seen on the gel. For the nested PCR a specific 5' inner primer (5'-CGCGGATCCGAACACTGCGTTTGCTGGCTTTGATG-3')

provided with the kit and a gene-specific primer (5'-ATTGAGGGTTTTCCGGT-GGA-3') both inside the first sequence obtained were used. PCR products visualized with ethidium bromide agarose gel electrophoresis were purified and sequenced. The obtained target sequences were verified and analyzed for similarity with other known *Syt1* sequences using BLAST programs at the National Centre for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>).

### 2.5. 3'-RACE

BD SMART<sup>™</sup> RACE, Clontech (BD Biosciences, Madrid, Spain) was used to obtain the 3' cDNA end of *Syt1* hepatic transcript according to the manufacturer. RNA was reverse transcribed into cDNA using BD PowerScript reverse transcriptase for 1.5 h at 42°C in presence of the special oligo(dT) 3'-CDS primer (5'-AAGCA-GTGGTATCAACGCAGAGTAC(T)<sub>30</sub>V N-3'; where N = A, C, G, or T and V = A, G, or C). This reaction used an antisense oligo that was specific for the special oligo (dT), BD SMART II A oligo (a mixture of 5'-CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGT-TCAACGCAGAGT-3' and 5'-CTAAT-ACGACTCACTATAGGGC-3') and a

## RESULTADOS

forward gene-specific primer (5'-TACA-ACAGCACCGGCGCAGAGCT-3').

PCR was performed at 95°C for 40 sec 65°C for 40 sec and 72°C for 2 min for 35 cycles. A nested PCR using an inner primer provided with the kit and gene-specific primer was required to obtain 3' *Syt1* hepatic sequence. PCR products visualized with ethidium bromide agarose gel electrophoresis were purified and sequenced.

### 2.6. Cloning of hepatic *Syt1* sequence

The fresh PCR product of the open reading frame hepatic *Syt1* transcript was amplified with primers 3BamH1*Syt1*/2Xho*Syt1* (Table 1), ligated into pCR<sup>®</sup>II vector, transformed in One Shot<sup>®</sup> INV $\alpha$ F' Competent *E. coli*, with the TA Cloning Kit Dual Promoter, Invitrogen (Madrid, Spain) following the manufacturer's instructions, and sequenced to confirm the consensus sequence.

### 2.7. Software used

The DNA sequences were compared using BLAST program from the NCBI. The alignment of predicted amino acid sequences was performed by The Universal Protein Resource (UniProt) database, a collaboration between the [European Bioinformatics Institute \(EMBL-EBI\)](http://www.ebi.ac.uk), the [SIB Swiss Institute of Bioinformatics](http://www.sib.ac.ch) and the [Protein Information Resource \(PIR\)](http://www.proteininfo.org). The phylogenetic tree of *Syt1* gene was determined using BLAST pairwise alignments from the National NCBI. Exons maps were performed using Ensembl tools (<http://www.ensembl.org>).

### 2.8. *Syt1* expression

RNA was isolated from different tissues (skeletal muscle, ileum, jejunum, duodenum, brown fat, abdominal fat, lung, spleen, kidney, pancreas, liver, brain and heart) of three male C57BL/6J wild-type mice and used in quantitative real-time PCR to analyze *Syt1* expression. First-strand cDNA was

Table 2: Primer sequences used for qPCR according to MIQE guidelines.

Gene symbol	Accession	Sequence	Length (bp)	Junction	[Primer]	Efficiency (%)
<i>Syt1</i>	NM_009306	Fw: GTGGATTTTGGCCACGTCAC Rw: CGGAGGGAGAAGCAGATGTC	95	Exon 8-9	100 nM	102
<i>Ppib</i>	NM_011149.2	Fw: CGAGTCGTCTTTGGACTCTTTG Rw: TAGATGCTCTTTCCTCCTGTGC	182	Exon 2-3	100 nM	90

## RESULTADOS

prepared as described above. Real time PCR reactions were performed using Power SYBR<sup>®</sup> Green PCR Master Mix, from Applied Biosystems<sup>®</sup> (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), according to the manufacturer's instructions, in a One Step Real Time PCR System from Applied Biosystems<sup>®</sup> (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Samples were run in triplicate and normalized to the selected control gene *Cyclophilin B (Ppib)*. The relative amount of all mRNAs was calculated using comparative  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method.

### 2.9. Hepatic homogenate and Western blot analysis

Tissues (200 mg) were homogenized in 1 mL of 0.25 M sucrose solution with protease inhibitor cocktail (Roche, Mannheim, Germany) at 4°C and centrifuged at 280 g for 5 min. The supernatant (S<sub>1</sub>) was collected and the pellet was washed with 500 µL of 0.25 M sucrose and centrifuged under the same conditions. The resulting pellet (P<sub>0</sub>) was discarded and the supernatant was added to the first one (S<sub>1</sub>). Supernatant S<sub>1</sub> was centrifuged at 1500 g for 10 min, the resulting pellet (P<sub>1</sub>) was resuspended with 0.665 ml of 0.25 M sucrose to obtain plasma membrane fraction through a sucrose gradient generated following

Hubbard's method [391]. The S<sub>2</sub> supernatant was centrifuged at 19000 g for 20 min to obtain supernatant S<sub>3</sub> used for the isolation and purification of microsomal fraction and the generated pellet P<sub>2</sub> was resuspended to obtain lysosomes by a single two phase partition on dextran/polyethylene glycol [392]. The obtained plasma membrane, lysosomal and microsomal preparations were resuspended with PBS (136 mM NaCl, 0.2 g/L of KCl, 1.44 g/L of Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> and 0.24 g/L of KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.4) containing 10% glycerol and 0.2% Triton X100. Protein concentration was determined by BioRad dye binding assay (BioRad, Madrid, Spain).

We loaded 10 µg of protein onto an 8% SDS-polyacrylamide gel and electrophoresed them for 110 min at 90 V in a Bio-Rad Miniprotean cell (Hercules, CA). Proteins were transferred electrophoretically to PVDF membranes (GE Healthcare, Madrid, Spain) using a semidry transfer cell apparatus (Bio-Rad Trans-Blot SD) with 1.5 mA/cm<sup>2</sup> membrane for 30 min at 20 V. Membranes were blocked with PBS buffer containing 5% BSA and 2% Tween 20 for 1 h at room temperature. The primary antibody, diluted in PBS buffer containing 2.5% BSA and 1% Tween 20, was added, and the membranes were incubated overnight at



## RESULTADOS

4°C and then 2 h at room temperature. SYT1 protein expression was evidenced by using a chicken polyclonal antibody against sequences shared between the mouse and human gene products (diluted 1/5000, STG1208; Acris Antibodies, San Diego, CA, USA). Membranes were washed with PBS buffer containing 0.1% Tween 20 and two secondary antibodies were used. An anti-chicken linked to horseradish peroxidase (A9046, Sigma, St. Louis, MO, USA) diluted 1/90000 in PBS buffer containing 2.5% BSA and 1% Tween 20 and incubated for 1 h at room temperature. Detection was carried out using Luminata™ Crescendo from Millipore (Billerica, MA, USA). Membranes were exposed for several periods to achieve proper signal intensity. The other membrane was incubated with conjugated IRdye 800CW secondary antibody (donkey anti-chicken, diluted, 1/15000, 926-32218 LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, USA). Image was captured using an Odyssey® Clx (LI-COR).

### 3. Results

#### 3.1. Characterization of hepatic *Syt1* cDNA

The hepatic *Syt1* cDNA restriction map and sequencing strategy are shown

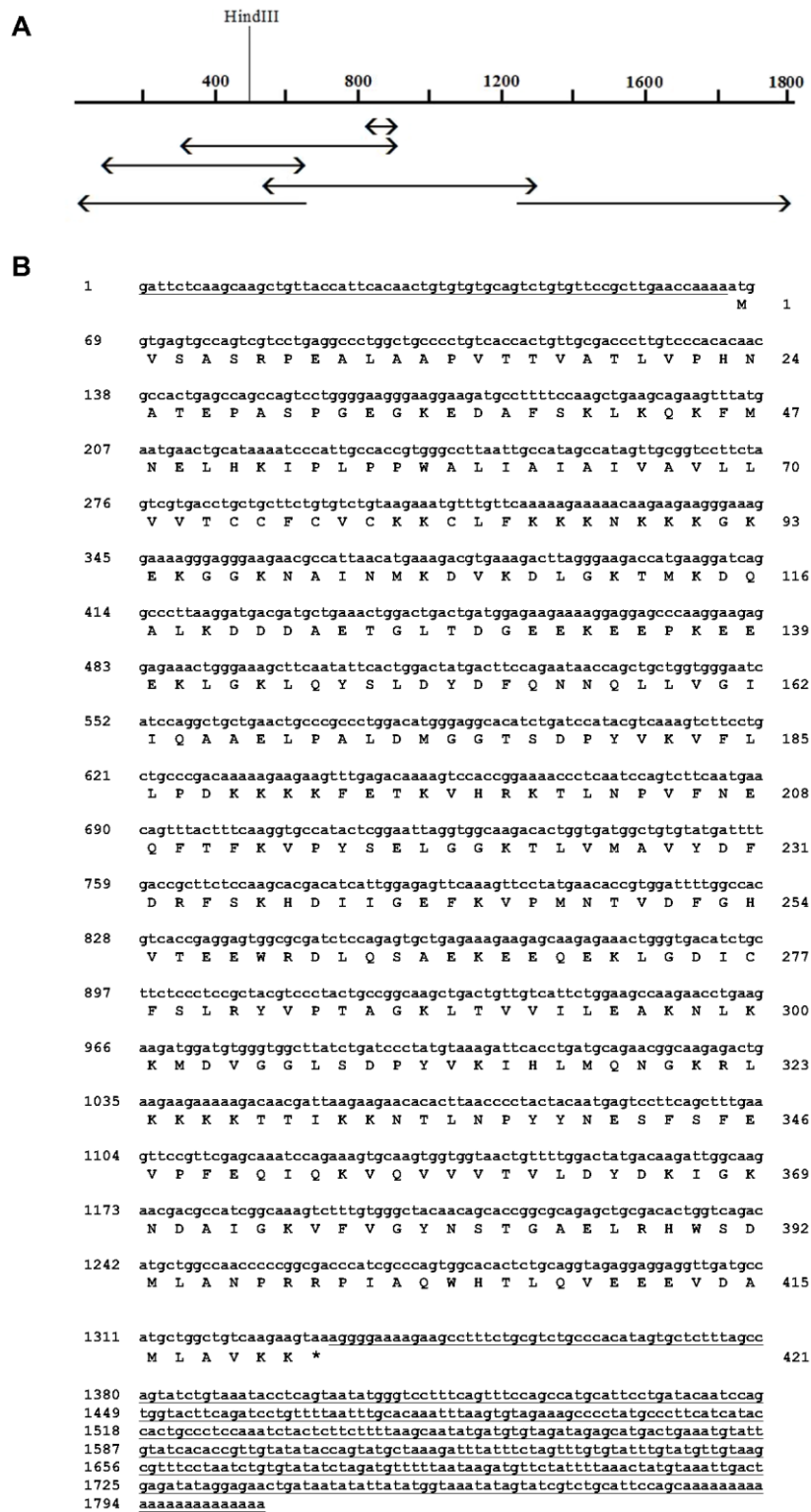
in Fig. 1A. The analyzed cDNA sequence (Fig.1B) was 1807 bp in length and contained an open reading frame of 1266 bp which begins with a methionine codon at position 66 and ends with TAA termination codon at position 1331, flanked by a 5' untranslated region of 66 bp. The 3' untranslated region is 476 bp in length from 1332 to 1807 and contains a polyA tail of 23 bp. The purified DNA product of amplified reading frame *Syt1* hepatic gene using 3BamHISyt1-Fw and 2XhoSyt1-Rv primers was cloned into pCR®II vector.

The recombinant plasmid was analyzed by restriction enzyme digestion with *BamHI* and *XhoI* (Fig. 2A) and PCR reaction (Fig. 2B), and as expected, an insert of 1338 bp was observed. Accuracy of cloning was also confirmed by nucleotide sequencing.

As shown in Fig. 3A, the *Syt1* brain transcript variant 2 (NM\_009306.3) was encoded by 11 exons, while the hepatic (FR827897) was only encoded by 9 (Fig. 3B). Differences between brain and liver *Syt1* transcript appear in the 5'-upstream and 3'-downstream sequences. *Syt1* liver 5'-UTR was encoded by a single intron region whereas in brain was encoded by 3 exons. The 3'-end in liver is shorter than in brain. Comparison of the brain sequence revealed a 100% homology

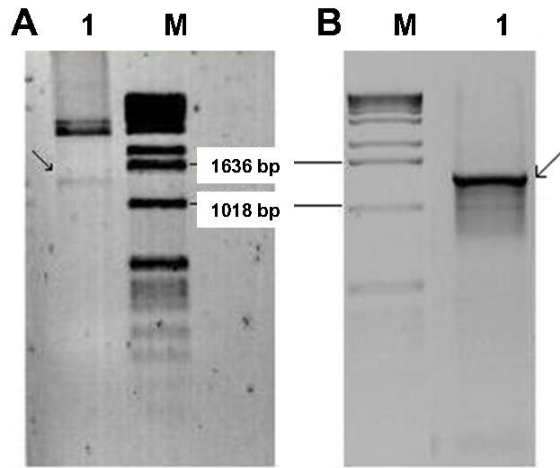
## RESULTADOS

with liver *Syt1* cDNA sequence (nt 66 to 1331). Sequencing revealed a 1266 bp conserved open reading frame between the brain and liver sequences coding for a 421 amino acid protein with a predicted molecular mass of 47.4 kDa.



**Fig. 1: Hepatic *Syt1* cDNA.** 1A): Restriction map and nucleotide sequencing strategy. The arrows indicate the direction and length for each sequencing reaction. 1B): Nucleotide and deduced amino acid sequences of hepatic *Syt1* transcript. The underline lower case letters indicate 5' and 3'-untranslated regions and upper case letters indicate the coding region. The stop codon is indicated with an asterisk.

## RESULTADOS



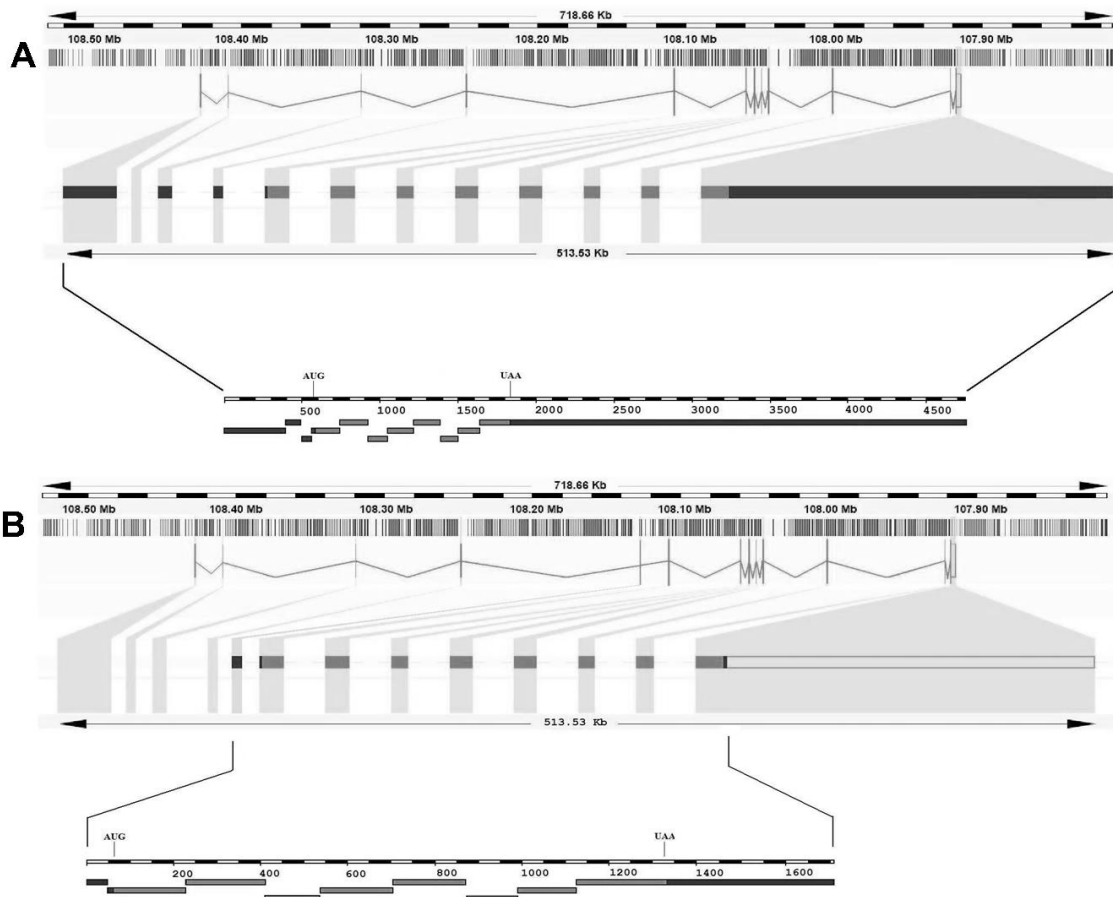
**Fig. 2:** Agarose gels of A) restriction enzyme analysis of pCR<sup>®</sup>II recombinant plasmid with BamHI and XhoI enzymes (*lane 1*), arrow indicates *Syt1* insert, B) PCR *Syt1* amplified using 3BamHISyt1-Fw and 2XhoSyt1-Rv primers and pCR<sup>®</sup>II recombinant sample (*lane 1*), arrow indicates the PCR product. GeneRuler<sup>™</sup> 1Kb DNA ladder, ready-to-use #SM0311/2/3 (*lane M*), Fermentas, USA.

### 3.2. Homology and phylogenetic analysis of *Syt1*

There are different SYT1 paralogous in vertebrates; specifically 17, all belonging to synaptotagmin family. The predicted hepatic amino acid SYT1 sequence (Fig. 1B) had a 100% homology with brain isoform 1 and jejunum [121] sequences in mouse. As is shown in Fig. 4B there are 3 mRNA transcripts described in brain mouse. Transcript variants 1 (NM\_001252341.1) and 2 (NM\_009306.3) codify SYT1 isoform 1, a 421-amino acidic protein, while transcript variant 3 (NM\_001252342.1) codifies for the isoform 2 a shorter protein of 418 amino acids. Mouse

isoform 1 and 2 are conserved at 99%. Rat (NM\_001033680.2), cow (NM\_174192.3) and orangutan (NM\_001133924.1) transcripts also encode for the isoform 1 while in humans there are 4 mRNA transcripts, variants 1 (NM\_005639.2), 2 (NM\_001135805.1) and 3 (NM\_001135806.1) encoding the SYT1 isoform 1, and the isoform 2 protein is codified by variant 4 (NM\_001291901.1). Furthermore, BLAST analysis revealed that SYT1 isoform 1 was highly conserved across different species. The 421 predicted amino acid sequence of the mouse protein, aligned with orthologous of human, rat, cow and orangutan are shown in Fig. 4A. The protein displayed a 99%, 98%, 97% and 97% identity with rat, cow, human and orangutan proteins, respectively. The variation among proteins was used to generate a phylogenetic tree of *Syt1* transcripts, shown in Fig. 4B. These analyses take into account the conservation of residues, evolutionary divergence and the physicochemical properties of the protein. The diagram shows distances between nodes that indicate divergence points of *Syt1* gene in time and between species.

## RESULTADOS



**Fig. 3. Differences in *Syt1* transcription between brain and liver.** A) Messenger RNA *Syt1* exons map in mouse brain sequence (NM\_009306), B) Messenger RNA *Syt1* exons map in mouse liver sequence (FR827897). 1266 bp conserved reading frame appears in grey. 5'-upstream sequences and 3'-downstream sequences are shown in black.

### 3.3. *Syt1* mRNA tissue expression

Real-time quantitative PCR was used to investigate *Syt1* expression in several mouse tissues. Data are expressed as signal  $\log_2$  ratio of *Syt1* expression changes normalized with *Ppib* and using *Syt1* heart expression as reference, the tissue which showed the lowest expression. The mRNA transcript of *Syt1* was expressed in all organs investigated. Fig. 5 shows that highest mRNA abundance was found in brain tissue as

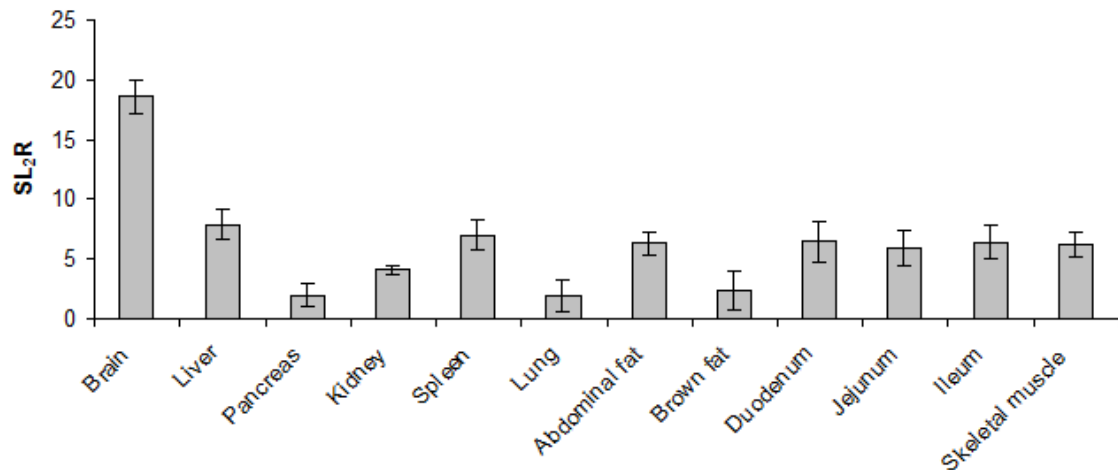
expected, followed by liver, spleen, abdominal fat, intestine tissues and skeletal muscle. All other tissues showed a lower expression of *Syt1*.

### 3.4. *SYT1* hepatic protein

Subcellular fractionation and Western blot were carried out to verify *SYT1* hepatic subcellular distribution. Accordingly (Fig.6A), two molecular size isoforms (~47 and < 65 kDa) were present in liver plasma membrane, lysosomal and microsomal fractions



## RESULTADOS



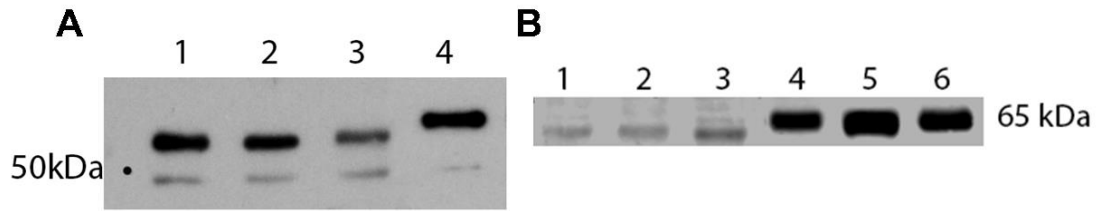
**Fig. 5. Quantitative real time polymerase chain reaction analysis of *Syt1* mRNA expression in several tissues.** Data are expressed as signal log<sub>2</sub> ratio of *Syt1* expression changes of each tissue normalized with *Ppib* and using *Syt1* heart expression as the reference.

#### 4. Discussion

Synaptotagmins are proteins having a N-terminal transmembrane region, a central linker, and two C-terminal C<sub>2</sub>-domains that account for the majority of their sequences and represent their only homologous sequences [46]. Vertebrates express at least 17 synaptotagmins diverged to release Ca<sup>2+</sup> and membranes with distinct kinetics [61]. Based on their properties and sequence, SYT1 is grouped into class 1. SYT1 C<sub>2</sub>A and C<sub>2</sub>B domains interact with Ca<sup>2+</sup> and the phospholipid bilayer mediating the rapid fusion of synaptic vesicles in neuronal tissues [2, 56], but together with other cytoplasmic regions, are implicated in a number of processes involved in vesicle exocytosis and endocytosis [121, 123, 125, 398]. In the present study we have

identified and sequenced the mRNA for the mouse hepatic synaptotagmin 1 isoform 1. The results indicate that despite the identical ORF compared to the brain gene, the hepatic *Syt1* transcript only uses 9 exons and 8 introns in an alternative splicing. Differences between brain and liver *Syt1* transcripts appear in the 5'-upstream sequences. *Syt1* liver 5'-UTR was encoded by a single intron genome region whereas in brain was encoded by 3 exons, suggesting transcripts are spliced in the 5'-UTR region [125]. Hepatic *Syt1* sequence revealed a 1266 bp conserved reading frame with brain sequence. The predicted SYT1 isoform 1 amino acid sequence in liver displayed 100% homology with the sequence in brain and jejunum and 99% with the brain isoform 2.

## RESULTADOS



**Fig. 6. SYT1 protein expression in mouse.** A): Western blot showing the molecular size in brain and liver. Lanes 1, 2 and 3 correspond to hepatic plasma membrane, lysosomal and microsomal fractions respectively and Lane 4, brain homogenate. B): Molecular size difference between liver and brain subcellular fractions. Lanes 1, 2 and 3 correspond to hepatic microsomal, lysosomal and plasma membrane respectively. Lanes 4, 5 and 6, brain microsomal, lysosomal and plasma membrane, respectively.

Moreover, BLAST analysis revealed a 99%, 98%, 97% and 97% identity with their orthologous in rat, cow, human and orangutan proteins, respectively. A potential explanation for such a high degree of conservation across species may be a crucial SYT1 function in neuronal synapses [55]. In *M. musculus*, *Syt1* transcripts were detected in all organs that were examined (Fig.5), but the highest levels were found in liver, spleen and intestine apart from brain. The latter high level of expression was also found by RNA sequencing from brain, cerebellum, heart, kidney, liver and testis ([http://www.ebi.ac.uk/gxa/experiments/E-GEOD-30352?\\_specific=on&queryFactorType=ORGANISM\\_PART&queryFactorValues=&geneQuery=SYT1&exactMatch=true&serializedFilterFactors=ORGANISM:Mus%20musculus](http://www.ebi.ac.uk/gxa/experiments/E-GEOD-30352?_specific=on&queryFactorType=ORGANISM_PART&queryFactorValues=&geneQuery=SYT1&exactMatch=true&serializedFilterFactors=ORGANISM:Mus%20musculus)). Not surprisingly, since it is brain, where SYT1 plays an important role for vesicle release and

synaptic neurotransmission. The observed ratio of liver and brain expressions were also similar to those found by RNA sequencing. This wide distribution of SYT1 among different tissues may result from an essential role in many other biological functions.

The hepatic cDNA encodes a 421 amino acid polypeptide with an expected molecular weight of 47.4 kDa corresponding to the immature protein form (Fig. 6A) as described for brain. The mature protein differs slightly in size in liver from the predicted molecular weight of 65 kDa described for brain [402] despite being a highly conserved sequence among species. This could be explained by a post-translational glycosylation. Mouse SYT1 brain protein contains one N-glycosylation site at amino acid position 24 (Asn) which it is essential for vesicular targeting of SYT1 in neuronal cells [403] but not in neuroendocrine and

## RESULTADOS

nonneuronal cells where SYT1 may be localized in other organelles playing a different role. Liver and brain subcellular fractionation and immunoblotting results shown in Fig. 6B indicate the presence of the protein in all fractions implicated in the secretion pathway with the difference that hepatic SYT1 protein may have a different glycosylation pattern. SYT1 was found to be a potential ligand of LRP1b, a member of the low-density lipoprotein receptor family in brain, binding to the receptor extracellular domain [118]. Apolipoproteins transport cholesterol and triglycerides in various tissues, so their receptors are necessary for the neuronal uptake of cholesterol which is required for membrane synthesis and maintenance [119]. If SYT1 binds apolipoprotein receptors in neuronal tissues and hepatic expression of *Syt1* was associated with steatosis in nutritional and genetic models of fatty liver disease where lipoproteins levels and composition were altered [12], we hypothesize that SYT1 could be involved in hepatic vesicle exocytosis and endocytosis interacting with apolipoprotein receptors.

In conclusion, a complete characterization of hepatic *Syt1* transcript has been carried out, resulting from a specific splicing in this tissue. Quantitative analysis of mRNA expression indicates that this gene

expression is widely distributed. The protein codified has been proved to be identical to the brain one. The existence of a post-translational is highly suggestive of explaining the discrepancy between predicted and observed molecular masses. SYT1 subcellular distribution in liver is similar to that in brain but the higher molecular weight is smaller in liver compared to the brain one. The discovery and characterization of SYT1 in liver may provide new insights into liver metabolism; however, additional studies will be required to establish its significance.

### Acknowledgments

This research was supported by grants from CICYT-FEDER (SAF2010-14958 and SAF2013-41651-R) and Redes FSE-DGA (B-69). CIBER Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición (CIBEROBN) is an initiative of ISCIII. SSK was recipient of a *Fundación Cuenca-Villoro* fellowship (BE 203/2009).







## 4.2 Hepatic Syt1 is involved in selective intracellular cholesterol transport

---

### Abstract

The molecular mechanisms by which the liver develops steatotic disease still remain unclear. Previous studies using nutritional and genetic models of hepatic steatosis in mice showed that *Synaptotagmin 1 (Syt1)* expression was associated with lipid droplet area. To find out its relationship, hepatic mouse *Syt1* mRNA was cloned into a vector driving hepatocyte-specific expression and administered by hydrodynamic injection to wild-type and *ApoE*-deficient mice, the latter as a model of rapid spontaneous steatosis development. In both situations, *Syt1* overexpression was used as a tool to explore its effect on hepatic lipid metabolism. Lysosomal and plasma membrane fractions were enriched in SYT1 protein in livers following gene overexpression. In these conditions, the presence of esterified cholesterol in plasma lipoproteins increased in high density or very low density lipoproteins, according to the mouse models. Likewise, the transgene caused an alteration in hepatic lipid content and a positive correlation between *Syt1* expression and hepatic total cholesterol content was found. Despite the fact that expressions of genes involved in lipid metabolism differed between models, the transgene overexpression promoted those involved in reverse cholesterol transport. These results indicate that this protein is involved in hepatic management of cholesterol esters and their secretion into plasma lipoproteins.

**Keywords:** Synaptotagmin 1; Mouse; Hepatic expression; *Syt1*; Reverse cholesterol transport

---



## 1. Introduction

Synaptotagmin 1 (Syt1) belongs to a family of membrane trafficking proteins [46] and is characterized by an N-terminal, a variable linker, and two C-terminal C<sub>2</sub>-domains in tandem in the cytoplasmic membrane side, C<sub>2</sub>A and C<sub>2</sub>B [47], designed to bind Ca<sup>2+</sup> and phospholipids (PL) [108]. SYTs are recognized to participate in the docking and fusion of membrane vesicles in neuronal and nonneuronal cells including macrophages [49], insulin-secreting  $\beta$ -cells [50], osteoblasts, and osteoclasts [51], airway and gastric mucin-secreting goblet cells [52] and muscle cells [397]. SYT1 is an integral membrane protein associated to lipid rafts [98] through its palmitoylated [57] transmembrane domain that mediates the fusion of synaptic vesicles with the plasma membrane to release the vesicle content during synaptic transmission. Membrane depolarization leads to Ca<sup>2+</sup> influx which binds SYT1 and triggers the fast release of neurotransmitters [106], but it is known that SYT1 requires the membrane anchor to stimulate vesicle fusion at physiological Ca<sup>2+</sup> levels [109]. This role is likely to be accomplished through the interaction of SYT1 with phospholipids and the SNARE proteins complex [111, 112] in lipid rafts whose performance is

being studied and understood nowadays [10]. Lipid rafts are dynamic lipid microdomains able to include or exclude proteins and lipids [23] with high cholesterol (CHO) content, essential for lipid and protein retention [24] involved in vesicle biogenesis and membrane fusion [5, 25]. Cholesterol concentration in vesicles changes protein structure modifying membrane properties such as membrane curvature favorable for fusion, thus cholesterol reduction impairs exocytosis of synaptic vesicles [26]. Not only is a 40% mol of cholesterol necessary for changing the intrinsic fusion properties of membranes but phospholipids also contribute directly since they can recruit and activate a large number of different proteins to create optimal conditions for exocytosis [27]. SYT1 binds anionic phospholipids in microdomains in Ca<sup>2+</sup> presence; anionic phospholipids headgroups complement the Ca<sup>2+</sup> binding sites, increasing the affinity of C<sub>2</sub>AB for Ca<sup>2+</sup>. SYT1 also interact in a Ca<sup>2+</sup> independent manner with phospholipids, overall phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate, through their polybasic Lys-rich conserved motif in the C<sub>2</sub>B domain and increases Ca<sup>2+</sup> attraction [114]. SYT1 C<sub>2</sub>B domain is also a high affinity receptor for the adaptor protein complex

## RESULTADOS

AP-2 [92] which promotes endocytosis and the recycling of synaptic vesicle proteins, thus participating in both sides of the cycle in neuronal cells [105]. Endocytic machinery requires a complex binding of lipids and proteins implicated in the process [115], clathrin coat pits are formed under specific conditions that implicate the AP-2 complex membrane anchor through the C<sub>2</sub>B SYT1 domain [116] which acts as a sensor of intracellular changes in neurons or neuroendocrine cells and activates a novel internalization signal [100]. Exocytosis and endocytosis processes take place simultaneously, however, the rate of each remains obscure and might vary due to lipid changes [117], dissociation of binding proteins and conformational protein changes.

Recently SYT1 seems to have an important role in non neuronal tissues. In the intestine, SYT1 appears to be expressed in the apical membrane and subapical region of intestinal epithelial cells. The role of SYT1 in regulating the apical membrane Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> exchanger (NHE3) was demonstrated in Caco2BBE cells [122] and the cAMP stimulation promotes direct binding of NHE3 with SYT1 directing it to the AP-2-clathrin complex, which is necessary for regulated endocytosis in intestinal epithelial cells [121]. Also intestinal *Syt1* was modulated

by conjugated linoleic acid (CLA) supplementation that might have a role on mucosal immune responses in early life [123]. In kidneys, it also appears to participate in the regulation of podocyte homeostasis [124]. Renal podocytes possess structures similar to synaptic cells, glomerular podocytes express *Syt1* gene product and it seems to be associated with the serum creatinine regulatory processes, the most important biomarker for a quick non-invasive assessment of kidney function [125].

