

TESIS DE DOCTORADO

**Papel del sistema L- α -
lisofosfatidilinositol/GPR55 en el
desarrollo de esteatosis no
alcohólica y esteatohepatitis**

Marcos Fernández Fondevila

ESCUELA DE DOCTORADO INTERNACIONAL DE LA USC

PROGRAMA DE DOCTORADO EN ENDOCRINOLOGÍA

SANTIAGO DE COMPOSTELA

AÑO 2021

DECLARACIÓN DEL AUTOR DE LA TESIS

**Papel del sistema L- α -lisofosfatidilinositol/GPR55 en el desarrollo
de esteatosis no alcohólica y esteatohepatitis**

D. Marcos Fernández Fondevila

Presento mi tesis, siguiendo el procedimiento adecuado al Reglamento, y declaro que:

- 1) *La tesis abarca los resultados de la elaboración de mi trabajo.*
- 2) *En su caso, en la tesis se hace referencia a las colaboraciones que tuvo este trabajo.*
- 3) *La tesis es la versión definitiva presentada para su defensa y coincide con la versión enviada en formato electrónico.*
- 4) *Confirmando que la tesis no incurre en ningún tipo de plagio de otros autores ni de trabajos presentados por mí para la obtención de otros títulos.*

En Santiago de Compostela, enero de 2021



AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR / TUTOR DE LA TESIS

Papel del sistema L- α -lisofosfatidilinositol/GPR55 en el desarrollo
de esteatosis no alcohólica y esteatohepatitis

D. Rubén Nogueiras Pozo

D. Carlos Diéguez González

INFORMA/N:

*Que la presente tesis, corresponde con el trabajo realizado por D/Dña. **Marcos Fernández Fondevila**, bajo nuestra dirección, y autorizamos su presentación, considerando que reúne los requisitos exigidos en el Reglamento de Estudios de Doctorado de la USC, y que como directores de ésta no incurre en las causas de abstención establecidas en Ley 40/2015.*

En Santiago de Compostela, enero de 2021

Rubén Nogueiras
Pozo

Carlos Diéguez
González



DECLARACIÓN DE CONFLICTO DE INTERÉS

Marcos Fernández Fondevila declara no tener ningún conflicto de interés en relación con la tesis doctoral



En Santiago de Compostela, enero de 2021





Papel del sistema L- α -lisofosfatidilinositol/GPR55 en el desarrollo de esteatosis no alcohólica y esteatohepatitis

RESUMEN

El receptor acoplado a proteína G 55 (GPR55) es un receptor cannabinoide putativo, y L- α -lisofosfatidilinositol (LPI) es su único ligando endógeno conocido. Aunque GPR55 está implicado en la homeostasis energética en diferentes órganos, su posible papel en el metabolismo lipídico del hígado no ha sido estudiado. Nosotros hipotetizamos que el sistema LPI/GPR55 podría modular el metabolismo lipídico hepático y su desregulación podría contribuir al desarrollo de la enfermedad de hígado graso no alcohólica (NAFLD). Medimos: 1) la expresión de GPR55 en el hígado de pacientes con NAFLD, comparándolo con los individuos sin la patología, y en diferentes modelos animales de NAFLD; 2) niveles de LPI en suero de pacientes con esteatosis (NAFL) y esteatohepatitis no alcohólica (NASH); 3) los efectos de LPI y la disrupción genética de GPR55 en ratones, hepatocitos humanos y células estelares hepáticas humanas. Encontramos que los niveles de LPI circulante y la expresión de GPR55 hepática están aumentados en pacientes con NASH. LPI induce la activación de la enzima acetil-CoA carboxilasa (ACC) por parte de la proteína quinasa activada por AMP (AMPK), incrementando el contenido lipídico en hepatocitos humanos y en el hígado de ratones por activación de la lipogénesis *de novo* e inhibición de la beta oxidación. La inhibición de GPR55 y ACC α bloquea los efectos de LPI, y el silenciamiento hepático de GPR55 *in vivo* es suficiente para mejorar el daño hepático en ratones alimentados con dieta alta en grasa y en ratones alimentados con dieta deficiente en metionina y colina. LPI también es capaz de desencadenar la activación de células estelares hepáticas estimulando GPR55 y activando ACC. Estos resultados muestran la importancia del sistema LPI/GPR55 en el desarrollo de NAFL y NASH activando ACC.



Role of the L- α -lysophosphatidylinositol/GPR55 system in the development of non-alcoholic steatosis and steatohepatitis

ABSTRACT

G protein-coupled receptor 55 (GPR55) is a putative cannabinoid receptor, and 1- α -lysophosphatidylinositol (LPI) is its only known endogenous ligand. Although GPR55 has been linked to energy homeostasis in different organs, its potential role in lipid metabolism in the liver has not previously studied. We hypothesized that the LPI/GPR55 system could modulate the hepatic lipid metabolism and its deregulation could contribute to the development of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). We measured: 1) GPR55 expression in the liver of patients with NAFLD, compared with individuals without liver disease, as well as animal models of NAFLD; LPI serum levels in patients with steatosis (NAFL) and non-alcoholic steatohepatitis (NASH); and 2) the effects of LPI and genetic disruption of GPR55 in mice, human hepatocytes and human hepatic stellate cells. We found that circulating LPI and liver expression of GPR55 were upregulated in patients with NASH. LPI induced- AMP-activated protein kinase (AMPK) activation of acetyl-CoA carboxylase (ACC) and increased lipid content in human hepatocytes and in the liver of treated mice by inducing *de novo* lipogenesis and decreasing beta oxidation. The inhibition of GPR55 and ACC α blocked the effects of LPI, and the *in vivo knockdown* of GPR55 was sufficient to improve liver damage in mice fed a high fat diet and mice fed a methionine–choline-deficient diet. Finally, LPI promoted the initiation of hepatic stellate cells activation by stimulating GPR55 and activation of ACC. These results highlight the importance of the LPI/GPR55 system in the development of NAFL and NASH by activating ACC.



Papel do sistema L- α -lisofosfatidilinositol/GPR55 no desenvolvemento de esteatose non alcohólica y esteat hepatite

RESUMO

A enfermidade de fígado graxo non alcohólica (NAFLD) é unha gran ameaza para a saúde global debido ás crecentes incidencia e prevalencia. Volveuse a causa primeira de enfermidade hepática e a pesar dos numerosos esforzos para achar dianas terapéuticas non existe aínda hoxe terapia dispoñible aprobada. No mesmo sentido, os receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) están entre as dianas de fármacos máis extensamente estudadas, debido á forte implicación na fisiopatoloxía e á súa flexibilidade farmacolóxica. De feito, aproximadamente o 34% de todos os fármacos aprobados actúan dalgunha maneira vía GPCRs, o que reflicte a relevancia da activación ou inhibición de cascadas de transdución de sinais por modulación da actividade de GPCRs no descubrimento de novos tratamentos.

O receptor acoplado a proteína G 55 (GPR55) é, xunto cos receptores clásicos tipo 1 e 2 (coñecidos como CB1 e CB2), considerado un receptor cannabinoide putativo. O sistema endocannabinoide (ECS) está implicado nunha gran variedade de procesos biolóxicos, sen embargo un dos aspectos polos que captou máis a atención nos últimos anos foi sen dúbida a súa habilidade para modular o metabolismo enerxético. GPR55 exprésase amplamente en tecidos humanos e roedores e media as accións do ligando endóxeno lisofosfatidilinositol (LPI) e en moita menor medida as accións da anandamida e o 2-araquidoneoilglicerol. LPI pertence á clase de lisofosfolípidos e é xerado por hidrólise do fosfatidilinositol pola acción da fosfolipasa A2 e a fosfolipasa 1 dependente de calcio. GPR55 está implicada en numerosas accións fisiolóxicas incluíndo reprodución, anxioxénese, apoptose, inflamación e homeostase enerxética, entre outras. No tracto gastrointestinal, a activación de GPR55 leva á inhibición das contraccións neuroxénicas no intestino de ratos, e tamén afecta a motilidade do colon. En relación ao papel do sistema LPI/GPR55 en metabolismo, está asociado positivamente coa obesidade en humanos xa que LPI induce a expresión de xenes lipoxénicos en explantes de tecido adiposo visceral en pacientes obesos. No páncreas, a exposición de illotes pancreáticos de roedores a agonistas de GPR55 potencia a secreción de insulina e mellora a tolerancia á glucosa. De xeito semellante, a exposición de illotes pancreáticos humanos a ligandos de GPR55 tamén potencia a os niveles de insulina.

A presenza de ARNm de GPR55 foi detectada no fígado de humanos e ratos, sen embargo, a función hepática de LPI/GPR55 permanece totalmente descoñecida polo de agora. Nós hipotetizamos que o sistema LPI/GPR55 podería modular o metabolismo lipídico hepático e a súa desregulación podería contribuir ao desenvolvemento do NAFLD. Daquela, os nosos obxectivos principais foron 1) investigar a posible función de GPR55 no metabolismo lipídico no fígado; e 2) estudar o papel que o sistema LPI/GPR55 podería ter no desenvolvemento do NAFLD.

Nós comezamos medindo os niveis de expresión de GPR55 en pacientes humanos con NAFLD. As análises de biopsias de fígado de pacientes obesos con NAFLD con índice de masa corporal (BMI) > 35 kg/m² revelaron unha elevada expresión de ARNm de GPR55 comparada con pacientes non obesos sen NAFLD. O incremento de GPR55 foi semellante se comparamos os pacientes obesos con só esteatose ou con esteatohepatite fronte aos individuos non obesos sen NAFLD. Ademais, o ARNm de GPR55 hepático estaba tamén elevada noutra cohorte de pacientes humanos con BMI < 30 kg/m² e NAFLD comparado con pacientes non obesos sen a

enfermidade e amosaron correlación positiva coa puntuación NAS. Finalmente, leváronse a cabo análises serolóxicas de LPI nunha terceira cohorte de pacientes obesos con NAFL ou NASH. Os nosos resultados amosaron maiores niveles de LPI 16:0, 18:1 e o isómero 18:1 en pacientes con NASH fronte a NAFL. Ademais, atopamos que estas especies de LPI aumentaban a medida que o facían a inflamación e o ballooning hepatocelular. Cando os pacientes da cohorte 3 foron separados entre diabéticos e non diabéticos, atopamos que os niveles de ningunha das especies de LPI cambiaba, suxerindo que os cambios nas especies de LPI son independentes das alteración no metabolismo da glucosa.

A continuación nós estudiamos a expresión de GPR55 no fígado de ratos alimentados con dieta alta en graxa (HFD) cun contido do 45% kcal de graxa, HFD combinada con deficiencia en colina (CD-HFD), moi alta en graxa (vHFD) cun contido do 60% kcal de graxa e dieta deficiente en metionina e colina (MCD) a diferentes tempos. En todos estes modelos animais detectamos as alteracións histolóxicas esperadas e incrementos dos niveis de ARNm e proteína de GPR55. Os niveis de ARNm e proteína de GPR55 tamén estaban aumentados en hepatocitos illados de ratos alimentados con dieta MCD comparados cos alimentados con dieta de pienso. Finalmente, usamos a liña celular hepática THLE2 e tratamos estes hepatocitos con ácido oleico. Este tratamento incrementou a expresión de ARNm de GPR55. Estes resultados indican que a expresión de GPR55 está consistentemente elevada en condicións de esteatose (NAFL) e esteatohepatite (NASH) en humanos e roedores.

Unha vez comprobado que GPR55 se atopa sobreexpresado en pacientes humanos e modelos de rato de NAFL e NASH, decidimos estudar o papel de LPI en hepatocitos. LPI (10 μ M), o ligando endóxeno de GPR55, incrementou a expresión de ARNm de GPR55 tras 1 hora tanto en células THLE2 como en HepG2. Tras 24 horas da súa administración, o LPI incrementou o contido de lípidos en ambas liñas celulares. A nivel molecular, atopamos que as dúas liñas de hepatocitos reducidos niveis de ACC (pACC) e o seu principal regulador AMPK alfa (pAMPK α), así como niveis de proteína da carnitina palmitoil transferasa 1a (CPT1A), suxerindo a activación de ACC e por tanto a estimulación da síntese *de novo* de ácidos graxos e a inhibición da beta oxidación. A dose empregada de LPI non alterou os niveis de proteína dos marcadores de apoptose. Para caracterizar se os efectos de LPI estaban mediados por GPR55, nós silenciámos o receptor e achamos que o LPI non era capaz de incrementar o contido lipídico. Consistente con isto, mentres LPI reduciu os niveis de proteína de pAMPK α e pACC, non o fixo tras o silenciamento de GPR55. Dado que GPR55 estaba mediando o depósito de lípidos inducido por LPI, a continuación estudiamos se este receptor podería ser relevante para a acumulación de lípidos inducida por diferentes estímulos. A esteatose inducida por ácido oleico foi fortemente bloqueada tras a inhibición de GPR55. Finalmente, dado que LPI activa ACC, nós investigamos se a inhibición de ACC afectaría ás accións de LPI. LPI non foi quen de incrementar o contido lipídico en células THLE2 e HepG2 tras silenciarmos ACC α .

Xa que estes resultados indicaban que LPI/GPR55 estaban modulando a síntese e oxidación de ácidos graxos, a continuación medimos directamente estes parámetros usando [3H]-acetato e [14C]-palmitato respectivamente, e detectamos que LPI incrementou a lipoxénese *de novo* de triglicéridos, diglicéridos, ácidos graxos libres e fosfolípidos mentres que diminuíu a beta oxidación. Estes efectos inducidos por LPI foron bloqueados cando se silenciou GPR55. Un evento importante que ocorre durante o desenvolvemento de NAFLD/NASH é a redución da respiración na cadea de transporte de electróns. Para investigar se a diminución na beta oxidación altera a respiración mitocondrial, monitorizamos a taxa de consumo de osíxeno (OCR) en células tratadas con LPI. Achamos unha redución significativa no OCR tras 1 hora

de administración de LPI. Este efecto foi bloqueado cando se engadiu etomoxir, un inhibidor farmacolóxico de CPT1, 30 minutos antes do LPI.

O seguinte paso foi avaliar se estes descubrimentos sobre o efecto hepático de LPI tamén ocorren *in vivo*. Para iso, ratos C57BL/6J foron tratados con LPI (0,5 mg/kg) intraperitonealmente durante 7 días. Como se describiu previamente, esta dose de LPI non afecta ao peso corporal nin á inxesta de comida. Deste xeito, nós non atopamos cambios nestes parámetros nin tampouco no peso do fígado, a aspartato aminotransferasa (AST) ou colesterol, pero sí que achamos un incremento en triglicéridos e ácidos graxos libres tras o tratamento de LPI. O contido de lípidos no fígado, a expresión de ARNm de GPR55 e os niveis da proteína FAS nos ratos tratados con LPI foron significativamente máis altos que naqueles tratados só co vehículo, mentres que os niveis de pAMPK α , a ratio pACC/ACC e CPT1A se reduciron.

Para probar se GPR55 estaba mediando os efectos *in vivo* de LPI, levamos a cabo o mesmo tratamento farmacolóxico pero engadindo un grupo experimental no que os ratos recibiron a inxección na vena da cola dun lentivirus codificante de shARN fronte a GPR55. Mentres que o LPI incrementou a expresión de GPR55, os ratos tratados con shGPR55 amosaron unha marcada diminución na expresión de GPR55 no fígado. A acumulación de lípidos e triglicéridos no fígado inducida por LPI foi bloqueada en ratos tratados con shGPR55. Ademais, a redución de pAMPK α e pACC causada por LPI non foi observada nos ratos tratados con shGPR55. Consistente coa activación de ACC por LPI, os niveis hepáticos de malonil-CoA aumentaron cando se trataron os ratos con LPI e viuse reducida cando se silenciou GPR55.

O seguinte paso foi investigar se ACC estaba xogando un papel relevante como mediador das accións de LPI no fígado. Para iso, tratamos ratos con LPI e parte destes ratos tamén foron co-tratados con GS-0976, que é un inhibidor de ACC que está sendo probado na actualidade en ensaios clínicos para o tratamento de NAFLD. Nos inxectamos GS-0976 intraperitonealmente a unha dose de 10 mg/kg durante 1 semana como previamente se describiu e atopamos que foi capaz de boquear os efectos hepáticos de LPI na acumulación de lípidos, contido de triglicéridos e malonil-CoA.

Tras demostrar que a activación farmacolóxica de GPR55 inducía esteatose hepática, realizamos o paradigma experimental oposto. Para isto, alimentamos aos ratos con vHFD durante 10 semanas. Ao comezo da sexta semana, inxectamos na vena da cola lentivirus codificantes de shARN fronte a GPR55 e continuamos coa mesma dieta catro semanas máis ata o sacrificio. A eficiencia de infección foi comprobada cunha redución significativa nos niveis de ARNm e proteína de GPR55 comparado cos ratos que recibiron o shRNA control. Non observamos cambios en peso corporal ou inxesta tras o silenciamento de GPR55 hepático. Os niveis séricos de AST, triglicéridos e ácidos graxos non esterificados foron significativamente máis baixos comparados co grupo control. O contido de lípidos e triglicéridos, así como os niveis de marcaxe F4/80 positivo reducíronse tras o silenciamento de GPR55. Consistente con isto, a inhibición de GPR55 no fígado inactivou ACC como así o demostra os maiores niveis de proteína pAMPK α , proteína pACC e malonil-CoA, tamén se reduciu a cantidade de proteína CPT1A. De acordo coa mellora da esteatose, diferentes marcadores de estrés do retículo endoplasmático (ER), inflamación e apoptose foron reducidos tras o silenciamento xénico de GPR55.

Xa que a expresión de GPR55 está aumentada no fígado de humanos e roedores con NASH, decidimos avaliar o potencial do silenciamento da expresión de GPR55 para mellorar NASH. Con este fin, empregamos ratos alimentados con dieta MCD, que provoca en poucos días esteatose macrovesicular e NASH con fibrose e é utilizada amplamente no campo de

investigación do NASH. Ratos que recibiron a inxección na vena da cola de lentivirus codificantes de shRNA fronte a GPR55 e 4 semanas despois foron alimentados con dieta MCD durante 4 semanas ata ser sacrificados. A eficiencia de infección foi comprobada coa detección de reducidos niveis de ARNm e proteína de GPR55 en comparación cos ratos do grupo control. Aínda que a masa do fígado e os niveis de triglicéridos, ácidos graxos libres e colesterol non se viron afectados pola inhibición hepática de GPR55, os niveis de transaminasas circulantes foron máis baixos que no grupo control. Na mesma liña, a inhibición de GPR55 reduciu os lípidos e triglicéridos hepáticos, a cantidade de hidroxiprolina, F/480 e coláxeno e inactivou ACC como indica os maiores niveis de pAMPK α e pACC e os menores niveis de malonil-CoA. De acordo coa mellora da condición hepática, observáronse menores os niveis de marcadores de estrés do ER, inflamación, fibrose e apoptose cando GPR55 hepático estaba silenciado.

Empregamos un segundo modelo de fibrose en ratos, o do tetracloruro de carbono, no cal inxectamos virus codificantes de shARN fronte a GPR55. Atopamos que tras 6 semanas, o tratamento con tetracloruro de carbono provocou un gran aumento nos niveis de ARNm de GPR55. Xunto a isto, atopáronse niveis máis altos de AST sérico e coláxeno hepático, e niveis baixos de proteínas pAMPK α e pACC. Todas estas accións do tetracloruro de carbono foron bloqueadas polo silenciamento de GPR55 hepático. En conxunto, estes resultados indican que a inhibición xenética de GPR55 mellora a fibrose hepática.

Tras demostrar que: a) a expresión de GPR55 está inducida no fígado de ratos alimentados con MCD, e b) que o silenciamento de GPR55 hepático mellora a fibrose inducida por MCD e tetracloruro de carbono, nós quixemos investigar se o eixo LPI/GPR55 podería mediar os mecanismos que gobernan a activación das células estelares hepáticas (HSCs), claves na fibrose hepática. Nos achamos que GPR55 está altamente expresado en HSCs primarias de ratos e células de HSCs humanas LX-2 cando o comparamos con hepatocitos primarios de ratos e hepatocitos humanos THLE2, respectivamente. Dado que as células LX-2 están amplamente caracterizadas e reteñen propiedades clave la sinalización das HSCs nós empregamos esta liña celular de aquí en adiante. LPI (10 μ M) incremento a expresión de GPR55 a tempos tan curtos como 1 hora, e tras 12 horas foi quen de incrementar a expresión da actina alfa 2 (ACTA2), coláxeno 1 alfa 1 (COL1 α 1) e coláxeno 1 alpfa 2 (COL1 α 2), marcadores de activación de HSCs e produción de matriz extracelular. Xa que o metabolismo de lípidos é esencial para o estado das HSCs, tamén avaliamos o efecto de LPI sobre ACC. Similar ao achado en hepatocitos e en fígado total, LPI reduciu pAMPK α e pACC.

A continuación, silenciamos GPR55 nas células LX-2 e encontramos que a expresión de ACTA2, COL1 α 1, COL1 α 2 e pACC inducida por LPI foi bloqueada. Para determinar a relevancia de ACC como mediador das accións de LPI en células LX-2, nós silenciamos ACC α en células LX-2 e descubrimos que a expresión de ACTA2, COL1 α 1 e COL1 α 2 inducida por LPI foi bloqueada.

Como se esperaba, o tratamento co factor de crecemento tumoral beta 1 (TGF β 1), un potente indutor da activación de HSCs, incrementou significativamente a expresión de ARNm de ACTA2, COL1 α 1 e COL1 α 2, ademais da expresión de GPR55, en células LX-2. Entón, nós investigamos se GPR55 podería modular os efectos de TGF β 1 e vimos que o silenciamento de GPR55 parcialmente bloqueou a indución da expresión de ACTA2, COL1 α 1 e COL1 α 2 por parte de TGF β 1. A pesar de que GPR55 diminuíu o efecto de TGF β 1, o tratamento das células LX-2 con LPI non incrementou significativamente a expresión de ARNm de TGF β 1. Isto suxire que a pesar de que LPI e GPR55 precisan (total ou parcialmente) de GPR55 para promover a activación de HSCs, non existe un mesmo mecanismo para as dúas moléculas.

Os descubrimentos presentados nesta tese amosan por primeira vez que GPR55 está sobreexpresado no fígado de pacientes e modelos animais de NAFLD, e que a activación de GPR55 inducida por LPI promove a o almacenamento de lípidos, e por tanto participa na progresión de esteatose hepática e esteatohepatite. Nós tamén demostramos que o silenciamento de GPR55 hepático mellora o NAFL inducido por vHFD e tamén o NASH inducido por MCD e tetracloruro de carbono. A sobreactivación patolóxica do ECS está asociada co desenvolvemento de dislipemia, obesidade e diabetes tipo 2. Estas acción do ECS foi principalmente atribuída á activación dos receptores CB1 centrais. A vHFD incrementa os niveis hepáticos do endocannabinoide anandamida, o receptor CB1 e as taxas basais de síntese de ácidos graxos, estes últimos se reducen cando CB1 é bloqueado. Máis especificamente, a activación de CB1 hepático estimula a lipoxénese *de novo* pola indución do factor de transcrición lipoxénico SREBP1c e as súas dianas enzimáticas ACC e a ácido graxo sintasa (FAS). Os nosos resultados indican que a activación de GPR55 no fígado polo seu ligando endóxeno LPI tamén pode promover o depósito de lípidos hepáticos polas súas accións nos hepatocitos e nas HSCs.

Alguns tipos de lisofosfolípidos circulantes emerxeron como moléculas sinalizadoras con importantes efectos en inflamación e fígado graxo. Nesta liña, os nosos resultados indican que os niveis de LPI están elevados en pacientes con NASH. Os mecanismos polos que LPI desencadea a acumulación de lípidos parece indicar alteración no metabolismo de ácidos graxos hepáticos, xa que LPI é quen de activar a lipoxénese *de novo* a través da inhibición da fosforilación de ACC, que leva á activación de ACC en hepatocitos e HSCs. Tamén atopamos que LPI pode inhibir a beta oxidación, consistente con niveis máis baixos de CPT1A que catalizan o paso clave da oxidación de ácidos graxos mitocondrial na membrana mitocondrial externa. Os nosos datos están de acordo co previamente publicado, amosando que os lisofosfolípidos postprandiais suprimen a oxidación de ácidos graxos. E promoven a inflamación e fibrose hepáticas. Deste xeito, recentemente publicouse que o xene O-aciltransferasa con dominio 7 (MBOAT7), codificante dunha enzima acetiltransferasa que especificamente esterifica araquidoneoil-CoA en lípidos LPI, está implicada en NAFLD. En particular, o silenciamento de MBOAT7 causa a progresión da enfermidade hepática e está asociada coa acumulación das especies de LPI 16:0 e 18:1 no fígado. É significativo o feito de que estas dúas especies son as mesmas que nós atopamos correlacionadas coa puntuación NAS. Entón, estes dous estudos implican os LPIs como importantes mediadores do desenvolvemento do NAFLD.

O receptor de LPI, GPR55, non está só incrementado no fígado de ratos alimentados en vHFD, senón que tamén o está en ratos expostos a dietas como CD-HFD e MCD ou tratamentos como tetracloruro de carbono, representando modelos de esteatose e NASH. Os nosos resultados coinciden co que recolle a literatura en relación aos datos en humanos: os niveis de GPR55 están aumentados no fígado de humanos con obesidade, tanto nos que teñen NAFL como os que teñen NASH. Este incremento é independente da obesidade xa que pacientes non obesos con NAFLD tamén manifestan este incremento de GPR55. En conxunto, estes datos apoian que os incrementos de LPI e GPR55 endóxenos son eventos temperáns na progresión da enfermidade hepática causando dislipemia e desregulación metabólica no fígado. É importante sinalar que os datos de GPR55 no fígado son homoxéneos entre humanos e roedores. Este non é o caso de GPR55 en tecido adiposo branco, no que a expresión de ARNm está reducida en roedores obesos pero incrementado en pacientes humanos obesos. Ademais, mentres que LPI/GPR55 inducen a expresión de xenes lipoxénicos en tecido adiposo branco, non son capaces de promover a diferenciación de 3T3-L1 derivadas de rato.

Na mesma liña que a estimulación da acumulación de lípidos inducida en dúas liñas de hepatocitos humanas diferentes (THLE2 e HepG2) e roedores, o silenciamento de GPR55 hepático mellorou a esteatose inducida por ácido oleico, LPI e vHFD, así como o NASH inducido por MCD ou tetracloruro de carbono. Isto é coherente con investigacións previas indicando que a inxección directa de LPIs exógenos pode incrementar a expresión de xenes de inflamación e fibrose en ratos alimentados con vHFD con silenciamento de MBOAT7. Empregar diferentes tecidos diana é un asunto relevante dado que GPR55 está amplamente expresado en órganos metabólicamente activos. Varios estudos recollen o fenotipado metabólico do rato deficiente en GPR55 e amosan resultados inconsistentes. Mentres que dous estudos encontraron unha maior adiposidade en ratos sen GPR55 e resistencia a insulina, outros amosaron que a tendencia á obesidade non é significativa. As diferencias en composición corporal tampouco son reproducibles. Nestes estudos avaliando a ausencia de GPR55, un deles acha que a deficiencia do xene se asocia coa alteración da sinalización da insulina no fígado. Sen embargo, é probable que os órganos que expresen GPR55 contribúan de xeito diferente ao fenotipo que se observa nos ratos sen GPR55, por tanto a ausencia de GPR55 non proba que o GPR55 hepático estea contribuíndo a alteración da sinalización da insulina. Aínda que nós non fomos capaces de detectar diferencias na tolerancia a glucosa tras a inhibición de GPR55 hepático en ratos alimentados con vHFD, si que detectamos reducións claras no contido lipídico hepático, e menor expresión de marcadores de inflamación e apoptose. A nosa ferramenta viroxénica demostra que con un silenciamento parcial (do 60-70%) de GPR55 no fígado de ratos é posible conseguir unha mellora clara do dano hepático en diferentes modelos de NAFL e NASH. Estes resultados *in vivo* son consistentes co obtido coas diferentes liñas celulares hepáticas humanas, indicando que o sistema LPI/GPR55 pode directamente regular o metabolismo de lípidos no fígado.

Xa que a expresión de GPR55 está aumentada tanto en hepatocitos coma en HSCs de ratos alimentados con dieta MCD, un aspecto relevante do noso proxecto foi investigar se a ruta de LPI/GPR55 era relevante en ambos tipos celulares. Os nosos descubrimentos indican que LPI incrementa o contido lipídico nos hepatocitos, un efecto que desaparece cando GPR55 é silenciado. Por outra banda, LPI incrementa a expresión de marcadores de activación e produción de fibrose en HSCs, un efecto que tamén desaparece cando GPR55 é silenciado. Estes resultados *in vitro* casan coa mellora en fibrose hepática observada en ratos expostos a MCD ou tetracloruro de carbono. Os nosos resultados indican que a activación de GPR55 é relevante no proceso de fibrose.

ACC é unha enzima que cataliza a carboxilación irreversible de acetil-CoA para producir malonil-CoA, por tanto proporcionando o substrato para a síntese de ácidos graxos. Os ensaios preclínicos demostraron que a ausencia ou inhibición de ACC α e ACC β reduciu a esteatose. Os ensaios clínicos amosaron que GS-0976, un inhibidor de ACC, é capaz de reducir a esteatose hepática e os marcadores de fibrose en pacientes con NASH. Tendo en conta que: a) pACC está regulado por LPI/GPR55, b) o silenciamento xénico de ACC bloquea os efectos de LPI en hepatocitos e HSCs, c) ratos tratados con GS-0976 non manifestan esteatose inducida por LPI, e d) a consistente expresión de GPR55 entre ratos e humanos; os nosos resultados obtidos en hepatocitos humanos e modelos animais indican que o mecanismo de activación implica a AMPK α , a principal enzima reguladora de ACC. De feito, como LPI/GPR55 regula a fosforilación de AMPK α é unha limitación do presente estudo, e o rol potencial dalgúns moduladores de AMPK como a quinasa hepática B1 (LKB1) ou proteína quinasa de la quinasa dependente de calcio/calmodulina beta (CaMKK β), só por nomear algúns, debería ser avaliado en profundidade.

Mentres que a promoción da esteatose polo LPI é un evento de certa maneira esperado para unha molécula que activa ACC e por tanto induce a lipoxénese *de novo* en hepatocitos, as consecuencias da activación de ACC en HSCs permanecen descoñecidas. As HSCs quiescentes conteñen gotas lipídicas e expresan ACC e outros xenos implicados en lipoxénese *de novo*, suxerindo que esta ruta metabólica está operativa durante a quiescencia e restrinxida durante a activación das HSCs. Un artigo recente amosa sen embargo que as HSCs activadas teñen incrementados os niveis de ACC α . Non só iso, senón que outro estudio demostra o papel directo de ACC desencadeando a fibrose hepática a través da activación das HSCs en miofibroblastos secretores de coláxeno, mentres que a inhibición de ACC ten propiedades antifibróticas. O noso estudo indica que a activación do sistema LPI/GPR55 desencadea a actividade de ACC e a expresión de marcadores de fibrose en HSCs, sendo estes efectos bloqueados tras o silenciamento de ACC. Por tanto, os nosos resultados apoian o papel de ACC na activación de HSCs.

En resumo, estes resultados indican por primeira vez que: a) a expresión de GPR55 está aumentada no fígado de pacientes e de modelos animais da enfermidade hepática, b) o ligando endóxeno de GPR55 chamado LPI correlaciona positivamente coa puntuación NAS en humanos e causa esteatose de forma dependente de GPR55, c) de silenciamento de GPR55 hepático mellora o NAFL inducido por HFD, o NASH inducido por MCD e a fibrose inducida por tetracloruro de carbono, e d) o eixo LPI/GPR55 activa ACC vía AMPK para provocar a patoloxía hepática. Eses descubrimentos amosan a importancia do sistema LPI/GPR55 no desenvolvemento de NAFL e NASH vía AMPK/ACC.





ÍNDICE





ÍNDICE

ABREVIATURAS, ACRÓNIMOS Y ANGLICISMOS	29
INTRODUCCIÓN	39
1. Hígado graso no alcohólico	41
1.1. Definición	41
1.2. Epidemiología	41
1.3. Diagnóstico e histopatología	42
1.4. Patogénesis	44
1.4.1. Homeostasis lipídica en el hígado	44
1.4.1.1. Aporte de lípidos	44
1.4.1.1.1. Captación desde la sangre	44
1.4.1.1.2. Lipogénesis <i>de novo</i>	45
1.4.1.2. Destino de los lípidos hepáticos	46
1.4.1.2.1. Síntesis de triglicéridos: acumulación y exporte a otros tejidos	46
1.4.1.2.2. Oxidación de ácidos grasos	46
1.4.1.3. Factores clave en la regulación del metabolismo lipídico en el hígado	49
1.4.1.3.1. Regulación transcripcional de la lipogénesis <i>de novo</i>	49
1.4.1.3.2. Regulación de la lipogénesis <i>de novo</i> por disponibilidad de sustratos	49
1.4.1.3.3. Lipogénesis <i>de novo</i> y localización celular de ACC: isoformas	50
1.4.1.3.4. Regulación de la lipogénesis <i>de novo</i> por actividad de ACC	50
1.4.1.3.5. Regulación cruzada entre lipogénesis <i>de novo</i> y β -oxidación	51
1.4.1.3.6. Integración del metabolismo lipídico: AMPK	51

1.4.1.3.7.	Otros reguladores clave del metabolismo lipídico	53
1.4.2.	Mecanismos celulares en la progresión de NAFLD	54
1.4.2.1.	Resistencia a insulina	54
1.4.2.2.	Estrés del retículo endoplasmático	54
1.4.2.3.	Estrés oxidativo	56
1.4.2.4.	Lipotoxicidad	56
1.4.2.5.	Inflamación	57
1.4.2.6.	Apoptosis	57
1.4.2.7.	Fibrosis	58
1.4.2.7.1.	Células estelares hepáticas	58
1.4.2.7.2.	Eventos extracelulares de activación de células estelares hepáticas	59
1.4.2.7.3.	Alteraciones moleculares en las células estelares hepáticas activadas	60
1.4.2.7.4.	Cambios metabólicos durante la activación de célula estelares hepáticas	60
1.5.	Tratamiento de NAFLD	62
1.6.	Modelos preclínicos de NAFLD	64
1.6.1.	Modelos de NAFLD <i>in vivo</i>	65
1.6.1.1.	Modelos de NAFLD inducido por dieta	65
1.6.2.	Modelos de NAFLD en células humanas <i>in vitro</i>	66
2.	Sistema endocannabinoide	66
2.1.	Características generales del sistema endocannabinoide	66
2.2.	distribución de los receptores cannabinoides	67
2.3.	Rutas de señalización de los receptores cannabinoides	68
2.4.	Funciones fisiológicas y patológicas de los receptores cannabinoides clásicos	68
2.4.1.	Sistema endocannabinoide y homeostasis energética	68
2.4.1.1.	Regulación central del balance energético	68

2.4.1.2.	Tejidos periféricos	69
2.5.	Sistema endocannabinoide y metabolismo hepático en NAFLD	70
2.5.1.	Esteatosis	70
2.5.2.	Fibrosis	71
2.5.3.	Evidencias clínicas	72
2.6.	GPR55	73
2.6.1.	Distribución	73
2.6.2.	Rutas de señalización y farmacología	73
2.6.2.1.	Endocannabinoides	75
2.6.2.2.	Fitocannabinoides y cannabinoides sintéticos	75
2.6.2.3.	Lisofosfatidilinositol	75
2.6.2.3.1.	Lípidos bioactivos y LPI	76
2.6.2.3.2.	Metabolismo de LPI	76
2.6.2.3.3.	Especies de LPI	77
2.6.2.3.4.	Funciones de LPI no mediadas por GPR55	79
2.6.3.	Funciones del sistema LPI/GPR55	79
2.6.3.1.	Acciones metabólicas	80
2.6.3.1.1.	Acciones metabólicas en el sistema nervioso central	80
2.6.3.1.2.	Acciones metabólicas en el tracto gastrointestinal	82
2.6.3.1.3.	Acciones metabólicas en los islotes pancreáticos	82
2.6.3.1.4.	Acciones metabólicas en el tejido adiposo blanco	82
2.6.3.1.5.	Acciones metabólicas en el hígado	83
	OBJETIVOS	87
	HIPÓTESIS	91
	MATERIAL Y MÉTODOS	95