Previous studies from our group using nutritional (Western diet enriched in the c9, t11-CLA or t10, c12-CLA isomers or chow diets containing 10% olive oil) and genetic models (*ApoE*- and *Cbs*-deficient mice, these latter hyperhomocysteinemic) of hepatic steatosis in mice together with microarray analysis and its confirmation by qPCR showed that *Syt1* expression was associated with steatosis [126]. The aim of this study was to establish the role of SYT1 in liver where the hepatic mouse transcript has been characterized as 1807 bp in length with an open reading frame codifying for a protein of 421 amino acids, identical to the brain protein [404]. To this end, wild-type and *ApoE*-deficient mice receiving a chow and high fat diet (HFD), respectively were used in two experiments in which

the hepatic *Syt1* gene was overexpressed to find out its relationship with lipids content induced hepatic steatosis.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Cloning Hepatic *Syt1* Sequence into a Liver *In Vivo* Expression vector

The open reading frame of mouse hepatic *Syt1* transcript (FR827897) was amplified by PCR using gene specific primers (Fw: 5'-GGATCCAAGTGTGTGTGCAGTCTGTGT-3'; Rv: 5'-CTCG-AGTATGTGGGCAGACGCAGAAA-3') designed to add *BamHI* and *XhoI* restriction sites to the 5' and 3' ends, respectively, purified using MinElute PCR Purification kit, Qiagen N.V. (Venlo, The Netherlands), ligated into pCR<sup>®</sup>II vector, transformed in One Shot<sup>®</sup> INVαF' Competent *E. coli*, with the TA Cloning Kit Dual Promoter, Invitrogen (Madrid, Spain) following the manufacturer's instructions, and sequenced to confirm the consensus sequence. To obtain high level expression of *Syt1* transgene in mouse liver, the full length *Syt1* cDNA product was introduced into pLIVE<sup>™</sup> (Mirus Bio, Madison, WI), a vector designed to achieve hepatocyte specific expression by using the minimal mouse albumin promoter and the mouse alpha fetoprotein

enhancer II. pCR<sup>®</sup>II-*Syt1* digested with *BamHI* and *XhoI* restriction enzymes was used as the insert source to clone into those restriction sites from pLIVE<sup>™</sup> vector. Once the correct clone was identified and verified by DNA sequencing, the pLIVE-*Syt1* construct was grown in competent *E. coli* bacteria and purified with the QIAGEN Endofree Plasmid Purification kit (QIAGEN N.V. Venlo, The Netherlands) which is suitable for *in vivo* delivery. The purity and quantity of the plasmid DNA were analyzed by agarose gel electrophoresis and by absorbance at 260 and 280 nm.

### 2.2. Cell Culture

The human hepatocellular carcinoma cells, HepG2, were cultured at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub> in Eagle's DMEM supplemented with 100 U/ml penicillin G, 100 µg/ml streptomycin, 200 mM glutamine, 100 mM sodium pyruvate and heat-inactivated 10% foetal bovine serum. HepG2 cells were seeded 24 h before transfection at a density of 4 × 10<sup>5</sup> cells in 60 mm dishes and transfected with 5 µg of pLIVE-*Syt1* vector with 15 µl of FuGENE<sup>®</sup> HD Transfection Reagent (Promega, Madison, WI, USA) according to the manufacturer's to test the construct before using it into

## RESULTADOS

animals. Cells were harvested 48 h after transfection and *Syt1* expression assessed by qPCR.

### 2.3. Animals

Fifteen 3-month-old wild-type male mice and twenty two *ApoE*-deficient male mice with a C57BL/6J genetic background obtained from Charles River (Charles River Laboratories, Barcelona, Spain) and bred in the *Servicio de Biomedicina y Biomateriales*, University of Zaragoza were used as experimental models. Blood samples obtained from the facial vein 4h after fasting period were used to establish experimental groups with similar baseline plasma cholesterol. Mice were housed in sterile filter-top cages (two or three per cage), had *ad libitum* access to food and water and were kept under light cycle conditions of 12 h light/12 h dark. The study protocols were approved by the Ethics Committee for Animal Research of the University of Zaragoza.

### 2.4. Experimental Designs

#### 2.4.1 Effect of *Syt1* Hydrodynamic Tail Vein Injection in Male Wild-type Mice Receiving a Commercial Chow Diet

An experiment with wild-type mice receiving a chow diet (Harlan Laboratories Models S.L, Barcelona, Spain) during the experiment was carried out first. One group ( $n = 8$ ) was injected into the tail vein with 50  $\mu\text{g}$  of the pLIVE-*Syt1* plasmid diluted in a volume of saline (0.9% NaCl) equivalent to 10% of the body weight within 5 seconds as previously described [381, 382]. Control group ( $n = 7$ ) was only injected with saline. No mortality was observed after hydrodynamic injections.

#### 2.4.2 Effect of *Syt1* Hydrodynamic Tail Vein Injection in Male *ApoE*-deficient Mice Receiving a High Fat Diet

Experimental mice group ( $n = 11$ ) was injected into the tail vein with 15  $\mu\text{g}$  of the pLIVE-*Syt1* plasmid diluted in a volume of saline (0.9% NaCl) equivalent to 10% of the bodyweight [381, 382]. Control group ( $n = 11$ ) was only injected with saline. Injection was repeated again four days after the first injection. No mortality was observed after hydrodynamic injections. The animals were fed for 12 days a purified high fat diet containing 0.15% cholesterol and 20% refined palm oil (prepared weekly and stored in a  $\text{N}_2$  atmosphere at  $-20^\circ\text{C}$ ).



## RESULTADOS

### 2.5. RNA Isolation and Quantification

Four days after the last injection and four-hour fasting mice were killed by suffocation with CO<sub>2</sub>. Livers were immediately removed and frozen in liquid nitrogen. RNA of each liver was isolated using Tri Reagent from Ambion<sup>®</sup> (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) following the manufacturer's instructions. DNA contamination was removed using TURBO DNase treatment and removal kit from Ambion<sup>®</sup> (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). RNA was quantified by absorbance at A260/280 (ratio was greater than 1.75) with NanoDrop ND-100 Spectrophotometer (Wilmington, DE, USA). Integrity of the 28 S and 18 S ribosomal RNAs was verified by 1% agarose gel electrophoresis followed by ethidium bromide staining. 500 ng of total RNA of each animal was reverse transcribed using the First Strand cDNA Synthesis Kit from Thermo Scientific (Thermo Fisher Scientific Company, Inc, Middletown, VA, USA). Differences in *Syt1* expression between the two experimental groups caused by hydrodynamic pLIVE-*Syt1* injection were analyzed by qPCR. PCR real time reactions were performed using Power SYBR<sup>®</sup> Green PCR Master Mix, from Applied Biosystems<sup>®</sup> (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA),

according to the manufacturer's instructions, in a One Step Real Time PCR System from Applied Biosystems<sup>®</sup> (Life Technologies). The primers used (Supplementary Table 1) were designed with Primer Express Applied Biosystems<sup>®</sup> program (Life Technologies) and checked by BLAST analysis (National Center for Biotechnology Information) to verify gene specificity. The relative amount of all mRNAs was calculated using comparative 2<sup>-ΔΔCt</sup> method. *Cyclophilin B* (*Ppib*, NM\_011149.2) mRNA was used as the reference gene.

### 2.6. Histological Analysis in *ApoE*-deficient Mice

Liver samples from *ApoE*-deficient mice were stored in neutral paraformaldehyde and embedded in paraffin. Sections (4 μm) were deparaffinized by heating for 30 minutes at 60°C, followed by soaking them twice at room temperature in a xylene bath for 5 minutes. The tissue slices were hydrated by transferring them through the following solutions for 3 minutes at room temperature: 100% ethanol twice; 95%, 90%, 85%, 70%, 50%, and 30% ethanol; and double-distilled water. Sections were stained with hematoxylin and eosin and observed using a Nikon

## RESULTADOS

microscope. Hepatic fat content was evaluated by quantifying the extent of fat droplets in each liver section with Adobe Photoshop CS2 and expressed as percentage of total liver section [126].

### 2.7. Immunohistochemistry

Paraffin-embedded liver tissues from *ApoE*-deficient mice were cut into 4- $\mu$ m slices using a microtome, deparaffinized, and hydrated as described above for histological analysis. The antigenic sites were retrieved by incubation of the sections in boiling citrate buffer (10 mM Tris-sodium citrate, 1.9 mM Citric acid, pH 6.0) for 15 min. Next, endogenous peroxidase activity was quenched by incubating the sections for 10 min in 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in methanol, followed by blocking with 5% BSA in TBS for 1 h at room temperature to reduce nonspecific binding. Immunohistochemistry was performed using a rabbit polyclonal anti-mouse SYT1 antibody (1451-1-AP, Proteintech Group, Inc., Manchester, UK, diluted 1/500 in TBS) incubated overnight at 4°C. For peroxidase signal detection EnVision+System-HRP (DAB) to use with rabbit primary antibodies (DAKO Corporation, Carpinteria, CA, USA) was used following the manufacturer's instructions. Finally the sections were counterstained with

hematoxylin. To assess the specificity of the immunolabeling, control experiments were performed by incubating the liver sections with TBS instead of with primary antibody. Also a positive control of brain tissue where SYT1 is described was carried out under the same conditions.

### 2.8. Hepatic Lipid Analysis

Tissues were homogenized in 10 volumes of PBS per gram of tissue according to Folch's method [390]. One volume of homogenate was extracted with two volumes of chloroform-methanol (2:1) twice. The separated organic phases were combined and evaporated under N<sub>2</sub> stream in a 55°C water bath. Extracts were dissolved in 100  $\mu$ l of isopropanol and used to estimate cholesterol and triglyceride concentrations using Infinity Reagent from Thermo Scientific (Thermo Fisher Scientific Company, Inc, Middletown, VA, USA).

### 2.9. Plasma Analysis

At the end of the experiments blood was drawn from hearts via cardiac puncture and centrifuged at 1000g for 5 minutes at 4°C to obtain plasma. Total plasma triglycerides and cholesterol

## RESULTADOS

concentrations were determined by microtiter assay using Infinity Reagent from Thermo Scientific (Thermo Fisher) and plasma glucose with Biosystem Glucose Kit (Biosystems S.A., Barcelona, Spain). Plasma lipoprotein profile was determined in 100 µl of pooled plasma samples from each group by fast protein liquid chromatography (FPLC) gel filtration [405] using a Superose 6B column (GE Healthcare), and total and free cholesterol in each fraction were measured using a fluorometric method (Amplex Red, Molecular Probes, USA). Phosphatidylcholine and sphingomyelin contents in each fraction were measured using the enzymatic procedure coupled to fluorometric detection [406]. Apolipoproteins APOA1 and APOB were quantified by ELISA using specific polyclonal antibodies (Bioscience) [407].

### *2.10. Hepatic Homogenate and Western Blot Analysis*

180 mg of pooled hepatic tissue of each group (4 animals per pool) of the two experiments was homogenated in 1 ml of sucrose 0.25 M solution with protease inhibitor cocktail (Roche, Mannheim, Germany) at 4°C and centrifuged at 280g for 5 min. Plasma membrane, lysosomal and microsomal fractions were obtained using different

methods [391, 392] and under specific conditions [404]. Protein concentration was determined by BioRad dye binding assay (BioRad, Madrid, Spain).

20 and 40 µg of protein for SYT1 and SCARB1 detection respectively were loaded onto a 8% SDS-polyacrylamide gel and electrophoresed for 110 min at 90V in a Bio-Rad Miniprotean cell (Hercules, CA). Proteins were transferred electrophoretically to PVDF membranes (GE Healthcare, Madrid, Spain) using semidry transfer cell Bio-Rad Trans-Blot SD apparatus with 1.5 mA/cm<sup>2</sup> membrane 27 min at 20 V. Membranes were blocked with PBS buffer containing 5% BSA for 3 h at room temperature. The primary antibody, diluted in PBS buffer containing 2.5% BSA and 1% Tween 20, was added, and the membranes were incubated overnight at 4°C and then 2 h at room temperature. SYT1 protein expression was evidenced by using a rabbit polyclonal antibody against sequences shared between the mouse and human gene products (1451-1-AP, Proteintech Group, Inc., Manchester, UK, diluted 1/1,000). Equal loadings were confirmed by using a goat polyclonal anti-HSC70 (K-19 SC-1059, Santa Cruz, Biotechnology, Inc, diluted 1/1,000). SCARB1 protein expression was evidenced by using a rabbit

## RESULTADOS

polyclonal antibody generated against a mouse synthetic peptide (NB 400-101, Abcam, Cambridge, UK, diluted 1/1,000). Equal loadings were confirmed by using a goat polyclonal anti-FLOT2 (A-16 SC-30750, Santa Cruz, Biotechnology, Inc, diluted 1/1,000). Membranes were washed with PBS buffer containing 0.1% Tween 20 and incubated for 1 h at room temperature with conjugated goat anti-rabbit IgG (H&L) DyLight 800 secondary antibody (SA5-35575, Thermo-scientific, diluted, 1/50,000) for SYT1 and SCARB1 detection and with a donkey anti-goat IgG (H&L) DyLight 680 (SA5-10090, Thermo-scientific, diluted 1/20,000) for HSC70 and FLOT2 detection in PBS buffer containing 2.5% BSA and 1% Tween 20. Image was captured using an Odyssey® Clx (LI-COR).

### 2.11. Statistical Analysis

Results are expressed as means  $\pm$  SD. Unless otherwise stated, non parametric Mann-Whitney U-test for comparison between pairs was used for unpaired observations. Association between variables was assessed by Spearman correlation test. All statistical tests were performed with the package SPSS version 15.0 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA), and a

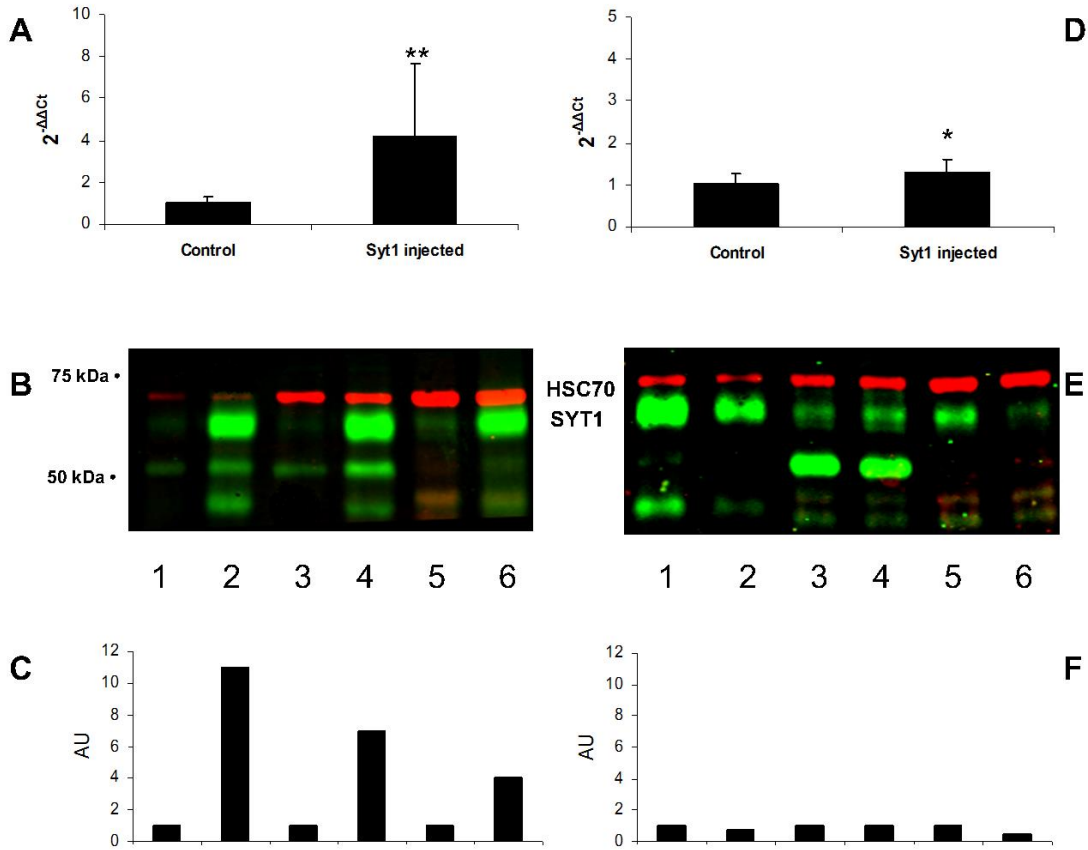
value of  $P < 0.05$  was considered statistically significant.

## 3. Results

### 3.1. Gene Expression and Protein Levels of *Syt1* in Liver of Wild type and *ApoE*-deficient Mice Injected with the Expression Vector

pLIVE-*Syt1* construct was tested previously in HepG2 cell line satisfactorily (data not shown) before mice injection experiments. To confirm the overexpression of *Syt1* in liver after the hydrodynamic injection of pLIVE construct, *Syt1* expression was examined in the four experimental groups of animals as shown in Fig. 1A and 1D for *ApoE*-deficient and wild-type mice experiments respectively. As expected, *Syt1* mRNA expression was significantly higher in injected mice than in control group supporting the effectiveness of hydrodynamic injection. To investigate whether the increase in *Syt1* mRNA expression correlated with protein levels, Western blot of the different enriched fractions involved in secretion pathway was performed (Fig. 1B and 1E). SYT1 levels were increased in all fractions involved in the secretion pathway in *ApoE*-deficient mice injected with the expression vector as shown in figure 1C

## RESULTADOS



**Fig. 1: Hepatic *Syt1* expression due to hydrodynamic tail vein injection of pLIVE-*Syt1* in *Apoe*-deficient mice fed Western diet, left panels and Wild-type mice fed a chow diet, right panels. A, D: Hepatic mRNA levels determined by qPCR using the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method for *Syt1* in injected mice vs. control group used as the reference and normalized to *Ppib*. Data represent means and SD for each group. \* $P < 0.04$ , \*\* $P < 0.0001$  between groups according to Mann-Whitney's *U*-test. B, E: Hepatic subcellular SYT1 protein expression of representative animals of each group pooled and analyzed by Western Blot. C, F: Quantitative results of western blot analysis (B, C, E and F: lane 1: lysosomal fraction control group; lane 2: lysosomal fraction injected group; lane 3: plasma membrane control group; lane 4: plasma membrane injected group; lane 5: microsomal fraction control group and lane 6: microsomal fraction injected group) expressed as arbitrary unit (AU).**

with an enrichment in large vesicles and lysosomal fraction. On the other hand, no increases in SYT1 protein levels were observed in wild-type mice (1F).

### 3.2. Detection and Tissue Distribution of SYT1 Antigen

Using immunohistochemical analyses, we have verified in *Apoe*-deficient mice elevated levels of SYT1

protein expression in those mice injected with pLIVE-*Syt1* construct. SYT1 basal levels in control mice are shown in Fig. 2A where the protein was present in the cytoplasm. Stronger signals, characterized by brown staining, were observed when SYT1 was overexpressed in liver (Fig. 2B) where plasma membrane was enriched with SYT1 protein. SYT1 immunostaining appeared to be concentrated around centrilobular

## RESULTADOS

veins (Fig. 2A) and was specific for SYT1 protein as demonstrated by the absence of staining in the negative controls (Fig. 2, C and D).

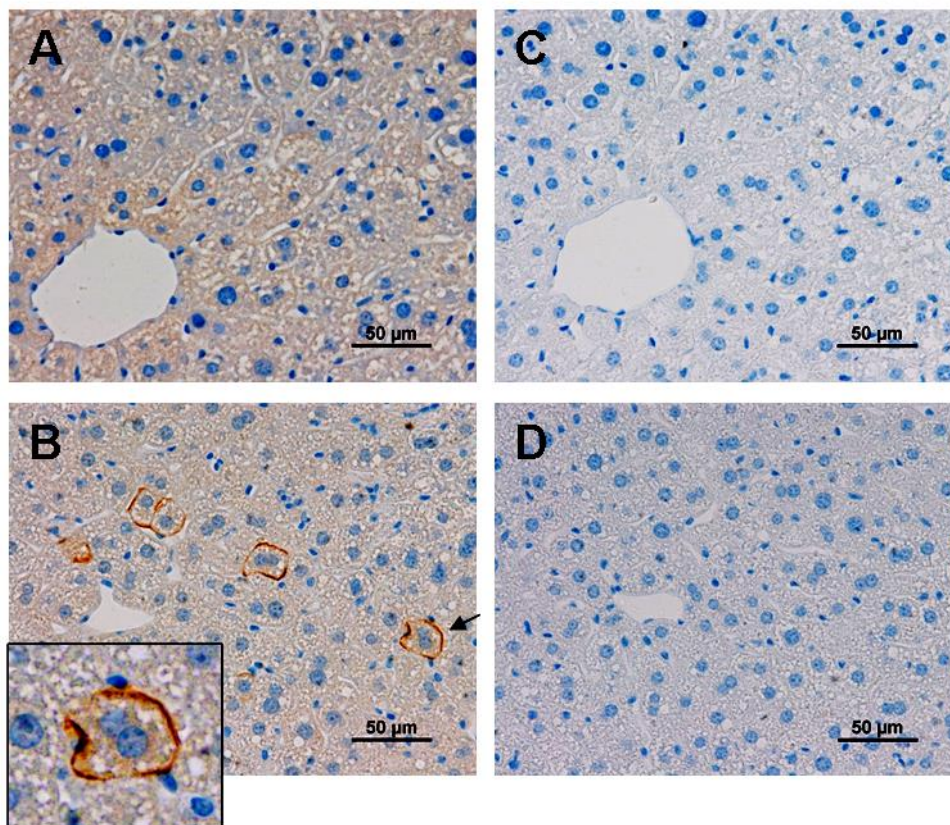
### 3.3. Hepatic Lipids in Wild-type Mice Injected with pLIVE-Syt1

Hepatic cholesterol amount did not change between the two experimental groups due to *Syt1* overexpression (Fig. 3A) although triglyceride content was significantly higher (3B) in mice injected with the pLIVE-*Syt1* construct. Moreover

correlation analyses, Fig. 3C and D, evidenced significant associations between *Syt1* expression and hepatic cholesterol ( $r_s = 0.44$ ;  $P < 0.05$ ) and triglyceride ( $r_s = 0.54$ ;  $P < 0.03$ ) contents in WT mice fed a chow diet.

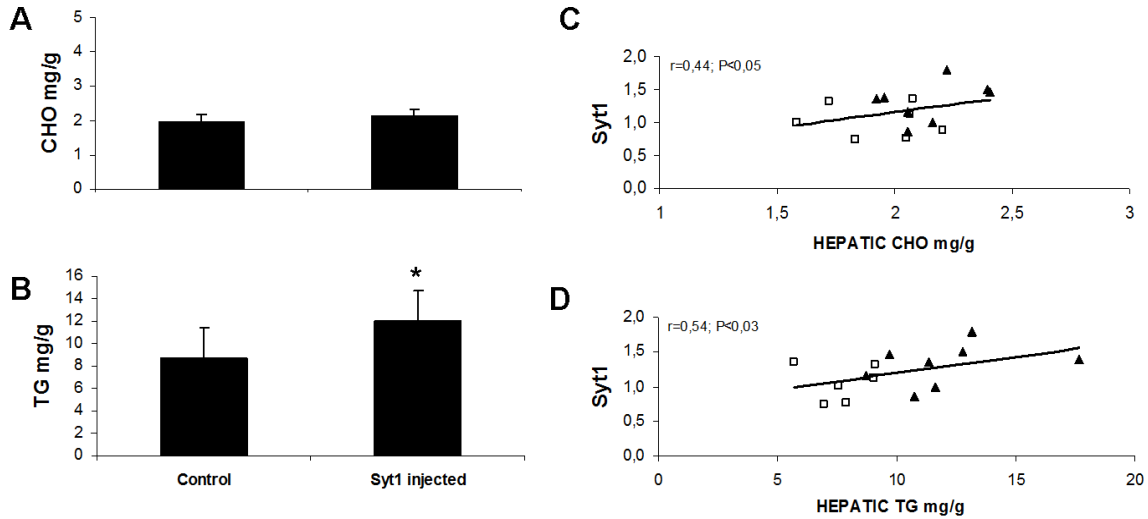
### 3.4. Liver Histological Analysis in Apoe-deficient Mice Injected with pLIVE-Syt1

Figure 4 shows representative histological images of livers from animals of the two experimental groups receiving high fat diet. Fig. 4A shows



**Fig.2: Immunohistochemical localization of SYT1 in liver.** Representative liver micrographs at  $\times 400$  magnification from Apoe-deficient mice fed a western diet. Positive signals of anti-SYT1 immunolabeling are shown in brown, control group (A) and *Syt1* injected Apoe-deficient mice (B) where black arrow shows a hepatocyte with plasma membrane SYT1 enrichment. C and D: negative controls without brown staining of a control and Apoe-deficient mouse respectively.

## RESULTADOS



**Fig. 3: Hepatic lipids in Wild-type (WT) mice fed chow diet.** Hepatic cholesterol (A) and triglyceride (B) content in WT mice. Data represent means and SD for each group. \* $P < 0.003$  between groups according to Mann-Whitney's *U*-test. Relationship between *Syt1* gene expression in liver and hepatic cholesterol (C) and hepatic triglyceride (D). □, Control mice; ▲, *Syt1* injected mice. Correlations were calculated according to Spearman's test.

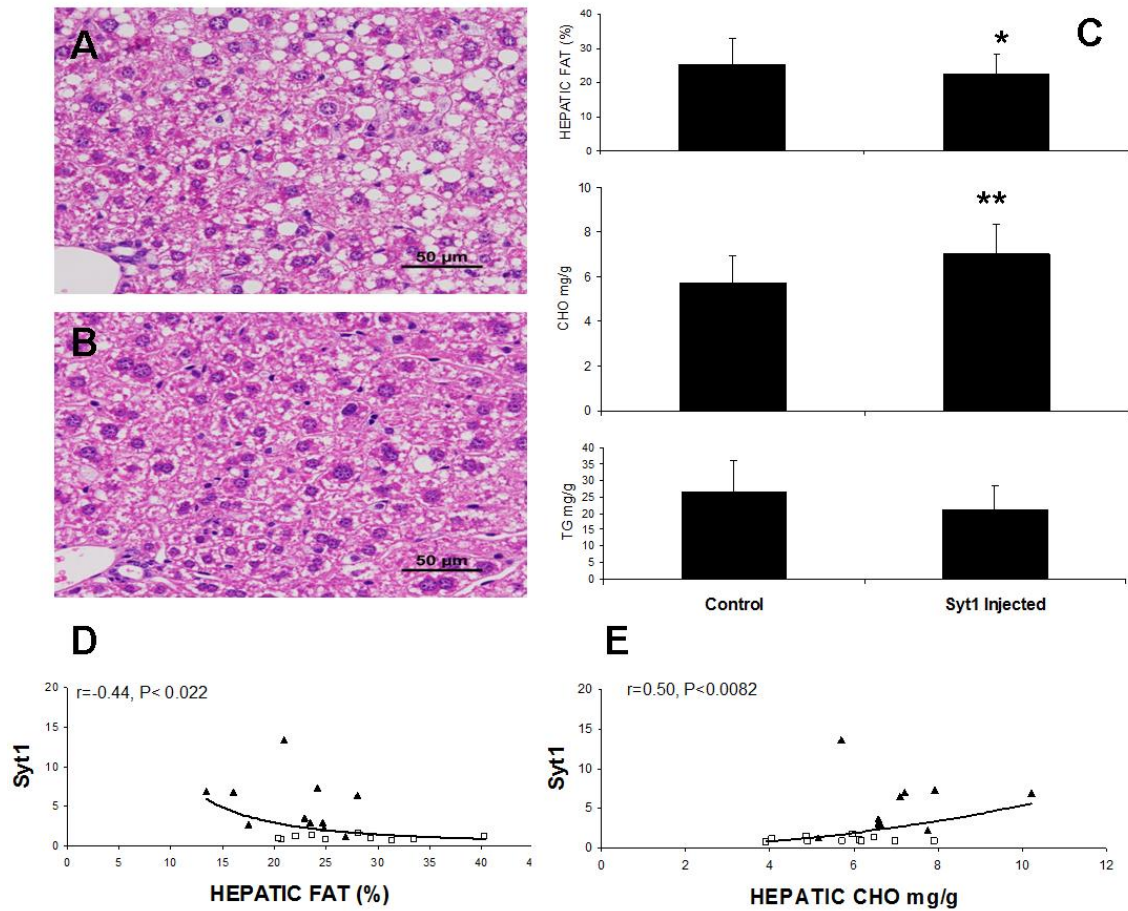
lipid droplets accumulation in the control group in accordance with the described in *ApoE*-deficient mice [408]. Surprisingly, mice overexpressing *Syt1* gene (Fig. 4B) had less accumulation of lipid droplets than those mice without the transgene. Quantitative evaluation of the percentage of hepatic lipid areas of all animals is shown in Fig. 4C. In contrast, hepatic cholesterol content was significantly increased in the injected group while there was no change in triglyceride levels compared to control group. Analyses of association were carried out, Fig. 4D and 4E, between *Syt1* gene expression and the hepatic fat ( $r_s = -0.44$ ;  $P < 0.02$ ) and with hepatic cholesterol ( $r_s = 0.50$ ;  $P < 0.01$ ) and both were significantly associated with *Syt1* overexpression.

### 3.5. Plasma Parameters and Lipoprotein Profile

The effects of *Syt1* injection on plasma parameters in *ApoE*-deficient and WT mice after the experimental period are shown in Table 1. There were no significant differences in triglycerides, neither in plasma glucose in any mouse model, nor in total cholesterol when pLIVE-*Syt1* vector was injected into WT mouse model receiving a chow diet. Nevertheless, *Syt1* overexpression significantly increased total cholesterol levels in *ApoE*-deficient mice feeding a Western diet.

Figure 5 shows the distribution of the plasma parameters in lipoprotein fractions separated by FPLC from the different mouse models. As expected,

## RESULTADOS



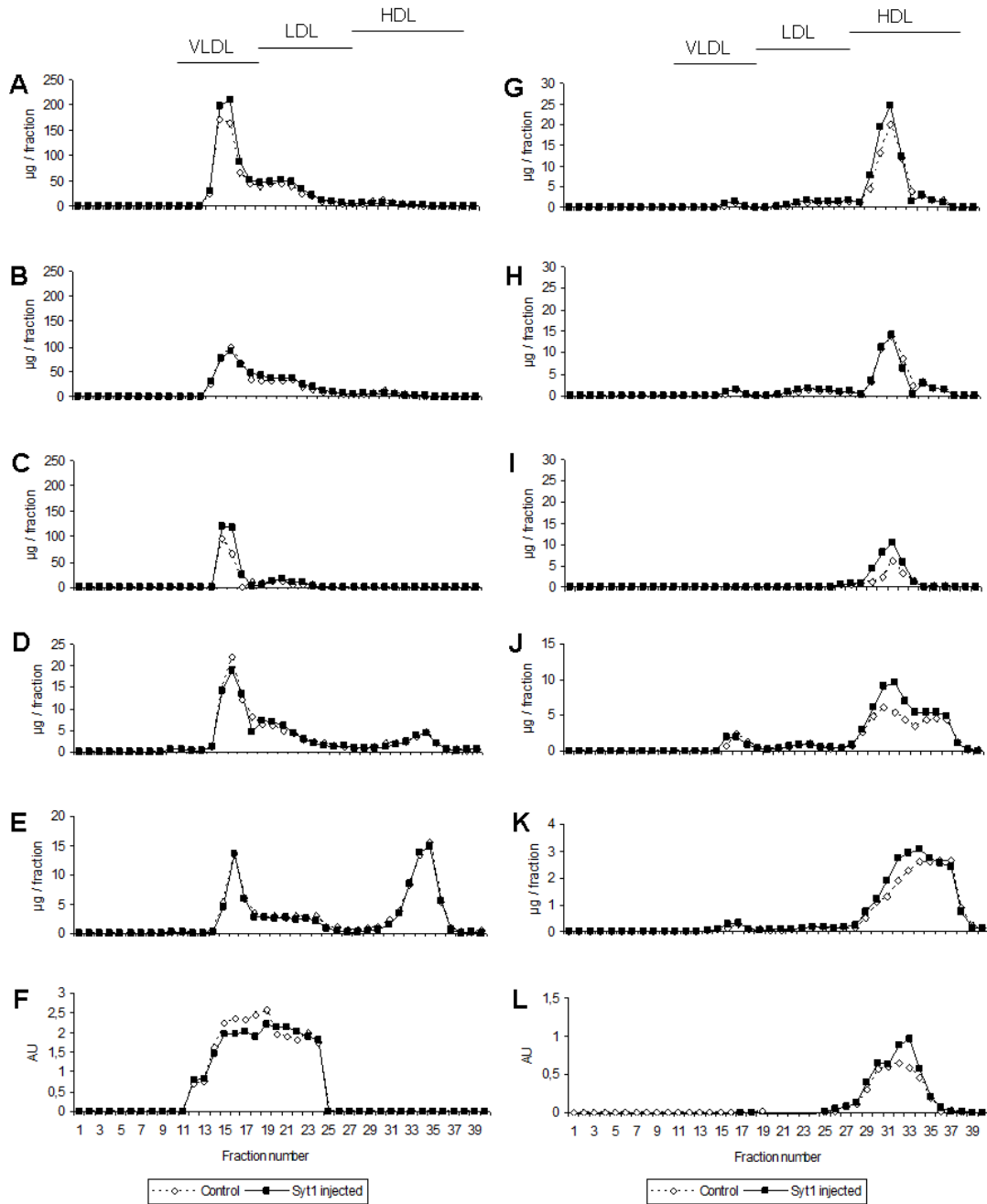
**Fig. 4: Hepatic lipids in *Apoe*-deficient mice fed HFD.** Representative liver micrographs at  $\times 400$  magnification from *Apoe*-deficient mice control group (A) and *Syt1* injected *Apoe*-deficient mice (B) on a western diet. C: Hepatic fat content in *Apoe*-deficient mice as morphometric analysis (top), cholesterol content (middle) and as triglyceride content (bottom). Data represent means and SD for each group. \* $P < 0.04$ ; \*\* $P < 0.01$  between groups according to Mann-Whitney's *U*-test. Relationship between hepatic fat area and *Syt1* gene expression in liver (D). Relationship between hepatic cholesterol and *Syt1* hepatic expression (E).  $\square$ , Control mice;  $\blacktriangle$ , *Syt1* injected mice. Correlations were calculated according to Spearman's test.