1. Muestras de pacientes humanos	97
1.1. Muestras hepáticas de humanos	97
1.1.1. Cohorte 1	97
1.1.2. Cohorte 2	97
1.1.3. Cohorte 3	98
1.1.4. Obtención de muestras hepáticas, diagnóstico y aspectos éticos	98
1.2. Análisis de LPI en suero de humanos	98
2. Procedimientos experimentales <i>in vivo</i>	99
2.1. Animales de experimentación	99
2.2. Animales y dietas	100
2.1. Administración intraperitoneal de LPI	101
2.2. Producción de lentivirus e inyección en la vena de la cola	101
2.2.1. Generación de partículas lentivirales	101
2.2.1. Inyección en la vena de la cola	102
2.3. Tratamiento farmacológico de GS-0976	102
2.4. Modelo de fibrosis inducida por tetracloruro de carbono	102
2.5. Sacrificio, recogida de tejidos y muestras	102
2.6. Aislamiento y cultivo de hepatocitos y células estelares primarias	103
3. Procedimientos experimentales <i>in vitro</i>	103
3.1. Cultivos celulares	103
3.1.1. THLE2	103
3.1.2. HepG2	104
3.1.3. LX-2	104
3.2. Silenciamiento génico	104
3.3. Tratamiento de LPI <i>in vitro</i>	105

3.4.	Administración de TGFβ1	105
3.5.	Tratamiento de ácido oleico	105
3.6.	Estudios funcionales de metabolismo lipídico	106
3.6.1.	Lipogénesis <i>de novo</i>	106
3.6.1.	Oxidación de ácidos grasos	107
3.7.	Medición de consumo de oxígeno celular	107
3.8.	Ensayos de proliferación celular	108
4.	Técnicas analíticas	108
4.1.	Tinciones citológicas e histológicas	108
4.1.1.	<i>Oil Red</i>	108
4.1.2.	Bodipy	108
4.1.3.	Hematoxilina y eosina	109
4.1.4.	<i>Sirius Red</i>	109
4.1.5.	Inmunohistoquímica	109
4.2.	Contenido hepático de triglicéridos en el hígado	110
4.3.	Cuantificación de malonil-CoA hepático	110
4.4.	Determinación cuantitativa de hidroxiprolina	110
4.5.	Cuantificación de metabolitos y transaminasas en suero	111
4.6.	PCR a tiempo real	111
4.6.1.	Extracción de ARN	112
4.6.1.	Retrotranscripción	112
4.6.1.	PCR a tiempo real	112
4.7.	<i>Western blot</i>	115
4.7.1.	Extracción de proteínas	115
4.7.1.	Cuantificación de proteína	115

4.7.2.	Electroforesis SDS-PAGE _____	116
4.7.3.	Transferencia semi-húmeda _____	116
4.7.4.	Inmunodetección de proteínas _____	117
5.	Análisis de datos y estadística _____	119
RESULTADOS _____		121
1.	El sistema LPI/GPR55 está desregulado en NAFLD en humanos y ratones _____	123
1.1.	GPR55 está sobreexpresado en hígado humanos con NAFL y NASH _____	123
1.2.	Los niveles de varias especies de LPI están aumentados en suero de pacientes con NASH frente a los que tienen sólo NAFL _____	127
1.3.	GPR55 hepático está aumentado en diferentes modelos de NAFLD <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> 130	
2.	LPI activa la lipogénesis <i>de novo</i> e inhibe la β -oxidación vía GPR55 y ACC en hepatocitos _____	132
2.1.	LPI induce acumulación lipídica en hepatocitos _____	132
2.2.	LPI regula a través de GPR55 la acumulación lipídica en los hepatocitos _____	134
2.3.	LPI regula a través de ACC α la acumulación lipídica en los hepatocitos _____	135
2.4.	LPI estimula la lipogénesis <i>de novo</i> e inhibe la β -oxidación de forma GPR55-dependiente _____	136
3.	LPI induce esteatosis hepática en ratones a través de GPR55 y ACC _____	138
3.1.	La administración de LPI provoca la acumulación de lípidos en el hígado de ratones 138	
3.2.	La administración de LPI provoca la acumulación de lípidos en el hígado de ratones de forma GPR55-dependiente _____	139
3.3.	La administración de LPI induce acumulación de lípidos <i>in vivo</i> de forma dependiente de ACC _____	141
4.	El silenciamiento de GPR55 hepático mejora el NAFL inducido por dieta muy alta en grasa 142	

5. El silenciamiento de GPR55 hepático reduce esteatosis y fibrosis en NASH inducido por dieta deficiente en metionina y colina	144
5.1. Ratones con NASH inducido por dieta deficiente en metionina y colina presentan menor esteatosis hepática tras la inhibición de GPR55	144
5.2. El silenciamiento de GPR55 hepático reduce la fibrosis en ratones con NASH inducido por dieta deficiente en metionina y colina	145
6. El silenciamiento de GPR55 en el hígado reduce la fibrosis hepática inducida por tetracloruro de carbono <i>in vivo</i>	147
7. El sistema LPI/GPR55 modula la activación de células estelares hepáticas a través de ACC	148
7.1. GPR55 se expresa en células estelares hepáticas y su expresión está aumentada en ratones con NASH	148
7.2. LPI activa las células estelares hepáticas	149
7.3. LPI activa las células estelares hepáticas a través de GPR55	150
7.4. ACC media los efectos de LPI/GPR55 en la activación de células estelares hepáticas	151
7.5. El silenciamiento de GPR55 en células LX-2 protege frente a la activación inducida por TGFβ1.	151
<i>DISCUSIÓN</i>	153
<i>CONCLUSIONES</i>	163
<i>BIBLIOGRAFÍA</i>	167
<i>ANEXOS</i>	197



***ABREVIATURAS,
ACRÓNIMOS Y
ANGLICISMOS***





ABREVIATURAS, ACRÓNIMOS Y ANGLICISMOS

- AASLD:** Asociación americana para el estudio de las enfermedades hepáticas, *American Association for the Study of Liver Diseases*
- ABCC1:** *ATP-binding cassette transporter subfamily C member 1*
- ABCD1:** *ATP-binding cassette transporter subfamily D member 1*
- ABHD6:** hidrolasa alfa/beta con dominio 6, *alpha/beta hydrolase domain 6*
- Abn-CBD:** *abnormal CBD*
- ACAD:** acil-CoA deshidrogenasa, *acyl-CoA dehydrogenase*
- ACC:** acetil-CoA carboxilasa, *acetyl-CoA carboxylase*
- ACOX1:** acil-CoA oxidasa 1, *acyl-CoA oxidase 1*
- ACP:** proteína transportadora de acilos, *acyl carrier protein*
- ACS:** acil-CoA sintetasa, *acyl-CoA synthetase*
- ACTA2:** actina alfa 2, *actin alpha 2*
- AGPAT:** acilglicerolfosfato aciltransferasa, *acylglycerolphosphate acyltransferase*
- ADNc:** ADN complementario,
- ADP:** adenina difosfato, *adenine diphosphate*
- AEA:** N-araquidonioiletanolamina, *N-arachidonoylethanolamine*
- ALD:** enfermedad de hígado graso alcohólico, *alcoholic liver disease*
- ALT:** alanine aminotransferasa, *alanine aminotransferase*
- AMP:** adenina monofosfato, *adenine monophosphate*
- AMPc:** AMP cíclico
- AMPK:** proteína quinasa activada por AMP, *AMP-activated protein kinase*
- ASK1:** quinasa reguladora de señales de apoptosis 1, *apoptosis signal-regulating kinase 1*
- αSMA:** *alpha-smooth muscle actin*
- AST:** aspartato aminotransferasa, *aspartate aminotransferase*
- ATCC:** *American Type Culture Collection*
- ATF:** factor activador de la transcripción, *activating transcription factor*
- ATGL:** lipasa de triglicéridos del adiposo, *adipose triglyceride lipase*
- ATP:** adenina trifosfato, *adenine triphosphate*
- ballooning:** abalonamiento, referido a la morfología de los hepatocitos
- BDL:** ligadura de conducto biliar, *bile duct ligation*
- BEBM:** *Bronchial Epithelial cell Basal Medium*
- BEGM:** *Bronchial Epithelial cell Growth Medium*

- BiP:** proteína de unión a inmunoglobulina, *binding immunoglobulin protein*
- BSA:** albúmina de suero bovino, *bovine serum albumin*
- buffer:** tampón
- CACT:** carnitina-acilcarnitina traslocasa, *carnitine-acylcarnitine translocase*
- CaMKK β :** proteína kinasa de la kinasa dependiente de calcio/calmodulina beta, *calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase beta*
- CBD:** *cannabidiol*
- CB1:** receptor cannabinoide 1, *cannabinoid receptor 1*
- CB2:** receptor cannabinoide 2, *cannabinoid receptor 2*
- CD36:** *cluster of differentiation 36*
- C/EBP:** proteína de unión al *potenciador CCAAT*, *CCAAT enhancer binding protein*
- CHOP:** proteína homóloga a C/EBP, *C/EBP homologous protein*
- ChREBP:** proteína de unión a elementos de respuesta a carbohidratos, *carbohydrate response element binding protein*
- CCL2:** ligando 2 de quimioquinas con motivo C-C, *C-C motif chemokine ligand 2*
- CCL5:** ligando 5 de quimioquinas con motivo C-C, *C-C motif chemokine ligand 5*
- CCR2:** receptor 2 de quimioquinas con motivo C-C, *C-C motif chemokine receptor 2*
- CCR5:** receptor 5 de quimioquinas con motivo C-C, *C-C motif chemokine receptor 5*
- CD-HFD:** dieta deficiente en colina y alta en grasa, *choline deficient and high fat diet*
- CoA:** coenzima A, *coenzyme A*
- COL1 α :** colágeno 1 alfa, *collagen 1 alpha*
- CPT1:** carnitina palmitoiltransferasa 1, *carnitine palmitoyltransferase 1*
- CREB:** proteína de unión a elemento de respuesta a AMPc, *cAMP response element-binding protein*
- CTGF:** factor de crecimiento de tejido conectivo, *connective tissue growth factor*
- CYP:** citocromo P450
- DAGL:** diacilglicerol lipasa, *diacylglycerol lipase*
- DAPI:** 4,6-diamino-2-fenilindol
- DEN:** dietilnitrosamina, *diethylnitrosamine*
- DEPC:** dietilpirocarbonato
- DGAT:** diglicérido aciltransferasa, *diglyceride acyltransferase*
- DMEM:** *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*
- DMSO:** dimetilsulfóxido, *dimethylsulfoxide*
- DNL:** lipogénesis *de novo*, *de novo lipogenesis*
- downstream:** corriente a bajo, referido a rutas de señalización

- DPP-4:** dipeptidil peptidasa 4, *dipeptidyl peptidase 4*
- EASD:** Asociación europea para el estudio de diabetes, *European Association for the Study of Diabetes*
- EASL:** Asociación europea para el estudio del hígado, *European Association for the Study of the Liver*
- EASO:** Asociación europea para el estudio de la obesidad, *European Association for the Study of Obesity*
- ECACC:** *European Collection of Authenticated Cell Cultures*
- ECAR:** tasa de acidificación extracelular, *extracellular acidification rate*
- ECH:** matriz extracelular, *extracellular matrix*
- ECM:** enoil-CoA hidratasa, *enoyl-CoA hydratase*
- EIF2 α :** factor de iniciación de la traducción 2 alfa, *eukaryotic translation initiation factor 2 alpha*
- EMA:** Agencia europea del medicamento, *European Medicines Agency*
- EMEM:** *Minimum Essential Medium Eagle*
- ERAD:** degradación de proteínas asociadas al RE, *ER-associated protein degradation*
- ERK:** kinasa regulada por señal extracelular, *extracellular signal-regulated kinase*
- FAAH:** hidrolasa de ácidos grasos amida 1, *fatty acid amide hydrolase*
- FABP1:** proteína de unión a ácidos grasos 1, *fatty acid-binding protein 1*
- FAS:** sintasa de ácidos grasos, *fatty acid synthase*
- FADH₂:** flavín adenín dinucleótido reducido, *reduced form of flavin adenine dinucleotide*
- FATP:** proteína de transporte de ácidos grasos, *fatty acid transport protein*
- FBP1:** fructosa bifosfatasa 1, *fructose biphosphatase 1*
- FBS:** suero bovino fetal, *fetal bovine serum*
- FDA:** Administración de Alimentos y Medicamentos, *Food and Drug Administration*
- FRIDA:** *Framework for Image Dataset Analysis*
- FXR:** receptor X farnesoide, *Farnesoid X receptor*
- GAPDH:** glieraldehido-3-fosfato deshidrogenasa, *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*
- GFAP:** proteína ácida fibrilar glial, *glial fibrillary acidic protein*
- GFP:** proteína fluorescente verde, *green fluorescent protein*
- GLS:** glutaminasa, *glutaminase*
- GLUD1:** glutamato deshidrogenasa, *glutamate dehydrogenase*
- GLUT1:** transportador de glucosa 1, *glucose transporter 1*
- GPAT:** glicerol-3-fosfato aciltransferasa, *glycerol-3-phosphate acyltransferase*
- GPCR:** receptor acoplado a proteína G, *G protein-coupled receptor*
- GPR55:** GPCR 55

GPR119: GPCR 119
GRP78: *glucose-regulated protein 78*
GRK: kinasa de GPCR, *GPCR kinase*
GYS: glucógeno sintasa, *glycogen synthase*
HAD: hidroxiacil-CoA deshidrogenasa, *hydroxyacyl-CoA dehydrogenase*
HDL: hidroximetilglutaril-CoA, *high-density lipoprotein*
HFD: dieta alta en grasa, *high fat diet*
hit: golpe, en relación a las etapas del desarrollo de NAFLD
HK2: hexokinasa 2, *hexokinase 2*
HMGC_oA: hidroximetilglutaril-CoA, *hydroxymethylglutaryl-CoA*
HMGCR: reductasa de HMGC_oA, *HMGCoA reductase*
HOMA: *homeostatic model assessment*
HPRT: hipoxantina guanina fosforribosiltransferasa 1, *hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1*
HSC: célula estelar hepática, *hepatic stellate cell*
HSL: lipasa sensible a hormonas, *hormone-sensitive lipase*
icv: intracerebroventricular
IHC: inmunohistoquímica, *immunohistochemistry*
IDL: lipoproteína de densidad intermedia, *intermediate-density lipoprotein*
IL: interleucina, *interleukin*
IMC: índice de masa corporal
ip: intraperitoneal
IP₃: inositol trifosfato, *inositol trisphosphate*
IRE1 α : *inositol requiring enzyme 1 alpha*
JNK: kinasa N-terminal de c-Jun, *c-Jun N-terminal kinase*
LAP: proteína asociada a latencia, *latency associated protein*
LC-MS: *liquid chromatography–mass spectrometry*
LDL: lipoproteína de baja densidad, *low-density lipoprotein*
LKB1: kinasa hepática B1, *liver kinase B1*
LPA: ácido lisofosfatídico, *lysophosphatidic acid*
LPI: lisofosfatidilinositol, *lysophosphatidylinositol*
LPL: lipoproteína lipasa, *lipoprotein lipase*
LXR: receptor X hepático, *liver X receptor*
lyso-PI-PLC: PLC específica de LPI, *LPI-specific PLC*
MAGL: monoacilglicerol lipasa, *monoacylglycerol lipase*

- MAPK:** kinasa reguladas por señal extracelular, *extracellular signal-regulated kinase*
- MBOAT7:** O-aciltransferasa unida a membrana 7, *membrane-bound O-acyltransferase 7*
- MDA:** malondialdehído, *malondialdehyde*
- MCD:** malonil-CoA decarboxilasa, *malonyl-CoA decarboxylase*; *deficiente en metionina y colina, methionine and choline deficient*
- MEM:** *Minimum Essential Medium*
- MMP:** metalopeptidasa de matriz, *matrix metalloproteinase*
- MRE:** resonancia magnética por elastografía, *magnetic resonance elastography*
- MRI:** resonancia magnética por imagen, *magnetic resonance imaging*
- mTOR:** diana de rapamicina en células de mamífero, *mammalian target of rapamycin*
- MTT** bromuro de 3(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio
- MTTP:** transferasa de triglicéridos microsomales, *microsomal triglyceride transfer protein*
- NADH:** nicotinamida adenina dinucleótido reducido, *reduced form of nicotinamide adenine dinucleotide*
- NADPH:** nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido, *reduced form of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*
- NAE:** N-acetiletanolamina, *N-acylethanolamine*
- NAFL:** esteatosis no alcohólica, *non-alcoholic fatty liver*
- NAFLD:** enfermedad de hígado graso no alcohólico, *non-alcoholic fatty liver disease*
- NAPE-PLD:** fosfolipasa D específica de N-acilfosfatidiletanolamina, *N-acylphosphatidylethanolamine-specific phospholipase D*
- NAS:** *NAFLD activity score*
- NASH:** esteatohepatitis no alcohólica, *non-alcoholic steatohepatitis*
- NASH-CNR:** Red de Investigación Clínica en esteatohepatitis no alcohólica, *Non-alcoholic Steatohepatitis Clinical Research Network*
- NAT:** N-acetiltransferasa, *N-acyltransferase*
- NFAT:** factor nuclear de células T activadas, *nuclear factor of activated T cells*
- NF-κB:** factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas, *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*
- NIH:** Institutos Nacionales de Salud, *National Institutes of Health*
- NLRP3:** proteína que contiene dominio pirina de la familia NLR 3, *NLR family pyrin domain containing protein 3*
- NOX1:** NADPH oxidasa 1, *NADPH oxidase 1*
- knockdown:** silenciado, referido a un gen cuya expresión ha sido reducida en un animal de estudio
- knockout:** deleciónado, referido a un gen que no se expresa o no es funcional en un animal de estudio
- OCR:** tasa de consumo de oxígeno, *oxygen consumption rate*