Table 1: Plasma parameters in *Apoe*-deficient mice feeding a Western diet and WT mice receiving a chow diet. Data represent means and SD for each group. \* $P < 0.05$  between groups according to Mann-Whitney's *U*-test.

	Apoe knockout		Wild-type	
	Control (n=11)	Syt1 injected (n=11)	Control (n=7)	Syt1 injected (n=8)
Cholesterol (mg/dl)	760 $\pm$ 166	877 $\pm$ 92*	157 $\pm$ 24	161 $\pm$ 12
Triglycerides (mg/dl)	245 $\pm$ 67	216 $\pm$ 44	118 $\pm$ 23	125 $\pm$ 12
Glucose (mg/dl)	438 $\pm$ 104	453 $\pm$ 51	386 $\pm$ 171	468 $\pm$ 137



## RESULTADOS



**Fig. 5: Fast protein liquid chromatography (FPLC) plasma lipoprotein profiles of the two experimental models.** Two independent pools of all mice per experimental group were prepared. Lipoproteins were separated and collected fractions analyzed for total cholesterol (A, G), free cholesterol (B, H), esterified cholesterol (C, I), phosphatidylcholine (D, J) and sphingomyelin (E, K). APOB (F) and APOA1 (L) expressed as arbitrary units (AU). Representative profiles are shown from *Apoe*-deficient mice, left panels (n = 11 for control and n = 11 for *Syt1* injected plasma pool). WT mice, right panels (n = 7 for control and n = 8 for *Syt1* injected plasma pool). Fraction numbers 11–19 corresponded to VLDL, 20–28 to low density lipoproteins and 29–38 to HDL.

cholesterol distribution changed according to the model. In this regard, cholesterol was mainly carried in HDL in WT mice (Fig. 5G) whereas in *Apoe*-

deficient mice it was mainly accumulated in VLDL fraction (Fig. 5A). *Syt1* overexpression in *Apoe*-deficient mice, significantly increased VLDL

## RESULTADOS

cholesterol, mainly due to esterified cholesterol (5C), and modified APOB (5F) distribution, no changes were observed in free cholesterol (5B), neither in phosphatidylcholine nor in sphingomyelin contents. To a lesser degree, an increase in HDL cholesterol in wild-type mice injected with *Syt1* gene was also observed (5G, 5H, 5I). These changes in WT in total (5G) and esterified cholesterol (5I) were accompanied by increased HDL phosphatidylcholine (5J), sphingomyelin (5K) and in APOA1 (5L), but not in APOA4 (data not shown). These results evidence that *Syt1* influences the presence of esterified cholesterol in plasma lipoproteins and modifies their composition depending on APOE.

### 3.6. *Syt1* Injection Effect on the Gene Expression in Livers of Wild-type Mice Fed a Chow Diet

To determine changes on hepatic gene expression induced by *Syt1* overexpression and to elucidate the role of SYT1 in liver, the expression of several genes involved in lipid transport and hepatic metabolism were individually analyzed by qPCR. We observed (Table 2), the increased expression of 16 transcripts and the reduced expression of only 1 transcript in samples of WT mice

injected with pLIVE-*Syt1* construct compared with the control group. Of the 16 genes increased, three encode proteins involved in fatty acid biosynthesis (*Acac-a*, *Acac-b* and *Scd1*), two participate in fatty acid catabolism (*Cpt1* and *Ppargc1b*), three promote triglyceride biosynthesis and transport (*Dgat1*, *Fsp27* and *Mttp*), two activate bile acid biosynthesis (*Cyp7a1* and *Cyp27a1*), one gene provides cholesteryl esters for transport in lipoproteins (*Acat2*), three genes encode proteins involved in lipid transfer to HDL (*Apoa1*, *Apoa2* and *Pltp*), one is a nuclear bile acid receptor that modulates bile acid metabolism and HDL uptake [409] (*Fxr*) and the last one gene codifies a protein associated to microsomal vesicles (*Vamp2*). Moreover the expression of one gene implicated in the bile acid alternative biosynthesis pathway was found repressed (*Cyp7b1*).

### 3.7. *Syt1* Injection Effect on Hepatic SCARB1 level in Wild-type Mice Fed a Chow Diet

Although *Scarb1* mRNA expression levels did not significantly change because of *Syt1* overexpression, *Fxr* a nuclear bile acid receptor which modulates HDL uptake via *Scarb1* did (Table 2). Western blot (Fig. 6A) was

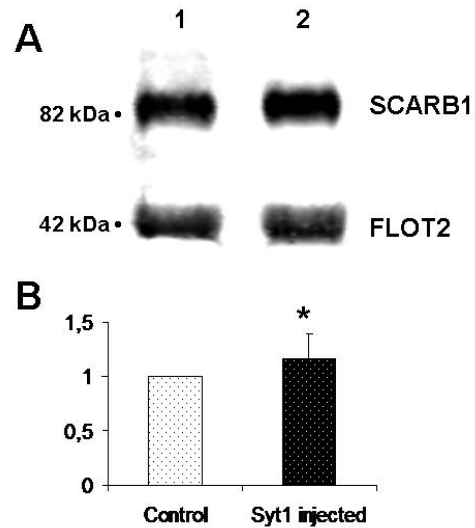
## RESULTADOS

Table 2: Effect of *Syt1* overexpression on hepatic gene expression in Wild-type mice fed a chow diet.

	Control	Syt1 injected
n	7	8
<i>Fatty Acid Biosynthesis</i>		
<i>Acac-a</i>	1.0 ± 0.0	1.3 ± 0.3*
<i>Acac-b</i>	1.0 ± 0.3	1.6 ± 0.3#
<i>Scd1</i>	1.0 ± 0.3	2.5 ± 0.3†
<i>Fatty Acid Catabolism</i>		
<i>Cpt1</i>	1.0 ± 0.2	1.8 ± 0.4†
<i>Ppargc1a</i>	1.0 ± 0.2	1.3 ± 0.5
<i>Ppargc1b</i>	1.0 ± 0.3	2.3 ± 0.9#
<i>TG Transport and Metabolism</i>		
<i>Dgat1</i>	1.0 ± 0.3	1.4 ± 0.3#
<i>Dgat2</i>	1.0 ± 0.2	1.3 ± 0.3
<i>Fsp27</i>	1.1 ± 0.3	2.0 ± 0.8#
<i>Mttp</i>	1.0 ± 0.1	1.4 ± 0.2†
<i>Bile Acid Biosynthesis</i>		
<i>Bsep</i>	1.0 ± 0.2	1.0 ± 0.1
<i>Cyp27a1</i>	1.0 ± 0.3	1.3 ± 0.2*
<i>Cyp7a1</i>	1.2 ± 0.8	2.6 ± 1.5*
<i>Cyp7b1</i>	1.0 ± 0.2	0.8 ± 0.3*
<i>Cholesterol Transport and Metabolism</i>		
<i>Abca1</i>	1.0 ± 0.1	1.1 ± 0.2
<i>Acat1</i>	1.0 ± 0.2	1.2 ± 0.2
<i>Acat2</i>	1.0 ± 0.1	1.6 ± 0.4#
<i>Lcat</i>	1.0 ± 0.2	1.0 ± 0.3
<i>Scarb1</i>	1.0 ± 0.2	1.1 ± 0.3
<i>Lipid transfer</i>		
<i>A1bp</i>	1.0 ± 0.3	1.1 ± 0.1
<i>Apoa1</i>	1.0 ± 0.2	1.5 ± 0.3#
<i>Apoa2</i>	1.0 ± 0.3	1.5 ± 0.1†
<i>Pltp</i>	1.1 ± 0.4	2.9 ± 0.9†
<i>Membrane trafficking</i>		
<i>Sar1a</i>	1.0 ± 0.1	1.1 ± 0.2
<i>Vamp2</i>	1.0 ± 0.2	1.4 ± 0.2#
<i>Transcription factors</i>		
<i>Fxr</i>	1.0 ± 0.3	1.6 ± 0.2#
<i>Lxr</i>	1.0 ± 0.1	1.0 ± 0.2

Data represent arbitrary units (mean ± S.D.) normalized to the *cyclophilin B* expression for each condition with the qPCR. Statistical analyses were carried out with the use of the Mann-Whitney's *U* test. \**P* < 0.05; #*P* < 0.01; †*P* < 0.001.

carried out in plasma membrane fraction of WT mice to quantify changes in SCARB1 receptor due to *Syt1* overexpression because mRNA and protein expression do not always change in parallel according to our experience [386]. Figure 6B shows that plasma membrane protein levels were significantly increased in WT mice injected group.



**Fig. 6: SCARB1 protein expression in WT mice fed a chow diet.** A: Representative Western blot showing the SCARB1 and FLOT2 expressions in plasma membrane fraction of WT control group (lane 1) and WT Syt1 injected group (lane 2). B: quantification of Western results. Data (means ± SD) expressed as arbitrary units normalized to FLOT2 expression are given. Western analysis was carried out as described in MATERIAL AND METHODS. Statistical analysis was done according to Mann-Whitney *U*-test. \**P* < 0.03.

## RESULTADOS

### 3.8. *Syt1* Injection Effect on the Gene Expression in Livers of *Apoe*-deficient Mice Fed a High Fat Diet

Table 3 shows the expression of hepatic genes analyzed by qPCR modified by *Syt1* overexpression in samples of *Apoe*-deficient mice injected with pLIVE-*Syt1* construct compared with control group fed all a HFD. We found modified the expression of 14 transcripts, 9 with an increased expression and 5 genes repressed. Of the 9 transcripts found increased, two participate in fatty acid metabolism (*Acac-a* and *Cpt1*), one is involved in TG transport and VLDL assembly (*Mttp*), one activates the alternative bile acid biosynthesis pathway (*Cyp7b1*), three are involved in cholesterol transport and metabolism (*Abca1*, *Lcat* and *Scarb1*), one encode a protein component of HDL (*Apoa2*) and one gene codified a protein associated to microsomal vesicles (*Vamp2*). Furthermore, of the 5 transcripts repressed, one regulates fatty acid catabolism (*Ppargc1a*), one mediates bile acid biosynthesis (*Cyp7a1*), two esterifies cholesterol (*Acat1* and *Acat2*) and one encodes a protein which binds APOA1 in HDL lipoproteins (*Albp*).

Table 3: Effect of *Syt1* overexpression on hepatic gene expression in *Apoe*-deficient fed a HFD.

	Control	<i>Syt1</i> injected
n	11	11
<i>Fatty Acid Biosynthesis</i>		
<i>Acac-a</i>	1.0 ± 0.1	1.3 ± 0.4*
<i>Acac-b</i>	1.0 ± 0.4	0.9 ± 0.2
<i>Scd1</i>	1.1 ± 0.4	1.1 ± 0.3
<i>Fatty Acid Catabolism</i>		
<i>Cpt1</i>	1.0 ± 0.3	1.3 ± 0.3*
<i>Ppargc1a</i>	1.0 ± 0.3	0.8 ± 0.2*
<i>Ppargc1b</i>	1.1 ± 0.5	0.9 ± 0.3
<i>TG Transport and Metabolism</i>		
<i>Dgat1</i>	1.0 ± 0.2	1.1 ± 0.2
<i>Dgat2</i>	1.0 ± 0.2	0.9 ± 0.0
<i>Fsp27</i>	1.2 ± 0.6	1.3 ± 1.1
<i>Mttp</i>	1.0 ± 0.2	1.3 ± 0.3#
<i>Bile Acid Biosynthesis</i>		
<i>Bsep</i>	1.0 ± 0.2	1.1 ± 0.3
<i>Cyp27a1</i>	1.0 ± 0.2	1.2 ± 0.2
<i>Cyp7a1</i>	1.2 ± 0.8	0.6 ± 0.2#
<i>Cyp7b1</i>	1.0 ± 0.3	1.4 ± 0.4*
<i>Cholesterol Transport and Metabolism</i>		
<i>Abca1</i>	1.0 ± 0.2	1.2 ± 0.3*
<i>Acat1</i>	1.0 ± 0.1	0.8 ± 0.2*
<i>Acat2</i>	1.0 ± 0.1	0.9 ± 0.1*
<i>Lcat</i>	1.0 ± 0.2	1.2 ± 0.2*
<i>Ldlr</i>	1.0 ± 0.2	1.0 ± 0.2
<i>Scarb1</i>	1.0 ± 0.3	1.2 ± 0.3*
<i>Lipid transfer</i>		
<i>Albp</i>	1.0 ± 0.2	0.8 ± 0.2*
<i>Apoa1</i>	1.0 ± 0.2	0.9 ± 0.1
<i>Apoa2</i>	1.1 ± 0.2	1.2 ± 0.3*
<i>Pltp</i>	1.1 ± 0.3	1.3 ± 0.3
<i>Membrane trafficking</i>		
<i>Sar1a</i>	1.0 ± 0.1	1.1 ± 0.1
<i>Vamp2</i>	1.0 ± 0.2	1.3 ± 0.2*
<i>Transcription factors</i>		
<i>Fxr</i>	1.0 ± 0.2	1.0 ± 0.3
<i>Lxr</i>	1.0 ± 0.1	1.0 ± 0.1

Data represent arbitrary units (mean ± S.D.) normalized to the *cyclophilin B* expression for each condition with the qPCR. Statistical analyses were carried out with the use of the Mann-Whitney's *U* test. \**P* < 0.05; #*P* < 0.01.

#### 4. Discussion

The main purpose of this study was to investigate the effect of *Syt1* overexpression in liver as a tool to infer its role in hepatic steatosis. In the present study, hydrodynamic tail vein injection of pLIVE-*Syt1* construct in WT and *ApoE*-deficient mice induced *Syt1* overexpression (Fig. 1A, 1D), which correlated with protein level only in the latter mice. This result could be explained by different genetic backgrounds and diets which may cause different translation times. Lysosomal and plasma membrane fractions were found enriched in SYT1 protein (Fig. 1C) as immunohistochemistry techniques corroborated (Fig 2B). Despite the fact that no changes in protein levels were found in WT injected mice, *Syt1* overexpression clearly caused an alteration in lipid metabolism in both experiments.

The hydrodynamic injection of pLIVE-*Syt1* construct in WT mice compared with the control group fed the same diet triggered significant changes in liver gene expression. Although there were no changes in plasma and hepatic cholesterol, a correlation between *Syt1* expression and hepatic cholesterol content was found (Fig. 3C). The increase in *Syt1* expression may be stimulating

reverse cholesterol transport, briefly outlined in Figure 7A, by increasing *ApoA1*, *ApoA2* and *Pltp* expressions transferring phospholipids and cholesterol to HDL. APOA1 (Fig. 5L) and the increase in phosphatidylcholine (Fig. 5J) and sphingomyelin (Fig. 5K) in HDL fractions support these expression results. Cholesterol is being internalized by liver SCARB1 receptor (Fig. 6) where two processes may occur, part of this cholesterol seems to be transformed into bile acids as indicate the increase in liver of *Cyp7a1* and *Cyp27a1* mRNA expressions to transform cholesterol into bile acids, modulated by *Fxr* expression [409], and some of it is being esterified as *Acat2* expression increased, providing cholesteryl esters for transport in lipoproteins [410]. Furthermore, the increase of *Mttp* expression, required for lipoprotein assembly and secretion [411-414], may be helping to remove cholesterol esters from their site of synthesis, depositing them into apoB lipoproteins for bloodstream secretion [415]. SCARB1 receptors also promote additional exchange of free cholesterol in a bidirectional process regulating cholesterol efflux [416], where nascent APOA1 HDL particles may take it to form larger particles HDL (Fig. 5I), the subsequent conversion of cholesterol to CE by LCAT then drives the net

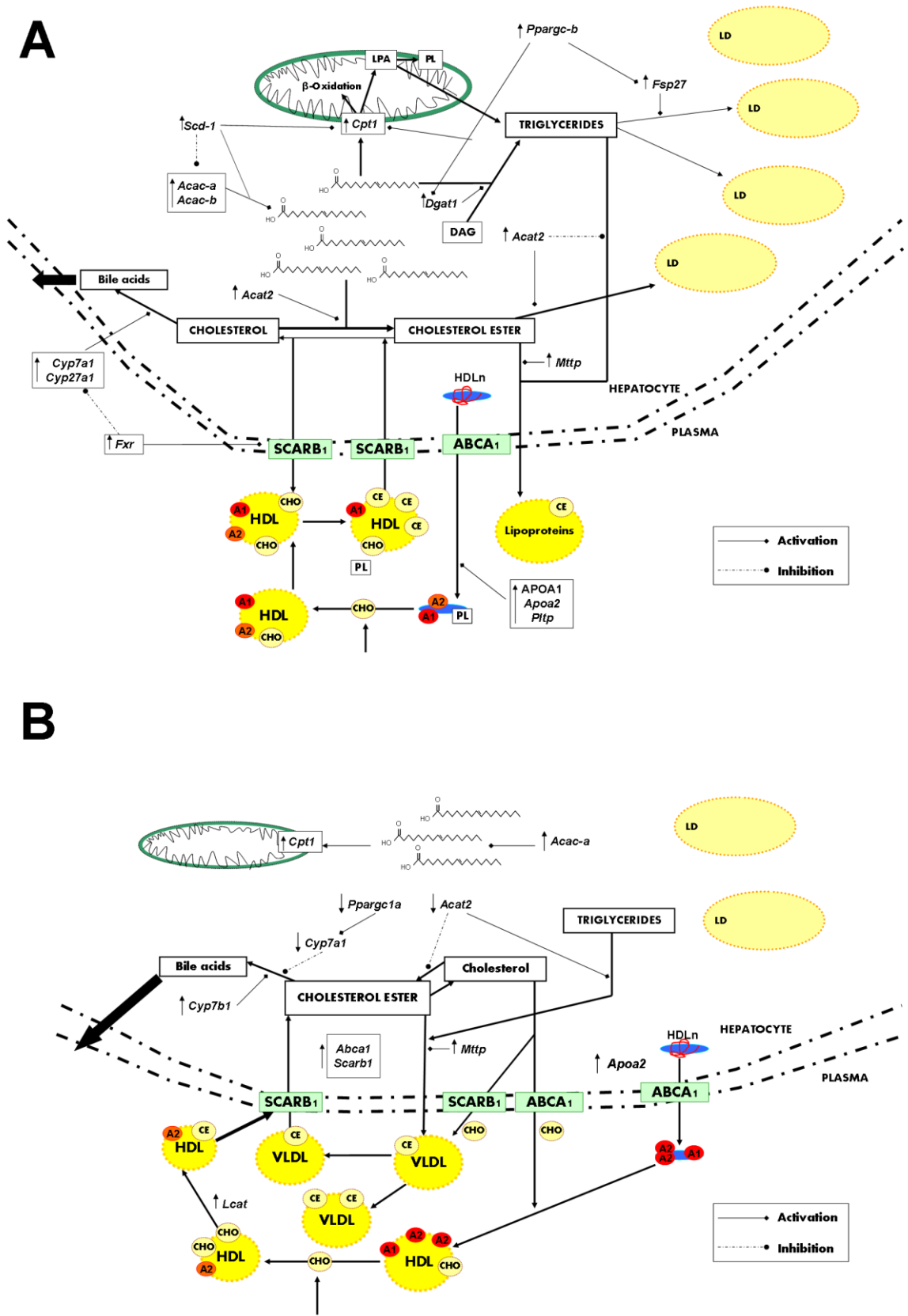
## RESULTADOS

movement of cholesterol along the RCT pathway. A significant increase in hepatic triglyceride content was found in *Syt1*-injected group (Fig. 3B) along with a strong correlation between *Syt1* mRNA expression and hepatic triglycerides in WT mice experiment (Fig. 3D). *Syt1* overexpression seems to be stimulating triglyceride synthesis through *Dgat1* gene expression increase [417]. High levels of *Dgat* enzymes lead to intracellular TG accumulation [418, 419] together with an increase in *Acat2* expression may be responsible for TG accumulation in liver [420] as well as an increase in *Fsp27* expression which promotes triglycerides storage into lipid droplets [421, 422]. Several genes implicated in fatty acids biosynthesis (*Acac-a*, *Acac-b* and *Scd1*) increased its expression. This could be explained by the fact that *Acat2* and *Dgat1* require fatty acids to esterify cholesterol and diacylglycerol respectively. It is known that SCD1 has a role in maintaining energy and cholesterol homeostasis as well as in *de novo* biosynthesis of cholesterol esters and triglycerides through proteins involved in lipid metabolism (for instance, SREBP, GAPC, CPT1 or ACAC) [423-425]. *PGC1B* gene expression coactivates PPAR- $\gamma$ , a member of peroxisome proliferator-activated receptor family (PPARs), present in adipose tissue which

regulates genes involved in adipocyte differentiation, lipid storage and glucose metabolism and is induced in liver by fasting to a lesser extent [426]. *PGC1B* hepatic gene expression coactivates nuclear receptors (NR) such as PPAR- $\gamma$  and PPAR- $\alpha$  and non-NR transcription factors as genes involved in lipogenesis via coactivation of SREBP1c [427, 428]. An increased expression of *Ppargc1b* (Table 2) in liver promotes an adipogenic action not well understood along with the increase of *Fsp27* and *Dgat1* which promotes TG synthesis and storage, and the increase of *Cpt1* expression [429, 430]. *Cpt1* catalyses the conversion of acyl-CoA to acylcarnitine to transfer acyl-CoA from the cytosol into the mitochondria where acyl-CoA could be degraded in  $\beta$ -oxidation process or incorporated at position *sn*-1 to synthesize lysophosphatidic acid (LPA), a TG and PL precursor [431, 432] catalyzed by the mitochondrial glycerol-3-phosphate acyltransferase (GPAT1) isoform enzyme. The latter possibility would contribute to increase TG content.

The observed cholesterol transport response found in WT mice in response to hepatic *Syt1*-overexpression raised the question whether these changes would be particularly striking in *ApoE*-deficient mice fed HFD due to their increased hepatic and plasma TG and CHO levels

RESULTADOS



## RESULTADOS

[433]. Indeed, hepatic (Fig. 4C) and plasma (Table 1) cholesterol levels were significantly increased in *ApoE*-deficient mice injected with pLIVE-*Syt1*. Furthermore, a correlation between *Syt1* expression and hepatic cholesterol content was found (Fig. 4E). In this mouse model, plasma cholesterol accumulated in VLDL fractions as shown in Fig. 5A, suggesting *Syt1* overexpression increased VLDL cholesterol, chiefly due to esterified cholesterol (Fig. 5C). LCAT plays a key role in high-density lipoprotein metabolism, and is believed to be critical in the process of reverse cholesterol transport [434] as well as in increasing biliary cholesterol excretion [435]. It is known that *ApoE*-deficient mice fed a Western diet display 50% reduction in LCAT activity without significant changes in the mRNA expression [436], nonetheless an increase in *Lcat* expression (Table 3) was found in *Syt1*-injected mice which could promote a faster esterification of plasma cholesterol and a more efficient transport by lipoproteins. SCARB1 a plasma membrane protein receptor in the liver facilitates all the phases of reverse cholesterol transport [437], binds a wide variety of lipoprotein class, more tightly to  $\alpha$ -HDL through APOA1/APOA2 [438] protein ratio and mediates both

cholesterol efflux from cells and selective transfer of cholesteryl esters into cells [439]. ABCA1 facilitates the efflux of cellular phospholipids and cholesterol to apolipoprotein acceptors, such as APOA1, and results in the formation of nascent HDL. Although the principal ligand for the uptake of cholesterol through SCARB1 is APOA1, there is growing evidence that APOA2 takes a relevant role in situations where APOA1 synthesis is impaired like it occurs in *ApoE*-deficient mice [440], where an APOA2 deficiency caused a decrease in HDL levels [441]. The decreased expression of *Albp* that codifies a protein which binds APOA1 in HDL supports APOA2 relevance. *Apoa2* is mainly expressed in liver and has also been shown to increase ABCA1 mediated cholesterol efflux. These facts coupled with an increase in *Scarb1*, *Abca1* and *Apoa2* expressions (Table 3) may indicate that *Syt1* overexpression is promoting the reverse cholesterol transport in *ApoE*-deficient mice. These results are inconsistent with other author's findings, for instance *Abca1* overexpression promotes RCT in WT whereas the opposite effect occurs in *ApoE*-deficient mice [442]. Figure 7B shows a hypothetical outline of *Syt1* overexpression effects in *ApoE*-deficient mice, on one hand the increase in *Lcat*,



## RESULTADOS

*Scarb1*, *Abca1* and *Apoa2* expressions along with a decrease in *Acat2* expression [410, 443] may induce liver cholesterol uptake. In addition a repression of *Ppargc1a* expression, a coactivator of PPAR- $\gamma$  and PPAR- $\alpha$ , results in inhibiting transcription of *Cyp7a1* the critical regulatory gene in bile acid synthesis [428], caused an activation of the alternative bile acid synthesis pathway by increasing *Cyp7b1* expression to excrete cholesterol from the liver. On the other hand, *Acat1* expression is decreased in *Syt1* overexpressing mice, ACAT1 enzyme catalyzed the same reaction as ACAT2 but in the liver is localized in Kupffer cells, studies affirm that knockout mice lacking both ACAT1 and APOE showed more severe atherogenic lesions due to free cholesterol induced toxicity [444], but is known that partial inhibition of ACAT1 and ACAT2 activities would retard atherosclerosis development while avoiding adverse tissue effects because of a less severe perturbation of cholesterol homeostasis in *Apoe*-deficient mice [445], so mice overexpressing *Syt1* with a decrease in *Acat1* and *Acat2* expressions might not have such negative atherogenic effects and would require of decreased activity of cholesterol esterases to explain the increased cholesterol esters in VLDL. Although there were no significant

changes in hepatic and plasma TG, a trend to decrease hepatic triglyceride was observed in *Syt1* overexpressing group along with a significant decrease in hepatic fat content compared with the control mice group (Fig.4C), besides a negative correlation between *Syt1* expression and the percentage of hepatic fat was found (Fig. 4D). The mechanism by which TG are being removed from the liver seems complex and still ambiguous because *Syt1* overexpression induces the increase of *Acac-a* and *Cpt1* expressions, a balance between malonyl synthesis and fatty acids activation, regulatory steps in the synthesis and degradation of fatty acids respectively, may be taking place. Previous studies indicate that the presence of CE in liver could limit TG hydrolysis and mobilization from this organ while inhibition of ACAT2 in mouse models of dietary cholesterol-induced NAFLD caused lower hepatic CE levels and also less hepatic TG accumulation [420]. In our study *Syt1* overexpression caused an inhibition of *Acat2* gene expression along with an increase in *Mttp* which in turn is making possible the particles VLDL output loaded with CE, PL and TG. These results support the decrease observed in fat liver content associated with *Syt1* expression (Fig. 4D). Fig. 5 allows us to assume that *Syt1*

## RESULTADOS

overexpression in *ApoE*-deficient and WT mice is influencing the presence of esterified cholesterol in plasma lipoproteins. In addition, *Vamp2*, a vesicle-associate membrane protein, part of the synaptic vesicle docking and fusion complex with a central role in neuroexocytosis, also described in non neuronal tissues [446], increased its hepatic expression in both experiments. Although *Syt1* expression level is lower in hepatocytes than in neurons [116], the positive association between *Syt1* and *Vamp2* in the liver could suggest that both proteins play an active role in exo/endocytosis in this organ, participating in cholesterol and triglyceride efflux.

### Conclusion

Endocytosis and exocytosis are complex processes, still under scrutiny, which involve multiple proteins with little differences among tissues. The reported results may indicate that a vesicle protein could be involved in the complex lipid metabolism in the liver participating in cholesterol efflux or associated with lipoproteins. This study opens new insights on SYT1 to fully understand its regulation and the involvement of this protein in hepatic metabolism.

### Acknowledgments

This research was supported by grants from CICYT-FEDER (SAF2010-14958 and SAF2013-41651-R) and Redes FSE-DGA (B-69). CIBER Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición (CIBEROBN) is an initiative of ISCIII. SSK was recipient of a *Fundación Cuenca-Villoro* fellowship (BE 203/2009).

## RESULTADOS

**Supplementary Table 1:** Primer sequences used for qPCR real time according to MIQE guidelines.

Gene symbol	Accession	Sequence	Length (bp)	Junction	[Primer]	Efficiency (%)
<i>A1bp</i>	NM_144897.3	Fw: CGGCTATTGCCAAGGCTTAT Rw: AAAGTTTGAGGTGTCGCGCA	104	Exon 2-3	100 nM	80
<i>Abca1</i>	NM_013454.3	Fw: GGTTTGGAGATGGTTATAACAATAGTTGT Rw: TTCCCGGAAACGCAAGTC	96	Exon 48-49	100 nM	85
<i>Acac-a</i>	NM_133360.2	Fw: ATGATGGTCTGAAGGCAGCTGA Rw: CTTTTCTGATCCCTTCCCTCC	87	Exon 7-8	100 nM	73
<i>Acac-b</i>	NM_133904.2	Fw: AATGTGGCAGACGCGATGTT Rw: CAACGTCCACAATGTTTCAGCAG	105	Exon 14-15	100 nM	85
<i>Acat1</i>	NM_144784.3	Fw: CCAATGCCAGCACACTGAAC Rw: TCTACGGCAGCATCAGCAA	121	Exon 9-10	100 nM	86
<i>Acat2</i>	NM_009338.3	Fw: TGTCACCCCAGCGAACG Rw: GCTTGGGACCAGGAGACTATT	123	Exon 6-7	100 nM	98
<i>Apoa1</i>	NM_009692.4	Fw: GCTGAACCTGAATCTCCTGGAA Rw: ACTAACGGTTGAACCCAGAGTGTC	59	Exon 3-4	100 nM	95
<i>Apoa2</i>	NM_013474.2	Fw: GGAGAAGGCCAAGACCTCAG Rw: CTGACCTGACAAGGGGTGTC	89	Exon 3-4	100 nM	87
<i>Bsep</i>	NM_021022.3	Fw: TCTCGCTGTCAGTCCTCTCA Rw: TCATCGGCAATAGACCCAGC	114	Exon 8-9	100 nM	94
<i>Cpt1a</i>	NM_013495.2	Fw: TTCAATACTTCCCGCATCCC Rw: TGTGGTACACGACAATGTGCCT	80	Exon 9-10	200 nM	103
<i>Cyp27a1</i>	NM_024264.4	Fw: ACCCAATAAGAGACCACATGGAT Rw: TCAAAGCCTGACGCAGATGG	114	Exon 2-3	100 nM	79
<i>Cyp7a1</i>	NM_007824.2	Fw: CATTACAGAGTGCTGGCCAAGA Rw: CTGTCCGGATATTCAAGGATGC	144	Exon 4-5	100 nM	85
<i>Cyp7b1</i>	NM_007825.4	Fw: AATTGGACAGCTTGGTCTGCCT Rw: TGTGTATGAGTGGAGGAAAGAGGG	172	Exon 4-5	200 nM	104
<i>Dgat1</i>	NM_010046.2	Fw: CGACGGCTACTGGGATCTGA Rw: CAGGATCAGCATCACCACACA	115	Exon 1-3	100 nM	89

## RESULTADOS

<i>Dgat2</i>	NM_026384.3	Fw: GCCATGGAGCTGATCTGGTT Rw: CTTCTTCTGGACCCATCGGC	104	Exon 6-7	100 nM	93
<i>Fsp27</i>	NM_178373.3	Fw: CATCAGAACAGCGCAAGAAGAG Rw: TGTCATAGAGGGTTGCCTTCAC	151	Exon 4-5	100 nM	95
<i>Fxr</i>	NM_001163504.1	Fw: GGCTGCAAAGGTTTCTTCCG Rw: CAGCCAACATCCCCATCTCT	148	Exon 3-4	100 nM	94
<i>Lcat</i>	NM_008490.2	Fw: CGTGGGGTGGTTCATCAAG Rw: TTATGCGCTGCTCCTTTTCA	103	Exon 6	100 nM	88
<i>Ldlr</i>	NM_010700.3	Fw: TTTTGGAGGATGAGAACCGG Rw: GGCCTGAAAATGGCTTCGT	101	Exon 12-13	100 nM	94
<i>Lxr</i>	NM_013839.4	Fw: TACGTCTCCATCAACCACCC Rw: TCTGAATGGACGCTGCTCAA	95	Exon 9-10	100 nM	104
<i>Mtp</i>	NM_001163457.1	Fw: AGACAGCGTGGGCTACAAAA Rw: CCTCTCTGTTGACCCGCATT	135	Exon 4-5	100 nM	95
<i>Pparg1a</i>	NM_008904.2	Fw: GTGTTCCCGATCACCATATTCC Rw: AGGGTGACCTTGAACGTGATCT	152	Exon 8-9	100 nM	93
<i>Pparg1b</i>	NM_133249.2	Fw: TTGTGTCAAGGTGGATGGCA Rw: TTATGCAGTTCGCTACAAGGCC	81	Exon 4-5	100 nM	98
<i>Pltp</i>	NM_011125.2	Fw: AATATGGCCTTCGGGGGAAC Rw: CTGCTGGTTGAGGAGGAACC	90	Exon 5-6	100 nM	90
<i>Ppib</i>	NM_011149.2	Fw: CGAGTCGTCTTTGGACTCTTTG Rw: TAGATGCTCTTTCCTCCTGTGC	182	Exon 2-3	100 nM	90
<i>Sar1a</i>	NM_009120.2	Fw: TTCAGCAGTGTGCTCCAGTT Rw: TGAAGTGGGATGGAGTGTTGG	150	Exon 2-4	100 nM	102
<i>Scarb1</i>	NM_016741.2	Fw: CTCCCAGACATGCTTCCCATAA Rw: CCATTTGTCCACCAGATGGATC	129	Exon 4-5	100 nM	85
<i>Scd1</i>	NM_009127.4	Fw: TGTCTCGGTGTGTGTCGGAGT Rw: TGTACCACTACCTGCCTGCATG	101	Exon 6	100 nM	91
<i>Syt1</i>	FR827897	Fw: GTGGATTTTGGCCACGTCAC Rw: CGGAGGGAGAAGCAGATGTC	95	Exon 6-7	100 nM	102
<i>Vamp2</i>	NM_009497.3	Fw: GGGACCAGAAGTTGTCGGAG Rw: GCGCAGATCACTCCCAAGAT	145	Exon 3-4	100 nM	94





### 4.3 Dietary components and ovarian hormones are important regulators of hepatic synaptotagmin 1 mRNA expression in mice

---

**Background and Purpose:** The mouse hepatic synaptotagmin 1 (SYT1) transcript is 1807 bp length and its expression has been found to be associated with hepatic lipid droplets under certain circumstances. However, its hepatic expression under different dietary conditions and both sexes needs to be addressed.