- OEA:** N-oleiletanolamina, *N-oleoylethanolamine*
- PAP:** fosfatasa de ácido fosfatídico, *phosphatidic acid phosphatase*
- PAG:** materia gris periacueductal, *periaqueductal gray*
- PBS:** *buffer* fosfato salino, *phosphate buffered saline*
- PCK1:** fosfoenolpiruvato carboxikinasa, *phosphoenolpyruvate carboxykinase 1*
- PCR:** reacción en cadena de la polimerasa, *polymerase chain reaction*
- PDGF:** factor de crecimiento derivado de plaquetas, *platelet-derived-growth factor*
- PDGFR β :** receptor beta de PDGF, *PDGF receptor beta*
- PEA:** N-palmitoiletanolamina, *N-palmitoylethanolamine*
- PEI:** polietilimina, *polyethylenimine*
- pellet:** sedimento, referido a la parte que permanece en el fondo de un tubo durante centrifugación diferencial
- PERK:** *PKR-like ER kinase*
- PGC1 α :** coactivador 1 α de PPAR γ , *PPAR γ coactivator 1 alpha*
- PI3K:** fosfatidilinositol 3 kinasa, *phosphatidylinositol-3-kinase*
- PKA:** proteína kinasa A, *protein kinase A*
- PKC:** proteína kinasa C, *protein kinase C*
- PKM2:** proteína kinasa M2, *pyruvate kinase M2*
- PLA:** fosfolipasa A, *phospholipase A*
- PLA1-DDHD:** fosfolipasa A1 con dominio DDHD, *phospholipase A1 DDHD domain containing 1*
- PLC:** fosfolipasa C, *phospholipase C*
- PPAR:** receptores activados por proliferador de peroxisomas, *peroxisome proliferator-activated receptor*
- PVDF:** polifluoruro de vinilideno, *polyvinylidene fluoride*
- Raptor:** proteína asociada y reguladora de mTOR, *regulatory-associated protein of mTOR*
- RE:** retículo endoplasmático
- RIPK3:** *receptor interacting serine/threonine protein kinase 3*
- ROS:** especies reactivas del oxígeno, *reactive species of oxygen*
- SCD1:** estearoil-CoA desaturase 1, *stearoyl-CoA desaturase 1*
- SP1:** esfingosina 1 fosfato, *sphingosine-1-phosphate*
- SREBP:** proteína de unión a elementos de respuesta a esteroides, *sterol regulatory element binding protein*
- SDS:** dodecil sulfato sódico, *sodium dodecyl sulfate*
- SDS-PAGE:** electroforesis en gel de poli(acrilamida) con SDS, *SDS- polyacrylamide gel electrophoresis*

- TAK1**: kinasa activada por TGF β 1, *TGF β -activated kinase 1*
- TEMED**: tetrametil-etilendiamina, *tetramethyl-ethylenediamine*
- TFEB**: factor de transcripción EB, *transcription factor EB*
- TGF β** : factor de crecimiento tumoral beta, *tumor growth factor beta*
- TGF β R**: receptor de TGF β , *TGF β receptor*
- THC**: tetracannabidiol, *tetrahydrocannabinol*
- TIMP1**: inhibidor tisular de metaloproteinasas 1, *tissue inhibitor of metalloproteinases 1*
- TLR**: *toll-like receptor*
- TNF**: factor de necrosis tumoral, *tumor necrosis factor receptor 1*
- TNFR1**: receptor 1 de TNF, *tumor necrosis factor*
- TRAIL-R**: receptor de ligandos que inducen apoptosis relacionados con TNF, *TNF related apoptosis inducing ligand receptor*
- TREK1**: *two-pore 2P domain potassium channel 1*
- TRPV**: canal catiónico y receptor de potencial transitorio subfamilia vaniloide, *transient receptor potential cation channel subfamily vanilloid*
- TVI**: inyección en la vena de la cola, *tail vein injection*
- UHPLC-MS**: *ultrahigh pressure liquid chromatography-mass spectrometry*
- UPR**: respuesta a proteínas mal plegadas, *unfolded protein response*
- upstream**: corriente arriba, referido a rutas de señalización
- VCTE**: *vibration control transient elastography*
- vHFD**: dieta muy alta en grasa, *very high fat diet*
- VLDL**: lipoproteína de muy baja densidad, *very low-density lipoprotein*
- vortex**: vorticial, referido a un tipo de agitación en torbellino ampliamente utilizada en los laboratorios
- wild type**: fenotipo salvaje, referido a un ratón que no ha sido manipulado genéticamente
- XBP1**: *X-box binding protein 1*
- XBP1s**: forma escindida de XBP1, *XBP1-spliced*
- 2-AcG**: 2-acilglicerol, *2-acylglycerol*
- 2-AG**: 2-araquidonioilglicerol, *2-arachidonoylglycerol*
- 4-HNE**: 4-hidroxinonenal, *4-hydroxy-2-nonenal*



INTRODUCCIÓN





1. Hígado graso no alcohólico

1.1. DEFINICIÓN

La enfermedad de hígado graso no alcohólico o NAFLD (*non-alcoholic fatty liver disease*) se define como la acumulación de lípidos en más del 5% de los hepatocitos excluyendo causas secundarias como el consumo de alcohol, hepatitis autoinmune y hemocromatosis (1). El término clínico NAFLD incluye un espectro continuo de enfermedades hepáticas crónicas que van desde la simple acumulación de triglicéridos en los hepatocitos sin evidencia de daño hepatocelular (esteatosis no alcohólica o NAFL, *non-alcoholic fatty liver*) hasta inflamación, *ballooning* y fibrosis (esteatohepatitis no alcohólica o NASH, *non-alcoholic steatohepatitis*), pudiendo progresar a cirrosis y hepatocarcinoma (2).

1.2. EPIDEMIOLOGÍA

La NAFLD es la enfermedad hepática más común en el mundo. Se estima que la prevalencia global es de un 25%, es decir, aproximadamente 1.900 millones de personas lo sufren a día de hoy (3), aunque hay grandes variaciones (13% África a 30% Asia-Sudamérica). En cualquier caso, estos datos deben ser tomados con precaución dado que no hay un buen método diagnóstico que sea usado sistemáticamente (4).

La NAFLD es considerada en muchos casos como la manifestación hepática del síndrome metabólico. Así, entre las comorbilidades más fuertemente asociadas con NAFLD encontramos la obesidad, con una prevalencia del 51% en este grupo de pacientes, la diabetes tipo 2 (23%), la hiperlipidemia (69%) y la hipertensión (39%) (3). Sin embargo, no presentan estos factores de riesgo metabólico hasta un 16% de los pacientes con NAFLD. Otros factores de riesgo independientes son la edad, el sexo, el grupo étnico y el consumo de tabaco, solo por nombrar algunos (5).

Un subgrupo de los pacientes con NAFLD exhiben estadios más severos de la enfermedad hepática. Es el caso de la NASH, con una prevalencia de un 12% entre la población general y de un 59% entre los pacientes con NAFLD sometidos a biopsia. El riesgo de progresión de NASH también es elevado, y se refleja en la proporción de pacientes que agravan la fibrosis tras 5 años, un 41%, y en las incidencias de cirrosis y hepatocarcinoma, de un 0,8% y 0,3% cada año (6). A estos alarmantes datos hay que añadir la ratio de tasa de mortalidad por causas hepáticas entre pacientes con NASH versus sin NASH, estimada en 64,6 (3, 7). En el futuro, se prevé que la prevalencia de fases avanzadas de NAFLD se incrementarán en los países occidentales y gran parte de Asia, duplicándose o triplicándose a lo largo de esta década (3, 8, 9).

1.3. DIAGNÓSTICO E HISTOPATOLOGÍA

La mayoría de pacientes con NAFL, definida como la presencia de esteatosis sin inflamación ni daño hepático, son asintomáticos. Si presentan síntomas, estos suelen manifestarse como dolor o malestar en el cuadrante superior derecho. Los signos son inespecíficos y van desde malestar general a náuseas. Para el diagnóstico de NAFL, existen técnicas de imagen comunes como la resonancia magnética por imagen (MRI, *magnetic resonance imaging*), no invasiva pero ciertamente precisa (10). Para el diagnóstico de NASH, sin embargo, el estudio histológico de biopsia hepática continúa siendo la técnica más fiable a día de hoy. Dada la importancia clave de la histología para la evaluación de NASH, la literatura se ha centrado en la búsqueda de sistemas de evaluación cuantitativa basados en histología. Destaca el sistema de puntuación numérica validado en 2005 por la red de investigación clínica NASH CNR (*Non-alcoholic Steatohepatitis Clinical Research Network*), agencia promovida por los Institutos Nacionales de Salud (NIH, *National Institutes of Health*). La NASH CNR describe la puntuación NAS (*NAFLD activity score*) como una puntuación compuesta de tres parámetros independientes: esteatosis, inflamación lobular, *ballooning* celular a los que se añade la fibrosis para definir el estadio de la enfermedad (Tabla 1) (11). La puntuación NAS es a día de hoy el sistema más extendido y es el método de referencia para la evaluación de NASH. Los rasgos histológicos más característicos de cada estadio son:

- NAFL. Requiere de esteatosis en más del 5% de los hepatocitos. Es posible diferenciar diferentes patrones de acumulación lipídica intracelular (microvesicular y macrovesicular) y distintos patrones de distribución, siendo la zona 1 la que rodea el espacio porta y la zona 3 la que rodea a las vénulas hepáticas.
- NASH. Se observan áreas de lesión que incluyen esteatosis, inflamación (con presencia de células *Kupffer* e infiltración de macrófagos, linfocitos, neutrófilos y eosinófilos) y *ballooning*, con o sin fibrosis. En adultos, estas áreas habitualmente presentan un patrón de distribución en la zona 3. El *ballooning* se muestra como células hinchadas con una o varias vesículas lipídicas de gran tamaño que en muchos casos contendrán cuerpos de *Mallory-Denk*. La presencia de *ballooning* celular es clave para el diagnóstico de NASH (12, 13).

A pesar de ser ampliamente utilizada, la diagnosis basada en estudio histológico está sujeta al carácter invasivo de las biopsias hepáticas y presenta limitaciones como la variabilidad en obtención de muestras y la variabilidad intra- e inter- observador en la evaluación histológica. Las biopsias hepáticas están ocasionalmente asociadas con complicaciones e incluso muerte, siendo poco recomendable su extensión a la práctica clínica de rutina (14). Para minimizar este problema, han sido desarrolladas nuevas herramientas no invasivas, orientadas especialmente al diagnóstico de pacientes con NASH de alto riesgo. Por un lado, existen técnicas específicas como la VCTE (*vibration control transient elastography*) o basadas en MRI (MRE, *magnetic resonance elastography*), que proporcionan información sobre la rigidez hepática (15). Por otro lado, se han desarrollado alternativas basadas en biomarcadores presentes en sangre. Estas incluyen mediciones directas (fragmentos de citoqueratina 18), paneles de marcadores (Fibrotest®) o índices basados en combinaciones de parámetros (como el FIB-4 y el APRI) (16). Aunque individualmente su uso presenta limitaciones, la aplicación combinada de pruebas no invasivas se está extendiendo para diagnosis, seguimiento de pacientes y la toma de decisiones en la práctica clínica (17-19).

Grado de esteatosis		Inflamación lobular		<i>Ballooning</i> hepatocelular		Fibrosis	
Puntuación	Descripción (%)	Puntuación	Descripción	Puntuación	Descripción	Puntuación	Descripción
0	<5	0	Ninguno	0	Ninguno	0	Ninguno
1	5-33	1	<2 focos por campo (20X)	1	Alguno	1 a	Fibrosis leve, perisinusoidal en zona 3
						1 b	Fibrosis moderada, perisinusoidal en zona 3
2	34-66	2	2-4 focos por campo (20X)	2	Muchos	1 c	Sólo fibrosis portal o periportal
						2	Fibrosis perisinusoidal en zona 3 con fibrosis portal o periportal
3	>66	3	>4 focos por campo (20X)			3	Fibrosis confluyente
						4	Cirrosis

Tabla 1. Sistema de puntuación de NASH CRN: NAS y fibrosis. Definiciones y puntuación establecidas para los diferentes parámetros de NAFLD para evaluar la severidad de la enfermedad en base a criterios histológicos de biopsia hepática. Fuente: adaptación de lo publicado en la referencia 10.

1.4. PATOGÉNESIS

La principal teoría que intenta explicar la progresión de NAFLD es la hipótesis de los dos *hits* o golpes, establecida en 1998. El primer *hit* es la acumulación de lípidos, que genera NAFL, la etapa menos progresiva de la enfermedad. El segundo *hit* viene dado por la exposición a citoquinas inflamatorias y es necesario para causar el daño celular propio del NASH (20). Desde entonces, sucesivas investigaciones han supuesto cambios muy sustanciales en esta teoría, que para algunos autores ya se ha quedado obsoleta (21). Como veremos a continuación, a día de hoy es ampliamente aceptado que el primer *hit* de esteatosis sí que puede generar estrés celular directo (lipotoxicidad), y que el segundo *hit* es fruto de una compleja relación entre mecanismos celulares como el estrés del RE (retículo endoplasmático) y el estrés oxidativo, generando daño celular y apoptosis responsables del *ballooning*, inflamación y fibrosis característicos de etapas avanzadas de NAFLD (21). Además, los mecanismos desencadenantes de la enfermedad parecen ser bastante heterogéneos, así como las manifestaciones clínicas (22). Esta variedad de mecanismos moleculares presenta sin embargo un punto en común: la incapacidad del hígado para manejar los sustratos energéticos principales, lípidos y glúcidos, lo que desencadena toxicidad. Por tanto, es clave entender el origen y destino de los lípidos en los hepatocitos para entender las bases de NAFLD.

1.4.1. Homeostasis lipídica en el hígado

Los lípidos constituyen un grupo amplio de moléculas diversas, desde ceras hasta esteroides. En este capítulo, nos referiremos a ácidos grasos y derivados, a menos que se indique de otro modo.

1.4.1.1. Aporte de lípidos

El hígado es esencial para el mantenimiento de la homeostasis de lípidos del organismo. El contenido lipídico de este órgano está regulado por la interacción entre liberación de lípidos hacia el hígado y la síntesis, captación, oxidación y secreción de lípidos hepáticos, como se representa en la Figura 1. Las principales fuentes de lípidos son la captación desde la sangre desde el tejido adiposo y el aporte directo de la dieta, así como la lipogénesis *de novo* (DNL, *de novo lipogenesis*).

1.4.1.1.1. Captación desde la sangre

En el tejido adiposo, la lipólisis de triglicéridos en los adipocitos implica la liberación de ácidos grasos a la sangre, que serán posteriormente captados por el hígado. El proceso de lipólisis está altamente regulado por señales hormonales, entre las que destaca la insulina, con un potente efecto antilipolítico inhibiendo la actividad de la lipasa de triglicéridos del adipocito ATGL (*adipose triglyceride lipase*) y la lipasa sensible a hormonas HSL (*hormone-sensitive lipase*). De este modo, la resistencia a insulina del tejido adiposo asociada a obesidad conlleva un incremento de la tasa basal de lipólisis y liberación de ácidos grasos (23). Una vez en la sangre, la captación de ácidos grasos por el hígado está mediada por proteínas de la familia FATP (*fatty acid transport proteins*, especialmente isoformas 2 y 5), CD36 (*cluster of differentiation 36*) y caveolinas localizadas en la membrana plasmática del hepatocito (Figura 1). La expresión/localización celular de estos transportadores parece ser dependiente de la severidad y subtipos de NAFLD.

Otra fuente de lípidos para el hígado es aportada por partículas lipoproteicas procedentes de la dieta o bien de síntesis endógena. En el primer caso, la incorporación directa de lípidos de la dieta a través de remanentes de quilomicrones puede suponer hasta un 15% de triglicéridos hepáticos, sin embargo no está claro en qué medida el proceso está alterado en pacientes con NAFLD (24, 25). En el segundo caso, se trata de remanentes de VLDL (*very low-density lipoprotein*) que vuelven al hígado. Curiosamente, el papel de la enzima LPL (*lipoprotein lipase*) hepática, poco relevante en este órgano en condiciones fisiológicas, experimenta un aumento con el grado de esteatosis en NAFL. La LPL es responsable de la hidrólisis y captación de triglicéridos y necesita apoproteína CII como cofactor, presente en partículas lipoproteicas maduras pero no en remanentes, por tanto este incremento aberrante es indicativa de cierta capacidad hepática para captar ácidos grasos desde los quilomicrones y VLDL maduros y contribuir a la esteatosis (26-28).

1.4.1.1.2. Lipogénesis *de novo*

La segunda mayor fuente de lípidos en el hígado es la síntesis *de novo* (DNL, *de novo lipogenesis*) a partir de acetil-CoA (Figura 1). Este acetil-CoA procede del piruvato generado partiendo de glucosa, fructosa y algunos aminoácidos, o bien de la β -oxidación, que se explicará más adelante. En ambos casos, el acetil-CoA deberá ser transportado previamente desde la matriz mitocondrial hasta el citoplasma siguiendo el mecanismo de lanzadera malato-citrato (29).

El acetil-CoA citoplasmático, en un primer paso, es transformado en malonil-CoA por la enzima ACC (*acetyl-CoA carboxylase*). Esta reacción es la etapa limitante y estas dos biomoléculas, los monómeros en el proceso de DNL. De hecho, la enzima ACC está altamente regulada a varios niveles (transcripcionalmente, alostéricamente, etc) y por diferentes señales (por ejemplo, metabolitos intermedios), como se explicará más adelante en este capítulo.