**Experimental Approaches:** *ApoE*-deficient mice were subjected to eight different experimental conditions for 11 weeks to test the influence of cholesterol, Western diet, squalene, oleanolic acid, sex and surgical castration. After this period, their hepatic *Syt1* mRNA expression was analyzed.

**Key Results:** dietary cholesterol increased hepatic *Syt1* expression, an effect that was enhanced when cholesterol was combined with saturated fat as represented by Western-diet feeding. The latter effect was modified by the administration of 10 mg/kg oleanolic acid. Females showed higher levels of hepatic *Syt1* expression than males either when mice were fed chow- or Western- diets. While surgical castration of males did not modify the expression, ovariectomized females did show decreased levels compared to control females.

**Conclusions and Implications:** hepatic *Syt1* expression has a complex regulation by influence of diet and hormonal milieu. In this way, it may generate more versatility of hepatocytes to adapt, but on the other hand, its study requires careful control of experimental conditions regarding sex and diets.

**Keywords:** synaptotagmin 1, cholesterol, apolipoprotein E deficient mice, squalene, high-fat diet, *Syt1*, sex.

---





## Introduction

Synaptotagmins (SYTs) belong to a family of membrane trafficking proteins characterized by an N-terminal, a variable linker and two C-terminal C<sub>2</sub>-domains, C<sub>2</sub>A and C<sub>2</sub>B, designed to bind Ca<sup>2+</sup> and phospholipids [10]. SYTs are recognized to participate in the docking and fusion of membrane vesicles in different cell types such as neurons, macrophages [49], pituitary cells [50], osteoblasts and osteoclasts [51], airway and gastric mucin-secreting goblet cells [52] and muscle cells [397].

Synaptotagmin 1 (SYT1) is a 65 kDa integral membrane protein of synaptic vesicles and secretory granules in neuronal and neurosecretory tissues [97, 447], where serves as a Ca<sup>2+</sup> sensor in synaptic exocytosis [99]. Likewise, a role in endocytosis has been proposed [92, 100]. In these situations, its Ca<sup>2+</sup> binding properties play an important role in the mechanisms of action [11]. As mentioned for the whole family of SYTs, SYT1 is equally expressed in other tissues. For instance, it binds to the intestinal Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> exchanger 3 and mediates cAMP- and Ca<sup>2+</sup>-induced endocytosis in a process requiring phosphorylation of exchanger 3 in Caco2BBE cell line [121, 122]. In addition, its intestinal mRNA expression was modified by a mixture of conjugated

linoleic acid isomers in rats [123]. SYT1 was found to be localized in the pancreas in acinar cells [448], and on the insulin secretory granules of pancreatic beta-cell lines where it plays an essential role in insulin vesicle exocytosis through its Ca<sup>2+</sup> dependent phospholipid-binding activity [399, 400]. In fact, the pancreatic and duodenal homeobox 1 stimulates insulin secretion in response to high glucose through the positive induction of *Syt1* expression [398]. In kidneys, it also appears to participate in the regulation of podocyte homeostasis [124]. Not surprisingly, a significant association has been reported between SYT1 polymorphisms and creatinine levels, the most important biomarker for non-invasive assessment of kidney function [125]. Using microarray analysis and confirmation by qPCR, our group found differential hepatic *Syt1* gene expression in *ApoE*-deficient mice fed different conjugated linoleic acid isomers added to Western diets. Furthermore, *Syt1* expression levels showed significant associations with hepatic steatosis [12]. Recently, we have characterized the mouse hepatic synaptotagmin 1 transcript as 1807 bp coding for a protein of 421 amino acids with a predicted molecular mass of 47.4 kDa. However, immunoblotting of hepatic protein showed two isoforms,

one with higher molecular mass than the theoretical prediction based on amino acid sequence but lower than the brain masses. Subcellular distribution corresponded to plasma membrane, lysosomes and microsomes. Quantitative mRNA tissue distribution showed that the highest values corresponded to the brain, followed by liver, spleen, abdominal fat, intestine and skeletal muscle. These findings were interpreted as a wide role of this protein in different tissues and with a specific posttranslational modification for the liver function [404]. Based on these facts, it was hypothesized that *Syt1* hepatic regulation might be complex. To this end, the present work was undertaken to characterize the influence of different dietary conditions and sex on *Syt1* gene expression in mouse liver.

### Material and methods

#### *Animals*

*Apoe*-deficient mice on C57BL/6J genetic background were obtained from Charles River (Charles River Laboratories, Barcelona, Spain). *Apoe*-deficient mice on C57BL/6JxOla129 genetic background were generously provided by Dr. Nobuyo Maeda from University of North Carolina at Chapel Hill. Two-month old mice were used, blood samples were taken (after four-hour fasting) from the facial vein to determine

plasma cholesterol and accordingly establish groups with similar initial values. All animals were housed in sterile filter-top cages in rooms maintained under a 12-h light/12-h dark cycle in the *Servicio de Biomedicina y Biomateriales*, University of Zaragoza. All had *ad libitum* access to food and water and study protocols were approved by the Ethics Committee for Animal Research of the University of Zaragoza.

#### *Experimental designs*

A summarize of all undertaken experiments is shown in Table 1.

#### *Effect of dietary cholesterol on Syt1 expression in male C57BL/6JxOla129 Apoe-deficient mice on a commercial chow diet*

Mice were assigned randomly to one of the following experimental groups: a) a control group (n= 7) fed a standard chow diet (B & K Universal Ltd, Humberside, UK), and b) a cholesterol group (n=7) fed a diet supplemented with 0.1% (w/w) cholesterol. The nutritional intervention lasted 10 weeks [383].

#### *Effect of a Western diet on Syt1 expression in male C57BL/6J Apoe-deficient mice.*

## RESULTADOS

Table 1. Summary of experimental conditions using *ApoE*-deficient mice

Experiment	Genetic background	Diet	Sex	Influence
1	C57BL/6J X OLA 129	Commercial chow w/wo cholesterol	Males	Cholesterol
2	C57BL/6J	Purified chow and Western	Males	HFD
3	C57BL/6J	Purified Western w/wo oleanolic	Males	Oleanolic acid
4	C57BL/6J	Purified Western w/wo squalene	Males	Squalene
5	C57BL/6J	Purified chow	Both sexes	Sex in chow diet
6	C57BL/6J	Purified Western	Both sexes	Sex in Western diet
7	C57BL/6J	Purified Western	Castrated and non-castrated males	Castration in males
8	C57BL/6J	Purified Western	Castrated and non-castrated females	Castration in females

HFD, high fat diet; w/wo, with or without

Two study groups were established: a) one group (n=13) received a purified chow diet, and b) the other group (n=9) received a purified Western diet containing 0.15% cholesterol and 20% palm oil (Gustav Heess, S.L., Barcelona, Spain) (Supplementary Table 1) [384].

*Effect of dietary oleanolic acid on Syt1 expression in male C57BL/6J ApoE-deficient mice on a Western diet*

Two study groups were established: a) one group (n=8) received the purified Western diet, and b) the other group (n=9) received the same diet but supplemented with 0.01% oleanolic acid

(Extrasynthese, Genay, France), equivalent to a dose of 10 mg/kg mouse assuming a daily intake of 3 g per mouse [385].

*Effect of dietary squalene on Syt1 expression in male C57BL/6J ApoE-deficient mice on a Western diet*

Two study groups were established: a) one control group of mice (n=9) that received the purified Western diet and b) a treatment group (n=10) that received the same diet but containing 1% squalene (Sigma, Madrid, Spain), equivalent to a dose of 1 g/kg mouse assuming a daily intake of 3 g per mouse [297].

## RESULTADOS

### *Effect of sex on Syt1 expression in C57BL/6J Apoe-deficient mice on a chow diet*

Two study groups were established: a) one group of male (n=13) and b) a second group of female mice (n=13) that received a purified chow diet (Supplementary Table 1) for 11 weeks.

### *Effect of sex on Syt1 expression in C57BL/6J Apoe-deficient mice on a Western diet*

Two study groups were established: a) one group of male (n=9) and b) a second group of female mice (n=10), both receiving the purified Western diet for 11 weeks.

### *Effect of surgical castration on Syt1 expression in male C57BL/6J Apoe-deficient mice on a Western diet*

Two study groups of males were established: a) one control group (n=9) that received a purified Western diet and b) a group of orchietomized mice (n=9) that received the same diet for 11 weeks.

### *Effect of surgical castration on Syt1 expression in female C57BL/6J Apoe-deficient mice on a Western diet*

Two study groups of females were established: a) one control group (n=9) that received a purified Western diet and

b) a group of ovariectomized mice (n=9) that received the same diet for 11 weeks.

### *RNA isolation*

At sacrifice, the livers were immediately removed and frozen in liquid nitrogen. RNA from each liver was isolated using Tri-reagent (AMBION, TX, USA). DNA contaminants were removed by TURBO DNase treatment using the DNA removal kit from AMBION. RNA was quantified by absorbance at  $A_{260/280}$ . The integrity of the 28 S and 18 S ribosomal RNAs was verified by agarose gel electrophoresis.

### *Quantification of mRNA*

The potential changes in *Syt1* mRNA expression were determined by quantitative real-time qPCR analysis of individual samples using equal amounts of DNA-free RNA from each sample of each animal. First-strand cDNA synthesis was performed using the First Strand synthesis kit (Thermo Scientific, Madrid, Spain). qPCR reactions were performed using the Sybr Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA). The primers were designed using Primer Express<sup>®</sup> (Applied Biosystems) and checked by BLAST

## RESULTADOS

analysis (NCBI) to verify gene specificity as well as to get amplification of the cDNA and not of genomic DNA [449]. qPCR reactions were performed in a Step One Real Time PCR System (Applied Biosystems) following the standard procedure. The relative amount of all mRNAs was calculated using the comparative  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method and normalized to the reference *Cyclophilin B* mRNA expression.

### *Liver histology analysis*

Aliquots of liver, stored in neutral formaldehyde, were embedded in paraffin. Sections (4  $\mu\text{m}$ ) were stained with hematoxylin and eosin and observed with a Nikon microscope. Hepatic fat content was evaluated by quantifying the extent of fat droplets in each liver section with Adobe Photoshop 7.0 and expressed as percentage of total liver section [297].

### *Hepatic homogenate preparation*

A piece of liver was homogenized in homogenization buffer (Phosphate buffered solution with protease inhibitor cocktail, Roche) and used to estimate protein concentration that was determined by the BioRad dye binding assay (BioRad, Madrid, Spain).

### *Hepatic lipid extraction*

The total lipids were extracted from the tissue homogenates according to Folch's method [390] using a chloroform-methanol (2:1, v/v) solvent system, and finally dissolved in 100  $\mu\text{l}$  of isopropanol. Cholesterol and triglycerides were measured by colorimetric assay with Infinity kits (Thermo Scientific).

### *Statistical analysis*

Data are shown as means  $\pm$  standard deviation of the values. The data were analyzed using the Statistical Package for Social Sciences (SPSS) program (SPSS, Chicago, IL, USA) or InStat 3.02 software for Windows (GraphPad, S. Diego, CA, USA). For parametric distributions, a Student's t test was employed. When the variables did not show normal distribution (according to the Shapiro-Wilk's test), or failed to show homology of variance, data were analyzed with the Mann-Whitney's U test. Correlations between variables were sought using the Spearman's correlation test. The statistical significance was set at  $p < 0.05$ .

## RESULTADOS

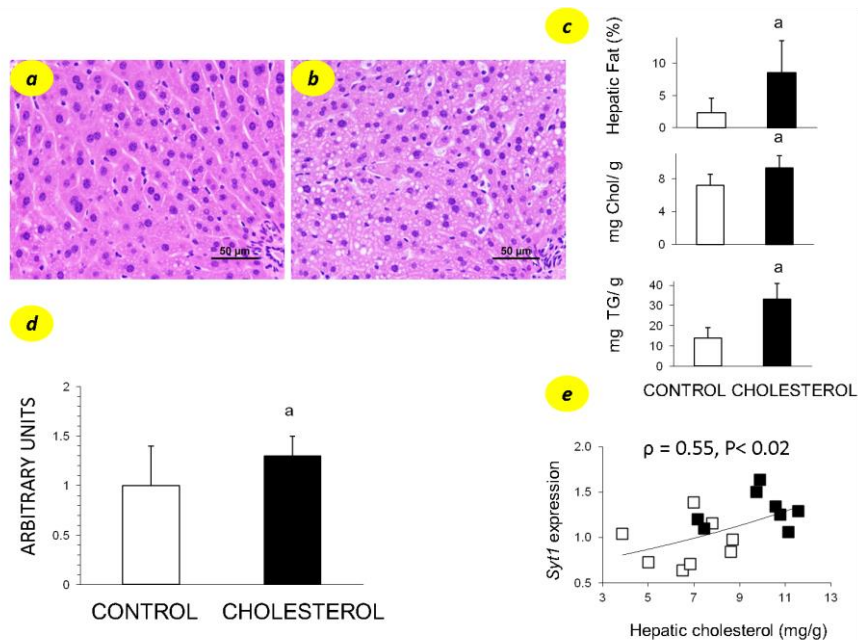
### Results

#### *Nutritional regulation of hepatic Syt1 expression in Apoe-deficient mice.*

To initially characterize the dietary regulation of this gene expression in mice, hepatic RNA samples of males consuming chow diet with and without cholesterol from a previous study [383] were analyzed for *Syt1* expression. The cholesterol supplementation raised hepatic surface occupied by lipid droplets, and hepatic cholesterol and triglyceride contents (Fig. 1a, b and c). As shown in Fig. 1d, the presence of dietary cholesterol induced a modest increase in the hepatic expression of this gene. Hepatic cholesterol content was

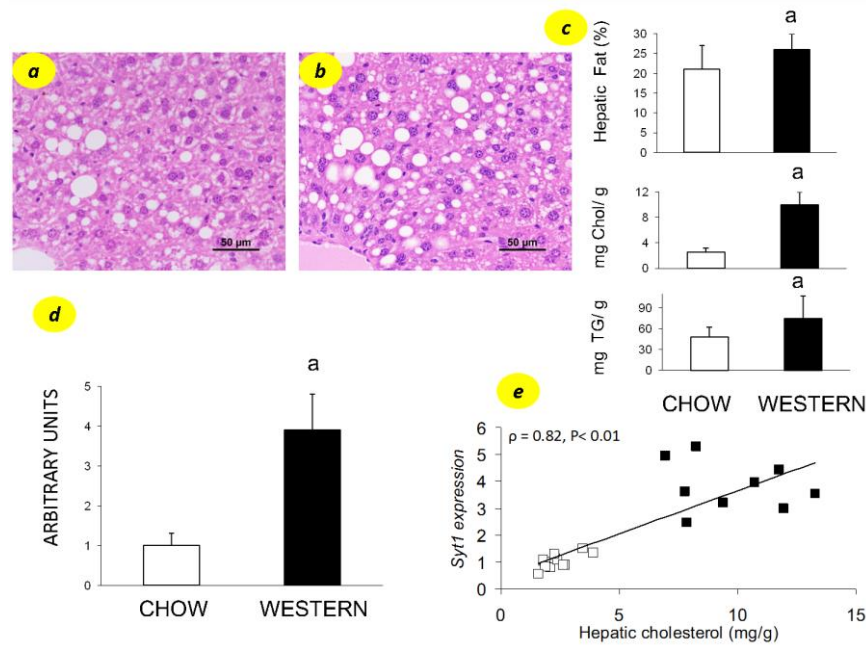
associated with hepatic *Syt1* expression (Fig. 1e).

In a second study, the combination of cholesterol and high fat diet (HFD) containing palm oil as source of long saturated fatty acids, provided as a purified Western diet to male C57BL/6J mice, was studied (Fig. 2). The consumption of a Western diet significantly increased the hepatic area occupied by lipid droplets (Fig. 2a, b and c) as well as hepatic cholesterol and triglyceride contents. In this experimental setting, significant augment of hepatic *Syt1* expression was found (Fig. 2d). Hepatic cholesterol content was associated with hepatic *Syt1* expression (Fig. 2e).



**Fig. 1. Effect of dietary cholesterol on hepatic steatosis and *Syt1* expression in *Apoe*-deficient mice.** Representative liver micrographs at x400 magnification from *Apoe*-deficient mice consuming the chow (a) and cholesterol-enriched (b) diets. Morphometric evaluation of surface of liver section occupied by fat, cholesterol and triglyceride contents (c). Analysis of hepatic *Syt1* expression determined by qPCR normalized to *Cyclophilin B* (d). Data are means  $\pm$  SD for each group. Statistical analyses were done according to Mann-Whitney's U test. <sup>a</sup>,  $P < 0.05$  vs control. Association between hepatic cholesterol content and *Syt1* expression (e). Spearman's correlation is shown.

## RESULTADOS



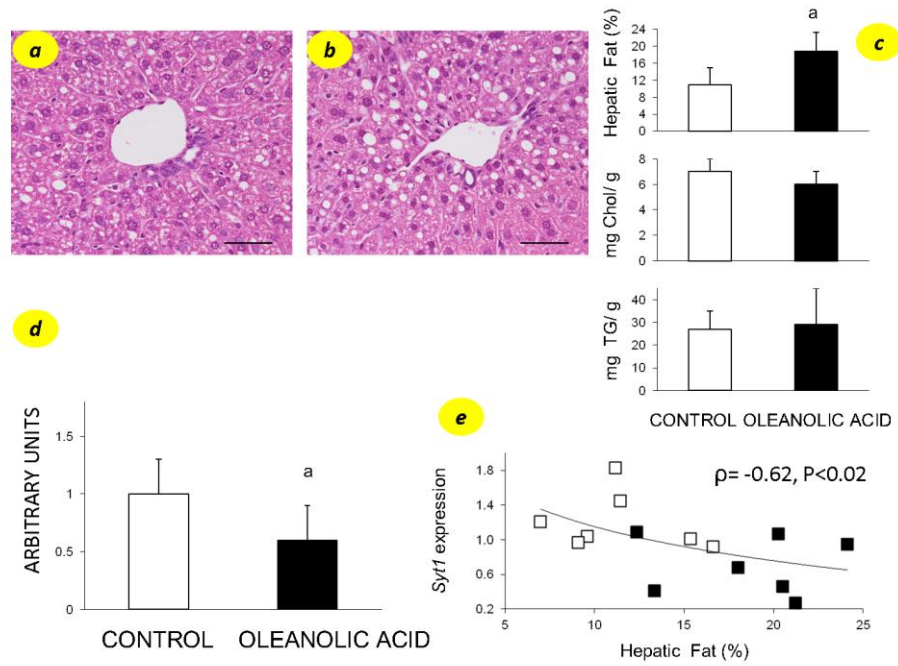
**Fig. 2. Effect of Western diet on hepatic steatosis and *Syt1* expression in *Apoe*-deficient mice.** Representative liver micrographs at x400 magnification from *Apoe*-deficient mice consuming the chow (a) and Western (b) diets. Morphometric evaluation of surface of hepatocyte occupied by fat, cholesterol and triglyceride contents (c). Analysis of hepatic *Syt1* expression determined by qPCR normalized to *Cyclophilin B* (d). Data are means  $\pm$  SD for each group. Statistical analyses were done according to Mann-Whitney's U test. <sup>a</sup>,  $P < 0.01$  vs control. Association between hepatic cholesterol content and *Syt1* expression (e). Spearman's correlation is shown.

Two experiments were set out to investigate whether the increased *Syt1* expression induced by HFD was modulated by other dietary components. In the first one, male mice receiving an oleanolic acid-supplemented Western diet were compared to those receiving this bare diet. Oleanolic acid administration induced a significant reduction of hepatic *Syt1* expression (Fig. 3d), without changes in hepatic cholesterol and triglyceride contents. However, the hepatic area occupied by lipid droplets was found significantly increased and negatively associated with hepatic *Syt1* expression. In the second one, the effect of a squalene-enriched Western diet was equally explored in males. The addition

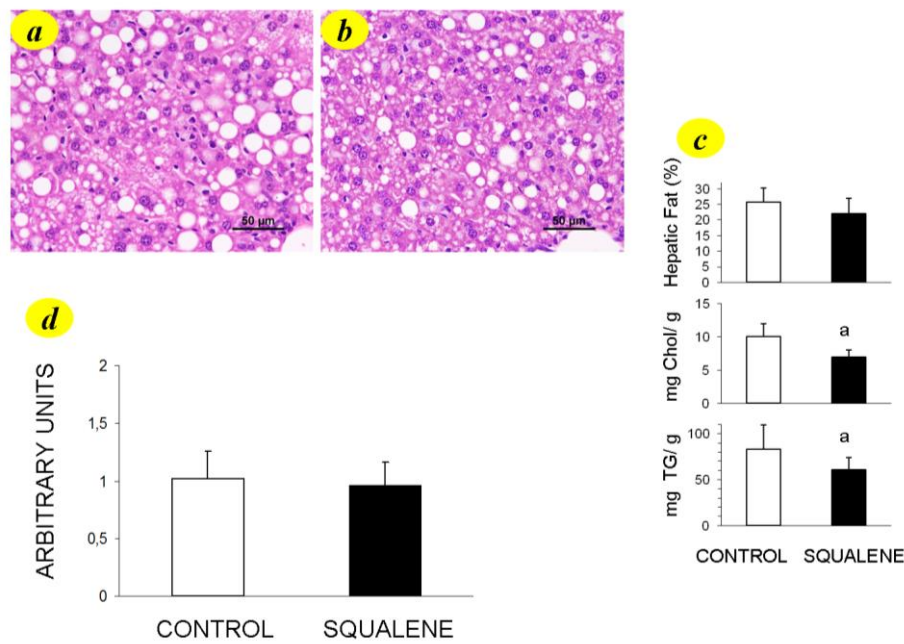
of this did not modified the hepatic *Syt1* expression while liver cholesterol and triglyceride contents decreased (Fig. 4). No significant changes were noted for the percentage of hepatic surface occupied by lipid droplets and nor was there any significant association among hepatic *Syt1* expression and these hepatic parameters.

Overall, these nutritional experiments emphasize that hepatic *Syt1* expression possesses an exquisite nutritional regulation at transcriptional level in *Apoe*-deficient mice, where cholesterol and saturated fat increase its levels, and the latter may be modulated by minor dietary components such as oleanolic acid.

## RESULTADOS



**Fig. 3. Effect of dietary oleanolic acid on hepatic steatosis and *Syt1* expression in *ApoE*-deficient mice fed on a Western diet.** Representative liver micrographs at x400 magnification from *ApoE*-deficient mice consuming the Western (a) and oleanolic acid-enriched (b) diets. Morphometric evaluation of surface of hepatocyte occupied by fat, cholesterol and triglyceride contents (c). Analysis of hepatic *Syt1* expression determined by qPCR normalized to *Cyclophilin B* (d). Data are means  $\pm$  SD for each group. Statistical analyses were done according to Mann-Whitney's U test. <sup>a</sup>,  $P < 0.05$  vs control. Relationship between percentage of hepatic surface occupied by fat and *Syt1* gene expression (e). Open squares correspond to control and black squares to oleanolic acid-fed mice. Correlations were calculated according to Spearman's test.



**Fig. 4. Effect of dietary squalene on hepatic steatosis and *Syt1* expression in *ApoE*-deficient mice fed on a Western diet.** Representative liver micrographs at x400 magnification from *ApoE*-deficient mice consuming the Western (a) and squalene-enriched (b) diets. Morphometric evaluation of surface of hepatocyte occupied by fat, cholesterol and triglyceride contents (c). Analysis of hepatic *Syt1* expression determined by qPCR normalized to *Cyclophilin B* (d). Data are means  $\pm$  SD for each group. Statistical analyses were done according to Mann-Whitney's U test. <sup>a</sup>,  $P < 0.05$  vs control.

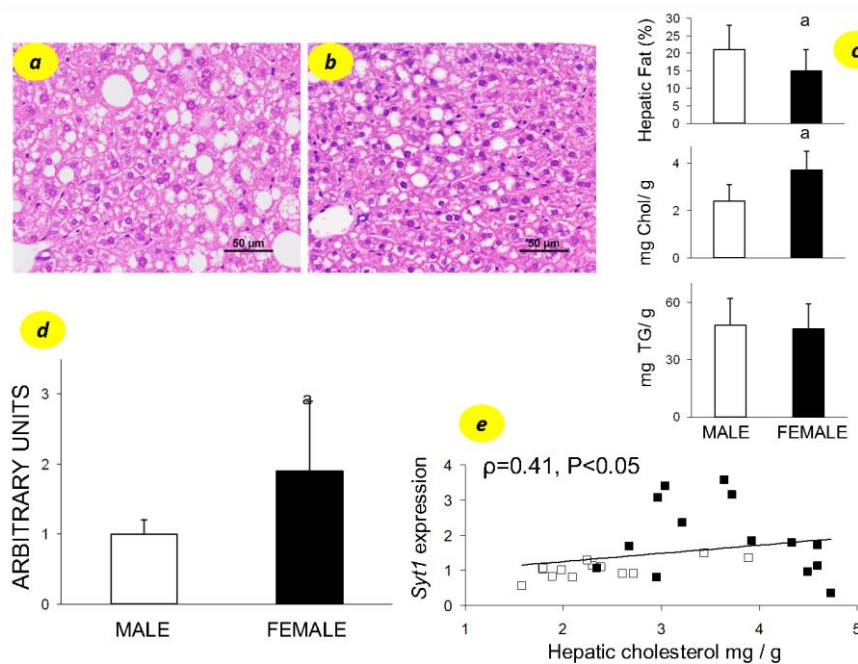


## RESULTADOS

### *Female hormones are involved in hepatic *Syt1* expression in *Apoe*-deficient mice.*

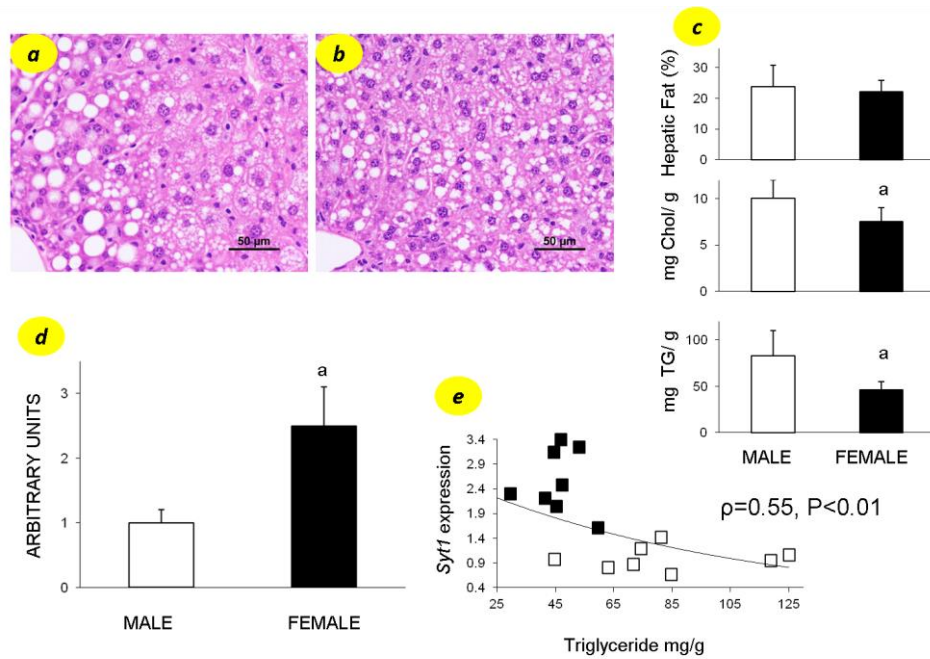
To explore the influence of sex, two different experiments were carried out in *Apoe*-deficient mice. In one of them, males and females were fed a purified chow diet and then their hepatic *Syt1* expression was analyzed. As shown in Fig. 5, females had higher levels of gene expression. Significant higher hepatic cholesterol content in females than in males and no change in triglyceride content were observed. A significant positive association was present between hepatic *Syt1* values and those of hepatic cholesterol. In the second experiment and

due to the above described HFD effect, the influence of sex was also addressed in mice fed a Western diet. As shown in Fig. 6, significant differences between sexes were obtained regarding hepatic *Syt1* expression in this experimental approach. However, no significant change was observed in the percentage of liver surface occupied by lipid droplets, and the levels of hepatic cholesterol and triglycerides were significantly lower in females than in males. An inverse significant associations were also found between hepatic *Syt1* values and those of hepatic triglycerides (Fig. 6e) and hepatic



**Fig. 5. Effect of sex on hepatic steatosis and *Syt1* expression in *Apoe*-deficient mice fed on a chow diet.** Representative liver micrographs at x400 magnification from male (a) and female (b) *Apoe*-deficient mice consuming chow diets. Morphometric evaluation of surface of hepatocyte occupied by fat, cholesterol and triglyceride contents (c). Analysis of hepatic *Syt1* expression determined by qPCR normalized to *Cyclophilin B* (d). Data are means  $\pm$  SD for each group. Statistical analyses were done according to Mann-Whitney's U test. <sup>a</sup>,  $P < 0.05$  vs control. Relationship between percentage of hepatic cholesterol content and *Syt1* gene expression (e). Open squares correspond to males and black squares to females. Correlations were calculated according to Spearman's test.

## RESULTADOS



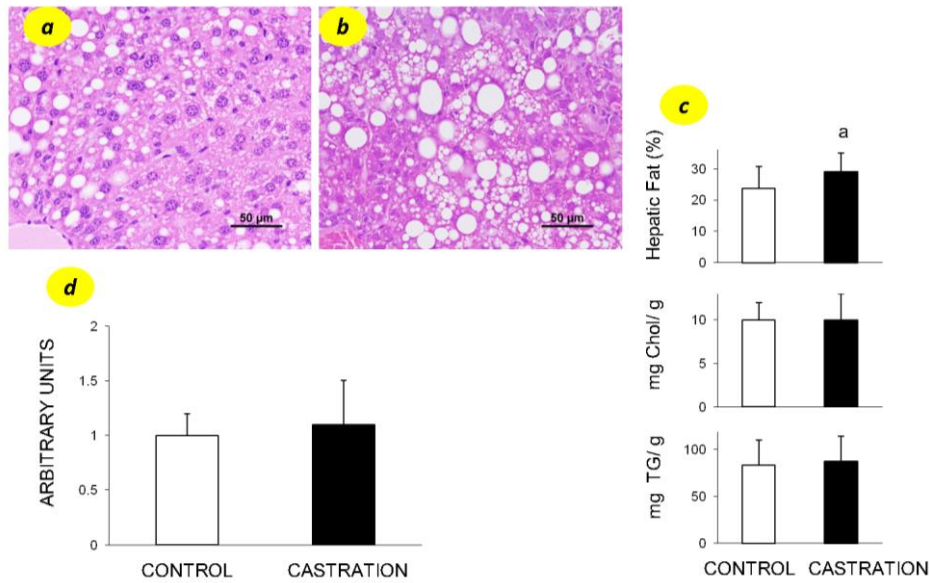
**Fig. 6. Effect of sex on hepatic steatosis and *Syt1* expression in *ApoE*-deficient mice fed on a Western diet.** Representative liver micrographs at x400 magnification from male (a) and female (b) *ApoE*-deficient mice consuming Western diets. Morphometric evaluation of surface of hepatocyte occupied by fat, cholesterol and triglyceride contents (c). Analysis of hepatic *Syt1* expression was determined by qPCR normalized to *Cyclophilin B* (d). Data are means  $\pm$  SD for each group. Statistical analyses were done according to Mann-Whitney's U test. <sup>a</sup>,  $P < 0.05$  vs control. Relationship between percentage of hepatic triglyceride content and *Syt1* gene expression (e). Open squares correspond to males and black squares to females. Correlations were calculated according to Spearman's test.

cholesterol (data not shown). These data indicate that sex, irrespective of diet, is playing an important role in hepatic *Syt1* expression.

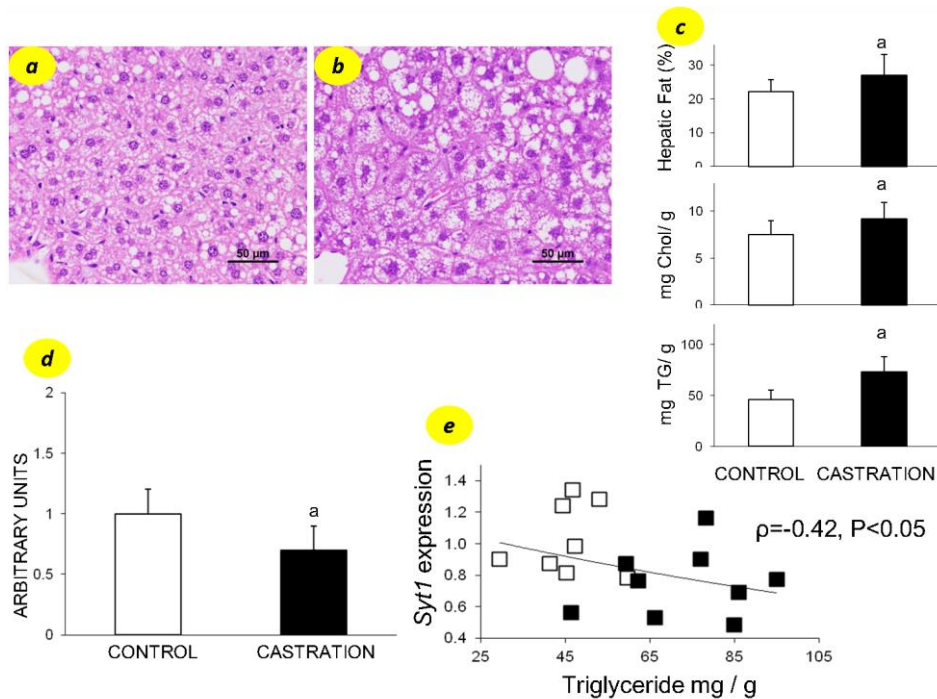
To analyze whether sex-differences were due to hormonal changes, both sex mice underwent surgical castration and were fed a Western diet. As shown in Fig. 7, no significant change in *Syt1* expression was observed in orchietomized males. Neither was there any significant change in hepatic cholesterol, nor in hepatic triglycerides. However, a significant increase was found in the hepatic surface occupied by lipid droplets in orchietomized males. No significant association was obtained

among *Syt1* expression and lipid parameters (data not shown). In contrast, ovariectomized females (Fig. 8) showed a significant decrease in *Syt1* expression compared to control females. Ovariectomy resulted in significant increases in hepatic cholesterol, triglycerides, and in the surface occupied by lipid droplets. Inverse significant associations were also found between hepatic *Syt1* values and those of hepatic triglycerides (Fig. 8e) and cholesterol (data not shown). These results indicate that the liberation of ovarian hormones is necessary to induce the increased hepatic *Syt1* expression observed in females.

## RESULTADOS



**Fig. 7. Effect of orchietomy on hepatic steatosis and *Syt1* expression in male *ApoE*-deficient mice fed on a Western diet.** Representative liver micrographs at x400 magnification from mock (a) and surgically castrated (b) male *ApoE*-deficient mice consuming Western diets. Morphometric evaluation of surface of hepatocyte occupied by fat, cholesterol and triglyceride contents (c). Analysis of hepatic *Syt1* expression determined by qPCR normalized to *Cyclophilin B* (d). Data are means  $\pm$  SD for each group. Statistical analyses were done according to Mann-Whitney's U test. <sup>a</sup>,  $P < 0.05$  vs control.



**Fig. 8. Effect of ovariectomy on hepatic steatosis and *Syt1* expression in female *ApoE*-deficient mice fed on a Western diet.** Representative liver micrographs at x400 magnification from mock (a) and surgically castrated (b) female *ApoE*-deficient mice consuming Western diets. Morphometric evaluation of surface of hepatocyte occupied by fat, cholesterol and triglyceride contents (c). Analysis of hepatic *Syt1* expression determined by qPCR normalized to *Cyclophilin B* (d). Data are means  $\pm$  SD for each group. Statistical analyses were done according to Mann-Whitney's U test. <sup>a</sup>,  $P < 0.05$  vs control. Relationship between percentage of hepatic triglyceride content and *Syt1* gene expression (e). Open squares correspond to males and black squares to females. Correlations were calculated according to Spearman's test.

## Discussion

This experimental approach was aimed to determine putative hepatic *Syt1* transcriptional changes induced by dietary components and sex. We found that in *ApoE*-deficient mouse, dietary cholesterol had a raising effect that was potentiated by combination with saturated fat. The latter was found to be modulated by dietary minor components such as oleanolic acid used at pharmacological doses. Likewise, our endeavor has allowed us to unveil a sex regulation with independence of provided diet, being the female sex a positive regulator. In an attempt to establish the role of sexual hormones, a castration experiment in both sexes has evidenced that ovarian hormones are crucial for the observed increase noted in females.

In a previous study using extreme dietary conditions with conjugated linoleic acid isomers and mixed genetic background C57BL/6JxOla129 *ApoE*-deficient mice, we identified hepatic *Syt1* as an important gene susceptible to vary in response to diet or dramatic changes of hepatic fat [12]. Recently, our group has characterized in detail the mouse hepatic *Syt1* mRNA, finding an important difference in length compared to the brain transcript [404]. The present work has explored the influence of several dietary

components on its hepatic expression, especially cholesterol and saturated fat. This would be in agreement with the results found in mice receiving a n-3 polyunsaturated fatty acid depleted diet and in those deficient in stearoyl-CoA desaturase 1 (Table 2), where saturated fatty acids tend to accumulate in liver. However, the discrepant result observed between mice overexpressing lipin 1-beta and those lacking medium-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase (Table 2) may suggest that the nature of fatty acids is important. In this regard, the different results noted between mice receiving different conjugated linoleic acid isomers [12] reinforce this notion. Overall, nutritional components are critical modulators of hepatic *Syt1* expression.

In this study, the intake of oleanolic acid, a pentacyclic triterpene, decreased *Syt1* expression, so did dietary supplement of *Boswellia serrata*, an extract rich in particular derivatives of boswellic acid, also a pentacyclic triterpene-based compound [450]. However, squalene, a lineal triterpene, did not show the any effect. These data indicate that chemical structure of triterpenes may be crucial in the final outcome of this gene expression. Due to the anti-inflammatory properties of the oleanolic acid and boswellic acid, its

## RESULTADOS

decreasing action would be in agreement with absence of the c-Jun N-terminal kinase 1. This kinase is activated by various stimuli, including UV light, interleukin-1, tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), and CD28 co-stimulation [451], some of which participating in hepatitis too [452]. For this reason, an increased expression was noted in virus B hepatitis, so did in Kupffer depletion (Table 2), whereas, a fulminant hepatitis induced a decrease. These results also point out to a regulation of this gene by the influence of several inflammatory compounds.

A striking result observed in this work was the increased hepatic *Syt1* expression in female mice and its suppression when ovariectomy was undertaken. Interestingly, female mice lacking steroid receptor coactivator-2 also showed decreased hepatic expression of this gene (Table 2). Steroid receptor coactivator-2 promotes the transcriptional activation of estrogen receptor in some tissues [453]. These results are indicating a positive regulation of the gene by the influence of estradiol or other female hormones.

In our initial description of hepatic *Syt1* gene expression [12], we observed significant associations with hepatic steatosis in *Apoe*-deficient mice fed different conjugated linoleic acid isomers, in *Cbs*-deficient mice and in olive oil-fed *Apoe*-deficient mice. When this

association has been searched for in the present study, it has just been observed in the study of oleanolic acid treatment (Fig. 3). Interestingly, *Syt1* expression was associated with hepatic triglycerides (Fig. 6 and 8) or cholesterol (Fig. 1, 2, 5, 6 and 8). Two main differences exist between the former study and the present: genetic background and diet composition. The present study has been conducted using C57BL/6J mice while the previous one used Ola129xC57BL/6J hybrids. These strains have been shown to present important differences in hepatic fat content [454] what could have influenced the outcome. The second important difference is the use of AIN-93 purified diet [387] in the present study compared to commercial ones in the previous one. This choice was forced by the high variability noted in our lab among control mice for years in atherosclerotic lesions when using commercial chows and the failure of obtaining the same batch throughout years. Undoubtedly, dietary components are an important source of variation [455], and in this sense this study in well-defined conditions of mouse strain and purified diets is adding more evidences.

## RESULTADOS

Table 2. Changes in hepatic *Syt1* expression according to Genome Expressed Omnibus data bank.

Experimental condition	Type of change	Accession number
Steroid receptor coactivator-2-deficient female mice	Decreased	GDS4785
SIRT1-deficient mice	Decreased	GDS3666
c-Jun N-terminal kinase 1 depleted livers of diet-induced obese mice	Decreased	GDS3001
Dietary supplement of <i>Boswellia serrata</i>	Decreased	GDS1227
NADPH-cytochrome P450 reductase-deficient mice	Decreased	GSE2362
Medium-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase-deficient	Decreased	GDS4546
Concanavalin A-induced fulminant hepatitis model	Decreased	GDS3752
SIRT4-deficient mice	Increased	GDS4823
Senescent activated hepatic stellate cells	Increased	GDS3492
Mice overexpressing lipin 1-beta	Increased	GDS1349
n-3 polyunsaturated fatty acid depleted diet	Increased	GDS4796
Stearoyl-CoA desaturase 1-deficient mice	Increased	GDS1517
Kupffer cell depletion in high-fat-diet-induced steatosis	Increased	GDS4166
Hepatitis B virus (HBV)-associated acute liver failure in humans	Increased	GDS4387
Glycosylphosphatidylinositol-specific phospholipase D overexpression effect in hepatoma cells	No change	GDS2049

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gds/>. Accessed on 12 October 2014.

In conclusion, the present report evidences three axes of hepatic *Syt1* regulation defined by dietary components, inflammation and sex. Regarding the first one, cholesterol and nature of fatty acids are involved. Anti-inflammatory modulators such as oleanolic acids seem to play a role as well. Finally, the female

increase in hepatic gene expression, not observed in ovariectomized mice, is a fact that suggests that female hormones are involved in hepatic *Syt1* expression.

### Acknowledgments

We thank Silvia Garcés and M<sup>a</sup> Pilar Lierta for their help in maintaining the animals. This research was supported by grants from CICYT-FEDER (SAF2010-14958 and SAF2013-41651-R) and Redes FSE-DGA (B-69). CIBER Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición (CIBEROBN) is an initiative of ISCIII. S.S.K. and M.A.N. were recipients of a *Fundación Cuenca-Villoro* fellowship (BE 203/2009) and a Miguel Servet contract, respectively.

No competing financial interests exist.

Abbreviations used: PCR, polymerase chain reaction; RT, reverse transcriptase.

## RESULTADOS

**Supplementary Table 1:** Composition of purified diets used in the different studies, based on AIN-93 recommended diets for laboratory rodents [387].

Ingredients	Chow (g/kg)	Western (g/kg)
Corn starch <sup>a</sup>	465.7	371.9
Casein <sup>b</sup>	140.0	111.8
Maltodextrin <sup>a</sup>	155.0	123.8
Saccharose <sup>c</sup>	100.0	79.9
Soybean oil <sup>d</sup>	40.0	31.9
Cellulose <sup>e</sup>	50.0	39.9
Mineral mix <sup>f</sup>	35.0	27.9
Vitamin mix <sup>g</sup>	10.0	8.0
Choline bitartrate <sup>h</sup>	2.5	2.0
L-Cystine <sup>h</sup>	1.8	1.4
Cholesterol <sup>h</sup>	--	1.5
Palm oil <sup>i</sup>	--	200

<sup>a</sup> Cargill, Barcelona, Spain

<sup>b</sup> Lactalis Ingredients, Bourgbarré, France

<sup>c</sup> Azucarera Ibérica S.L., Madrid, Spain

<sup>d</sup> Aceites Muñoz, Toledo, Spain

<sup>e</sup> Vitacel R200, Rettenmaier Ibérica S.L, Barcelona, Spain

<sup>f</sup> AIN-93M Mineral Mix (MP Biomedicals, Illkirch, France). The salt mixture contains the following amounts (g/kg): calcium carbonate, 357; monopotassium phosphate, 250; potassium citrate monohydrate, 28; sodium chloride, 74; potassium sulphate, 46.6; magnesium oxide, 24; ferric citrate, 6.06; zinc carbonate, 1.65; manganese carbonate, 0.63; copper carbonate, 0.3; potassium iodate, 0.01; sodium selenate anhydrous, 0.01025; ammonium molybdate.4H<sub>2</sub>O, 0.00795; sodium metasilicate.9H<sub>2</sub>O, 1.45; chromium potassium sulfate.12H<sub>2</sub>O, 0.275; lithium chloride, 0.0174; boric acid, 0.0815; sodium fluoride, 0.0635; nickel carbonate, 0.0318; ammonium vanadate, 0.0066 and powdered sugar, 209.806.



## RESULTADOS

<sup>g</sup> AIN-93-VX Vitamin Mix (MP Biomedicals, Illkirch, France). Vitamin mixture contains the following amounts (mg/kg): nicotinic acid, 3; D-calcium pantothenate, 1.6; pyridoxine HCl, 0.7; thiamine HCl, 0.6; riboflavin, 0.6; folic acid, 0.2; D-biotin, 0.02; vitamin B<sub>12</sub> (0.1% triturated in mannitol), 2.5;  $\alpha$ -tocopherol powder (250 U/g), 30; vitamin A palmitate (250,000 U/g), 1.6; vitamin D<sub>3</sub> (400,000 U/g), 0.25; phylloquinone, 0.075 and powdered sucrose, 959.655.

<sup>h</sup> Sigma-Aldrich Química, Madrid, España

<sup>i</sup> Gustav Heess, Barcelona, Spain



## **5. DISCUSIÓN**



## DISCUSIÓN

La enfermedad del hígado graso no alcohólica (EHGNA) es una de las formas más comunes de enfermedad hepática, sin embargo, hay poca información de la expresión génica hepática que clarifique los eventos moleculares asociados a la enfermedad. Miembros del grupo identificaron nuevos genes, entre ellos *Syt1*, cuyas expresiones parecían estar asociadas al área de gota grasa en el hígado [12].

El desarrollo de la presente tesis doctoral se centra en estudiar la implicación de una proteína de vesículas sinápticas que participa en procesos de exocitosis y endocitosis en la sinapsis química neuronal, en el desarrollo del hígado graso en determinadas situaciones y la importancia de que la regulación de su expresión génica es necesaria para el desarrollo normal de la función que desempeña.

El objetivo de esta investigación fue identificar y caracterizar la *Sinaptotagmina 1* hepática de ratón y estudiar su posible función en la movilización de lípidos hepáticos y su relación con el desarrollo de esteatosis. Para ello se clonó la secuencia hepática codificante de *Syt1* de ratón en un vector de expresión hepático como herramienta para abordar la relación existente entre la sobreexpresión de *Syt1*, parámetros plasmáticos, lípidos hepáticos y la expresión génica hepática. Se utilizaron dos modelos murinos, uno de ellos capaz de desarrollar EHGNA en un corto periodo de tiempo.

Los patrones alimentarios de la sociedad occidental están causando la aparición y un aumento de la prevalencia de enfermedades como la EHGNA. Puesto que la dieta es uno de los reguladores metabólicos más determinante y modificable en cuanto a su composición que influye en el metabolismo lipídico [220], se estudió el efecto de una dieta alta en grasas y de suplementos como colesterol, ácido oleanólico y escualeno sobre la expresión de *Syt1*. Debido al extenso dimorfismo sexual de la expresión génica del hígado [364], se analizó también la influencia del sexo en la expresión de *Syt1*, puesto que estas diferencias de expresión en los genes pueden contribuir a las diferencias sexuales observadas en la fisiopatología hepática [371]. La interpretación de los resultados de esta tesis doctoral se discuten a continuación.

### A) Clonaje y expresión de la sinaptotagmina 1 de ratón

La secuencia hepática de *Syt1* (Fig.1B manuscrito 1) tiene una longitud de 1807 pares de bases (pb) con una secuencia codificante de 1266 pb la cual comienza con un codón de metionina en posición 66 y termina con un codón de terminación TAA en posición 1331, flanqueada por una región en 5' de 66 pb. La región no codificante en 3' tiene 476 pb de longitud desde la base 1332 hasta la 1807 y contiene una cola poli A de 23 pb.

Como se muestra en la Fig. 3A del manuscrito 1, la variante 2 del transcrito de cerebro de *Syt1* (NM\_009306.3) está codificado por 11 exones, mientras que en hígado (FR827897) sólo lo está por 9 (Fig. 3B manuscrito 1). Las diferencias entre los transcritos de *Syt1* de cerebro e hígado radican en las secuencias en 5' y 3', puesto que en hígado la secuencia de *Syt1* en 5' está codificada únicamente por una única región intrónica mientras que en cerebro está codificada por 3 exones. Además la secuencia en 3' del hígado es mucho menor que la del cerebro.

### Homología y conservación

La secuencia aminoacídica predicha para SYT1 isoforma 1 en el hígado muestra una homología del 100% con la secuencia de cerebro y de yeyuno y guarda un 99% de similitud con la isoforma 2 de cerebro.

Además, el análisis BLAST reveló un 99%, 98%, 97% y 97% de homología con su ortólogo, en la rata, vaca, humano y orangután, respectivamente. Este alto grado de conservación entre las especies se debe a la importante función que SYT1 desempeña en las sinapsis neuronales [55].

### Localización de la proteína en hígado

El cDNA hepático de *Syt1* codifica un polipéptido de 421 aminoácidos con un peso molecular de 47.4 kDa correspondiente a la forma inmadura de la proteína (Fig. 6A del manuscrito 1) como se describe también para cerebro. En el hígado la forma madura de la proteína difiere ligeramente de tamaño respecto al peso molecular descrito para cerebro de 65 kDa [402] a pesar de ser una secuencia altamente conservada entre las especies. La diferencia en el tamaño podría ser debida a la ausencia de una glicosilación post-traducciona, ya que la glicosilación de proteínas se ve alterada en enfermedades hepáticas [456] y la muestra utilizada pertenecía a un ratón deficiente en APOE o

## DISCUSIÓN

porque el papel que desempeña fuera del hígado no requiere la glicosilación de la proteína. La proteína SYT1 de cerebro de ratón contiene un sitio de N-glicosilación en la posición del aminoácido 24 (Asn), que es esencial para la orientación de SYT1 en las vesículas de células neuronales [403], pero no en las neuroendocrinas y células no neuronales.

El fraccionamiento subcelular llevado a cabo en hígado y cerebro y los resultados obtenidos por Western-blot muestran en la Fig. 6B (manuscrito 1) la presencia de la proteína en todas las fracciones implicadas en la ruta de secreción: microsomas, fracción lisosómica y de grandes vesículas y membrana plasmática, con la diferencia de que la proteína SYT1 hepática puede tener un patrón de glicosilación diferente.

### Estudio de la expresión en diferentes tejidos

En *M. musculus*, el transcrito de *Syt1* fue detectado en todos los órganos examinados (Fig.5 manuscrito 1), el cerebro fue el órgano donde se encontró una mayor expresión, seguida de hígado, bazo e intestino. No es sorprendente, ya que es en cerebro, donde SYT1 juega un papel importante en la fusión de vesículas durante la transmisión sináptica. Similares resultados de expresión se han descrito mediante secuenciación de RNA de cerebro, cerebelo, corazón, riñón, hígado y testículos ([http://www.ebi.ac.uk/gxa/experiments/E-GEOD-30352?\\_specific=on&queryFactorType=ORGANISM\\_PART&queryFactorValues=&geneQuery=SYT1&exactMatch=true&serializedFilterFactors=ORGANISM:Mus%20musculus](http://www.ebi.ac.uk/gxa/experiments/E-GEOD-30352?_specific=on&queryFactorType=ORGANISM_PART&queryFactorValues=&geneQuery=SYT1&exactMatch=true&serializedFilterFactors=ORGANISM:Mus%20musculus)). La relación observada entre la expresión de hígado y cerebro fue similar a la encontrada en la secuenciación de RNA. La amplia distribución de SYT1 en los diferentes tejidos podría indicar un papel esencial en otros procesos biológicos.

### B) Estudio del efecto de la sobreexpresión hepática de *Syt1*

El constructo pLIVE-*Syt1* fue testado previamente en la línea celular HepG2 de forma satisfactoria antes de su uso en animales. La inyección hidrodinámica en la vena caudal del constructo pLIVE-*Syt1* en WT y en los ratones deficientes en *ApoE* indujo la sobreexpresión de *Syt1* (Fig. 1A, 1D manuscrito 2), la cual correlacionó con el nivel de proteína en todas las fracciones involucradas en la ruta de secreción en los ratones *ApoE*-deficientes pero no se apreció este cambio en los niveles de proteína en los ratones

## DISCUSIÓN

WT inyectados. Este resultado podría deberse al fondo genético de los ratones y a la dieta suministrada en cada experimento que podría originar tiempos de traducción diferentes. El enriquecimiento en proteína SYT1 encontrado en las fracciones lisosomales y de membrana plasmática en hígado de los ratones *ApoE*-deficientes por Western-blot fue corroborado mediante técnicas inmunohistoquímicas (Fig 2B manuscrito 2).

### 1. En ratones wild-type alimentados con una dieta normal

Pese al hecho de que no fueron encontrados cambios significativos de la proteína SYT1 en el hígado de los ratones WT inyectados respecto a los controles, la sobreexpresión de *Syt1* causó claramente alteraciones en el metabolismo lipídico en estos animales.

#### Efecto sobre parámetros plasmáticos

No se encontraron diferencias significativas en los niveles de triglicéridos, ni en la glucosa, ni en el colesterol plasmático total cuando el vector pLIVE-*Syt1* se inyectó en los ratones WT.

Sin embargo, la distribución de algunos parámetros plasmáticos en fracciones lipoproteicas separadas por FPLC (Figura 5 manuscrito 2) se vio modificada, observándose un discreto aumento del colesterol HDL en los ratones inyectados con el transgen de *Syt1*. Este pequeño cambio en el colesterol total HDL se debió fundamentalmente a un incremento en el colesterol esterificado (Fig. 5I manuscrito 2) de los animales inyectados, acompañado además de un aumento en los niveles de APOA1 y de los fosfolípidos fosfatidilcolina y esfingomielina.

#### Efecto sobre los lípidos hepáticos

El contenido de triglicéridos hepáticos fue significativamente mayor (Fig. 3B manuscrito 2) en los ratones inyectados con el constructo pLIVE-*Syt1*, aunque no se encontraron cambios en el colesterol hepático entre los dos grupos experimentales debido a la sobreexpresión de *Syt1*, si que se evidenciaron asociaciones significativas en los análisis de correlación llevados a cabo, entre la expresión de *Syt1* y el contenido de colesterol ( $r_s = 0.44$ ;  $P < 0.05$ ) y triglicéridos ( $r_s = 0.54$ ;  $P < 0.03$ ) hepáticos.



### **Efecto sobre la expresión hepática de genes**

La expresión de varios genes involucrados en el metabolismo lipídico hepático fue analizada por qPCR para clarificar el efecto de la sobreexpresión de *Syt1* sobre los cambios lipídicos observados por la expresión del transgen. De los genes analizados, los ratones WT inyectados con el vector pLIVE-*Syt1* vieron incrementada la expresión de 16 transcritos y la reducción de la expresión de 1 respecto al grupo control.

La correlación positiva encontrada entre la expresión de *Syt1* y el colesterol hepático junto con un aumento en colesterol esterificado, APOA1, fosfatidilcolina y esfingomiélinas en las fracciones HDL causada por la sobreexpresión del transgen parece estar estimulando el transporte reverso de colesterol en los ratones WT inyectados. La Figura 7A del manuscrito 2 trata de resumir el modelo propuesto donde la sobreexpresión de *Syt1* está provocando el incremento de la expresión de *Apoa1*, *Apoa2* y *Pltp*, genes encargados de la transferencia de colesterol en tejidos periféricos y fosfolípidos a las HDL. El análisis por Western-blot de SCARB1 (Fig. 6 manuscrito 2) mostró un aumento de la expresión proteica de dicho receptor hepático en los animales con mayor expresión de *Syt1*, ello contribuiría a la internalización del colesterol HDL en el modelo planteado, además el aumento de la expresión de *Cyp7a1* y *Cyp27a1* estaría favoreciendo su eliminación mediante la transformación de dicho colesterol en ácidos biliares, modulado por *Fxr* [409] cuya expresión se ha encontrado también modificada. El incremento de la expresión de *Acat2* y *Mttp* estaría a su vez regulando la homeostasis del colesterol facilitando su salida como ésteres de colesterol [410] depositándolo en lipoproteínas con apoB [411-414] para ser secretado al torrente sanguíneo [415]. Además el incremento del receptor SCARB1 que promueve el intercambio bidireccional de colesterol libre [416] facilitaría a las partículas HDL nacientes ricas en APOA1 la captación de colesterol libre del hígado que junto con el captado en tejidos periféricos, y la subsecuente esterificación por la LCAT regularían así el flujo de colesterol a través de la ruta reversa de transporte de colesterol.

Por otro lado la sobreexpresión de *Syt1* en los animales WT parece estar estimulando la síntesis y almacenaje de TG puesto que un incremento significativo del contenido de triglicéridos hepáticos y su correlación con la expresión de *Syt1* en los animales que fueron inyectados con el constructo pLIVE-*Syt1* estuvo acompañado por el incremento de la expresión de *Dgat1* [417], enzima que estimula la síntesis y acumulación de TG intracelulares [418, 419], así como el aumento de *Acat2* que

## DISCUSIÓN

también favorece su acumulación [420] y *Fsp27* que promueve su almacenamiento en las gotas lipídicas [421, 422].

Varios genes implicados en la síntesis de ácidos grasos (*Acac-a*, *Acac-b* y *Scd1*) vieron aumentada su expresión debido a la sobreexpresión de *Syt1*, esto podría explicarse por el hecho de que *Acat2* y *Dgat1* requieren ácidos grasos para la esterificación del colesterol y triglicéridos respectivamente.

SCD1 tiene un papel en el mantenimiento de la energía y la homeostasis del colesterol, así como la biosíntesis *de novo* de ésteres de colesterol y triglicéridos a través de la regulación de proteínas implicadas en el metabolismo lipídico (como por ejemplo, SREBP, GAPT, CPT1 o ACAC) [423-425]. La expresión hepática de PGC1B coactiva receptores nucleares como PPAR- $\gamma$  y PPAR- $\alpha$  y factores de transcripción no nucleares como genes involucrados en la lipogénesis a través de SREBP1c [427, 428]. El aumento de la expresión de *Ppargc1b* en el hígado está promoviendo una acción adipogénica no muy bien entendida con el aumento de la expresión de *Fsp27* y *Dgat1* que favorecen la síntesis y almacenamiento de TG, y el aumento de la expresión *Cpt1* [429, 430], la cual cataliza la conversión de acil-CoA a acilcarnitina para transferir ácidos grasos del citosol a la mitocondria donde éste puede ser degradado en el proceso de  $\beta$ -oxidación o incorporado a la posición *sn*-1 del glicerol para sintetizar ácido lisofosfatídico, un precursor de TG y PL [431, 432]. Esta última posibilidad contribuiría a aumentar el contenido de TG y PL descritos anteriormente.

### **2. En ratones deficientes de APOE alimentados con una dieta alta en grasas**

La respuesta observada en animales *wild-type* debido a la sobreexpresión hepática de *Syt1* planteó la cuestión de si estos cambios serían especialmente llamativos en ratones *Apoe*-deficientes que desarrollan una rápida esteatosis en poco tiempo debido a su fondo genético y a una alimentación alta en grasas [433].

#### **Efecto sobre parámetros plasmáticos**

Como se observó en el modelo de ratón *wild-type* no se encontraron cambios en los niveles plasmáticos de glucosa ni de triglicéridos debido a la sobreexpresión de *Syt1*. Sin embargo, si se encontró un aumento significativo en los niveles de colesterol total en ratones *Apoe*-deficientes alimentados con una dieta occidental que fueron inyectados con el vector pLIVE-*Syt1*.

## DISCUSIÓN

En la distribución del colesterol en fracciones lipoproteicas separadas por FPLC (Fig. 5 manuscrito 2) se observó un cambio en el perfil del colesterol en los ratones inyectados con el vector pLIVE-*Syt1* con un aumento del colesterol total acumulado principalmente en fracciones VLDL, como es de esperar para este modelo animal. Este aumento en el colesterol total debido a la sobreexpresión de *Syt1* se debió mayormente a un aumento en el colesterol esterificado. La distribución de APOB se encontró modificada en menor medida, por otro lado no se encontraron cambios en el contenido de fosfolípidos.

### **Efecto sobre la gota lipídica y los lípidos hepáticos**

La figura 4 del manuscrito 2 muestra imágenes histológicas representativas de hígados de los animales de los dos grupos experimentales que recibieron la dieta alta en grasas. De acuerdo con lo descrito para los ratones *ApoE*-deficientes [408], el grupo control presentó una acumulación de gotas lipídicas, mientras que los ratones que sobreexpresaban *Syt1* mostraron sorprendentemente una menor acumulación. Por el contrario no se observaron cambios en los niveles de triglicéridos aunque sí una tendencia a su descenso. Sí se encontró un aumento significativo en el contenido de colesterol hepático en los animales inyectados con el transgen de *Syt1* respecto a los ratones del grupo control.

Los análisis de asociación llevados a cabo mostraron una correlación negativa entre la expresión de *Syt1* y el porcentaje de gota grasa ( $r_s = -0.44$ ;  $P < 0.02$ ) y una correlación positiva con el contenido de colesterol hepático ( $r_s = 0.50$ ;  $P < 0.01$ ). Ambas significativamente asociadas con la sobreexpresión de *Syt1*.

### **Efecto sobre la expresión hepática de genes**

La expresión de varios genes involucrados en el metabolismo lipídico hepático fue analizada por qPCR para clarificar el efecto de la sobreexpresión de *Syt1* sobre los cambios lipídicos observados por la expresión del transgen. La sobreexpresión de *Syt1* en los ratones *ApoE*-deficientes inyectados con el constructo pLIVE-*Syt1* indujo la modificación significativa de la expresión de 14 transcritos, de los cuales 9 incrementaron su expresión y 5 genes se vieron reprimidos respecto al grupo control.

Los ratones *ApoE*-deficientes con una mayor expresión de *Syt1* presentaron un contenido de colesterol hepático significativamente mayor que los no inyectados, de igual manera que en animales WT los niveles de colesterol correlacionaron

## DISCUSIÓN

positivamente con la expresión de *Syt1*. El colesterol plasmático aumentado en las fracciones VLDL de los animales inyectados con pLIVE-*Syt1* se debió a un aumento del colesterol esterificado en dichas fracciones. Los ratones *ApoE*-deficientes que consumen dietas altas en grasas presentan una reducción de la actividad LCAT del 50% [436], enzima importante en el metabolismo de las HDL, crítica en el proceso de RCT [434] y en la conversión del colesterol a ácidos biliares para su excreción [435]. En nuestro estudio, la sobreexpresión de *Syt1* provocó el aumento de la expresión de *Lcat* la cual podría estar contribuyendo a una esterificación más rápida del colesterol plasmático y a un transporte más eficiente por las lipoproteínas. ABCA1 media el flujo de fosfolípidos y colesterol de las células a apolipoproteínas aceptoras, como APOA1, que resulta en la formación de HDLs nacientes. El receptor SCARB1 en el hígado facilita todas las fases del RCT [437], une una amplia variedad de lipoproteínas, más estrechamente a las  $\alpha$ -HDL a través de un ratio APOA1 / APOA2 adecuado [438] y regula el flujo bidireccional de colesterol [439]. Aunque el principal ligando de SCARB1 para la captación de colesterol sea APOA1, existe una creciente evidencia de que APOA2 toma un papel relevante en situaciones en las que se altera la síntesis de APOA1 como ocurre en los ratones *ApoE*-deficientes [440], donde una deficiencia en APOA2 causa una disminución en los niveles de HDL [441]. La disminución de la expresión encontrada en nuestro estudio de *Albp* que codifica una proteína que se une a APOA1 en HDL apoya la relevancia de APOA2 en estas situaciones. *Apoa2* se expresa principalmente en el hígado y se ha demostrado que incrementa el flujo de colesterol a través de ABCA1. Estos hechos, junto con un aumento de la expresión de *Scarb1*, *Abca1* y *Apoa2* (Tabla 3 manuscrito 2) podrían indicar que la sobreexpresión de *Syt1* está promoviendo el transporte reverso del colesterol en ratones *ApoE*-deficientes.

La figura 7B del manuscrito 2 resume el hipotético efecto causado por la sobreexpresión de *Syt1* en los ratones *ApoE*-deficientes. Por un lado el incremento de la expresión de genes como *Lcat*, *Scarb1*, *Abca1* y *Apoa2* junto con la reducción de la expresión de *Acat2* [410, 443] estarían facilitando el flujo de colesterol en el hígado. Además la represión de *Ppargc1a* resulta en la inhibición de *Cyp7a1*, gen regulador de la síntesis de ácidos biliares [428], causando la activación de la ruta alternativa de la síntesis de ácidos biliares a través de un aumento de la expresión de *Cyp7b1* para la excreción de colesterol del hígado. Por otro lado, la expresión de *Acat1* en los ratones que sobreexpresan *Syt1* se encuentra disminuída. Ratones deficientes en ACAT1 y APOE muestran severas lesiones aterogénicas debido a la toxicidad del colesterol libre

## DISCUSIÓN

[444], pero una disminución parcial de la actividad de ACAT1 y ACAT2 evitaría dichos efectos por la perturbación menos severa en la homeostasis del colesterol [445], así que los ratones que sobreexpresan *Syt1* con una disminución de expresiones de *Acat1* y *Acat2* podrían no tener tales efectos negativos aterogénicos y requerirían de la disminución de la actividad esterasa junto con el incremento encontrado de *Mttp* para explicar el aumento de los ésteres de colesterol en VLDL.

Aunque no se encontraron cambios significativos en el contenido de TG hepáticos ni plasmáticos si se observó una tendencia a su disminución en el grupo que sobreexpresaba *Syt1* junto a un descenso significativo de la gota lipídica respecto al grupo control además de una correlación negativa entre la expresión de *Syt1* y el porcentaje de gota grasa. El mecanismo por el cual los TG pudieran estar siendo eliminados del hígado parece complejo y ambiguo puesto que la sobreexpresión de *Syt1* indujo el incremento de la expresión de *Acac-a* y *Cpt1*, un equilibrio entre la síntesis de malonil y activación de ácidos grasos, etapas reguladoras en la síntesis y degradación de los ácidos grasos respectivamente, podría estar ocurriendo. Estudios previos indican que la presencia de CE en el hígado limitaría la movilización e hidrólisis de TG pero que una inhibición de ACAT2 en modelos animales con dietas altas en colesterol que inducen EHGNA causaría menor CE en hígado y un menor acúmulo de TG en el hígado [420]. Estos resultados apoyarían la disminución observada en el contenido de grasa del hígado asociada con la expresión de *Syt1*.