En el siguiente paso de la DNL, el complejo multienzimático FAS (*fatty acid synthase*) ancla acetil-CoA y malonil-CoA a un componente de su estructura conocido como ACP (*acyl carrier protein*). A continuación, FAS añadirá secuencialmente moléculas de acetil-CoA sobre un esqueleto carbonado originado a partir de malonil-CoA mediante series de reacciones en cadena: condensación, reducción, deshidratación y reducción. En cada ciclo, la cadena de ácidos grasos se extiende dos carbonos y consume dos moléculas de NADPH+H⁺ (29).

Por último, tras una reacción de tiólisis que permite la separación entre el ácido graso sintetizado y el ACP de la enzima FAS, se obtiene el producto de esta serie de ciclos, principalmente el ácido palmítico (16:0) y minoritariamente ácido mirístico (14:0) y esteárico (18:0). A partir de estos productos, por elongación se generan especies de ácidos grasos de cadenas más largas en el RE, y en menor medida en la mitocondria. Junto con la elongación, la desaturación de ácidos grasos por acción de las enzimas desaturasas (como la SCD1, *stearoyl-CoA desaturase 1*) en el RE permite una amplia gama de ácidos grasos complejos existentes que podrán integrar una gran variedad de lípidos (con excepción de ácidos grasos esenciales tales como los insaturados en posiciones ω -6 y ω -3) (29, 30).

Las moléculas de ácidos grasos recién generadas por DNL, pueden formar parte de triglicéridos, como se explicará a continuación. Cuantitativamente, la DNL representa el 5% del aporte de triglicéridos hepáticos en condiciones de ayuno, y aumenta postprandialmente hasta el 23%. Sin embargo, en pacientes con NAFLD, el aporte de la DNL es elevado en ambos contextos, sugiriendo que el proceso funciona a la máxima capacidad independientemente de

la existencia de un estímulo. Esto refuerza el concepto de que la DNL contribuye al desarrollo de NAFLD (25, 31).

1.4.1.2. Destino de los lípidos hepáticos

Una vez en el hígado, los ácidos grasos se encuentran eminentemente unidos a FABP1 (*fatty acid-binding protein 1*). La formación de triglicéridos y su acumulación en vesículas lipídicas o exporte a través de la sangre, así como la beta oxidación (β -oxidación), constituyen los principales destinos de los ácidos grasos.

1.4.1.2.1. Síntesis de triglicéridos: acumulación y exporte a otros tejidos

Los ácidos grasos hepáticos pueden ser activados por unión a CoA y a continuación esterificados secuencialmente sobre una molécula de glicerol-3-P formando sucesivamente monoacilglicéridos, diacilglicéridos y triglicéridos. El primer paso y además limitante es el mediado por enzimas GPAT (*glycerol-3-phosphate acyltransferase*), para ser posteriormente metabolizado por las enzimas AGPAT (*acylglycerolphosphate acyltransferase*), PAP (*phosphatidic acid phosphatase*) y DGAT (*diglyceride acyltransferase*).

Los triglicéridos recién sintetizados se almacenarán intracelularmente en vesículas lipídicas, características de NAFLD, o se exportarán a la sangre formando partículas VLDL (Figura 1). Las VLDL se sintetizan en el RE, donde la apoproteína apoB100 es lipidada por la MTTP (*microsomal triglyceride transfer protein*) y transferida al aparato de Golgi, siendo lipidada de nuevo. Las VLDL cargadas de triglicéridos son secretadas entonces a la sangre y maduran por adquisición de ésteres de colesterol y apoproteínas (incluyendo ApoE) desde las HDL (*high-density lipoprotein*). Sus triglicéridos se hidrolizan y se liberan progresivamente por la LPL en los tejidos periféricos, y esto proporciona remanentes de VLDL, recaptados por el hígado, y en menor medida forman IDL (*intermediate-density lipoprotein*) y LDL (*low-density lipoprotein*). Alcanzado este último estadio, la partícula lipoproteica se ha desprendido de la inmensa mayoría de los triglicéridos (así como de las apoproteínas, exceptuando ApoB100). Diferentes estudios muestran que en NAFL, la síntesis de apoB100 y MTTP está aumentada, así como la secreción de VLDL (32, 33). Ésta se pierde durante la progresión a NASH, donde se encuentran inhibidas (34, 35). De este modo, la disminución del exporte de lípidos en NASH agrava la esteatosis hepática y promueve la progresión de la enfermedad.

1.4.1.2.2. Oxidación de ácidos grasos

El segundo principal destino de los ácidos grasos hepáticos es el catabolismo. La β -oxidación mitocondrial (Figura 1) se erige cuantitativamente como la principal ruta oxidativa de ácidos grasos, aunque existen otras que pueden adquirir relevancia en ciertos contextos, como se explicará más adelante en el texto (36).

Para que la β -oxidación se produzca, en primer lugar, los ácidos grasos son activados en el citoplasma por la ACS (*acyl-CoA synthetase*) generando acil-CoA grasos. A continuación, los acil-CoA grasos de cadena media son transportados a la matriz mitocondrial mediante un sistema lanzadera de carnitina, que involucra a CPT1A (*carnitine palmitoyltransferase 1 isoform A* – hepática-), CACT (*carnitine-acylcarnitine translocase*) y CPT2 (*carnitine palmitoyltransferase 2*). Los acil-CoA grasos de cadena corta son transportados a través de las membranas directamente sin necesidad de sistema lanzadera.

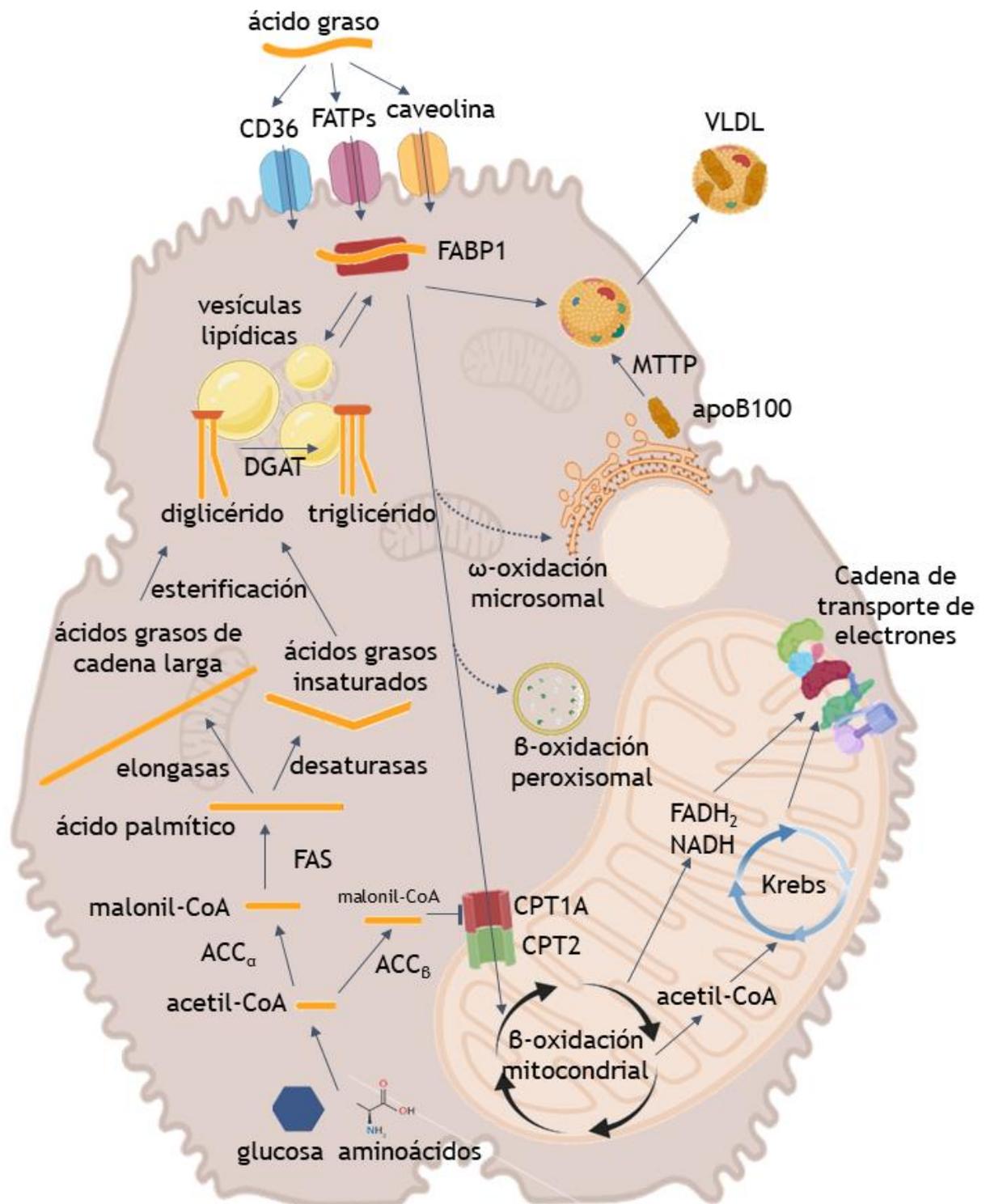


Figura 1. Metabolismo lipídico en el hígado. Esquema general de las principales vías de oxidación y síntesis de lípidos en los hepatocitos, así como captación y secreción. Fuente: elaboración propia.

Una vez en la matriz mitocondrial, los acil-CoA grasos serán sometidos a sucesivas series de reacciones enzimáticas de oxidación, hidratación, oxidación y tiólisis, que se repiten hasta que la molécula de ácido graso se consume por completo. En la primera reacción, el acil-CoA graso es oxidado por la enzima ACAD (*acyl-CoA dehydrogenase*), que presenta isoformas específicas dependiendo de la longitud del ácido graso, liberando FADH₂ (*flavin adenine dinucleotide, reduced form*) (37). La segunda reacción consiste en una hidratación por parte de la enzima ECH (*enoyl-CoA hydratase*). La tercera reacción es una oxidación catalizada por la enzima HAD (*hydroxyacyl-CoA dehydrogenase*) que produce NADH+H⁺ (*nicotinamide adenine dinucleotide, reduced form*) y la cuarta reacción es una tiólisis que libera acetil-CoA. Por tanto, en cada ciclo, la cadena de ácidos grasos se acorta dos carbonos y genera una molécula de acetil-CoA, una molécula de FADH₂ y una molécula de NADH+H⁺. Alternativamente, si los ácidos grasos son de cadena impar, el paso final produce propionil-CoA, de 3 carbonos, que puede convertirse en succinil-CoA liberando FADH₂ y NADH+H⁺ adicionales. Además, la presencia de insaturaciones ralentiza el proceso, ya que éstas deben adquirir configuración *trans* para ser reconocidas por las enzimas de la β-oxidación y dan lugar a derivados de ácidos grasos diferentes de acetil-CoA que deben ser adicionalmente metabolizados (36).

Independientemente de la naturaleza de los ácidos grasos que hayan sido oxidados, los productos de β-oxidación, es decir, acetil-CoA y las coenzimas FADH₂ y NADH+H⁺, pueden respectivamente oxidarse completamente en el ciclo de Krebs o participar directamente en la fosforilación oxidativa como dadores de electrones en la cadena de transporte de electrones. Por tanto, queda de manifiesto que el objetivo fundamental de la β-oxidación mitocondrial del hígado es la obtención de energía en los hepatocitos. Otra función es la producción de cuerpos cetónicos, que son exportados a la circulación y proporcionan sustratos energéticos a tejidos extrahepáticos durante el ayuno, aunque este papel queda fuera del interés de la presente tesis.

Los ácidos grasos de cadena muy larga (24 carbonos o más) y aquellos de cadena ramificada no pueden emplear el sistema lanzadera de carnitina y son sometidos a β-oxidación perioxosomal. Las enzimas de esta ruta son diferentes a la de la análoga mitocondrial, actuando en los dos primeros pasos el transportador ABCD1 (*ATP-binding cassette transporter subfamily D member 1*) y la enzima ACOX1 (*acyl-CoA oxidase 1*, isoforma perioxosomal). Una vez el acil-CoA graso se acorta hasta una longitud media (6-12 carbonos), se esterifica con carnitina y sale por difusión al citoplasma, pudiendo acceder ya a la lanzadera de carnitina y a la β-oxidación mitocondrial. El acetil-CoA generado accede a la mitocondria para ser incluido en el Ciclo de Krebs, mientras que el FADH₂ recién sintetizado no puede participar en la fosforilación oxidativa (sino que forma H₂O₂) (37).

Una tercera vía de oxidación de ácidos grasos es la omega oxidación (ω-oxidación), que permite el catabolismo de ácidos grasos en el RE mediante enzimas citocromo p450 (CYP), tales como CYP2E1 y CYP4A10 (38, 39).

En condiciones de esteatosis hepática, en respuesta a la sobrecarga de lípidos cabría esperar un incremento de la oxidación de ácidos grasos a través de las rutas recién explicadas. Sin embargo, la literatura recoge estudios en pacientes donde no se encuentran cambios (40), donde aumenta (41), y donde ésta disminuye (42). Esto podría deberse a la diversidad de subtipos y estadios de la enfermedad, a una compensación entre los sistemas oxidativos, o a una combinación de todas ellas. Esta cuestión no está todavía totalmente clarificada. Lo que sí está claro es que una gran parte de los pacientes con NASH presentan una función mitocondrial hepática alterada (43, 44). Cabe la posibilidad de que defectos mitocondriales subyacentes

predispongan a NASH, o bien la disfunción mitocondrial sea una simple consecuencia del estrés celular de la enfermedad. En cualquier caso, a nivel metabólico esto se traduce en una menor eficiencia en los sistemas de producción de energía mitocondrial: β -oxidación, ciclo de *Krebs* y fosforilación oxidativa en la cadena de transporte de electrones (44). Esto genera especies reactivas de oxígeno, que reducen todavía más la funcionalidad mitocondrial. Esto favorece la aparición (si existe disfunción mitocondrial subyacente) o acelera (en caso de NAFL original) la sobrecarga lipídica en los hepatocitos. Ante la incapacidad de la β -oxidación mitocondrial para lidiar con la carga oxidativa, una gran parte de los ácidos grasos serán procesados por los sistemas de β -oxidación perioxosomal y ω -oxidación, menos eficientes y que generan cantidades considerables de especies reactivas de oxígeno o ROS (*reactive species of oxygen*), propiciando el desarrollo de la enfermedad (45).

Una última vía que permite a los hepatocitos la oxidación de ácidos grasos independiente de la mitocondria y las vías clásicas es la lipofagia. Se trata de un tipo de autofagia especializado en la digestión de lípidos almacenados. La autofagia es un mecanismo de reciclaje celular que traslada componentes celulares específicos hacia lisosomas para su degradación. La autofagia en general y la lipofagia de vesículas lipídicas en los hepatocitos en particular es útil en condiciones fisiológicas como el ayuno (46). En el contexto patológico del NAFLD, parece que ante una esteatosis leve la lipofagia está aumentada, mientras que en NASH su funcionalidad está disminuida (47-49).

1.4.1.3. Factores clave en la regulación del metabolismo lipídico en el hígado

Dada la importancia del hígado en la homeostasis energética del organismo, no es de extrañar que el metabolismo lipídico hepático esté estrechamente regulado a diferentes niveles. Esto queda de manifiesto en la DNL, donde coexisten el control transcripcional de enzimas integrales de la síntesis de ácidos grasos, la disponibilidad de sustratos y la regulación de la localización y actividad enzimática de ACC, además de regulación cruzada con la β -oxidación.

1.4.1.3.1. Regulación transcripcional de la lipogénesis *de novo*

La regulación transcripcional de la DNL tiene clásicamente dos protagonistas: SREBP1c (*sterol regulatory element binding protein 1c*) y ChREBP (*carbohydrate response element binding protein*). El factor de transcripción SREBP1c inmaduro se localiza en el aparato de Golgi, anclado a la membrana. Su corte proteolítico libera la forma activa, permitiendo su traslocación al núcleo, promoviendo la transcripción de genes lipogénicos como ACC y FAS. Esto sucede, por ejemplo, en situación postprandial, en la que la acción de la insulina promueve la regulación positiva de la DNL. Por otra parte, el factor de transcripción ChREBP se activa por incrementos de glucosa (o metabolitos intermediarios de la glucólisis) hepática. Como resultado de su traslocación al núcleo, transcribe genes de DNL, como ACC, y de la piruvato kinasa, proporcionando acetil-CoA, sustrato lipogénico necesario para la acción de ACC (50).

1.4.1.3.2. Regulación de la lipogénesis *de novo* por disponibilidad de sustratos

La DNL también está sujeta a la disponibilidad de sustratos: malonil-CoA y NADPH+H⁺. En el primer caso, la disponibilidad de malonil CoA depende de la capacidad de ACC para transformar el acetil-CoA disponible. Estos niveles de acetil-CoA responden eminentemente a la actividad glucolítica. Inicialmente, el acetil-CoA se incorporará al ciclo de *Krebs* y solamente cuando esta ruta no pueda hacer frente a la carga de sustrato (bien porque la tasa de producción glucolítica es elevada o bien porque el ciclo de *Krebs* está inhibido), entonces el acetil-CoA

estará disponible para ser utilizado en la DNL. En el segundo caso, el $\text{NADPH} + \text{H}^+$ se consume durante la DNL, liberando NADP^+ . Para recuperar la forma reducida de esta coenzima y mantener la DNL en funcionamiento, se activa la ruta de las pentosas fosfato, además del aporte procedente de la lanzadera malato-citrato (50).

1.4.1.3.3. Lipogénesis *de novo* y localización celular de ACC: isoformas

Como ya se ha indicado previamente, ACC cataliza la síntesis de malonil-CoA en la ruta de DNL, proporcionando monómeros para la síntesis de ácidos grasos. La localización de la enzima ACC es isoforma específica y esto determina su acción reguladora en DNL o β -oxidación en el hígado. Existen dos isoformas: $\text{ACC}\alpha$ (o ACC1) y $\text{ACC}\beta$ (o ACC2). $\text{ACC}\alpha$, citosólica, genera el malonil-CoA que será usado por FAS para generar ácido palmítico. $\text{ACC}\beta$ se localiza en la membrana mitocondrial y proporciona un incremento local de malonil-CoA que inhibe CPT1, la enzima responsable del importe de ácidos grasos hacia la mitocondria para la β -oxidación (51). De este modo, ratones sin $\text{ACC}\alpha$ en el hígado presentan menor DNL y menos lípidos hepáticos, mientras que ratones sin $\text{ACC}\beta$ presentan mayor gasto energético y menos triglicéridos hepáticos (52, 53). Esto fue corroborado usando oligonucleótidos antisentido para silenciar específicamente ambas isoformas en el hígado durante la etapa adulta en rata: el silenciamiento de $\text{ACC}\alpha$ redujo DNL (y aumentó en cierta medida la β -oxidación), mientras que el silenciamiento de $\text{ACC}\beta$ no tuvo impacto en DNL y sí estimuló fuertemente la β -oxidación (54). Resulta llamativo que ratones *knockout* para las dos isoformas de ACC desarrollan esteatosis en dieta estándar, mientras que su silenciamiento en la etapa adulta redujo el NAFL inducido por dieta alta en grasa (HFD, *high fat diet*) en rata, sugiriendo que el modelo genético desarrolla mecanismos compensatorios ante la ausencia de esta enzima clave para la homeostasis energética (54, 55). En conjunto, los resultados apuntan a que estas dos isoformas de ACC incrementan la cantidad de lípidos totales acoplado la producción de lípidos de DNL con la inhibición de la β -oxidación. En humanos con NAFLD, los niveles de expresión de $\text{ACC}\alpha$ y $\text{ACC}\beta$ están aumentados (45).

1.4.1.3.4. Regulación de la lipogénesis *de novo* por actividad de ACC

Además de ser regulada a nivel transcripcional y por su localización celular, la enzima ACC es estrictamente regulada en relación a su actividad. El primer nivel de regulación es la polimerización (56). En estado basal, $\text{ACC}\alpha$ (la isoforma más estudiada) se presenta en forma monomérica, enzimáticamente inactiva. La dimerización permite que la enzima sea funcional. La mayor actividad de ACC se produce por polimerización de dímeros de $\text{ACC}\alpha$. El activador alostérico citrato, intermediario del ciclo de *Krebs*, induce su polimerización. Ese papel del citrato sobre la DNL permite la coordinación entre el ciclo de *Krebs* y la DNL: incrementos de acetil-CoA impulsan inicialmente la actividad del ciclo de *Krebs*, provocando acumulación de los productos, que inhiben la actividad del propio ciclo. En ese punto, el citrato activa $\text{ACC}\alpha$ a la vez que el acetil-CoA queda disponible para participar en la DNL. $\text{ACC}\alpha$ es además inhibida alostéricamente por malonil-CoA y palmitoil-CoA, productos de la reacción enzimática de ACC y FAS. No es de extrañar, entonces, que muchos de los potentes fármacos inhibidores de ACC diseñados recientemente (como GS-0976) interaccionen con sitios de unión la dimerización de las dos isoformas de ACC (57). Éstos han mostrado su eficacia en reducir NAFL en ratones y humanos, como se explicará más adelante.

Otro nivel de control de la actividad de ACC es la fosforilación. ACC α humana es inactivada por fosforilación en Ser80, Ser1201 y Ser1216 por AMPK (*adenine monophosphate-AMP-activated protein kinase*) y en Ser78 y Ser1201 por PKA (*protein kinase A*) (56). El lugar de fosforilación Ser80 (Ser79 en ratón) ejerce el mayor impacto en su actividad (58). En ACC β , el lugar de fosforilación que más regula la actividad es Ser222 (Ser212 en ratón) (59). En ambos casos, la enzima responsable de la fosforilación es AMPK. Ratones donde Ser79 y Ser212 han sido sustituidas por Ala presentan mayores niveles de malonil-CoA hepático, DNL y acumulación de lípidos, pero reducida β -oxidación, demostrando la importancia de la fosforilación inhibitoria de AMPK sobre ACC en NAFL (58). Desafortunadamente, lo que se conoce sobre los mecanismos y enzimas que desfosforilan ACC permanen mucho menos estudiados, y se piensa que varias fosfatasaas ubicuas podrían participar en este proceso (60, 61).

1.4.1.3.5. Regulación cruzada entre lipogénesis *de novo* y β -oxidación

La β -oxidación mitocondrial es un proceso metabólico altamente regulado. Además de responder al estado energético de la célula, debe ejercer un control cruzado con la DNL para evitar un ciclo fútil. Por estas razones, la β -oxidación está principalmente regulada por metabolitos de la DNL como el malonil CoA y por sensores energéticos las coenzimas NAD $^+$ y FAD y la enzima AMPK.

La tasa de β -oxidación se encuentra sometida a la disponibilidad de sustratos: ácidos grasos, NAD $^+$ y FAD (62). La oxidación de ácidos grasos de cadena intermedia y corta está limitada por la velocidad con la que pueden llegar a las mitocondrias. El malonil-CoA, que se acumula cuando la DNL está activada, inhibe a CPT1A y por tanto ralentiza el importe de ácidos grasos a la matriz mitocondrial. La existencia de ACC β en la membrana mitocondrial permite que incrementos locales de malonil-CoA ejerzan un bloqueo rápido de la β -oxidación vía CPT1A. De manera recíproca, ya se ha explicado que la β -oxidación modula la tasa de DNL por disponibilidad de acetil-CoA, de modo que cuando la primera ruta está activa se deriva el acetil-CoA hacia el ciclo de Krebs, impidiendo la activación de la DNL. En relación a NAD $^+$ y FAD, la β -oxidación necesita ambas coenzimas para que actúen como pareja de oxidorreducción. Ante un estado energético de la célula elevado, ambas se encuentran como forma reducida NADH+H $^+$ y FADH $_2$, la forma oxidada escasea y como consecuencia la β -oxidación se inhibe por falta de sustratos disponibles. Ante un estado energético de la célula bajo, se promueve la β -oxidación (36).

En otro nivel de regulación integrada entre β -oxidación y lipogénesis *de novo* se encuentra AMPK. Como veremos a continuación, AMPK controla la actividad y transcripción de diferentes dianas claves en ambas rutas metabólicas.

1.4.1.3.6. Integración del metabolismo lipídico: AMPK

AMPK no sólo regula directamente a ACC, sino que se erige como una proteína reguladora indispensable en el metabolismo celular y del organismo. Estructuralmente es un trímero consistente en una subunidad catalítica (α) y dos reguladoras (β , γ) que presentan lugares de unión a glucógeno (inhibiendo su actividad) y AMP/ADP/ATP (activando/activando menos/inhibiendo), respectivamente. Existen dos isoformas de las subunidades α y β , y tres isoformas de la subunidad γ , para todas ellas la expresión varía entre tejidos y tipos celulares y tiene consecuencias en localización celular, afinidad por ciertas dianas y regulación de su activación (63). En el hígado, existen diferencias entre humanos y ratón: mientras que los

hepatocitos humanos expresan mayoritariamente las subunidades $\alpha 1$, $\beta 2$ y $\gamma 1$, en ratones las isoformas predominantes son $\alpha 1$ y $\alpha 2$ (50/50%) y $\beta 1$ y $\gamma 2$ (64, 65). La actividad de AMPK está regulada principalmente por fosforilación en Thr172. Ésta puede estar mediada por LKB1 (*liver kinase B1*; a su vez, regulada por niveles de AMP/ADP), CaMKK β (*calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase beta*; regulada por niveles de calcio) y TAK1 (*tumor growth factor -TGF β - activated kinase 1*; regulada por TGF β , *tumor necrosis factor-TNF- e interleukin 1-IL-1-*), solo por nombrar algunos.

AMPK actúa como sensor energético e integra una respuesta metabólica orquestada. Globalmente inhibe el anabolismo lipídico y estimula su catabolismo. Sus respuestas se suelen agrupar en acciones a corto plazo, con un impacto directo en la actividad de las enzimas diana, y acciones a largo plazo por regulación transcripcional.

Por acción directa, AMPK fosforila proteínas esenciales del metabolismo energético: ACC α/β , inhibiendo DNL y fomentando la β -oxidación de ácidos grasos; MCD (*malonyl-CoA decarboxylase*), estimulando la reacción inversa a la catalizada por ACC y consecuentemente impidiendo que el malonil-CoA sea utilizado para la DNL; GPAT, inhibiendo la formación de triglicéridos y desviando los ácidos grasos hacia la β -oxidación; Raptor (*regulatory-associated protein of mTOR*)/mTOR (*mammalian target of rapamycin*), inhibiendo la síntesis de proteínas y lípidos y activando la autofagia; HMGCR (*hydroxymethylglutaryl-CoA -HMGCoA-reductase*), bloqueando la síntesis de colesterol y otros esteroides; y GYS (*glycogen synthase*), impidiendo la glucogenogénesis (66).

Por otro lado, AMPK regula factores de transcripción clave implicados en las principales rutas del metabolismo energético. Entre ellos se encuentran SREBP1c, bloqueando el programa lipogénico, y ChREBP, inhibiendo la síntesis y exportación de lípidos y estimulando la glucólisis. AMPK también promueve la activación de PGC1 α (*peroxisome proliferator-activated receptor -PPAR- gamma, coactivator 1 alpha*), estimulando la β -oxidación y la biogénesis mitocondrial, y la inhibición de PPAR γ , reprimiendo la captación y acumulación de lípidos (66).

En el contexto de NAFLD, resulta llamativo que la actividad de AMPK está reducida tanto en NAFL como en NASH en ratones (65, 67, 68). Aunque los ratones doble *knockout* para $\alpha 1$ y $\alpha 2$ específicos de hígado no desarrollan aparentemente alteraciones en la homeostasis lipídica hepática, sí exhiben un fenotipo más severo en modelos de NAFL y NASH inducido por dieta (65, 67, 68). La activación farmacológica de AMPK en ratones *wild type* o la activación genética en ratones con expresión de AMPK $\alpha 1$ inducible por doxiciclina disminuye el NAFL inducido por dieta, y esto se asocia a un incremento en la β -oxidación y una reducción de DNL (65, 68). En la misma línea, ratones que expresan una forma de AMPK constitutivamente activa en el hígado suprimen el NAFL inducido por dieta (69). La activación farmacológica de AMPK también tiene efectos beneficiosos en ratones con NASH inducido por dieta, que se explican en parte por la acción directa de AMPK reprimiendo la apoptosis mediada por la caspasa 6 (67). De hecho, AMPK contribuye a las acciones de varios fármacos utilizados en el contexto de obesidad y diabetes tipo 2, especialmente relevante es el caso de la metformina, aunque también ejerce efectos independientes de AMPK (por ejemplo, a través de otros mecanismos AMP-sensibles implicados en el metabolismo lipídico) (70).

1.4.1.3.7. Otros reguladores clave del metabolismo lipídico

Además de enzimas como ACC y AMPK y factores de transcripción como SREBP1c y ChREBP, existen una gran variedad de proteínas que se han visto involucradas en la tarea de regular el metabolismo energético y particularmente el lipídico. Muchas veces regulándose mutuamente y formando rutas metabólicas complejas, controlan no sólo la DNL sino también la oxidación de ácidos grasos, la captación y exporte de lípidos entre el hígado y los tejidos periféricos y el metabolismo de glucosa.

Entre los más conocidos se encuentran los receptores nucleares FXR (*Farnesoid X receptor*) y LXR (*Liver X receptor*). FXR es un receptor de ácidos biliares. Su activación bloquea la síntesis de ácidos biliares a partir de colesterol, reduciendo la absorción de lípidos. Ejerce, además, un papel inhibitorio sobre la DNL mediante represión de SREBP1c, y un papel activador de la oxidación de ácidos grasos mediante activación transcripcional de PPAR α . Además, inhibe la producción de VLDL por silenciamiento de MTTP y activa la hidrólisis de triglicéridos en los tejidos periféricos vía LPL-APOCII (71). LXR, por su parte, promueve DNL vía SREBP1c, ChREBP e incluso activando directamente la transcripción de enzimas como FAS (72).

Los receptores PPARs también han sido ampliamente estudiados. PPAR α es ampliamente conocido por su papel en la oxidación de ácidos grasos, aumentando la expresión de genes como CPT1 (mitocondrial), ACOX1 (peroxisomal) y CYP4A10 (RE), aunque también la captación desde la sangre de ácidos grasos (VLDLR) y triglicéridos (LPL) (73). PPAR β/δ estimula la expresión hepática de genes involucrados en β -oxidación vía PGC1 α y la autofagia vía AMPK/mTOR, además de inducir la producción de HDL e inhibir la producción de VLDL (74, 75). PPAR γ estimula la captación de lípidos mediante aumento de expresión del transportador de ácidos grasos CD36, de LPL y de la proteína de unión a ácidos grasos FABP1, y en menor medida promueve la DNL, por lo que sus acciones favorecen globalmente la esteatosis (76).

PGC1 es un factor de transcripción que colabora con los PPARs, aunque también exhibe funciones independientes. Presenta dos isoformas, α y β , con funciones redundantes como promotoras de β -oxidación, de fosforilación oxidativa y de biogénesis mitocondrial, así como en activar la respuesta antioxidante. Sin embargo, presentan funciones específicas de isoforma: exclusivamente PGC1 α promueve gluconeogénesis mientras que sólo PGC1 β (en determinados contextos) es capaz de promover la DNL y el exporte de triglicéridos hepáticos en VLDL (77).

El sistema endocannabinoide es conocido por su función en la regulación del metabolismo lipídico en un gran número de tejidos, incluidos el hígado (78, 79). Más adelante se explicará en profundidad que, por ejemplo, CB1 (*cannabinoid receptor 1*) es un regulador positivo de la DNL e inhibidor de β -oxidación, o como la desregulación de los endocannabinoides y sus receptores altera la homeostasis lipídica en el hígado.

Por último, mTOR, asociado a otras proteínas formando los complejos mTORC1 y mTORC2, coordina el metabolismo en respuesta a señales nutricionales y estrés. Promueve la DNL mediante activación de factores de transcripción como SREBP1c, inhibe la autofagia mediante represión sobre TFEB (*transcription factor EB*), e inhibe la oxidación de ácidos grasos mediante represión de PPAR α (80, 81).

1.4.2. Mecanismos celulares en la progresión de NAFLD

El desequilibrio de la homeostasis lipídica hepática conduce a NAFL. La progresión a NASH está marcada histológicamente por el *ballooning* y la inflamación. Éstas son manifestaciones celulares del estrés metabólico inducido por la sobrecarga lipídica. Entre los mecanismos subyacentes se encuentra la resistencia a insulina, estrés del RE, estrés oxidativo, lipotoxicidad, inflamación y apoptosis.

1.4.2.1. Resistencia a insulina

La resistencia a insulina contribuye a la patogénesis de NAFLD (82). Como se ha explicado previamente, la menor sensibilidad a insulina en el tejido adiposo conlleva incrementos en lipólisis y liberación de ácidos grasos. Esto promueve a su acumulación ectópica en los tejidos periféricos, que acelera a su vez la resistencia a insulina, dando lugar a una hiperinsulinemia compensatoria. Por ejemplo, en el músculo esto se traduce como una reducción en la captación de glucosa. Este escenario estimula enormemente las vías de obtención de lípidos hepáticos, específicamente la captación desde el tejido adiposo y la DNL, esta última a causa de la sobreestimulación de factores como SREBP-1c, y una mayor disponibilidad de sustrato (la gluconeogénesis no está suprimida a pesar de hiperinsulinemia) (83). Además, existe una comunicación cruzada entre tejido adiposo e hígado. Señales del tejido adiposo, como la IL-6 o TNF α aceleran la desregulación de la señalización hepática de la insulina (84). Señales hepáticas, como la DPP-4 (*dipeptidyl peptidase 4*), promueven a su vez la resistencia a insulina del tejido adiposo (85). Además en pacientes humanos existe una correlación positiva entre índice HOMA (*homeostatic model assessment*) y NAFLD (86), y se ha comprobado que la producción hepática de glucosa está progresivamente desregulada desde pacientes sanos a NAFL y a NASH, e incluso en ausencia de diabetes tipo 2 (87).

1.4.2.2. Estrés del retículo endoplasmático

El RE es el orgánulo celular donde la mayoría de proteínas son ensambladas. Las proteínas mal plegadas pueden acumularse en respuesta a varios tipos de estrés, como la sobrecarga de lípidos en NAFL (88). Estas proteínas forman agregados y activan un mecanismo adaptativo conocido como UPR (*unfolded protein response*). Éste ejerce una respuesta orquestada para reestablecer la homeostasis basada en arresto del ciclo celular, atenuación de la síntesis proteica, degradación de proteínas asociadas al RE o ERAD (*ER-associated protein degradation*) e inducción de chaperonas del RE (89). La chaperona más conocida es BiP/GRP78 (*binding immunoglobulin protein/glucose-regulated protein 78*). Como se muestra en la Figura 2, existen tres rutas de señalización canónicas de proteínas sensores de estrés que se activan durante la UPR:

- IRE1 α (*inositol requiring enzyme 1 alpha*). La disociación de GRP78 inducida por la acumulación de proteínas mal plegadas provoca su dimerización y autofosforilación, activando su actividad endorribonucleasa. Ésta escinde el ARNm de XBP1 (*X-box binding protein 1*), activador transcripcional de chaperonas del RE y de genes implicados en ERAD. En esta ruta también es activada JNK (*c-Jun N-terminal kinase*), que en condiciones de estrés del RE crónico induce apoptosis.
- PERK (*PKR-like ER kinase*) Una vez liberada de GRP78, se activa por autofosforilación y oligomerización, fosforila a EIF2 α (*eukaryotic translation initiation factor 2 alpha*), desencadenando una reducción global de la traducción de

proteínas, pero también induciendo la expresión de ATF4 (*activating transcription factor 4*) y CHOP (*CCAAT enhancer binding protein -C/EBP- homologous protein*), que promueve la producción de chaperonas del RE y factores implicados en ERAD y promueve la reanudación de la síntesis proteica.