La Figura 5 del manuscrito 2 nos permite suponer que la sobreexpresión de *Syt1* en ratones *Apoe*-deficientes y WT está influyendo en la presencia de colesterol esterificado en las lipoproteínas plasmáticas. Además, VAMP2, una proteína de membrana asociada a vesículas sinápticas, con un papel central en la neuroexocitosis, también descrita en tejidos no neuronales [446], vio aumentada su expresión hepática en ambos experimentos debido a la sobreexpresión del transgen. Aunque el nivel basal de expresión de *Syt1* es menor en los hepatocitos que en las neuronas [116], la asociación positiva entre *Syt1* y *Vamp2* en el hígado podría sugerir que ambas proteínas juegan un papel activo en la exo/endocitosis en este órgano, participando en el flujo de colesterol y lipoproteínas.

### **C) Estudio de la dieta y el efecto hormonal en la expresión hepática de *Syt1***

Ratones *ApoE*-deficientes que desarrollan esteatosis en un corto periodo de tiempo se sometieron a ocho diferentes condiciones experimentales durante 11 semanas para probar la influencia del colesterol, dieta occidental, escualeno, ácido oleanólico, el sexo y la castración quirúrgica. Después de este período, se analizó la expresión hepática de *Syt1*.

#### **1. Efecto colesterol y dieta alta en grasas**

Para caracterizar inicialmente la regulación dietética de este gen y teniendo en cuenta la correlación positiva de la expresión de *Syt1* con el colesterol hepático en los dos estudios de sobreexpresión anteriormente mencionados, la expresión de *Syt1* fue analizada a partir de un estudio previo [383] donde ratones macho consumían una dieta normal con y sin colesterol. La suplementación con el colesterol elevó la superficie ocupada por las gotas lipídicas y el contenido hepático de colesterol y triglicéridos (Fig.1 manuscrito 3). La suplementación de colesterol en la dieta indujo un modesto incremento significativo de la expresión hepática de *Syt1*, aunque aquellos animales con una mayor expresión de *Syt1* resultaron tener un mayor contenido de colesterol hepático hallando una correlación positiva significativa entre ambas variables.

La suplementación con colesterol fue combinada con una dieta alta en grasas que contenía aceite de palma como fuente de ácidos grasos saturados largos, suministrada como una dieta occidental a ratones macho. El consumo de la dieta occidental provocó un aumento significativo de triglicéridos y colesterol hepáticos así como un aumento de la superficie de gota grasa. En este experimento la expresión de *Syt1* se vio significativamente aumentada en aquellos animales que consumieron la dieta occidental y una fuerte correlación se encontró entre dicha expresión y el contenido de colesterol hepático (Fig. 2e manuscrito 3).

Estos resultados concuerdan con aquellos encontrados en la base de datos GEO (Tabla 2 manuscrito 3), donde ratones que recibieron una dieta empobrecida en ácido graso poliinsaturado n-3 y aquellos deficientes en esteroil-CoA desaturasa 1 acumulaban ácidos grasos saturados en el hígado, sin embargo discrepan con la expresión de *Syt1* observada entre los ratones que sobreexpresan lipin 1-beta y los que carecen de la acil-coenzima A deshidrogenasa que rompe ácidos grasos de cadena

## DISCUSIÓN

media, estos datos sugieren que la naturaleza de los ácidos grasos es importante y concuerda con los diferentes resultados observados entre los ratones que recibieron diferentes isómeros de ácido linoleico conjugado [12].

### **2. Efecto suplementación con oleanólico y escualeno**

Dos experimentos analizaron la posible modulación por otros componentes dietéticos de la expresión de *Syt1* inducida por la dieta alta en grasas.

#### **Suplementación con oleanólico**

La suplementación con oleanólico a uno de los grupos de ratones macho que consumían la dieta alta en grasa indujo la reducción significativa de la expresión hepática de *Syt1*, también lo hizo el suplemento dietético de *Boswellia serrata*, un extracto indio rico en derivados de ácido boswélico, también un triterpeno pentacíclico. [450]. El suplemento con oleanólico no indujo cambios en el contenido hepático de triglicéridos ni colesterol. A diferencia de los estudios anteriores no se encontró correlación de la expresión del gen con el colesterol hepático pero si una correlación negativa con el área de gota grasa ocupada, donde aquellos animales con una menor expresión de *Syt1* presentaban mayor superficie ocupada por la gota grasa. Esta asociación fue también encontrada en los primeros estudios llevados a cabo por el grupo en los que se suplementaba con diferentes isómeros del CLA o con aceite de oliva [12].

#### **Suplementación con escualeno**

La adición de escualeno a una dieta alta en grasas en ratones macho no modificó la expresión hepática de *Syt1*, la suplementación disminuyó el contenido de colesterol y triglicéridos hepáticos. No se observaron cambios significativos en el porcentaje de la superficie hepática ocupada por las gotas lipídicas ni ninguna asociación significativa entre la expresión de *Syt1* y estos parámetros hepáticos. Estos datos indican que la estructura química de los triterpenos puede ser crucial en el resultado final de la expresión del gen, puesto que el escualeno es un triterpeno lineal y el oleanólico y el ácido boswélico son pentacíclicos además de tener propiedades antiinflamatorias. Además la expresión de *Syt1* se encontró aumentada en situaciones donde el hígado padecía procesos inflamatorios en la base de datos GEO (Tabla 2 manuscrito 3). Estos

## DISCUSIÓN

resultados apuntan a una regulación de este gen por la influencia de varios compuestos inflamatorios.

En conjunto, estos experimentos nutricionales destacan que la expresión hepática de *Syt1* posee una regulación nutricional exquisita a nivel transcripcional en ratones *ApoE*-deficientes. Donde el colesterol y las grasas saturadas aumentan sus niveles, y la suplementación con otros componentes minoritarios, como el ácido oleanólico, en dietas occidentales podría también regular su expresión.

### 3. Efecto sexo y castración quirúrgica

Para explorar la influencia del sexo, la expresión de *Syt1* se analizó en dos experimentos llevados a cabo con ratones *ApoE*-deficientes.

La expresión de *Syt1* en hembras que consumían una dieta normal resultó ser significativamente mayor que el grupo de machos que recibieron la misma dieta. Además el contenido de colesterol hepático fue significativamente mayor en las hembras, al igual que en otros estudios se encontró una correlación positiva entre la expresión de *Syt1* y el contenido hepático de colesterol.

En el segundo experimento, y debido al efecto de la dieta alta en grasas descrito anteriormente, la influencia del sexo también se estudió en los ratones alimentados con una dieta occidental. Se observaron diferencias significativas entre sexos en cuanto a la expresión hepática de *Syt1* siendo mayor en las hembras que en los machos. No se observaron cambios significativos en los niveles de colesterol hepático, sin embargo los triglicéridos fueron significativamente menores en las hembras que en los machos. La expresión de *Syt1* en este estudio correlacionó de forma significativa con los triglicéridos y colesterol hepáticos, esta asociación resultó ser inversa, aquellos animales con menor expresión del gen tenían mayor contenido de TG y COL.

Para analizar si las diferencias sexuales se debían a cambios hormonales, se llevaron a cabo castraciones quirúrgicas en ambos sexos y se alimentaron con una dieta occidental. No se encontraron cambios significativos en la expresión de *Syt1* en machos debido a la castración, tampoco hubo ningún cambio significativo en el colesterol, ni en los triglicéridos hepáticos. Sin embargo, un aumento significativo se encontró en la superficie hepática ocupada por las gotas de lípidos en los machos orquiectomizados. No se encontraron asociaciones significativas entre los parámetros hepáticos y la



## DISCUSIÓN

expresión de *Syt1*. Por el contrario, las hembras ovariectomizadas mostraron un descenso significativo en la expresión de *Syt1* respecto a las hembras controles. La castración en hembras resultó en un aumento significativo de colesterol, triglicéridos y superficie ocupada por la gota grasa en el hígado. Además la expresión de *Syt1* correlacionó significativamente de forma inversa tanto con los triglicéridos como con el colesterol hepático. Curiosamente, ratones hembra carentes del coactivador-2 del receptor de esteroides también mostraron disminución de la expresión hepática de *Syt1* (Tabla 2 manuscrito 3). El coactivador-2 del receptor de esteroides promueve la activación transcripcional de los receptores de estrógeno en algunos tejidos [453].

La deficiencia en APOE predispone a los individuos al desarrollo de enfermedad hepática, mientras que la dieta puede disminuir o exacerbar este riesgo. De todos los ensayos analizados, aquellas situaciones experimentales donde la dieta inducía un aumento significativo de colesterol hepático (dieta suplementada con colesterol o una dieta occidental) la expresión de *Syt1* aumentó significativamente además de encontrar una correlación positiva entre ambas variables. Esta correlación no se encontró con la suplementación de oleanólico y escualeno en las dietas, por lo que la expresión hepática de *Syt1* parece tener una regulación nutricional más compleja a nivel transcripcional en ratones *ApoE*-deficientes. En el ensayo donde machos y hembras eran alimentados con una dieta normal la mayor expresión de *Syt1* en las hembras volvía a coincidir con mayor contenido hepático de colesterol y una correlación significativa positiva entre ambas variables. Cuando el análisis de expresión se llevó a cabo con machos y hembras alimentados con la dieta occidental, la expresión de *Syt1* seguía siendo mayor en hembras pero no así el colesterol hepático, encontrando a diferencia de los anteriores experimentos una correlación inversa entre ambas variables. Esta correlación inversa entre la expresión de *Syt1* y colesterol hepático volvió a hallarse debido al efecto de la castración en las hembras alimentadas con la dieta occidental. La liberación de hormonas ováricas parece ser necesaria para inducir el aumento de la expresión hepática de *Syt1* observada en las hembras, sin embargo es difícil determinar la implicación de *Syt1* en la enfermedad hepática cuando convergen varios factores que aceleran el desarrollo de la enfermedad hepática como factores genéticos, la deficiencia en APOE, factores dietéticos, el sexo o la castración.

En los dos ensayos de sobreexpresión donde la expresión de *Syt1* está forzada, se encontró el colesterol hepático aumentado y la correlación entre ambas variables volvió

## *DISCUSIÓN*

a ser positiva. La comprensión de que la sobreexpresión puede causar fenotipos, incluyendo enfermedades, acentúa la importancia de establecer niveles correctos de expresión en las estrategias de terapia génica [353], donde el efecto causado por la misma no puede compararse entre un animal sano y un animal enfermo sin plantear antes nuevas estrategias génicas que complementen la iniciada en la presente tesis doctoral para dilucidar qué tipo de mecanismos provoca la sobreexpresión y así determinar las interacciones con otros genes y las rutas en las que pudiera estar involucrado el gen de estudio en el hígado.

## **6. CONCLUSIONES**



## CONCLUSIONES

1. La secuencia hepática del RNAm de *Sinaptotagmina 1* isoforma 1 de ratón ha sido identificada. Los resultados indican que la secuencia hepática de *Syt1* posee un marco de lectura de 1.266 pb conservado con la secuencia de cerebro. A pesar de ello, la transcripción hepática de *Syt1* sólo utiliza 9 exones y 8 intrones en un corte y empalme alternativo. Las diferencias entre las transcripciones de *Syt1* de cerebro y de hígado aparecen en la región no traducida en 5'. La región no traducida en 5' de *Syt1* hepática está codificada por una sola región intrónica en el genoma mientras que en el cerebro está codificada por 3 exones, sugiriendo un empalme alternativo en la región 5'-UTR.
2. La secuencia aminoacídica de hígado está altamente conservada con la isoforma 1 de cerebro y yeyuno en el ratón y como ocurre en el cerebro el fraccionamiento subcelular hepático muestra la presencia de SYT1 en todas las fracciones implicadas en la ruta de secreción. El análisis cuantitativo indica que la expresión del RNAm de *Syt1* se encuentra ampliamente distribuida en varios tejidos, pudiendo desempeñar dicha proteína otras funciones biológicas.
3. La sobreexpresión de *Syt1* en ratones *wild-type* y *ApoE*-deficientes generó fenotipos mutantes con un aumento significativo del colesterol hepático, cuyos valores correlacionaron significativamente con la expresión del transgen. Además, la modificación en la expresión de varios genes involucrados en el metabolismo lipídico por la expresión del transgen podría estar favoreciendo el transporte reverso de colesterol. En ambos modelos utilizados, la sobreexpresión de *Syt1* incrementó la presencia de colesterol esterificado en las lipoproteínas del plasma y modificó su composición. Además el efecto de la sobreexpresión en los ratones carentes de *ApoE* disminuyó el área de gota grasa hepática, la cual correlacionó de forma inversa con la expresión de *Syt1*.
4. La endocitosis y exocitosis son complejos procesos que implican múltiples proteínas con pequeñas diferencias entre los tejidos. Cómo algunas lipoproteínas son captadas o liberadas por el hígado mediante dichos procesos sigue siendo hoy en día cuestión de estudio. La proteína vesicular SYT1 implicada en endo/exocitosis en tejidos neuroendocrinos parece estar involucrada en el flujo de

## CONCLUSIONES

colesterol en el hígado o asociada al metabolismo de lipoproteínas formando parte de los complejos proteicos para su captación y liberación.

5. Algunos componentes nutricionales son moduladores críticos de la expresión hepática de *Syt1*. El colesterol y la dieta occidental en ratones deficientes en *ApoE* provocan el aumento del contenido hepático de colesterol y la expresión hepática de *Syt1*, variables que en ambos ensayos resultaron estar significativamente asociadas. La suplementación con ácido oleanólico en una dieta occidental no generó cambios en el contenido de colesterol hepático pero provocó la represión de la expresión de *Syt1* y el aumento del área de gota grasa, variables que correlacionaron de forma inversa.
6. La expresión hepática de *Syt1* en ratones deficientes en *ApoE* parece estar afectada por el dimorfismo sexual hepático que afecta entre otros, a genes implicados en el metabolismo de lipoproteínas y ácidos grasos. La liberación de hormonas ováricas parecen ser necesarias para inducir el aumento de la expresión hepática de *Syt1* observada en las hembras. Estas diferencias de expresión pueden contribuir a las diferencias sexuales observadas en la fisiopatología hepática.

## **7. BIBLIOGRAFÍA**





## BIBLIOGRAFÍA

1. Montedoro, G., et al., *Antioxidants in virgin olive oil*. Olea. FAO OLIVE NETWORK, 2007. **26**: p. 5-13.
2. Gustavsson, N. and W. Han, *Calcium-sensing beyond neurotransmitters: functions of synaptotagmins in neuroendocrine and endocrine secretion*. Biosci Rep, 2009. **29**(4): p. 245-59.
3. Malhotra, V., et al., *Role of an N-ethylmaleimide-sensitive transport component in promoting fusion of transport vesicles with cisternae of the Golgi stack*. Cell, 1988. **54**(2): p. 221-7.
4. Lin, R.C. and R.H. Scheller, *Mechanisms of synaptic vesicle exocytosis*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2000. **16**: p. 19-49.
5. Takamori, S., et al., *Molecular anatomy of a trafficking organelle*. Cell, 2006. **127**(4): p. 831-46.
6. Bhalla, A., M.C. Chicka, and E.R. Chapman, *Analysis of the synaptotagmin family during reconstituted membrane fusion. Uncovering a class of inhibitory isoforms*. J Biol Chem, 2008. **283**(31): p. 21799-807.
7. Farrell, G.C. and C.Z. Larter, *Nonalcoholic fatty liver disease: from steatosis to cirrhosis*. Hepatology, 2006. **43**(2 Suppl 1): p. S99-S112.
8. Romeo, S., et al., *Genetic variation in PNPLA3 confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease*. Nat Genet, 2008. **40**(12): p. 1461-5.
9. Daly, A.K., et al., *Genetic determinants of susceptibility and severity in nonalcoholic fatty liver disease*. Expert Rev Gastroenterol Hepatol, 2011. **5**(2): p. 253-63.
10. Südhof, T.C., *A molecular machine for neurotransmitter release: synaptotagmin and beyond*. Nat Med, 2013. **19**(10): p. 1227-31.
11. Kiessling, V., et al., *Rapid fusion of synaptic vesicles with reconstituted target SNARE membranes*. Biophys J, 2013. **104**(9): p. 1950-8.
12. Guillén, N., et al., *Microarray analysis of hepatic gene expression identifies new genes involved in steatotic liver*. Physiol Genomics, 2009. **37**(3): p. 187-98.
13. Jahn, R. and T.C. Südhof, *Membrane fusion and exocytosis*. Annu Rev Biochem, 1999. **68**: p. 863-911.
14. Bonifacino, J.S. and B.S. Glick, *The mechanisms of vesicle budding and fusion*. Cell, 2004. **116**(2): p. 153-66.
15. Katz, B. and R. Miledi, *Further study of the role of calcium in synaptic transmission*. J Physiol, 1970. **207**(3): p. 789-801.
16. Terrian, D.M. and M.K. White, *Phylogenetic analysis of membrane trafficking proteins: a family reunion and secondary structure predictions*. Eur J Cell Biol, 1997. **73**(3): p. 198-204.
17. Weimbs, T., et al., *A model for structural similarity between different SNARE complexes based on sequence relationships*. Trends Cell Biol, 1998. **8**(7): p. 260-2.
18. Weimbs, T., et al., *A conserved domain is present in different families of vesicular fusion proteins: a new superfamily*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(7): p. 3046-51.
19. Bennett, M.K., et al., *The syntaxin family of vesicular transport receptors*. Cell, 1993. **74**(5): p. 863-73.
20. Elferink, L.A., W.S. Trimble, and R.H. Scheller, *Two vesicle-associated membrane protein genes are differentially expressed in the rat central nervous system*. J Biol Chem, 1989. **264**(19): p. 11061-4.
21. Rehman, A., et al., *Reconciling the regulatory role of Munc18 proteins in SNARE-complex assembly*. IUCrJ, 2014. **1**(Pt 6): p. 505-13.
22. Lipatova, Z. and N. Segev, *Ypt/Rab GTPases regulate two intersections of the secretory and the endosomal/lysosomal pathways*. Cell Logist, 2014. **4**(3): p. e954870.
23. Rajendran, L. and K. Simons, *Lipid rafts and membrane dynamics*. J Cell Sci, 2005. **118**(Pt 6): p. 1099-102.
24. Tillman, T.S. and M. Cascio, *Effects of membrane lipids on ion channel structure and function*. Cell Biochem Biophys, 2003. **38**(2): p. 161-90.
25. Thiele, C., et al., *Cholesterol binds to synaptophysin and is required for biogenesis of synaptic vesicles*. Nat Cell Biol, 2000. **2**(1): p. 42-9.
26. Linetti, A., et al., *Cholesterol reduction impairs exocytosis of synaptic vesicles*. J Cell Sci, 2010. **123**(Pt 4): p. 595-605.
27. Ammar, M.R., et al., *Lipids in Regulated Exocytosis: What are They Doing?* Front Endocrinol (Lausanne), 2013. **4**: p. 125.
28. Ahnert-Hilger, G., et al., *Regulation of vesicular neurotransmitter transporters*. Rev Physiol Biochem Pharmacol, 2003. **150**: p. 140-60.
29. Südhof, T.C. and R. Jahn, *Proteins of synaptic vesicles involved in exocytosis and membrane recycling*. Neuron, 1991. **6**(5): p. 665-77.

## BIBLIOGRAFÍA

30. Jahn, R. and T.C. Südhof, *Synaptic vesicles and exocytosis*. Annu Rev Neurosci, 1994. **17**: p. 219-46.
31. Jahn, R., W. Schiebler, and P. Greengard, *A quantitative dot-immunobinding assay for proteins using nitrocellulose membrane filters*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1984. **81**(6): p. 1684-7.
32. Chapman, E.R. and R. Jahn, *Calcium-dependent interaction of the cytoplasmic region of synaptotagmin with membranes. Autonomous function of a single C2-homologous domain*. J Biol Chem, 1994. **269**(8): p. 5735-41.
33. Bennett, M.K. and R.H. Scheller, *The molecular machinery for secretion is conserved from yeast to neurons*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(7): p. 2559-63.
34. Rosa, P. and A. Fratangeli, *Cholesterol and synaptic vesicle exocytosis*. Commun Integr Biol, 2010. **3**(4): p. 352-3.
35. Südhof, T.C., *The synaptic vesicle cycle: a cascade of protein-protein interactions*. Nature, 1995. **375**(6533): p. 645-53.
36. Ryan, T.A., *Inhibitors of myosin light chain kinase block synaptic vesicle pool mobilization during action potential firing*. J Neurosci, 1999. **19**(4): p. 1317-23.
37. Ting, A.E. and R.H. Scheller, *Insight into the molecular mechanisms of synaptic vesicle docking and fusion*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 1995. **60**: p. 361-9.
38. Monck, J.R., A.F. Oberhauser, and J.M. Fernandez, *The exocytotic fusion pore interface: a model of the site of neurotransmitter release*. Mol Membr Biol, 1995. **12**(1): p. 151-6.
39. Almers, W. and F.W. Tse, *Transmitter release from synapses: does a preassembled fusion pore initiate exocytosis?* Neuron, 1990. **4**(6): p. 813-8.
40. Lindau, M. and W. Almers, *Structure and function of fusion pores in exocytosis and ectoplasmic membrane fusion*. Curr Opin Cell Biol, 1995. **7**(4): p. 509-17.
41. Leikin, S.L., et al., *Membrane fusion: overcoming of the hydration barrier and local restructuring*. J Theor Biol, 1987. **129**(4): p. 411-25.
42. Chernomordik, L.V. and J. Zimmerberg, *Bending membranes to the task: structural intermediates in bilayer fusion*. Curr Opin Struct Biol, 1995. **5**(4): p. 541-7.
43. Chanturiya, A., L.V. Chernomordik, and J. Zimmerberg, *Flickering fusion pores comparable with initial exocytotic pores occur in protein-free phospholipid bilayers*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(26): p. 14423-8.
44. Lynch, K.L., et al., *Synaptotagmin-1 utilizes membrane bending and SNARE binding to drive fusion pore expansion*. Mol Biol Cell, 2008. **19**(12): p. 5093-103.
45. Bai, J., et al., *Fusion pore dynamics are regulated by synaptotagmin\**t*-SNARE interactions*. Neuron, 2004. **41**(6): p. 929-42.
46. Südhof, T.C., *Synaptotagmins: why so many?* J Biol Chem, 2002. **277**(10): p. 7629-32.
47. Südhof, T.C. and J. Rizo, *Synaptotagmins: C2-domain proteins that regulate membrane traffic*. Neuron, 1996. **17**(3): p. 379-88.
48. Perin, M.S., et al., *Domain structure of synaptotagmin (p65)*. J Biol Chem, 1991. **266**(1): p. 623-9.
49. Czibener, C., et al., *Ca<sup>2+</sup> and synaptotagmin VII-dependent delivery of lysosomal membrane to nascent phagosomes*. J Cell Biol, 2006. **174**(7): p. 997-1007.
50. Hu, Z.T., et al., *Synaptotagmin IV regulates dense core vesicle (DCV) release in LbetaT2 cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2008. **371**(4): p. 781-6.
51. Zhao, H., et al., *Synaptotagmin VII regulates bone remodeling by modulating osteoclast and osteoblast secretion*. Dev Cell, 2008. **14**(6): p. 914-25.
52. Davis, C.W. and B.F. Dickey, *Regulated airway goblet cell mucin secretion*. Annu Rev Physiol, 2008. **70**: p. 487-512.
53. Craxton, M., *Evolutionary genomics of plant genes encoding N-terminal-TM-C2 domain proteins and the similar FAM62 genes and synaptotagmin genes of metazoans*. BMC Genomics, 2007. **8**: p. 259.
54. Fukuda, M. and K. Mikoshiba, *The N-terminal cysteine cluster is essential for membrane targeting of B/K protein*. Biochem J, 2001. **360**(Pt 2): p. 441-8.
55. Hadley, D., et al., *Patterns of sequence conservation in presynaptic neural genes*. Genome Biol, 2006. **7**(11): p. R105.
56. Perin, M.S., et al., *Phospholipid binding by a synaptic vesicle protein homologous to the regulatory region of protein kinase C*. Nature, 1990. **345**(6272): p. 260-3.
57. Heindel, U., M.F. Schmidt, and M. Veit, *Palmitoylation sites and processing of synaptotagmin I, the putative calcium sensor for neurosecretion*. FEBS Lett, 2003. **544**(1-3): p. 57-62.
58. Veit, M., T.H. Sollner, and J.E. Rothman, *Multiple palmitoylation of synaptotagmin and the t-SNARE SNAP-25*. FEBS Lett, 1996. **385**(1-2): p. 119-23.

## BIBLIOGRAFÍA

59. Nalefski, E.A. and J.J. Falke, *The C2 domain calcium-binding motif: structural and functional diversity*. Protein Sci, 1996. **5**(12): p. 2375-90.
60. Perin, M.S., *Mirror image motifs mediate the interaction of the COOH terminus of multiple synaptotagmins with the neurexins and calmodulin*. Biochemistry, 1996. **35**(43): p. 13808-16.
61. Hui, E., et al., *Three distinct kinetic groupings of the synaptotagmin family: candidate sensors for rapid and delayed exocytosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(14): p. 5210-4.
62. Moghadam, P.K. and M.B. Jackson, *The functional significance of synaptotagmin diversity in neuroendocrine secretion*. Front Endocrinol (Lausanne), 2013. **4**: p. 124.
63. Ullrich, B. and T.C. Sudhof, *Differential distributions of novel synaptotagmins: comparison to synapsins*. Neuropharmacology, 1995. **34**(11): p. 1371-7.
64. Mizuta, M., et al., *Synaptotagmin III is a novel isoform of rat synaptotagmin expressed in endocrine and neuronal cells*. J Biol Chem, 1994. **269**(16): p. 11675-8.
65. Babity, J.M., et al., *A novel seizure-induced synaptotagmin gene identified by differential display*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(6): p. 2638-41.
66. Adolfsen, B. and J.T. Littleton, *Genetic and molecular analysis of the synaptotagmin family*. Cell Mol Life Sci, 2001. **58**(3): p. 393-402.
67. Yeo, H., et al., *Developmental expression and subcellular distribution of synaptotagmin 11 in rat hippocampus*. Neuroscience, 2012. **225**: p. 35-43.
68. Li, C., et al., *Ca(2+)-dependent and -independent activities of neural and non-neural synaptotagmins*. Nature, 1995. **375**(6532): p. 594-9.
69. Hutt, D.M., J.M. Baltz, and J.K. Ngsee, *Synaptotagmin VI and VIII and syntaxin 2 are essential for the mouse sperm acrosome reaction*. J Biol Chem, 2005. **280**(21): p. 20197-203.
70. Hutt, D.M., et al., *Synaptotagmin VIII is localized to the mouse sperm head and may function in acrosomal exocytosis*. Biol Reprod, 2002. **66**(1): p. 50-6.
71. Fukuda, M., *Molecular cloning, expression, and characterization of a novel class of synaptotagmin (Syt XIV) conserved from Drosophila to humans*. J Biochem, 2003. **133**(5): p. 641-9.
72. Fukuda, M., *Molecular cloning and characterization of human, rat, and mouse synaptotagmin XV*. Biochem Biophys Res Commun, 2003. **306**(1): p. 64-71.
73. Kwon, O.J., et al., *The expression and cellular localization of brain/kidney protein in the rat retina*. Brain Res, 2000. **860**(1-2): p. 178-80.
74. Han, K.H., et al., *Differential regulation of B/K protein expression in proximal and distal tubules of rat kidneys with ischemia-reperfusion injury*. Am J Physiol Renal Physiol, 2007. **292**(1): p. F100-6.
75. Butz, S., et al., *The subcellular localizations of atypical synaptotagmins III and VI. Synaptotagmin III is enriched in synapses and synaptic plasma membranes but not in synaptic vesicles*. J Biol Chem, 1999. **274**(26): p. 18290-6.
76. Martinez, I., et al., *Synaptotagmin VII regulates Ca(2+)-dependent exocytosis of lysosomes in fibroblasts*. J Cell Biol, 2000. **148**(6): p. 1141-49.
77. Littleton, J.T., et al., *Synaptic function modulated by changes in the ratio of synaptotagmin I and IV*. Nature, 1999. **400**(6746): p. 757-60.
78. Osborne, S.L., et al., *Calcium-dependent oligomerization of synaptotagmins I and II. Synaptotagmins I and II are localized on the same synaptic vesicle and heterodimerize in the presence of calcium*. J Biol Chem, 1999. **274**(1): p. 59-66.
79. Ibata, K., et al., *Synaptotagmin IV is present at the Golgi and distal parts of neurites*. J Neurochem, 2000. **74**(2): p. 518-26.
80. Schiavo, G., S.L. Osborne, and J.G. Sgouros, *Synaptotagmins: more isoforms than functions?* Biochem Biophys Res Commun, 1998. **248**(1): p. 1-8.
81. Ubach, J., et al., *The C2B domain of synaptotagmin I is a Ca2+-binding module*. Biochemistry, 2001. **40**(20): p. 5854-60.
82. Shao, X., et al., *Solution structures of the Ca2+-free and Ca2+-bound C2A domain of synaptotagmin I: does Ca2+ induce a conformational change?* Biochemistry, 1998. **37**(46): p. 16106-15.
83. Dai, H., et al., *Structural basis for the evolutionary inactivation of Ca2+ binding to synaptotagmin 4*. Nat Struct Mol Biol, 2004. **11**(9): p. 844-9.
84. Gustavsson, N., et al., *Impaired insulin secretion and glucose intolerance in synaptotagmin-7 null mutant mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(10): p. 3992-7.
85. Mittelsteadt, T., et al., *Differential mRNA expression patterns of the synaptotagmin gene family in the rodent brain*. J Comp Neurol, 2009. **512**(4): p. 514-28.

## BIBLIOGRAFÍA

86. Zhang, Q., et al., *Synaptotagmin IV regulates glial glutamate release*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(25): p. 9441-6.
87. Schiavo, G., et al., *Calcium-dependent switching of the specificity of phosphoinositide binding to synaptotagmin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(23): p. 13327-32.
88. Davis, A.F., et al., *Kinetics of synaptotagmin responses to Ca<sup>2+</sup> and assembly with the core SNARE complex onto membranes*. Neuron, 1999. **24**(2): p. 363-76.
89. Gerona, R.R., et al., *The C terminus of SNAP25 is essential for Ca(2+)-dependent binding of synaptotagmin to SNARE complexes*. J Biol Chem, 2000. **275**(9): p. 6328-36.
90. Sheng, Z.H., C.T. Yokoyama, and W.A. Catterall, *Interaction of the synprint site of N-type Ca<sup>2+</sup> channels with the C2B domain of synaptotagmin I*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(10): p. 5405-10.
91. Yoshida, A., et al., *HPC-1 is associated with synaptotagmin and omega-conotoxin receptor*. J Biol Chem, 1992. **267**(35): p. 24925-8.
92. Zhang, J.Z., et al., *Synaptotagmin I is a high affinity receptor for clathrin AP-2: implications for membrane recycling*. Cell, 1994. **78**(5): p. 751-60.
93. Schiavo, G., et al., *A possible docking and fusion particle for synaptic transmission*. Nature, 1995. **378**(6558): p. 733-6.
94. Hata, Y., et al., *Interaction of synaptotagmin with the cytoplasmic domains of neurexins*. Neuron, 1993. **10**(2): p. 307-15.
95. Fukuda, M., et al., *Inositol-1,3,4,5-tetrakisphosphate binding to C2B domain of IP4BP/synaptotagmin II*. J Biol Chem, 1994. **269**(46): p. 29206-11.
96. Mizutani, A., et al., *SYNCRIP, a cytoplasmic counterpart of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein R, interacts with ubiquitous synaptotagmin isoforms*. J Biol Chem, 2000. **275**(13): p. 9823-31.
97. Matthew, W.D., L. Tsavaler, and L.F. Reichardt, *Identification of a synaptic vesicle-specific membrane protein with a wide distribution in neuronal and neurosecretory tissue*. J Cell Biol, 1981. **91**(1): p. 257-69.
98. Lv, J.H., L. He, and S.F. Sui, *Lipid rafts association of synaptotagmin I on synaptic vesicles*. Biochemistry (Mosc), 2008. **73**(3): p. 283-8.
99. Tucker, W.C. and E.R. Chapman, *Role of synaptotagmin in Ca<sup>2+</sup>-triggered exocytosis*. Biochem J, 2002. **366**(Pt 1): p. 1-13.
100. Jarousse, N. and R.B. Kelly, *The AP2 binding site of synaptotagmin I is not an internalization signal but a regulator of endocytosis*. J Cell Biol, 2001. **154**(4): p. 857-66.
101. Lynch, K.L., et al., *Synaptotagmin C2A loop 2 mediates Ca<sup>2+</sup>-dependent SNARE interactions essential for Ca<sup>2+</sup>-triggered vesicle exocytosis*. Mol Biol Cell, 2007. **18**(12): p. 4957-68.
102. Bai, J. and E.R. Chapman, *The C2 domains of synaptotagmin--partners in exocytosis*. Trends Biochem Sci, 2004. **29**(3): p. 143-51.
103. Tucker, W.C., T. Weber, and E.R. Chapman, *Reconstitution of Ca<sup>2+</sup>-regulated membrane fusion by synaptotagmin and SNAREs*. Science, 2004. **304**(5669): p. 435-8.
104. Chicka, M.C., et al., *Synaptotagmin arrests the SNARE complex before triggering fast, efficient membrane fusion in response to Ca<sup>2+</sup>*. Nat Struct Mol Biol, 2008. **15**(8): p. 827-35.
105. Schwarz, T.L., *Synaptotagmin promotes both vesicle fusion and recycling*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(47): p. 16401-2.
106. Fernandez-Chacon, R., et al., *Synaptotagmin I functions as a calcium regulator of release probability*. Nature, 2001. **410**(6824): p. 41-9.
107. Chapman, E.R. and A.F. Davis, *Direct interaction of a Ca<sup>2+</sup>-binding loop of synaptotagmin with lipid bilayers*. J Biol Chem, 1998. **273**(22): p. 13995-4001.
108. Fernandez, I., et al., *Three-dimensional structure of the synaptotagmin I C2B-domain: synaptotagmin I as a phospholipid binding machine*. Neuron, 2001. **32**(6): p. 1057-69.
109. Lee, H.K., et al., *Dynamic Ca<sup>2+</sup>-dependent stimulation of vesicle fusion by membrane-anchored synaptotagmin I*. Science, 2010. **328**(5979): p. 760-3.
110. Lai, Y., et al., *Synaptotagmin I and Ca<sup>2+</sup> drive trans SNARE zippering*. Sci Rep, 2014. **4**: p. 4575.
111. Loewen, C.A., et al., *C2B polylysine motif of synaptotagmin facilitates a Ca<sup>2+</sup>-independent stage of synaptic vesicle priming in vivo*. Mol Biol Cell, 2006. **17**(12): p. 5211-26.
112. de Wit, H., et al., *Synaptotagmin-1 docks secretory vesicles to syntaxin-1/SNAP-25 acceptor complexes*. Cell, 2009. **138**(5): p. 935-46.
113. Davletov, B.A. and T.C. Sudhof, *A single C2 domain from synaptotagmin I is sufficient for high affinity Ca<sup>2+</sup>/phospholipid binding*. J Biol Chem, 1993. **268**(35): p. 26386-90.

## BIBLIOGRAFÍA

114. van den Bogaart, G., et al., *Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate increases Ca<sup>2+</sup> affinity of synaptotagmin-1 by 40-fold*. J Biol Chem, 2012. **287**(20): p. 16447-53.
115. Haucke, V., et al., *Dual interaction of synaptotagmin with mu2- and alpha-adaptin facilitates clathrin-coated pit nucleation*. Embo J, 2000. **19**(22): p. 6011-9.
116. von Poser, C., et al., *Synaptotagmin regulation of coated pit assembly*. J Biol Chem, 2000. **275**(40): p. 30916-24.
117. Houy, S., et al., *Exocytosis and endocytosis in neuroendocrine cells: inseparable membranes!* Front Endocrinol (Lausanne), 2013. **4**: p. 135.
118. Marschang, P., et al., *Normal development and fertility of knockout mice lacking the tumor suppressor gene LRP1b suggest functional compensation by LRP1*. Mol Cell Biol, 2004. **24**(9): p. 3782-93.
119. Kosacka, J., et al., *Apolipoproteins D and E3 exert neurotrophic and synaptogenic effects in dorsal root ganglion cell cultures*. Neuroscience, 2009. **162**(2): p. 282-91.
120. Koudinov, A.R. and N.V. Koudinova, *Essential role for cholesterol in synaptic plasticity and neuronal degeneration*. Faseb J, 2001. **15**(10): p. 1858-60.
121. Musch, M.W., et al., *Cyclic AMP-mediated endocytosis of intestinal epithelial NHE3 requires binding to synaptotagmin I*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2010. **298**(2): p. G203-11.
122. Musch, M.W., et al., *Synaptotagmin I binds intestinal epithelial NHE3 and mediates cAMP- and Ca<sup>2+</sup>-induced endocytosis by recruitment of AP2 and clathrin*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2007. **292**(6): p. G1549-58.
123. Selga, E., et al., *Gene expression profiles in rat mesenteric lymph nodes upon supplementation with conjugated linoleic acid during gestation and suckling*. BMC Genomics, 2011. **12**: p. 182.
124. Rastaldi, M.P., et al., *Glomerular podocytes contain neuron-like functional synaptic vesicles*. FASEB J, 2006. **20**(7): p. 976-8.
125. Pattaro, C., et al., *A meta-analysis of genome-wide data from five European isolates reveals an association of COL22A1, SYT1, and GABRR2 with serum creatinine level*. BMC Med Genet, 2010. **11**: p. 41.
126. Acín, S., et al., *Microarray analysis of hepatic genes differentially expressed in the presence of the unsaponifiable fraction of olive oil in apolipoprotein E-deficient mice*. Br J Nutr, 2007. **97**(4): p. 628-38.
127. Goldberg, I.J. and H.N. Ginsberg, *Ins and outs modulating hepatic triglyceride and development of nonalcoholic fatty liver disease*. Gastroenterology, 2006. **130**(4): p. 1343-6.
128. Browning, J.D. and J.D. Horton, *Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury*. J Clin Invest, 2004. **114**(2): p. 147-52.
129. Valenti, L., et al., *Dietary anthocyanins as nutritional therapy for nonalcoholic fatty liver disease*. Oxid Med Cell Longev, 2013. **2013**: p. 145421.
130. Day, C.P., *Pathogenesis of steatohepatitis*. Best Pract Res Clin Gastroenterol, 2002. **16**(5): p. 663-78.
131. Omagari, K., et al., *Fatty liver in non-alcoholic non-overweight Japanese adults: incidence and clinical characteristics*. J Gastroenterol Hepatol, 2002. **17**(10): p. 1098-105.
132. Shen, L., et al., *Prevalence of nonalcoholic fatty liver among administrative officers in Shanghai: an epidemiological survey*. World J Gastroenterol, 2003. **9**(5): p. 1106-10.
133. Bellentani, S., et al., *Epidemiology of non-alcoholic fatty liver disease*. Dig Dis, 2010. **28**(1): p. 155-61.
134. Lazo, M., et al., *Non-alcoholic fatty liver disease and mortality among US adults: prospective cohort study*. Bmj, 2011. **343**: p. d6891.
135. Browning, J.D., et al., *Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: impact of ethnicity*. Hepatology, 2004. **40**(6): p. 1387-95.
136. Lonardo, A., et al., *'Endocrine NAFLD' a hormonocentric perspective of nonalcoholic fatty liver disease pathogenesis*. J Hepatol, 2006. **44**(6): p. 1196-207.
137. Barshop, N.J., et al., *Review article: epidemiology, pathogenesis and potential treatments of paediatric non-alcoholic fatty liver disease*. Aliment Pharmacol Ther, 2008. **28**(1): p. 13-24.
138. Nobili, V., et al., *NAFLD in children: a prospective clinical-pathological study and effect of lifestyle advice*. Hepatology, 2006. **44**(2): p. 458-65.
139. Levene, A.P. and R.D. Goldin, *The epidemiology, pathogenesis and histopathology of fatty liver disease*. Histopathology, 2012. **61**(2): p. 141-52.
140. Angulo, P. and K.D. Lindor, *Non-alcoholic fatty liver disease*. J Gastroenterol Hepatol, 2002. **17** **Suppl**: p. S186-90.
141. Marchesini, G., et al., *Nonalcoholic fatty liver disease: a feature of the metabolic syndrome*. Diabetes, 2001. **50**(8): p. 1844-50.

## BIBLIOGRAFÍA

142. Rossetti, L., A. Giaccari, and R.A. DeFronzo, *Glucose toxicity*. Diabetes Care, 1990. **13**(6): p. 610-30.
143. Ford, E.S., W.H. Giles, and A.H. Mokdad, *Increasing prevalence of the metabolic syndrome among u.s. Adults*. Diabetes Care, 2004. **27**(10): p. 2444-9.
144. Cohen, J.C., J.D. Horton, and H.H. Hobbs, *Human fatty liver disease: old questions and new insights*. Science, 2011. **332**(6037): p. 1519-23.
145. Yamaguchi, K., et al., *Inhibiting triglyceride synthesis improves hepatic steatosis but exacerbates liver damage and fibrosis in obese mice with nonalcoholic steatohepatitis*. Hepatology, 2007. **45**(6): p. 1366-74.
146. Donnelly, K.L., et al., *Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease*. J Clin Invest, 2005. **115**(5): p. 1343-51.
147. Bugianesi, E., et al., *Insulin resistance in non-diabetic patients with non-alcoholic fatty liver disease: sites and mechanisms*. Diabetologia, 2005. **48**(4): p. 634-42.
148. Marchesini, G., et al., *Association of nonalcoholic fatty liver disease with insulin resistance*. Am J Med, 1999. **107**(5): p. 450-5.
149. Medina-Santillan, R., et al., *Hepatic manifestations of metabolic syndrome*. Diabetes Metab Res Rev, 2013.
150. Gastaldelli, A., *Fatty liver disease: the hepatic manifestation of metabolic syndrome*. Hypertens Res, 2010. **33**(6): p. 546-7.
151. Vanni, E., et al., *From the metabolic syndrome to NAFLD or vice versa? Dig Liver Dis*, 2010. **42**(5): p. 320-30.
152. Vigouroux, C., [*Laminopathies: lipodystrophies, insulin resistance, syndromes of accelerated ageing... and others*]. Ann Endocrinol (Paris), 2005. **66**(3): p. 270-8.
153. Riddle, T.M., et al., *HIV protease inhibitor induces fatty acid and sterol biosynthesis in liver and adipose tissues due to the accumulation of activated sterol regulatory element-binding proteins in the nucleus*. J Biol Chem, 2001. **276**(40): p. 37514-9.
154. Brea-Hernando, A. and J. Puzo Foncillas, *Non-alcoholic fatty liver disease and cardiovascular risk*. Clin Invest Arterioscl., 2010. **22**(6): p. 259-271.
155. *Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases*. World Health Organ Tech Rep Ser, 2003. **916**: p. i-viii, 1-149, backcover.
156. Te Morenga, L., S. Mallard, and J. Mann, *Dietary sugars and body weight: systematic review and meta-analyses of randomised controlled trials and cohort studies*. Bmj, 2013. **346**: p. e7492.
157. Hooper, L., et al., *Effect of reducing total fat intake on body weight: systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials and cohort studies*. Bmj, 2012. **345**: p. e7666.
158. FAO, *Fats and fatty acids in human nutrition. Report of an expert consultation*. FAO Food Nutr Pap, 2010. **91**: p. 1-166.
159. Estruch, R., et al., *Primary prevention of cardiovascular disease with a Mediterranean diet*. N Engl J Med, 2013. **368**(14): p. 1279-90.
160. World Health Organization. Geneva, *Guideline: Sodium intake for adults and children*. 2012.
161. Carey, M.C., D.M. Small, and C.M. Bliss, *Lipid digestion and absorption*. Annu Rev Physiol, 1983. **45**: p. 651-77.
162. Phan, C.T. and P. Tso, *Intestinal lipid absorption and transport*. Front Biosci, 2001. **6**: p. D299-319.
163. Iqbal, J. and M.M. Hussain, *Intestinal lipid absorption*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2009. **296**(6): p. E1183-94.
164. Wilson, M.D. and L.L. Rudel, *Review of cholesterol absorption with emphasis on dietary and biliary cholesterol*. J Lipid Res, 1994. **35**(6): p. 943-55.
165. Westergaard, H. and J.M. Dietschy, *The mechanism whereby bile acid micelles increase the rate of fatty acid and cholesterol uptake into the intestinal mucosal cell*. J Clin Invest, 1976. **58**(1): p. 97-108.
166. Dietschy, J.M., L.E. Weeks, and J.J. Delente, *Enzymatic measurement of free and esterified cholesterol levels in plasma and other biological preparations using the oxygen electrode in a modified glucose analyzer*. Clin Chim Acta, 1976. **73**(3): p. 407-14.
167. Rosenson, R.S., et al., *HDL measures, particle heterogeneity, proposed nomenclature, and relation to atherosclerotic cardiovascular events*. Clin Chem, 2011. **57**(3): p. 392-410.
168. Smith, L.C., H.J. Pownall, and A.M. Gotto, Jr., *The plasma lipoproteins: structure and metabolism*. Annu Rev Biochem, 1978. **47**: p. 751-7.
169. Hussain, M.M., et al., *Chylomicron metabolism. Chylomicron uptake by bone marrow in different animal species*. J Biol Chem, 1989. **264**(30): p. 17931-8.

## BIBLIOGRAFÍA

170. Anderson, L.J., J.K. Boyles, and M.M. Hussain, *A rapid method for staining large chylomicrons*. J Lipid Res, 1989. **30**(11): p. 1819-24.
171. Mahley, R.W., et al., *Chylomicron remnant metabolism. Role of hepatic lipoprotein receptors in mediating uptake*. Arteriosclerosis, 1989. **9**(1 Suppl): p. I14-8.
172. Rudling, M., et al., *Importance of growth hormone for the induction of hepatic low density lipoprotein receptors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(15): p. 6983-7.
173. Hussain, M.M., *A proposed model for the assembly of chylomicrons*. Atherosclerosis, 2000. **148**(1): p. 1-15.
174. Ginsberg, H.N., *New perspectives on atherogenesis: role of abnormal triglyceride-rich lipoprotein metabolism*. Circulation, 2002. **106**(16): p. 2137-42.
175. Chajek, T. and S. Eisenberg, *Very low density lipoprotein. Metabolism of phospholipids, cholesterol, and apolipoprotein C in the isolated perfused rat heart*. J Clin Invest, 1978. **61**(6): p. 1654-65.
176. Streja, D., M.A. Kallai, and G. Steiner, *The metabolic heterogeneity of human very low density lipoprotein triglyceride*. Metabolism, 1977. **26**(12): p. 1333-44.
177. Nozaki, S., et al., *The role of hepatic triglyceride lipase in the metabolism of intermediate-density lipoprotein--postheparin lipolytic activities determined by a sensitive, nonradioisotopic method in hyperlipidemic patients and normals*. Metabolism, 1986. **35**(1): p. 53-8.
178. Marzetta, C.A., D.M. Foster, and J.D. Brunzell, *Conversion of plasma VLDL and IDL precursors into various LDL subpopulations using density gradient ultracentrifugation*. J Lipid Res, 1990. **31**(6): p. 975-84.
179. Stein, E.A., *Lipids, Lipoproteins and apolipoproteins*. Fundamentals of Clinical Chemistry, ed. W.N.S.C. 1987.
180. Badimon, L., G. Vilahur, and T. Padro, *Lipoproteins, platelets and atherothrombosis*. Rev Esp Cardiol, 2009. **62**(10): p. 1161-78.
181. Brown, M.S. and J.L. Goldstein, *A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis*. Science, 1986. **232**(4746): p. 34-47.
182. Barter, P., et al., *High density lipoproteins (HDLs) and atherosclerosis; the unanswered questions*. Atherosclerosis, 2003. **168**(2): p. 195-211.
183. Assmann, G. and J.R. Nofer, *Atheroprotective effects of high-density lipoproteins*. Annu Rev Med, 2003. **54**: p. 321-41.
184. Mutch, D.M., et al., *An integrative metabolism approach identifies stearyl-CoA desaturase as a target for an arachidonate-enriched diet*. FASEB J, 2005. **19**(6): p. 599-601.
185. Navab, M., et al., *The oxidation hypothesis of atherogenesis: the role of oxidized phospholipids and HDL*. J Lipid Res, 2004. **45**(6): p. 993-1007.
186. Barter, P.J., R. Puranik, and K.A. Rye, *New insights into the role of HDL as an anti-inflammatory agent in the prevention of cardiovascular disease*. Curr Cardiol Rep, 2007. **9**(6): p. 493-8.
187. Nicholls, S.J., et al., *Reconstituted high-density lipoproteins inhibit the acute pro-oxidant and proinflammatory vascular changes induced by a periarterial collar in normocholesterolemic rabbits*. Circulation, 2005. **111**(12): p. 1543-50.
188. Nofer, J.R. and G. Assmann, *Atheroprotective effects of high-density lipoprotein-associated lysosphingolipids*. Trends Cardiovasc Med, 2005. **15**(7): p. 265-71.
189. Lusis, A.J., A.M. Fogelman, and G.C. Fonarow, *Genetic basis of atherosclerosis: part I: new genes and pathways*. Circulation, 2004. **110**(13): p. 1868-73.
190. Cordain, L., et al., *Origins and evolution of the Western diet: health implications for the 21st century*. Am J Clin Nutr, 2005. **81**(2): p. 341-54.
191. Liu, S. and W.C. Willett, *Dietary glycemic load and atherothrombotic risk*. Curr Atheroscler Rep, 2002. **4**(6): p. 454-61.
192. Cordain, L., M.R. Eades, and M.D. Eades, *Hyperinsulinemic diseases of civilization: more than just Syndrome X*. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol, 2003. **136**(1): p. 95-112.
193. Ludwig, D.S., *The glycemic index: physiological mechanisms relating to obesity, diabetes, and cardiovascular disease*. Jama, 2002. **287**(18): p. 2414-23.
194. Zammit, V.A., et al., *Insulin stimulation of hepatic triacylglycerol secretion and the etiology of insulin resistance*. J Nutr, 2001. **131**(8): p. 2074-7.
195. Boden, G. and G.I. Shulman, *Free fatty acids in obesity and type 2 diabetes: defining their role in the development of insulin resistance and beta-cell dysfunction*. Eur J Clin Invest, 2002. **32** Suppl 3: p. 14-23.
196. Thomson, M.J., M.G. Williams, and S.C. Frost, *Development of insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes*. J Biol Chem, 1997. **272**(12): p. 7759-64.

## BIBLIOGRAFÍA

197. Trumbo, P., et al., *Dietary reference intakes for energy, carbohydrate, fiber, fat, fatty acids, cholesterol, protein and amino acids*. J Am Diet Assoc, 2002. **102**(11): p. 1621-30.
198. Stamler, J., et al., *Relationship of baseline serum cholesterol levels in 3 large cohorts of younger men to long-term coronary, cardiovascular, and all-cause mortality and to longevity*. Jama, 2000. **284**(3): p. 311-8.
199. Subar, A.F., et al., *Dietary sources of nutrients among US adults, 1989 to 1991*. J Am Diet Assoc, 1998. **98**(5): p. 537-47.
200. Kris-Etherton, P.M., et al., *Polyunsaturated fatty acids in the food chain in the United States*. Am J Clin Nutr, 2000. **71**(1 Suppl): p. 179S-88S.
201. Emken, E.A., *Nutrition and biochemistry of trans and positional fatty acid isomers in hydrogenated oils*. Annu Rev Nutr, 1984. **4**: p. 339-76.
202. Allison, D.B., et al., *Estimated intakes of trans fatty and other fatty acids in the US population*. J Am Diet Assoc, 1999. **99**(2): p. 166-74; quiz 175-6.
203. Hu, F.B., R.M. van Dam, and S. Liu, *Diet and risk of Type II diabetes: the role of types of fat and carbohydrate*. Diabetologia, 2001. **44**(7): p. 805-17.
204. Cotton, P.A., et al., *Dietary sources of nutrients among US adults, 1994 to 1996*. J Am Diet Assoc, 2004. **104**(6): p. 921-30.
205. Cordain, L., *Cereal grains: humanity's double-edged sword*. World Rev Nutr Diet, 1999. **84**: p. 19-73.
206. Frassetto, L.A., et al., *Estimation of net endogenous noncarbonic acid production in humans from diet potassium and protein contents*. Am J Clin Nutr, 1998. **68**(3): p. 576-83.
207. Bushinsky, D.A., *Metabolic alkalosis decreases bone calcium efflux by suppressing osteoclasts and stimulating osteoblasts*. Am J Physiol, 1996. **271**(1 Pt 2): p. F216-22.
208. Frassetto, L., R.C. Morris, Jr., and A. Sebastian, *Potassium bicarbonate reduces urinary nitrogen excretion in postmenopausal women*. J Clin Endocrinol Metab, 1997. **82**(1): p. 254-9.
209. Pak, C.Y., et al., *Long-term treatment of calcium nephrolithiasis with potassium citrate*. J Urol, 1985. **134**(1): p. 11-9.
210. Morris, R.C., Jr., et al., *Normotensive salt sensitivity: effects of race and dietary potassium*. Hypertension, 1999. **33**(1): p. 18-23.
211. Mickleborough, T.D., et al., *Dietary chloride as a possible determinant of the severity of exercise-induced asthma*. Eur J Appl Physiol, 2001. **85**(5): p. 450-6.
212. Alpern, R.J. and K. Sakhaee, *The clinical spectrum of chronic metabolic acidosis: homeostatic mechanisms produce significant morbidity*. Am J Kidney Dis, 1997. **29**(2): p. 291-302.
213. Eaton, S.B. and S.B. Eaton, 3rd, *Paleolithic vs. modern diets--selected pathophysiological implications*. Eur J Nutr, 2000. **39**(2): p. 67-70.
214. Antonios, T.F. and G.A. MacGregor, *Salt--more adverse effects*. Lancet, 1996. **348**(9022): p. 250-1.
215. Gotshall, R.W., T.D. Mickleborough, and L. Cordain, *Dietary salt restriction improves pulmonary function in exercise-induced asthma*. Med Sci Sports Exerc, 2000. **32**(11): p. 1815-9.
216. Jansson, B., *Geographic cancer risk and intracellular potassium/sodium ratios*. Cancer Detect Prev, 1986. **9**(3-4): p. 171-94.
217. Krauss, R.M., et al., *AHA Dietary Guidelines: revision 2000: A statement for healthcare professionals from the Nutrition Committee of the American Heart Association*. Circulation, 2000. **102**(18): p. 2284-99.
218. Anderson, J.W., B.M. Smith, and N.J. Gustafson, *Health benefits and practical aspects of high-fiber diets*. Am J Clin Nutr, 1994. **59**(5 Suppl): p. 1242S-1247S.
219. Trowell, H. and D. Burkitt, *Physiological role of dietary fiber: a ten-year review*. ASDC J Dent Child, 1986. **53**(6): p. 444-7.
220. Bullo, M., P. Cozar-Torrell, and J. Salas-Salvado, *Dietary regulation of glucose metabolism in metabolic syndrome*. Curr Vasc Pharmacol, 2014. **11**(6): p. 928-45.
221. Ekstedt, M., et al., *Long-term follow-up of patients with NAFLD and elevated liver enzymes*. Hepatology, 2006. **44**(4): p. 865-73.
222. Ruttman, E., et al., *Gamma-glutamyltransferase as a risk factor for cardiovascular disease mortality: an epidemiological investigation in a cohort of 163,944 Austrian adults*. Circulation, 2005. **112**(14): p. 2130-7.
223. Matteoni, C.A., et al., *Nonalcoholic fatty liver disease: a spectrum of clinical and pathological severity*. Gastroenterology, 1999. **116**(6): p. 1413-9.
224. Angulo, P., et al., *Independent predictors of liver fibrosis in patients with nonalcoholic steatohepatitis*. Hepatology, 1999. **30**(6): p. 1356-62.



## BIBLIOGRAFÍA

225. Bhatia, L.S., et al., *Non-alcoholic fatty liver disease: a new and important cardiovascular risk factor?* Eur Heart J, 2012. **33**(10): p. 1190-200.
226. Nestel, P.J. and R.P. Mensink, *Perspective: nonalcoholic fatty liver disease and cardiovascular risk.* Curr Opin Lipidol, 2013. **24**(1): p. 1-3.
227. Sung, K.C., et al., *Fatty liver, insulin resistance, and features of metabolic syndrome: relationships with coronary artery calcium in 10,153 people.* Diabetes Care, 2012. **35**(11): p. 2359-64.
228. Targher, G., et al., *Increased prevalence of cardiovascular disease in Type 2 diabetic patients with non-alcoholic fatty liver disease.* Diabet Med, 2006. **23**(4): p. 403-9.
229. Assy, N., et al., *Presence of coronary plaques in patients with nonalcoholic fatty liver disease.* Radiology, 2010. **254**(2): p. 393-400.
230. Lizardi-Cervera, J. and D. Aguilar-Zapata, *Nonalcoholic fatty liver disease and its association with cardiovascular disease.* Ann Hepatol, 2009. **8 Suppl 1**: p. S40-3.
231. Sookoian, S., et al., *Liver transcriptional profile of atherosclerosis-related genes in human nonalcoholic fatty liver disease.* Atherosclerosis, 2011. **218**(2): p. 378-85.
232. Goring, H.H., et al., *Discovery of expression QTLs using large-scale transcriptional profiling in human lymphocytes.* Nat Genet, 2007. **39**(10): p. 1208-16.
233. Musso, G., et al., *Prolonged saturated fat-induced, glucose-dependent insulinotropic polypeptide elevation is associated with adipokine imbalance and liver injury in nonalcoholic steatohepatitis: dysregulated enteroadipocyte axis as a novel feature of fatty liver.* Am J Clin Nutr, 2009. **89**(2): p. 558-67.
234. Toye, A.A., et al., *A genetic and physiological study of impaired glucose homeostasis control in C57BL/6J mice.* Diabetologia, 2005. **48**(4): p. 675-86.
235. Toye, A.A., et al., *Subtle metabolic and liver gene transcriptional changes underlie diet-induced fatty liver susceptibility in insulin-resistant mice.* Diabetologia, 2007. **50**(9): p. 1867-79.
236. Kirpich, I.A., et al., *Integrated hepatic transcriptome and proteome analysis of mice with high-fat diet-induced nonalcoholic fatty liver disease.* J Nutr Biochem, 2011. **22**(1): p. 38-45.
237. Alevizos, I., et al., *Linking hepatic transcriptional changes to high-fat diet induced physiology for diabetes-prone and obese-resistant mice.* Cell Cycle, 2007. **6**(13): p. 1631-8.
238. de Fourmestraux, V., et al., *Transcript profiling suggests that differential metabolic adaptation of mice to a high fat diet is associated with changes in liver to muscle lipid fluxes.* J Biol Chem, 2004. **279**(49): p. 50743-53.
239. Kreeft, A.J., et al., *Genomic analysis of the response of mouse models to high-fat feeding shows a major role of nuclear receptors in the simultaneous regulation of lipid and inflammatory genes.* Atherosclerosis, 2005. **182**(2): p. 249-57.
240. Aoki, F., et al., *Suppression by licorice flavonoids of abdominal fat accumulation and body weight gain in high-fat diet-induced obese C57BL/6J mice.* Biosci Biotechnol Biochem, 2007. **71**(1): p. 206-14.
241. Yang, R.L., et al., *Lipoic acid prevents high-fat diet-induced dyslipidemia and oxidative stress: a microarray analysis.* Nutrition, 2008. **24**(6): p. 582-8.
242. Chang, T.Y., et al., *Cholesterol sensing, trafficking, and esterification.* Annu Rev Cell Dev Biol, 2006. **22**: p. 129-57.
243. Chiang, J.Y., *Regulation of bile acid synthesis: pathways, nuclear receptors, and mechanisms.* J Hepatol, 2004. **40**(3): p. 539-51.
244. Mahaffee, D., R.C. Reitz, and R.L. Ney, *The mechanism of action of adrenocorticotropic hormone. The role of mitochondrial cholesterol accumulation in the regulation of steroidogenesis.* J Biol Chem, 1974. **249**(1): p. 227-33.
245. Fan, J. and V. Papadopoulos, *Evolutionary origin of the mitochondrial cholesterol transport machinery reveals a universal mechanism of steroid hormone biosynthesis in animals.* PLoS One, 2013. **8**(10): p. e76701.
246. van Heek, M., et al., *Comparison of the activity and disposition of the novel cholesterol absorption inhibitor, SCH58235, and its glucuronide, SCH60663.* Br J Pharmacol, 2000. **129**(8): p. 1748-54.
247. Grundy, S.M. and A.L. Metzger, *A physiological method for estimation of hepatic secretion of biliary lipids in man.* Gastroenterology, 1972. **62**(6): p. 1200-17.
248. Clearfield, M.B., *A novel therapeutic approach to dyslipidemia.* J Am Osteopath Assoc, 2003. **103**(1 Suppl 1): p. S16-20.
249. Subramanian, S., et al., *Dietary cholesterol exacerbates hepatic steatosis and inflammation in obese LDL receptor-deficient mice.* J Lipid Res, 2011. **52**(9): p. 1626-35.

## BIBLIOGRAFÍA

250. Comhair, T.M., et al., *Dietary cholesterol, female gender and n-3 fatty acid deficiency are more important factors in the development of non-alcoholic fatty liver disease than the saturation index of the fat*. *Nutr Metab (Lond)*, 2011. **8**: p. 4.
251. Inoue, M., et al., *Increased expression of PPARgamma in high fat diet-induced liver steatosis in mice*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005. **336**(1): p. 215-22.
252. Maxwell, K.N., et al., *Novel putative SREBP and LXR target genes identified by microarray analysis in liver of cholesterol-fed mice*. *J Lipid Res*, 2003. **44**(11): p. 2109-19.
253. Obama, T., et al., *Dietary cholesterol reduces plasma triacylglycerol in apolipoprotein E-null mice: suppression of lipin-1 and -2 in the glycerol-3-phosphate pathway*. *PLoS One*, 2011. **6**(8): p. e22917.
254. Watanabe, S., et al., *Effect of Lactobacillus brevis 119-2 isolated from Tsuda kabu red turnips on cholesterol levels in cholesterol-administered rats*. *J Biosci Bioeng*, 2013.
255. UNESCO. *Representative List of the Intangible Cultural Heritage of Humanity*. 2010 [cited April 2011]; Available from: <http://www.unesco.org>.
256. Ministerio de agricultura, a.y.m.A.G.d.E. *Dieta Mediterránea*. 2011 [cited; Available from: [http://alimentacion.es/es/conoce\\_lo\\_que\\_comes/dieta\\_mediterranea/](http://alimentacion.es/es/conoce_lo_que_comes/dieta_mediterranea/)].
257. Keys, A., et al., *The diet and 15-year death rate in the seven countries study*. *Am J Epidemiol*, 1986. **124**(6): p. 903-15.
258. Mattson, F.H. and S.M. Grundy, *Comparison of effects of dietary saturated, monounsaturated, and polyunsaturated fatty acids on plasma lipids and lipoproteins in man*. *J Lipid Res*, 1985. **26**(2): p. 194-202.
259. Food, Drug, and Administration. *Monounsaturated Fatty Acids From Olive Oil and Coronary Heart Disease*. 2004 Nov 1 [cited; P 04-100]. Available from: <http://www.fda.gov/food/ingredientspackaginglabeling/labelingnutrition/ucm073992.htm#olive>.
260. Codex Alimentarius, *Codex standard for olive oils and olive pomace oils* FAO, Editor. 2009. p. 1-8.
261. International Olive Council, C. *Trade Standard Applying to Olive Oils and Olive-Pomace Oils*. 2013 [cited 2014 February 21, 2014]; COI/T.15/NC No 3/Rev. 7]. Available from: <http://www.internationaloliveoil.org>.
262. Lou-Bonafonte, J.M., et al., *Efficacy of bioactive compounds from extra virgin olive oil to modulate atherosclerosis development*. *Mol Nutr Food Res*, 2012. **56**(7): p. 1043-57.
263. Mataix Verdú, F.J., *El aceite de oliva. Bases para el futuro*. 1988, Jaén: Junta de Andalucía.
264. Harwood, J.a.A., R., *Handbook of olive oil, Analysis and Properties*. 2000: Kluwer Academic Publishers J.L. Harwood, R. Aparicio.
265. Boskou, D., *Olive oil, Chemistry and Technology*. Second ed. 2006, Champaign, Ill: AOCS Press.
266. Boskou, D., *Olive oil*. *World Rev Nutr Diet*, 2000. **87**: p. 56-77.
267. Dieffenbacher, A. and U. Bracco, *Analytical techniques in food emulsifiers*. *J Am Oil Chem Soc*, 1978. **55**(9): p. 642-6.
268. Viola, P. and M. Viola, *Virgin olive oil as a fundamental nutritional component and skin protector*. *Clin Dermatol*, 2009. **27**(2): p. 159-65.
269. Sanchez-Fidalgo, S., et al., *Dietary unsaponifiable fraction from extra virgin olive oil supplementation attenuates acute ulcerative colitis in mice*. *Eur J Pharm Sci*, 2012. **48**(3): p. 572-581.
270. Lou-Bonafonte, J.M., et al., *HDL-related mechanisms of olive oil protection in cardiovascular disease*. *Curr Vasc Pharmacol*, 2012. **10**(4): p. 392-409.
271. Owen, R.W., et al., *Olive-oil consumption and health: the possible role of antioxidants*. *Lancet Oncol*, 2000. **1**: p. 107-12.
272. Vasto, S., et al., *Mediterranean Diet And Longevity: An Example Of Nutraceuticals?* *Curr Vasc Pharmacol*, 2013.
273. Bertuzzi, M., et al., *Olive oil consumption and risk of non-fatal myocardial infarction in Italy*. *Int J Epidemiol*, 2002. **31**(6): p. 1274-7; author reply 1276-7.
274. Perez-Jimenez, F., et al., *Olive oil and haemostasis: a review on its healthy effects*. *Public Health Nutr*, 2006. **9**(8A): p. 1083-8.
275. Waterman, E. and B. Lockwood, *Active components and clinical applications of olive oil*. *Altern Med Rev*, 2007. **12**(4): p. 331-42.
276. La Vecchia, C., *Association between Mediterranean dietary patterns and cancer risk*. *Nutr Rev*, 2009. **67 Suppl 1**: p. S126-9.
277. Castaner, O., et al., *The effect of olive oil polyphenols on antibodies against oxidized LDL. A randomized clinical trial*. *Clin Nutr*, 2011. **30**(4): p. 490-3.