- ATF6 (*activating transcription factor 6*). La disociación de GPR78 implica su traslado al aparato de Golgi, donde es escindida y activada para la promoción transcripcional de genes, sola o asociada a la forma escindida de XBP1 (*XBP1s*, *XBP1-spliced*), estimulando la expresión de chaperonas del RE y proteínas de ERAD.

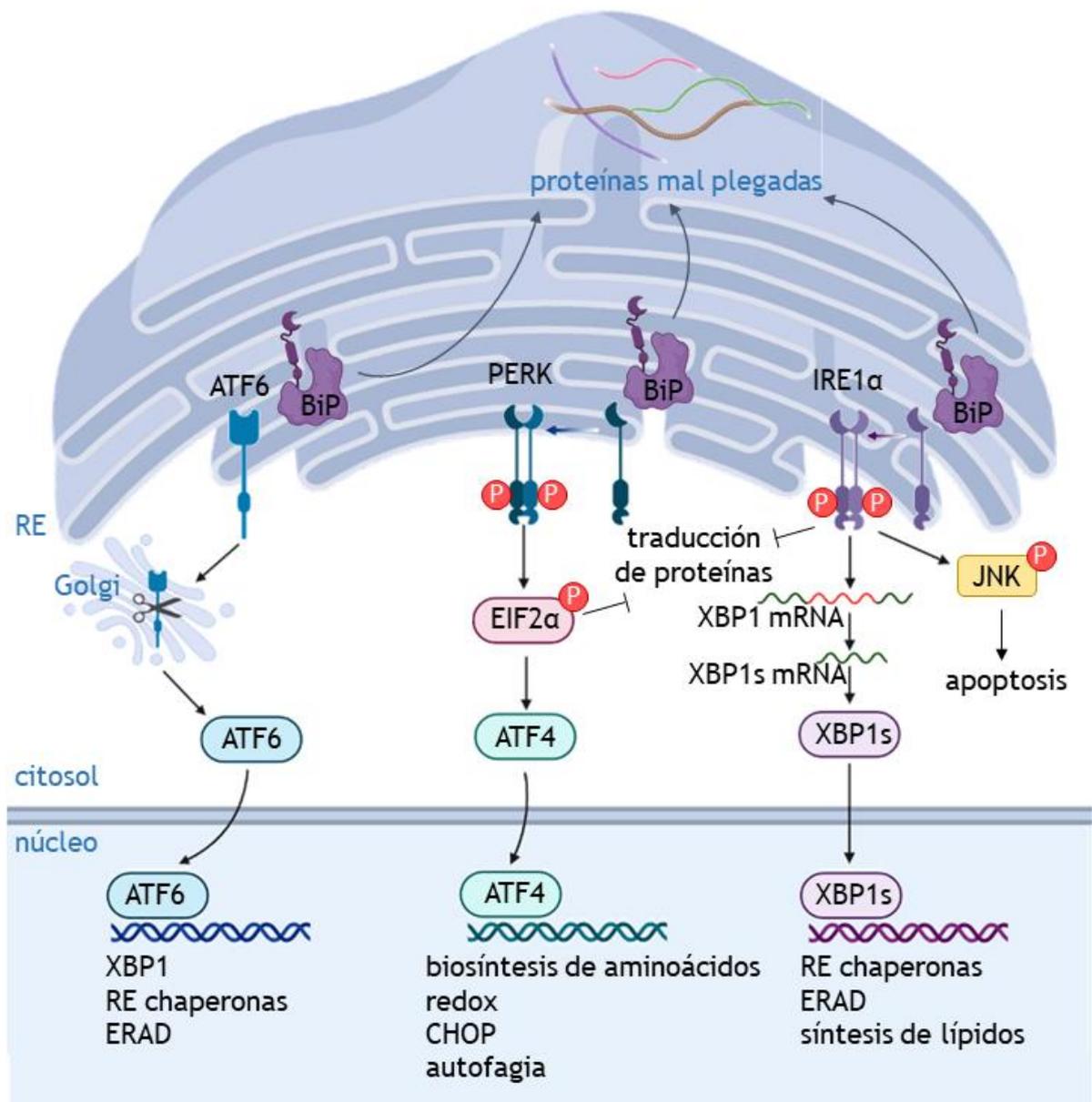


Figura 2. Estrés del retículo endoplasmático (RE). Esquema general de las vías canónicas de señalización activadas en respuesta a proteínas mal plegadas (UPR). Fuente: elaboración propia.

Disrupciones en cualquiera de estas tres rutas de señalización promueve NAFLD en ratones (89). En algunos casos, se ha demostrado que este fenotipo obedece a acción transcripcional directa, con es el caso de XBP1 sobre genes de DNL, mientras que en otros casos la disfunción del ER impide la correcta producción de VLDL (90, 91). Queda de manifiesto, por tanto, que la acumulación de lípidos y el estrés de RE se activan mutuamente en un círculo vicioso, aumentando el estrés celular y agravando el NAFLD. Consecuentemente, los niveles de expresión de estos factores de respuesta a estrés del RE están incrementadas *in vivo* en diferentes modelos de NAFL y NASH, *in vitro* ante exposición a ácidos grasos y en un grado variable en biopsias humanas de pacientes con NAFL y NASH (89, 92).

1.4.2.3. Estrés oxidativo

La principal fuente de estrés oxidativo en los hepatocitos es la oxidación de ácidos grasos. Como ya se ha explicado previamente, en condiciones fisiológicas normales la β -oxidación mitocondrial ejerce mayoritariamente esta función. En NAFL, las antes rutas minoritarias β -oxidación perioxosomal y la ω -oxidación del RE asumen un rol protagonista, y son responsables de una mayor producción de ROS. Durante la inflamación, los macrófagos activados también suponen una fuente muy relevante de ROS, frecuentemente por acción de la enzima NADPH oxidasa (93). Esta generación mantenida de ROS no podrá ser eficazmente neutralizada por el sistema antioxidante de la célula, y este desequilibrio se conoce como estrés oxidativo. Este estrés oxidativo alterará la integridad mitocondrial, reduciendo el rendimiento de sus procesos oxidativos (oxidación incompleta de ácidos grasos, desacoplamiento de la cadena de transporte de electrones, etc) y generando más ROS. También desencadenará la peroxidación de lípidos, extendiendo la acción del estrés oxidativo en orgánulos como el RE y causando muerte celular (43, 94). Entre los productos más estudiados derivados de la peroxidación lipídica se encuentra el MDA (*malondialdehyde*) y el 4-HNE (*4-hydroxy-2-nonenal*). Varios estudios han encontrado estos y otros marcadores de estrés oxidativo aumentados en el hígado de pacientes con NASH, en comparación con NAFL y sin NAFLD (87, 95, 96).

1.4.2.4. Lipotoxicidad

La lipotoxicidad es la disfunción celular inducida por lípidos. Además de la aparición de productos de peroxidación lipídica, la abundancia relativa de especies lipídicas en el hígado varía en la progresión de NAFL a NASH. Este desequilibrio provoca que algunos lípidos ejerzan efectos lipotóxicos. Aunque a priori los triglicéridos serían los principales candidatos a mediar estos efectos, diferentes publicaciones apuntan a que otras especies lipídicas también son responsables. Entre los lípidos lipotóxicos se encuentran ciertos ácidos grasos, esfingolípidos y el colesterol libre, solo por nombrar algunos. La sobrecarga de ácidos grasos insaturados reduce la acumulación de triglicéridos pero induce apoptosis en los hepatocitos de ratón (97). La producción de esfingolípidos, en particular ceramidas, está aumentada en pacientes con NAFLD, agrava la resistencia a insulina y su inhibición reduce el daño hepático inducido por dieta en ratones (98-100). El colesterol libre está aumentado progresivamente desde NAFL hacia NASH en pacientes humanos, y sensibiliza frente a apoptosis inducida por TNF en ratones en el contexto de NASH (101, 102). Estudios recientes proporcionan información de otros lípidos con expresión diferencial entre NAFL y NASH. Éstos son candidatos a ejercer efectos lipotóxicos además de ser utilizados potencialmente en aplicación diagnóstica (22).

1.4.2.5. Inflamación

La inflamación es una respuesta fisiológica a una lesión tisular o infección que lleva a la secreción de mediadores inflamatorios, como citocinas e eicosanoides, que coordinan la respuesta de defensa y reparación. La persistencia de la actividad inflamatoria en el tiempo resulta en cambios inflamatorios crónicos que agravan el daño del tejido, en el contexto de NAFLD, desarrollando NASH. La fuente desencadenante de la inflamación en NAFLD puede ser extrahepática o proceder del hígado. En el primer caso, la secreción de citocinas por parte de macrófagos en el tejido adiposo en condiciones de obesidad tiene un efecto quimiotáctico, provocando la infiltración de macrófagos al hígado (103). También el intestino, que manifiesta disbiosis en respuesta a estrés metabólico alterando la barrera intestinal, produce señales microbianas que inducen inflamación hepática (104). Tanto es así que existe una correlación entre la abundancia de algunas especies bacterianas y la severidad del NASH en humanos (105). En el segundo caso, el estrés celular es generado por una gran variedad de procesos, como el estrés oxidativo, estrés del RE y lipotoxicidad, que ya se ha explicado previamente. En ambos casos, se desencadena la activación del sistema inmune innato (106).

Durante el desarrollo de NASH, las células *Kupffer* hepáticas secretan factores como TNF α y CCL2 (*C-C motif chemokine ligand 2*), atrayendo monocitos por quimiotaxis (107, 108). Estos monocitos, una vez convertidos en macrófagos infiltrados en el hígado y con fenotipo proinflamatorio, producen TNF α , IL-6, TGF β e IL-1 β , entre otros, amplificando las señales proinflamatorias preexistentes (109, 110). TNF α , además de reclutar células inflamatorias, activa cascadas de señalización intracelulares que desencadenan resistencia a insulina y apoptosis en hepatocitos y la supervivencia celular en células estelares hepáticas (HSCs, *hepatic stellate cells*) (111, 112). TNF α e IL-6 son capaces de activar la vía de ASK1 (*apoptosis signal-regulating kinase 1*)/JNK que bloquea la acción de PPAR α y retroalimenta la producción de citocinas proinflamatorias (113). IL-6 es capaz de inducir resistencia a insulina y agrava el estrés oxidativo y apoptosis en modelos de NASH (114, 115). Curiosamente, la inducción de HCC por HFD y DEN (*diethylnitrosamine*) en ratones (modelo de progresión NASH-hepatocarcinoma) es dependiente de IL-6 y TNF α (116). TGF β es secretado por macrófagos y HSCs (y en menor medida, en hepatocitos expuestos a TNF α), promoviendo la apoptosis en los hepatocitos y mediando la activación de las HSCs y la fibrogénesis, como se explicará más adelante (117, 118).

1.4.2.6. Apoptosis

La combinación de los múltiples insultos inductores de daño celular activa rutas de muerte celular. Ésta ocurre en forma de muerte celular programada (apoptosis principalmente, aunque nuevas evidencias muestran la existencia de otros tipos) o accidental (necrosis). Todos ellos implican la rotura de los componentes celulares.

La apoptosis es un proceso de muerte celular altamente regulado y una característica morfológica de NASH (19). Se ejecuta por dos vías de señalización celular: la vía intrínseca, por mecanismos de daño de membranas (del RE, de la mitocondria, etc); y la extrínseca, mediada por receptores de superficie de membrana celular. En la vía extrínseca destaca TNFR1 (*tumor necrosis factor receptor 1*) y TRAIL-Rs (*TNF related apoptosis inducing ligand receptors*), activados por ácidos grasos y TNF α , y aumentados en pacientes con NASH (119, 120). En ambas vías, la activación de las rutas desencadena una cascada de señalización que

lleva a la activación por escisión de las caspasas iniciadoras (por ejemplo, caspasa 8 en la vía extrínseca y caspasas 2 y 9 en la intrínseca), que finalmente derivará en la activación por escisión de las caspasas ejecutoras (caspasa 3 y 7 principalmente) que coordinan la condensación y colapso de la célula, quedando auto-englobadas en estructuras llamadas cuerpos apoptóticos (121). La importancia de las caspasas ejecutoras en el desarrollo de NASH queda de manifiesto en el fenotipo del ratón *knockout* para la caspasa 3 en NASH inducido por dieta, mostrando reducidos depósitos de colágeno y niveles de citocinas inflamatorias, pero sin disminución en esteatosis (122). Las formas cortadas de las caspasas 3 y 7 están presentes en el hígado de pacientes con NASH (120).

Por otro lado, la necrosis es un proceso de muerte celular no programada en la que se lisan las membranas celulares y el núcleo en respuesta al agotamiento de ATP. Tanto apoptosis como necrosis podrían representar los dos finales extremos del espectro frente a un mismo evento desencadenante (123).

Por último, nuevos tipos de muerte celular están comenzando a ser estudiados en el contexto de NASH. Es el caso de la piroptosis, muerte celular inducida por NLRP3 (*NLR family pyrin domain containing protein 3*) inflamasoma y los receptores TLRs (*toll-like receptors*), promoviendo que la caspasa 1, activadora de IL-1 β , medie una respuesta de muerte celular rápida con rotura de membrana plasmática y liberando productos proinflamatorios (124). También el caso de la necroptosis, que ejecuta muerte celular programada independiente de caspasas y dependiente de la kinasa RIPK3 (*receptor interacting serine/threonine protein kinase 3*). Esta proteína, aumentada en pacientes con NASH, contribuye en ratón a los efectos inflamatorios, fibróticos y de muerte celular en NASH inducido por dieta (125).

1.4.2.7. Fibrosis

El daño hepático mantenido puede activar repuestas fibrogénicas y conducir a fibrosis y cirrosis. La fibrosis es la formación y depósito de componentes de la matriz extracelular (ECM, *extracellular matrix*), resultando en la alteración de la arquitectura hepática y actividad normales. En NAFLD, la fibrosis es clave para la progresión de NAFL a NASH. Es un proceso que se desarrolla en el marco de varios años/ décadas, pudiendo progresar a cirrosis. Ésta se caracteriza por la alteración de la vasculatura hepática y gruesos septos fibróticos que rodean a nódulos regenerativos (126).

El proceso de fibrogénesis empieza con la transdiferenciación (más comúnmente, activación) de miofibroblastos. Estos miofibroblastos son la fuente del exceso de matriz extracelular, como colágeno tipo I y III y otras proteínas del tejido fibrótico. Factores paracrinos como TGF β , PDGF (*platelet-derived-growth factor*) y CTGF (*connective tissue growth factor*), junto con citocinas, activan las rutas de proliferación, migración, síntesis de proteínas de ECM y contractilidad que promueven la transformación de precursores mesenquimáticos en miofibroblastos fibrogénicos. Una vez activos, bucles de retroalimentación positiva perpetúan su activación (127).

1.4.2.7.1. Células estelares hepáticas

Las HSCs son las células mesenquimáticas residentes precursoras de la mayoría de los miofibroblastos. En condiciones fisiológicas normales, las HSCs quiescentes, acumuladoras de vesículas de vitamina A, residen en el espacio subendotelial entre la superficie basolateral de

los hepatocitos y la capa de células endoteliales sinusoidales (espacio de *Disse*). Esta zona de tejido conectivo es donde se produce el intercambio de biomoléculas entre la sangre portal procedente del tracto gastrointestinal y los hepatocitos, así como la comunicación entre células vía mediadores solubles. En el hígado fibrogénico, las células HSCs quiescentes se activan y las moléculas de ECM secretadas se acumulan y forman cicatrices en el espacio de *Disse* que lleva a la capilarización sinusoidal. Durante esta activación, las HSCs adquieren capacidad proliferativa, liberan citocinas y pierden sus características vesículas de vitamina A (127). Entre los marcadores de HSCs están la proteína α SMA (*alpha-smooth muscle actin*; es habitual encontrar el uso del término ACTA2 –*actin alpha 2*- para referirse al gen que la codifica), GFAP (*glial fibrillary acidic protein*) y PDGFR β (*PDGF receptor beta*) (128). Otras células mesenquimáticas residentes e incluso fibrocitos infiltrados desde la médula ósea pueden actuar como precursoras, aunque parecen ser minoritarias y su contribución a la fibrogénesis en NASH no es conocida (129).

1.4.2.7.2. Eventos extracelulares de activación de células estelares hepáticas

La activación de las HSCs puede ser inducida por una variedad de señales desde el propio hígado inflamado/dañado o por factores extrahepáticos. A nivel celular, las señales desencadenantes proceden mayoritariamente de hepatocitos, otras HSCs y células inflamatorias.

Los hepatocitos, como hemos explicado previamente, son las dianas de los agentes que producen daño hepático en NASH. Consecuencia de ello, la muerte celular de los hepatocitos liberará ROS, citocinas y cuerpos apoptóticos, entre otros, que estimularán las vías de activación de las HSCs. Así, la inhibición farmacológica de las enzimas generadoras de ROS como NOX1 (*NADPH oxidase 1*) reduce los depósitos de ECM en modelos fibróticos de ratón, algo similar a lo observado con los inhibidores de la apoptosis (130, 131).

Los macrófagos ejercen acciones profibróticas, aunque la existencia de subgrupos heterogéneos hace difícil la generalización. Las células *Kupffer* amplifican las señales de daño hepático de los hepatocitos, secretando factores como CCL2 que reclutan macrófagos no residentes. En etapas de NASH más avanzadas, parece que la actividad de estos últimos es la dominante, eliminando los crecientes restos celulares y cuerpos apoptóticos y produciendo en consecuencia gran cantidad de ROS y secretando factores como TGF β y PDGF (132).

Por último, señales extrahepáticas pueden contribuir a la activación de HSCs. Es especialmente interesante el caso de la disbiosis intestinal. Dietas como la occidental inducen la aparición de especies bacterianas que aceleran la activación de HSCs en modelos de fibrosis en ratón. No sólo eso, sino que el trasplante de microbioma profibrogénico en ratones alimentados con dieta estándar agrava la fibrosis inducida por tetracloruro de carbono y ligadura del conducto biliar (BDL, *bile duct ligation*) (133).