## BIBLIOGRAFÍA

278. Pelucchi, C., et al., *Olive oil and cancer risk: an update of epidemiological findings through 2010*. *Curr Pharm Des*, 2011. **17**(8): p. 805-12.
279. Acín, S., et al., *Hydroxytyrosol administration enhances atherosclerotic lesion development in apo E deficient mice*. *J Biochem*, 2006. **140**(3): p. 383-91.
280. van Dijk, S.J., et al., *Consumption of a high monounsaturated fat diet reduces oxidative phosphorylation gene expression in peripheral blood mononuclear cells of abdominally overweight men and women*. *J Nutr*, 2012. **142**(7): p. 1219-25.
281. Matyas, G.R., et al., *Induction and detection of antibodies to squalene*. *J Immunol Methods*, 2000. **245**(1-2): p. 1-14.
282. Xu, R., G.C. Fazio, and S.P. Matsuda, *On the origins of triterpenoid skeletal diversity*. *Phytochemistry*, 2004. **65**(3): p. 261-91.
283. Hallgren, B. and G. Stallberg, *1-O-(2-hydroxyalkyl)glycerols isolated from Greenland shark liver oil*. *Acta Chem Scand B*, 1974. **28**(9): p. 1074-6.
284. Smith, T.J., *Squalene: potential chemopreventive agent*. *Expert Opin Investig Drugs*, 2000. **9**(8): p. 1841-8.
285. Liu, G.C., et al., *Measurement of squalene in human tissues and plasma: validation and application*. *J Lipid Res*, 1976. **17**(1): p. 38-45.
286. Miettinen, T.A. and H. Vanhanen, *Serum concentration and metabolism of cholesterol during rapeseed oil and squalene feeding*. *Am J Clin Nutr*, 1994. **59**(2): p. 356-63.
287. Kelly, G.S., *Squalene and its potential clinical uses*. *Altern Med Rev*, 1999. **4**(1): p. 29-36.
288. Kohno, Y., et al., *Kinetic study of quenching reaction of singlet oxygen and scavenging reaction of free radical by squalene in n-butanol*. *Biochim Biophys Acta*, 1995. **1256**(1): p. 52-6.
289. Saint-Leger, D., et al., *A possible role for squalene in the pathogenesis of acne. II. In vivo study of squalene oxides in skin surface and intra-comedonal lipids of acne patients*. *Br J Dermatol*, 1986. **114**(5): p. 543-52.
290. Ghanbari, R., et al., *Valuable Nutrients and Functional Bioactives in Different Parts of Olive (Olea europaea L.)-A Review*. *Int J Mol Sci*. **13**(3): p. 3291-340.
291. Sotiroudis, T.G. and S.A. Kyrtopoulos, *Anticarcinogenic compounds of olive oil and related biomarkers*. *Eur J Nutr*, 2008. **47 Suppl 2**: p. 69-72.
292. Newmark, H.L., *Squalene, olive oil, and cancer risk: a review and hypothesis*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 1997. **6**(12): p. 1101-3.
293. Murakoshi, M., et al., *Inhibition by squalene of the tumor-promoting activity of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate in mouse-skin carcinogenesis*. *Int J Cancer*, 1992. **52**(6): p. 950-2.
294. Zadak, Z., et al., *Polyunsaturated fatty acids, phytosterols and cholesterol metabolism in the Mediterranean diet*. *Acta Medica (Hradec Kralove)*, 2006. **49**(1): p. 23-6.
295. Arbonés-Mainar, J.M., et al., *Accelerated atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice fed Western diets containing palm oil compared with extra virgin olive oils: a role for small, dense high-density lipoproteins*. *Atherosclerosis*, 2007. **194**(2): p. 372-82.
296. Strandberg, T.E., R.S. Tilvis, and T.A. Miettinen, *Effects of cholestyramine and squalene feeding on hepatic and serum plant sterols in the rat*. *Lipids*, 1989. **24**(8): p. 705-8.
297. Guillen, N., et al., *Squalene in a sex-dependent manner modulates atherosclerotic lesion which correlates with hepatic fat content in apoE-knockout male mice*. *Atherosclerosis*, 2008. **196**: p. 558-564.
298. Pollier, J. and A. Goossens, *Oleanolic acid*. *Phytochemistry*, 2012. **77**: p. 10-5.
299. Guillén, N., et al., *Cloning, characterization, expression and comparative analysis of pig Golgi membrane sphingomyelin synthase 1*. *Gene*, 2007. **388**(1-2): p. 117-24.
300. Allouche, Y., et al., *Triterpenic content and chemometric analysis of virgin olive oils from forty olive cultivars*. *J Agric Food Chem*, 2009. **57**(9): p. 3604-10.
301. Perez-Camino, M.C. and A. Cert, *Quantitative determination of hydroxy pentacyclic triterpene acids in vegetable oils*. *J Agric Food Chem*, 1999. **47**(4): p. 1558-62.
302. Allouche, Y., et al., *How heating affects extra virgin olive oil quality indexes and chemical composition*. *J Agric Food Chem*, 2007. **55**(23): p. 9646-54.
303. Lu, Y.F., et al., *Repeated oral administration of oleanolic acid produces cholestatic liver injury in mice*. *Molecules*, 2013. **18**(3): p. 3060-71.
304. Sato, H., et al., *Anti-hyperglycemic activity of a TGR5 agonist isolated from Olea europaea*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007. **362**(4): p. 793-8.
305. Liu, J., *Oleanolic acid and ursolic acid: research perspectives*. *J Ethnopharmacol*, 2005. **100**(1-2): p. 92-4.

## BIBLIOGRAFÍA

306. Liu, J., et al., *Oleanolic acid alters bile acid metabolism and produces cholestatic liver injury in mice*. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2013. **272**(3): p. 816-24.
307. Graham, V.S., et al., *Triacylglycerol-rich lipoproteins derived from healthy donors fed different olive oils modulate cytokine secretion and cyclooxygenase-2 expression in macrophages: the potential role of oleanolic acid*. *Eur J Nutr*, 2012. **51**(3): p. 301-9.
308. Jeong, D.W., et al., *Dose-linear pharmacokinetics of oleanolic acid after intravenous and oral administration in rats*. *Biopharm Drug Dispos*, 2007. **28**(2): p. 51-7.
309. Balanehru, S. and B. Nagarajan, *Protective effect of oleanolic acid and ursolic acid against lipid peroxidation*. *Biochem Int*, 1991. **24**(5): p. 981-90.
310. Perona, J.S., et al., *Effect of dietary high-oleic-acid oils that are rich in antioxidants on microsomal lipid peroxidation in rats*. *J Agric Food Chem*, 2005. **53**(3): p. 730-5.
311. He, X., et al., *A fluorescence-based, high-throughput sphingomyelin assay for the analysis of Niemann-Pick disease and other disorders of sphingomyelin metabolism*. *Anal Biochem*, 2002. **306**(1): p. 115-23.
312. Feng, J., et al., *PI3K and ERK/Nrf2 pathways are involved in oleanolic acid-induced heme oxygenase-1 expression in rat vascular smooth muscle cells*. *J Cell Biochem*, 2011. **112**(6): p. 1524-31.
313. Rodriguez-Rodriguez, R., et al., *Potential vasorelaxant effects of oleanolic acid and erythrodiol, two triterpenoids contained in 'orujo' olive oil, on rat aorta*. *Br J Nutr*, 2004. **92**(4): p. 635-42.
314. Lucio, K.A., et al., *Oleanolic acid initiates apoptosis in non-small cell lung cancer cell lines and reduces metastasis of a B16F10 melanoma model in vivo*. *PLoS One*, 2011. **6**(12): p. e28596.
315. Hsu, H.Y., J.J. Yang, and C.C. Lin, *Effects of oleanolic acid and ursolic acid on inhibiting tumor growth and enhancing the recovery of hematopoietic system postirradiation in mice*. *Cancer Lett*, 1997. **111**(1-2): p. 7-13.
316. Kashiwada, Y., et al., *Anti-AIDS agents. 30. Anti-HIV activity of oleanolic acid, pomolic acid, and structurally related triterpenoids*. *J Nat Prod*, 1998. **61**(9): p. 1090-5.
317. Mengoni, F., et al., *In vitro anti-HIV activity of oleanolic acid on infected human mononuclear cells*. *Planta Med*, 2002. **68**(2): p. 111-4.
318. Senthil, S., M. Sridevi, and K.V. Pugalendi, *Cardioprotective effect of oleanolic acid on isoproterenol-induced myocardial ischemia in rats*. *Toxicol Pathol*, 2007. **35**(3): p. 418-23.
319. Somova, L.O., et al., *Cardiovascular, antihyperlipidemic and antioxidant effects of oleanolic and ursolic acids in experimental hypertension*. *Phytomedicine*, 2003. **10**(2-3): p. 115-21.
320. Yoshikawa, M. and H. Matsuda, *Antidiabetogenic activity of oleanolic acid glycosides from medicinal foodstuffs*. *Biofactors*, 2000. **13**(1-4): p. 231-7.
321. Mooser, V. and J.M. Ordovas, *'Omic' approaches and lipid metabolism: are these new technologies holding their promises?* *Curr Opin Lipidol*, 2003. **14**(2): p. 115-9.
322. Collins, F.S., et al., *A vision for the future of genomics research*. *Nature*, 2003. **422**(6934): p. 835-47.
323. van Ommen, B. and R. Stierum, *Nutrigenomics: exploiting systems biology in the nutrition and health arena*. *Curr Opin Biotechnol*, 2002. **13**(5): p. 517-21.
324. Holtzman, N.A., *Genetic variation in nutritional requirements and susceptibility to disease: policy implications*. *Am J Clin Nutr*, 1988. **48**(6): p. 1510-6.
325. Fenech, M., et al., *Nutrigenetics and nutrigenomics: viewpoints on the current status and applications in nutrition research and practice*. *J Nutrigenet Nutrigenomics*, 2011. **4**(2): p. 69-89.
326. Ordovas, J.M. and D. Corella, *Nutritional genomics*. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 2004. **5**: p. 71-118.
327. Ordovas, J.M. and V. Mooser, *Nutrigenomics and nutrigenetics*. *Curr Opin Lipidol*, 2004. **15**(2): p. 101-8.
328. Mutch, D.M., W. Wahli, and G. Williamson, *Nutrigenomics and nutrigenetics: the emerging faces of nutrition*. *FASEB J*, 2005. **19**(12): p. 1602-16.
329. Muller, M. and S. Kersten, *Nutrigenomics: goals and strategies*. *Nat Rev Genet*, 2003. **4**(4): p. 315-22.
330. Elliott, R.M., *Transcriptomics and micronutrient research*. *Br J Nutr*, 2008. **99 Suppl 3**: p. S59-65.
331. Ordovas Munoz, J.M., *Predictors of obesity: the "power" of the omics*. *Nutr Hosp*, 2013. **28 Suppl 5**: p. 63-71.
332. Prelich, G., *Gene overexpression: uses, mechanisms, and interpretation*. *Genetics*, 2012. **190**(3): p. 841-54.

## BIBLIOGRAFÍA

333. Lejeune, J., R. Turpin, and M. Gautier, [*Mongolism; a chromosomal disease (trisomy)*]. Bull Acad Natl Med, 1959. **143**(11-12): p. 256-65.
334. Birchler, J.A. and R.A. Veitia, *The gene balance hypothesis: from classical genetics to modern genomics*. Plant Cell, 2007. **19**(2): p. 395-402.
335. Prelich, G., *Suppression mechanisms: themes from variations*. Trends Genet, 1999. **15**(7): p. 261-6.
336. Tong, A.H., et al., *Systematic genetic analysis with ordered arrays of yeast deletion mutants*. Science, 2001. **294**(5550): p. 2364-8.
337. Herskowitz, I., *Functional inactivation of genes by dominant negative mutations*. Nature, 1987. **329**(6136): p. 219-22.
338. Arnoldo, A., et al., *Identification of small molecule inhibitors of Pseudomonas aeruginosa exoenzyme S using a yeast phenotypic screen*. PLoS Genet, 2008. **4**(2): p. e1000005.
339. Takahashi, K. and S. Yamanaka, *Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors*. Cell, 2006. **126**(4): p. 663-76.
340. Berger, S.L., et al., *Genetic isolation of ADA2: a potential transcriptional adaptor required for function of certain acidic activation domains*. Cell, 1992. **70**(2): p. 251-65.
341. Dolan, J.W. and S. Fields, *Overproduction of the yeast STE12 protein leads to constitutive transcriptional induction*. Genes Dev, 1990. **4**(4): p. 492-502.
342. Kim, J.H., et al., *Ubiquitin ligase MKRN1 modulates telomere length homeostasis through a proteolysis of hTERT*. Genes Dev, 2005. **19**(7): p. 776-81.
343. Meeks-Wagner, D. and L.H. Hartwell, *Normal stoichiometry of histone dimer sets is necessary for high fidelity of mitotic chromosome transmission*. Cell, 1986. **44**(1): p. 43-52.
344. Lin, J. and E.H. Blackburn, *Nucleolar protein PinX1p regulates telomerase by sequestering its protein catalytic subunit in an inactive complex lacking telomerase RNA*. Genes Dev, 2004. **18**(4): p. 387-96.
345. Lopez-Aviles, S., et al., *Inactivation of the Cdc25 phosphatase by the stress-activated Srk1 kinase in fission yeast*. Mol Cell, 2005. **17**(1): p. 49-59.
346. Davis, R.L., H. Weintraub, and A.B. Lassar, *Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts*. Cell, 1987. **51**(6): p. 987-1000.
347. Rine, J., et al., *Targeted selection of recombinant clones through gene dosage effects*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1983. **80**(22): p. 6750-4.
348. Suzuki-Fujimoto, T., et al., *Analysis of the galactose signal transduction pathway in Saccharomyces cerevisiae: interaction between Gal3p and Gal80p*. Mol Cell Biol, 1996. **16**(5): p. 2504-8.
349. Kato, S., et al., *Activation of the estrogen receptor through phosphorylation by mitogen-activated protein kinase*. Science, 1995. **270**(5241): p. 1491-4.
350. Erickson, J.W. and T.W. Cline, *Molecular nature of the Drosophila sex determination signal and its link to neurogenesis*. Science, 1991. **251**(4997): p. 1071-4.
351. Santarius, T., et al., *A census of amplified and overexpressed human cancer genes*. Nat Rev Cancer, 2010. **10**(1): p. 59-64.
352. Carroll, S.B., *Evo-devo and an expanding evolutionary synthesis: a genetic theory of morphological evolution*. Cell, 2008. **134**(1): p. 25-36.
353. Maier, P., C. von Kalle, and S. Laufs, *Retroviral vectors for gene therapy*. Future Microbiol, 2010. **5**(10): p. 1507-23.
354. Guillen, N., et al., *Knowledge of the biological actions of extra virgin olive oil gained from mice lacking apolipoprotein E*. Rev Esp Cardiol, 2009. **62**(3): p. 294-304.
355. Reddick, R.L., S.H. Zhang, and N. Maeda, *Atherosclerosis in mice lacking apo E. Evaluation of lesional development and progression*. Arterioscler Thromb, 1994. **14**(1): p. 141-7.
356. Acin, S., et al., *Microarray analysis of hepatic genes differentially expressed in the presence of the unsaponifiable fraction of olive oil in apolipoprotein E-deficient mice*. Br J Nutr, 2007. **97**(4): p. 628-38.
357. Overturf, M.L. and D.S. Loose-Mitchell, *In vivo model systems: the choice of the experimental animal model for analysis of lipoproteins and atherosclerosis*. Curr Opin Lipidol, 1992. **3**: p. 179-185.
358. Nishina, P.M., et al., *Atherosclerosis and plasma and liver lipids in nine inbred strains of mice*. Lipids, 1993. **28**(7): p. 599-605.
359. Waxman, D.J. and M.G. Holloway, *Sex differences in the expression of hepatic drug metabolizing enzymes*. Mol Pharmacol, 2009. **76**(2): p. 215-28.
360. Waxman, D.J. and C. O'Connor, *Growth hormone regulation of sex-dependent liver gene expression*. Mol Endocrinol, 2006. **20**(11): p. 2613-29.

## BIBLIOGRAFÍA

361. Veldhuis, J.D. and C.Y. Bowers, *Three-peptide control of pulsatile and entropic feedback-sensitive modes of growth hormone secretion: modulation by estrogen and aromatizable androgen*. J Pediatr Endocrinol Metab, 2003. **16 Suppl 3**: p. 587-605.
362. Park, S.H., C.A. Wiwi, and D.J. Waxman, *Signalling cross-talk between hepatocyte nuclear factor 4alpha and growth-hormone-activated STAT5b*. Biochem J, 2006. **397**(1): p. 159-68.
363. Verma, A.S., R.N. Dhir, and B.H. Shapiro, *Inadequacy of the Janus kinase 2/signal transducer and activator of transcription signal transduction pathway to mediate episodic growth hormone-dependent regulation of hepatic CYP2C11*. Mol Pharmacol, 2005. **67**(3): p. 891-901.
364. Clodfelter, K.H., et al., *Sex-dependent liver gene expression is extensive and largely dependent upon signal transducer and activator of transcription 5b (STAT5b): STAT5b-dependent activation of male genes and repression of female genes revealed by microarray analysis*. Mol Endocrinol, 2006. **20**(6): p. 1333-51.
365. Oscarsson, J., et al., *Growth hormone regulation of serum lipoproteins in the rat: different growth hormone regulatory principles for apolipoprotein (apo) B and the sexually dimorphic apo E concentrations*. Metabolism, 1991. **40**(11): p. 1191-8.
366. Johnson, D., R. al-Shawi, and J.O. Bishop, *Sexual dimorphism and growth hormone induction of murine pheromone-binding proteins*. J Mol Endocrinol, 1995. **14**(1): p. 21-34.
367. Amador-Noguez, D., et al., *Gender-specific alterations in gene expression and loss of liver sexual dimorphism in the long-lived Ames dwarf mice*. Biochem Biophys Res Commun, 2005. **332**(4): p. 1086-100.
368. Cheung, P. and P. Lau, *Epigenetic regulation by histone methylation and histone variants*. Mol Endocrinol, 2005. **19**(3): p. 563-73.
369. Jalouli, M., et al., *Sex difference in hepatic peroxisome proliferator-activated receptor alpha expression: influence of pituitary and gonadal hormones*. Endocrinology, 2003. **144**(1): p. 101-9.
370. Laz, E.V., et al., *Characterization of three growth hormone-responsive transcription factors preferentially expressed in adult female liver*. Endocrinology, 2007. **148**(7): p. 3327-37.
371. Yokoyama, Y., et al., *Current understanding of gender dimorphism in hepatic pathophysiology*. J Surg Res, 2005. **128**(1): p. 147-56.
372. Shimizu, I., et al., *Female hepatology: favorable role of estrogen in chronic liver disease with hepatitis B virus infection*. World J Gastroenterol, 2007. **13**(32): p. 4295-305.
373. Rogers, A.B., et al., *Hepatocellular carcinoma associated with liver-gender disruption in male mice*. Cancer Res, 2007. **67**(24): p. 11536-46.
374. Yao, Y.C., et al., *Influence of castration-induced sex hormone deficiency on serum lipid levels and the genes expression in male pigs*. Horm Metab Res, 2011. **43**(10): p. 674-80.
375. Xia, J.F., et al., *Flavonoids as potential anti-hepatocellular carcinoma agents: recent approaches using HepG2 cell line*. Drug Discov Ther, 2013. **7**(1): p. 1-8.
376. Knowles, B.B., C.C. Howe, and D.P. Aden, *Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen*. Science, 1980. **209**(4455): p. 497-9.
377. Roe, A.L., et al., *HepG2 cells: an in vitro model for P450-dependent metabolism of acetaminophen*. Biochem Biophys Res Commun, 1993. **190**(1): p. 15-9.
378. Dehn, P.F., et al., *Characterization of the human hepatocellular carcinoma (hepg2) cell line as an in vitro model for cadmium toxicity studies*. In Vitro Cell Dev Biol Anim, 2004. **40**(5-6): p. 172-82.
379. Hart, S.N., et al., *A comparison of whole genome gene expression profiles of HepaRG cells and HepG2 cells to primary human hepatocytes and human liver tissues*. Drug Metab Dispos, 2010. **38**(6): p. 988-94.
380. Bustin, S.A., et al., *The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments*. Clin Chem, 2009. **55**(4): p. 611-22.
381. Zhang, G., V. Budker, and J.A. Wolff, *High levels of foreign gene expression in hepatocytes after tail vein injections of naked plasmid DNA*. Hum Gene Ther, 1999. **10**(10): p. 1735-7.
382. Liu, F., Y. Song, and D. Liu, *Hydrodynamics-based transfection in animals by systemic administration of plasmid DNA*. Gene Ther, 1999. **6**(7): p. 1258-66.
383. Acin, S., et al., *Dietary cholesterol suppresses the ability of olive oil to delay the development of atherosclerotic lesions in apolipoprotein E knockout mice*. Atherosclerosis, 2005. **182**(1): p. 17-28.
384. Arbonés-Mainar, J.M., et al., *Trans-10, cis-12- and cis-9, trans-11-conjugated linoleic acid isomers selectively modify HDL-apolipoprotein composition in apolipoprotein E knockout mice*. J Nutr, 2006. **136**(2): p. 353-9.

## BIBLIOGRAFÍA

385. Gabas-Rivera, C., et al., *Dietary oleanolic acid mediates circadian clock gene expression in liver independently of diet and animal model but requires apolipoprotein A1*. J Nutr Biochem, 2013. **24**(12): p. 2100-9.
386. Guillén, N., et al., *Squalene in a sex-dependent manner modulates atherosclerotic lesion which correlates with hepatic fat content in apoE-knockout male mice*. Atherosclerosis, 2008. **197**(1): p. 72-83.
387. Reeves, P.G., F.H. Nielsen, and G.C. Fahey, *AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet*. J Nutr, 1993. **123**(11): p. 1939-51.
388. Guillen, N., et al., *Apolipoprotein E determines the hepatic transcriptional profile of dietary maslinic acid in mice*. J Nutr Biochem, 2009. **20**(11): p. 882-93.
389. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method*. Methods, 2001. **25**(4): p. 402-8.
390. Folch, J., M. Lees, and G.H. Sloane Stanley, *A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues*. J Biol Chem, 1957. **226**(1): p. 497-509.
391. Hubbard, A.L., D.A. Wall, and A. Ma, *Isolation of rat hepatocyte plasma membranes. I. Presence of the three major domains*. J Cell Biol, 1983. **96**(1): p. 217-29.
392. Osada, J., et al., *Isolation of rat liver lysosomes by a single two-phase partition on dextran/polyethylene glycol*. Anal Biochem, 1990. **185**(2): p. 249-53.
393. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem, 1976. **72**: p. 248-54.
394. Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon, *Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1979. **76**(9): p. 4350-4.
395. Zhou, M., et al., *A stable nonfluorescent derivative of resorufin for the fluorometric determination of trace hydrogen peroxide: applications in detecting the activity of phagocyte NADPH oxidase and other oxidases*. Anal Biochem, 1997. **253**(2): p. 162-8.
396. Mohanty, J.G., et al., *A highly sensitive fluorescent micro-assay of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> release from activated human leukocytes using a dihydroxyphenoxazine derivative*. J Immunol Methods, 1997. **202**(2): p. 133-41.
397. Li, Y., et al., *Regulation of insulin secretion and GLUT4 trafficking by the calcium sensor synaptotagmin VII*. Biochem Biophys Res Commun, 2007. **362**(3): p. 658-64.
398. Nakajima-Nagata, N., et al., *Pdx-1 enables insulin secretion by regulating synaptotagmin 1 gene expression*. Biochem Biophys Res Commun, 2004. **318**(3): p. 631-5.
399. Lang, J., et al., *The first C2 domain of synaptotagmin is required for exocytosis of insulin from pancreatic beta-cells: action of synaptotagmin at low micromolar calcium*. EMBO J, 1997. **16**(19): p. 5837-46.
400. Jacobsson, G., et al., *Identification of synaptic proteins and their isoform mRNAs in compartments of pancreatic endocrine cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(26): p. 12487-91.
401. Acín, S., et al., *Microarray analysis of hepatic genes differentially expressed in the presence of the unsaponifiable fraction of olive oil in apolipoprotein E-deficient mice*. Br J Nutr, 2007. **97**(4): p. 628-38.
402. Bagalá, C., et al., *The alternative translation of synaptotagmin 1 mediates the non-classical release of FGF1*. Biochem Biophys Res Commun, 2003. **310**(4): p. 1041-7.
403. Han, W., et al., *N-glycosylation is essential for vesicular targeting of synaptotagmin I*. Neuron, 2004. **41**(1): p. 85-99.
404. Sancho-Knapik, S., N. Guillen, and J. Osada, *Cloning and expression of hepatic synaptotagmin I in mouse*. Gene, 2015. **562**(2): p. 236-243.
405. Calleja, L., et al., *Low-cholesterol and high-fat diets reduce atherosclerotic lesion development in ApoE-knockout mice*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1999. **19**(10): p. 2368-75.
406. Hojjati, M.R. and X.C. Jiang, *Rapid, specific, and sensitive measurements of plasma sphingomyelin and phosphatidylcholine*. J Lipid Res, 2006. **47**(3): p. 673-6.
407. Navarro, M.A., et al., *Immune-regulation of the apolipoprotein A-I/C-III/A-IV gene cluster in experimental inflammation*. Cytokine, 2005(1): p. 52-63.
408. Sehayek, E., et al., *Apolipoprotein E regulates dietary cholesterol absorption and biliary cholesterol excretion: studies in C57BL/6 apolipoprotein E knockout mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(7): p. 3433-7.
409. Calkin, A.C. and P. Tontonoz, *Transcriptional integration of metabolism by the nuclear sterol-activated receptors LXR and FXR*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2012. **13**(4): p. 213-24.

## BIBLIOGRAFÍA

410. Rudel, L.L., R.G. Lee, and P. Parini, *ACAT2 is a target for treatment of coronary heart disease associated with hypercholesterolemia*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005. **25**(6): p. 1112-8.
411. Gordon, D.A. and H. Jamil, *Progress towards understanding the role of microsomal triglyceride transfer protein in apolipoprotein-B lipoprotein assembly*. *Biochim Biophys Acta*, 2000. **1486**(1): p. 72-83.
412. Wetterau, J.R., M.C. Lin, and H. Jamil, *Microsomal triglyceride transfer protein*. *Biochim Biophys Acta*, 1997. **1345**(2): p. 136-50.
413. Hussain, M.M., et al., *Microsomal triglyceride transfer protein: a multifunctional protein*. *Front Biosci*, 2003. **8**: p. s500-6.
414. Hussain, M.M., J. Shi, and P. Dreizen, *Microsomal triglyceride transfer protein and its role in apoB-lipoprotein assembly*. *J Lipid Res*, 2003. **44**(1): p. 22-32.
415. Iqbal, J., L.L. Rudel, and M.M. Hussain, *Microsomal triglyceride transfer protein enhances cellular cholesterol esterification by relieving product inhibition*. *J Biol Chem*, 2008. **283**(29): p. 19967-80.
416. Jian, B., et al., *Scavenger receptor class B type I as a mediator of cellular cholesterol efflux to lipoproteins and phospholipid acceptors*. *J Biol Chem*, 1998. **273**(10): p. 5599-606.
417. Yen, C.L., et al., *Thematic review series: glycerolipids. DGAT enzymes and triacylglycerol biosynthesis*. *J Lipid Res*, 2008. **49**(11): p. 2283-301.
418. Monetti, M., et al., *Dissociation of hepatic steatosis and insulin resistance in mice overexpressing DGAT in the liver*. *Cell Metab*, 2007. **6**(1): p. 69-78.
419. Millar, J.S., et al., *Short-term overexpression of DGAT1 or DGAT2 increases hepatic triglyceride but not VLDL triglyceride or apoB production*. *J Lipid Res*, 2006. **47**(10): p. 2297-305.
420. Alger, H.M., et al., *Inhibition of acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferase 2 (ACAT2) prevents dietary cholesterol-associated steatosis by enhancing hepatic triglyceride mobilization*. *J Biol Chem*, 2010. **285**(19): p. 14267-74.
421. Nishino, N., et al., *FSP27 contributes to efficient energy storage in murine white adipocytes by promoting the formation of unilocular lipid droplets*. *J Clin Invest*, 2008. **118**(8): p. 2808-21.
422. Kelley, D.S., et al., *Contrasting effects of t10,c12- and c9,t11-conjugated linoleic acid isomers on the fatty acid profiles of mouse liver lipids*. *Lipids*, 2004. **39**(2): p. 135-41.
423. Ntambi, J.M. and M. Miyazaki, *Recent insights into stearoyl-CoA desaturase-1*. *Curr Opin Lipidol*, 2003. **14**(3): p. 255-61.
424. Ntambi, J.M., et al., *Loss of stearoyl-CoA desaturase-1 function protects mice against adiposity*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. **99**(17): p. 11482-6.
425. Miyazaki, M., W.C. Man, and J.M. Ntambi, *Targeted disruption of stearoyl-CoA desaturase1 gene in mice causes atrophy of sebaceous and meibomian glands and depletion of wax esters in the eyelid*. *J Nutr*, 2001. **131**(9): p. 2260-8.
426. Braissant, O., et al., *Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR-alpha, -beta, and -gamma in the adult rat*. *Endocrinology*, 1996. **137**(1): p. 354-66.
427. Lin, J., et al., *Hyperlipidemic effects of dietary saturated fats mediated through PGC-1beta coactivation of SREBP*. *Cell*, 2005. **120**(2): p. 261-73.
428. Finck, B.N. and D.P. Kelly, *PGC-1 coactivators: inducible regulators of energy metabolism in health and disease*. *J Clin Invest*, 2006. **116**(3): p. 615-22.
429. Memon, R.A., et al., *Up-regulation of peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR-alpha) and PPAR-gamma messenger ribonucleic acid expression in the liver in murine obesity: troglitazone induces expression of PPAR-gamma-responsive adipose tissue-specific genes in the liver of obese diabetic mice*. *Endocrinology*, 2000. **141**(11): p. 4021-31.
430. Yu, S., et al., *Adipocyte-specific gene expression and adipogenic steatosis in the mouse liver due to peroxisome proliferator-activated receptor gamma1 (PPARgamma1) overexpression*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(1): p. 498-505.
431. Coleman, R.A. and D.P. Lee, *Enzymes of triacylglycerol synthesis and their regulation*. *Prog Lipid Res*, 2004. **43**(2): p. 134-76.
432. Shi, Y. and P. Burn, *Lipid metabolic enzymes: emerging drug targets for the treatment of obesity*. *Nat Rev Drug Discov*, 2004. **3**(8): p. 695-710.
433. Kuipers, F., et al., *Impaired secretion of very low density lipoprotein-triglycerides by apolipoprotein E- deficient mouse hepatocytes*. *J Clin Invest*, 1997. **100**(11): p. 2915-22.
434. Tanigawa, H., et al., *Lecithin: cholesterol acyltransferase expression has minimal effects on macrophage reverse cholesterol transport in vivo*. *Circulation*, 2009. **120**(2): p. 160-9.



## BIBLIOGRAFÍA

435. Zhang, A.H., et al., *Increased plasma HDL cholesterol levels and biliary cholesterol excretion in hamster by LCAT overexpression*. FEBS Lett, 2004. **570**(1-3): p. 25-9.
436. Forte, T.M., et al., *Altered activities of anti-atherogenic enzymes LCAT, paraoxonase, and platelet-activating factor acetylhydrolase in atherosclerosis-susceptible mice*. J Lipid Res, 2002. **43**(3): p. 477-85.
437. Trigatti, B.L., M. Krieger, and A. Rigotti, *Influence of the HDL receptor SR-BI on lipoprotein metabolism and atherosclerosis*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2003. **23**(10): p. 1732-8.
438. de Beer, M.C., et al., *Apolipoprotein A-I conformation markedly influences HDL interaction with scavenger receptor BI*. J Lipid Res, 2001. **42**(2): p. 309-13.
439. Rigotti, A., H.E. Miettinen, and M. Krieger, *The role of the high-density lipoprotein receptor SR-BI in the lipid metabolism of endocrine and other tissues*. Endocr Rev, 2003. **24**(3): p. 357-87.
440. Forte, T.M., et al., *Recruitment of cell phospholipids and cholesterol by apolipoproteins A-II and A-I: formation of nascent apolipoprotein-specific HDL that differ in size, phospholipid composition, and reactivity with LCAT*. J Lipid Res, 1995. **36**(1): p. 148-57.
441. Weng, W. and J.L. Breslow, *Dramatically decreased high density lipoprotein cholesterol, increased remnant clearance, and insulin hypersensitivity in apolipoprotein A-II knockout mice suggest a complex role for apolipoprotein A-II in atherosclerosis susceptibility*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(25): p. 14788-94.
442. Joyce, C.W., et al., *The ATP binding cassette transporter A1 (ABCA1) modulates the development of aortic atherosclerosis in C57BL/6 and apoE-knockout mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(1): p. 407-12.
443. Willner, E.L., et al., *Deficiency of acyl CoA:cholesterol acyltransferase 2 prevents atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(3): p. 1262-7.
444. Su, Y.R., et al., *Reduced ABCA1-mediated cholesterol efflux and accelerated atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice lacking macrophage-derived ACAT1*. Circulation, 2005. **111**(18): p. 2373-81.
445. Kusunoki, J., et al., *Acyl-CoA:cholesterol acyltransferase inhibition reduces atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice*. Circulation, 2001. **103**(21): p. 2604-9.
446. Rossetto, O., et al., *VAMP/synaptobrevin isoforms 1 and 2 are widely and differentially expressed in nonneuronal tissues*. J Cell Biol, 1996. **132**(1-2): p. 167-79.
447. Hu, Y., et al., *Molecular characterization of a metastatic neuroendocrine cell cancer arising in the prostates of transgenic mice*. J Biol Chem, 2002. **277**(46): p. 44462-74.
448. Messenger, S.W., et al., *Tumor protein D52 controls trafficking of an apical endolysosomal secretory pathway in pancreatic acinar cells*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2013. **305**(6): p. G439-52.
449. Martinez-Beamonte, R., et al., *Selection of reference genes for gene expression studies in rats*. J Biotechnol, 2011. **151**(4): p. 325-34.
450. Kiela, P.R., et al., *Effects of Boswellia serrata in mouse models of chemically induced colitis*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2005. **288**(4): p. G798-808.
451. Chen, Y.R., C.F. Meyer, and T.H. Tan, *Persistent activation of c-Jun N-terminal kinase 1 (JNK1) in gamma radiation-induced apoptosis*. J Biol Chem, 1996. **271**(2): p. 631-4.
452. Brenner, C., et al., *Decoding cell death signals in liver inflammation*. J Hepatol, 2013. **59**(3): p. 583-94.
453. Xu, J. and Q. Li, *Review of the in Vivo Functions of the p160 Steroid Receptor Coactivator Family*. Molecular Endocrinology, 2003. **17**(9): p. 1681-1692.
454. Surra, J.C., et al., *Sex as a profound modifier of atherosclerotic lesion development in apolipoprotein E-deficient mice with different genetic backgrounds*. J Atheroscler Thromb, 2010. **17**(7): p. 712-21.
455. Sarria, A.J., et al., *Understanding the role of dietary components on atherosclerosis using genetic engineered mouse models*. Front Biosci, 2006. **11**: p. 955-67.
456. Blomme, B., et al., *Alteration of protein glycosylation in liver diseases*. J Hepatol, 2009. **50**(3): p. 592-603.