Una vez estos mecanismos de iniciación de la fibrosis han activado las HSCs, estas depositan progresivamente proteínas de ECM en el espacio de *Disse*, aumentando la densidad y rigidez de la ECM. Estos cambios en las propiedades físicas de la ECM activan mecánicamente las HSCs (134). La expansión de ECM también facilita la retención de factores activadores de HSCs (135).

1.4.2.7.3. Alteraciones moleculares en las células estelares hepáticas activadas

Las HSCs activadas perpetúan su activación a través de diversas vías de señalización. Las más estudiadas son:

- TGF β . Las HSCs activadas secretan TGF β , así como los macrófagos, plaquetas y colangiocitos. TGF β se une y activa los receptores TGF β R1, TGF β R2 y TGF β R3, desencadenando una cascada de señalización que activan a proteínas de la familia SMAD y regulando la expresión génica de factores de la ECM. La ruta de señalización de TGF β está altamente regulada a varios niveles: a nivel de ligando, con enzimas que impiden su unión a LAP (*latency associated protein*) y enzimas que degradan la ECM como MMPs (*matrix metalloproteinases*); a nivel de receptor, la internalización del receptor mediada por clatrina permite la propagación de la señal, pero si es mediada por caveolinas, los receptores serán ubiquinizados y degradados; y a nivel transcripcional, uniéndose a los complejos SMAD o a sus dianas transcripcionales (136-138).
- PDGF. Esta citocina proinflamatoria producida por plaquetas y macrófagos activa vía de las MAPKs (*extracellular signal-regulated kinases*) (139). La expresión de su receptor PDGFR β aumenta durante la iniciación de la activación de HSCs y media sus efectos proliferativos (es el mitógeno más potente conocido de HSCs) y de activación, además es un potente quimiotáctico y angiogénico (140).
- CTGF. Juega un papel profibrótico actuando directamente o como cofactor de TGF β . De hecho, el silenciamiento de CTGF suprime la fibrogenesis inducida por tetracloruro de carbono (141).
- Receptores cannabinoides. Multitud de estudios recogen la desregulación del sistema endocannabinoide en condiciones de fibrosis hepática. De hecho, la activación del receptor CB1 y la inactivación del receptor CB2 (*cannabinoid receptor 2*) promueven un fenotipo profibrótico en HSCs, como se ha observado *in vivo* e *in vitro* (78). Este apartado será desarrollando más adelante.
- FXRs. La señalización de FXR, activada por ácidos biliares, reduce el daño celular en hepatocitos, mejorando indirectamente la fibrosis en pacientes con NASH (142). Sin embargo, se sabe mucho menos sobre sus efectos directos sobre HSCs. Su nivel de expresión y su respuesta a ácidos biliares es baja, pero restringe la contractilidad de HSCs *in vitro* y la hipertensión portal *in vivo* (143).
- PPARs. PPAR γ ha sido el más estudiado como potencial diana antifibrótica. Por ejemplo, se ha visto que su aumento en HSCs activadas suprime los efectos angiogénicos mediados por PDGFR β y los fibróticos mediados por TGF β *in vitro* (144, 145).
- CCR5 (*C-C chemokine receptor type 5*). La señalización mediada por CCR5 promueve la proliferación y migración de HSCs. La deficiencia en CCR5 o su inhibición farmacológica protegen frente a la fibrosis en modelos de ratón (108).
- Otros factores como el patrón de metilación y desregulación de los ARN no codificantes han sido involucrados en la activación de HSCs (127).

1.4.2.7.4. Cambios metabólicos durante la activación de célula estelares hepáticas

La activación de las HSCs implica la transición de un estado metabólico quiescente a un fenotipo proliferativo, fibrótico y migratorio. Las señales y rutas metabólicas recién explicadas tienen un profundo impacto en el metabolismo de las células, adaptándose a la demanda energética creciente.

Las HSCs activadas *in vitro* expresan mayores niveles de proteínas glucolíticas, incluyendo HK2 (*hexokinase 2*), PKM2 (*pyruvate kinase M2*) y GLUT1 (*glucose transporter 1*), y menores niveles de enzimas gluconeogénicas como PCK1 (*phosphoenolpyruvate carboxykinase 1*) y FBP1 (*fructose biphosphatase 1*) (146). También la glutaminólisis parece jugar un papel importante en el proceso de activación. HSCs activadas *in vitro* e *in vivo* aumentaron el consumo de glutamina, los niveles de expresión de GLS (*glutaminase*) y GLUD1 (*glutamate dehydrogenase*), y su inhibición reduce la proliferación y producción de colágeno (147). El α -cetogluturato resultante de la glutaminólisis pasará a integrarse como intermediario en ciclo de *Krebs*. Otro de estos intermediarios, el succinato, que parece tener un efecto inductor de activación de HSCs (148).

El metabolismo lipídico de las HSCs activadas también sufre una transformación. Las células HSCs quiescentes presentan grandes vesículas lipídicas distribuidas en torno al núcleo. Estas vesículas constan principalmente de vitamina A. Se ha descrito que, durante la activación, las gotas lipídicas de vitamina A desaparecen, dado lugar transitoriamente a otras más dispersas y pequeñas, abundantes en triglicéridos ricos en ácidos grasos insaturados y situadas en la periferia del citoplasma celular, para luego desaparecer (149). En HSCs de rata, la acción de DGAT contribuye a formar este segundo tipo de vesículas, y ATGL a degradarlas, aunque la inhibición de ambas tiene efectos modestos en activación de HSCs y los resultados no son reproducibles en HSCs activadas de ratón (150). También se piensa que la activación de la DNL promueve la quiescencia de las HSCs. Esta idea se sustenta en dos observaciones. Por un lado, la expresión de SREPB1c está reducida en HSCs activadas (151, 152). Por otro, la exposición de HSCs a cócteles adipogénicos induce quiescencia y aumento de incorporación de acetato a palmitato en HSCs de rata (152). Contrariamente, una investigación reciente mostró que los niveles de ARNm y proteína de ACC α , así como la cantidad de lípidos totales, están aumentadas en la línea de células estelares humanas LX-2 activadas (153). La ausencia de mediciones directas de la actividad de DNL y de ensayos más profundos de ganancia y pérdida de función de genes de enzimas clave en esta ruta metabólica, así como su validación *in vivo*, restringe la interpretación de los escasos datos de los que se dispone actualmente.

Con respecto a la oxidación de ácidos grasos, ensayos funcionales muestran una mayor tasa de oxidación de ácido palmítico tras activación en células LX-2 (153). La expresión de ACC β está totalmente silenciada tras la activación de HSCs *in vitro* (153). El tratamiento con etomoxir, inhibidor de CPT1 (y por tanto, de β -oxidación), disminuye la activación de HSCs (154). Además, la autofagia, que puede proporcionar ácidos grasos para la β -oxidación, se ha visto aumentada en HSCs en fibrosis. La inhibición de la autofagia suprime activación y proliferación de HSCs de ratón *in vitro* y su silenciamiento HSC-específico reduce la fibrosis inducida por tetracloruro de carbono *in vivo* (154). El estrés del ER podría contribuir a la activación de HSCs, induciendo la autofagia a través de IRE1 α , e induciendo la activación de la ruta de señalización de TGF β a través de PERK (155, 156).

La proteína AMPK también ha sido estudiada en relación a la activación de HSCs. Siendo la proteína más importante que actúa como sensor del estado energético y coordinadora del metabolismo celular, es razonable pensar que esté involucrada en este proceso de reajuste metabólico. Así, la activación farmacológica de AMPK reduce la producción de ECM y TGF β , proliferación y migración en LX-2, y reduce la fibrosis en los modelos de MCD y tetracloruro de carbono en ratón (157, 158). En otro estudio donde se evaluaba el efecto de la curcumina en la activación de HSCs de rata *in vitro*, ésta incrementó los niveles de fosforilación de AMPK y disminuyó los niveles de α SMA de forma dosis dependiente (151). Contrariamente, otro grupo describe que la activación *in vitro* de HSCs de ratón conduce a mayor actividad de AMPK,

mayores niveles de proteína pAMPK y mayores niveles de mRNA AMPK γ 3. Los mismos autores no encontraron alteraciones en la activación *in vitro* de HSCs procedentes de ratones sin AMPK α 1 (159). Por otro lado, la activación farmacológica y la sobreexpresión plasmídica de AMPK en LX-2 reducen la expresión de ECM inducida por TGF β . Mecánicamente, encontraron que AMPK interacciona físicamente con el coactivador transcripcional p300, impidiendo su unión con Smad3 y aumentando su degradación proteosomal (160). Un último estudio publicó que AICAR (activador farmacológico de AMPK) inhibe la activación de HSCs inducida por TGF β pero, sorprendentemente, este efecto es bloqueado por rapamicina (activador farmacológico de autofagia). Los autores concluyen que el rol antifibrótico de AMPK se debe a su control inhibitorio sobre la autofagia, a pesar de que AMPK es ampliamente conocido por su papel activador sobre ese proceso (161). En conjunto, parece que la activación de AMPK podría jugar un papel beneficioso reduciendo la activación de HSCs, aunque el conocimiento actual acerca de las señales que regulan y los mecanismos implicados es limitado.

1.5. TRATAMIENTO DE NAFLD

Se sabe que cambios en el estilo de vida, independientemente del mecanismo subyacente, tienen efectos beneficiosos en NAFL (162). En el caso de NASH, uno de los estudios más completos permitió hacer un seguimiento de 293 pacientes voluntarios participantes de un programa destinado a mejorar cambios en el estilo de vida durante un año, con análisis histológico de biopsias hepáticas previo y posterior. Todos los pacientes que perdieron más del 10% del peso corporal presentaron reducciones de la puntuación NAS (de media, redujeron más de 4 puntos de NAS), el 90% resolvieron NASH y el 45% presentaron regresión de fibrosis. Pérdidas más moderadas de peso (5-10%) también tuvieron efectos beneficiosos más modestos en NASH (163). Sin embargo, dos factores invitan a ser cautos ante estos resultados tan prometedores. En primer lugar, la mayoría de estos pacientes presentaban inicialmente fibrosis escasa o nula, indicativa de estadios menos severos de NASH. En segundo lugar, un 70% de los pacientes no consiguió alcanzar el 5% de pérdida de peso a lo largo de doce meses, proporcionando una idea de lo difícil que es alcanzarlo. Tampoco se ha investigado el efecto a largo plazo de la pérdida de peso mantenida en la severidad de NASH.

La cirugía bariátrica, aplicable a casos de obesidad severa y mórbida, también tiene un efecto beneficioso en NAFLD. En un estudio donde se hizo seguimiento de histología hepática de 381 pacientes sometidos a cirugía bariátrica con NAFLD (la mayoría de ellos, con NAFL) durante 5 años, la puntuación NAS pasó de 1.97 a 1.00. Considerando solamente los pacientes con NASH, la puntuación NAS se redujo de 3.71 a 1.92. En ambos casos, se encontraron reducciones en esteatosis y *ballooning*, pero sin cambios para inflamación ni fibrosis (164). La morbilidad y mortalidad asociadas a la cirugía bariátrica, especialmente en cirrosis, hace que no sea una opción a considerar en parte de los pacientes con NASH (165).

El trasplante hepático también es un procedimiento aceptado en pacientes con NASH con fallo hepático y/o HCC (1, 166). De hecho, ha pasado de representar el 1,2% de los pacientes sometidos a trasplante hepático en Europa en 2002 al 8,4% en 2016, y se estima que será la primera causa de trasplante hepático en Estados Unidos y Europa al final de esta década (167). La tasa de supervivencia tras 5 años y el rechazo son similares en pacientes con y sin NASH, y la probabilidad de recurrencia menor que para otras etiologías (167, 168).

Con respecto al tratamiento farmacológico, en las guías actuales de práctica clínica, las organizaciones europeas EASL (*European Association for the Study of the Liver*)-EASD (*European Association for the Study of Diabetes*)-EASO (*European Association for the Study*

of Obesity) advierten: “Actualmente, ningún fármaco ha sido testado en ensayos clínicos fase 3 ni está aprobado por las agencias reguladoras para el tratamiento de NASH. Por tanto, ninguna terapia específica puede ser firmemente recomendada y cualquier tratamiento farmacológico será usado fuera de indicación” (166). Además, la organización americana AASLD (*American Association for the Study of Liver Diseases*) recoge en la última guía de práctica clínica que “la farmacoterapia debe ser reservada para aquellos pacientes con NASH que presenten estadio 2 de fibrosis o superior” (1, 166). La ausencia de fármacos aprobados para NASH ha potenciado la búsqueda de nuevas dianas y el desarrollo de nuevos compuestos.

Los primeros fármacos testados clínicamente frente a NASH tenían como diana el estrés oxidativo y la resistencia a insulina, específicamente la vitamina E y los agonistas de PPAR γ *pioglitazona* y *rosiglitazona*. Este último, que aumentaba la sensibilidad a insulina pero no mejoraba el *ballooning*, fue descartado por problemas de toxicidad (169). Ensayos clínicos fase 3 con vitamina E y *pioglitazona* y *metformina* (llamados PIVENS y TONIC y llevados a cabo por la NASH CRN) demostraron que vitamina E y *pioglitazona* eran capaces de reducir 2 puntos la puntuación NAS (al menos 1 de ellos por *ballooning* y sin agravamiento de fibrosis), mientras que *metformina* fue incapaz de mejorar NASH (170, 171). El uso de vitamina E y/o *pioglitazona* frente a NASH son los más recomendados para uso fuera de indicación en las últimas guías de práctica clínica de las agencias AASLD americana y EASL-EASD-EASO europeas (1, 166).

Más tarde, el descubrimiento de que el receptor FXR controlaba el metabolismo lipídico hepático y la sensibilidad a insulina llevó al NASH CRN a desarrollar el prometedor ensayo clínico FLINT para el uso de su agonista *ácido obeticolico* (fase 2b). Demostró el cumplimiento del objetivo principal (reducir 2 puntos la puntuación NAS sin agravar la fibrosis) en un 45% (*versus* 21% en grupo placebo) y la reversión farmacológica de fibrosis en un 35% de los casos (*versus* 19% en grupo placebo) tras 18 meses (142). El subsiguiente ensayo clínico fase 3 REGENERATE, para pacientes con NASH y fibrosis estadio 2-3, se prevé que dure unos 7 años (172).

Otro de los fármacos más prometedores es el del doble agonista de PPAR α – PPAR δ *elafibranor*. Con la activación de estas rutas de señalización se pretende combinar la oxidación de ácidos grasos inducida por PPAR α y el efecto antiinflamatorio de PPAR δ . El ensayo clínico fase 2b con *elafibranor* consiguió la resolución de NASH (definida como *ballooning* NAS = 0 acompañada de inflamación NAS = 0-1 sin progresión de inflamación) en un 19% de los pacientes, frente a un 12% del grupo placebo, mejorando especialmente aquéllos pacientes con NAS > 4, en 12 meses (173). El ensayo clínico fase 3 RESOLVE-IT, para pacientes con NASH y fibrosis estadio 1-3, está ya en marcha y se prevé que en termine en 2021.

GS-0976, también conocido como *firsocostat* es uno de los inhibidores de ACC α y ACC β sometidos a estudio en ensayos clínicos. Su seguridad y eficacia fueron testados en fase clínica 2 en 2017 (174). La diagnosis fue establecida mediante MRI (esteatosis) y MRE (fibrosis), o bien mediante histología. Tras 12 semanas de tratamiento diario de 20 mg de GS-0976, un 48% de los pacientes presentó mejoras de más del 30% en esteatosis medida por MRI, frente a un 15% del grupo que recibió placebo. La fibrosis experimentó una tendencia (no significativa) a reducirse en pacientes tratados con GS-0976, medida con MRE, aunque sí sufrió una reducción significativa del marcador sérico de fibrosis TIMP1 (*tissue inhibitor of metalloproteinases 1*). El fármaco GS-0976 superó la evaluación de seguridad, aunque fueron encontrados incrementos del 11% en niveles de triglicéridos en suero (67).

Otro fármaco que tiene ACC por diana es PF-05221304, un inhibidor de ACC α y ACC β específico de hígado, y ha sido recientemente evaluado en ensayos clínicos fase 2a. Su objetivo primario era la reducción de estatois hepática para pacientes con NAFLD. A la espera de un análisis pormenorizado de los datos, se conoce que los pacientes tratados diariamente con 50 mg de PF-05221304 durante 18 semanas redujo la esteatosis en un 65%, frente al 7% del grupo que recibió el placebo, y sin presentar más efectos adversos que éste (175).

Los últimos fármacos en acceder a fase clínica 3 han sido el *cenicriviroc* y el *selonsertib*. El primero de ellos, un antagonista dual de CCR2 y CCR5, todavía reclutando pacientes con NASH y estadios de fibrosis 2-3 (AURORA) (176). El *selonsertib* (STELLAR 3 y 4), un inhibidor de ASK-1 para pacientes con NASH estadios 3 y 4, todavía no ha sido capaz de mostrar efectos antifibróticos tras el primer año de estudio (177).

A raíz de los prometedores resultados obtenidos, *selonsertib*, GS-0976 y el agonista de FXR *cilofexor* fueron combinados en una potencial terapia que está actualmente siendo evaluada en ensayos clínicos fase 2. El objetivo primario es la mejora de fibrosis sin agravar NASH en pacientes NASH con estadios de fibrosis 3-4 (21, 178).

Actualmente, más de 200 ensayos clínicos para NAFLD permanecen activos (179). Esto refleja la creciente necesidad de fármacos impulsada por los incrementos de las tasas de prevalencia e incidencia de las etapas más avanzadas de NAFLD. Consecuentemente, los ensayos clínicos están sufriendo cambios. La selección de pacientes ha cambiado, centrándose en aquéllos con NASH y fibrosis intermedia o avanzada. También es diferente el indicador primario de eficacia, donde la mejora de fibrosis ha sustituido a la reducción de NAS. Las herramientas de evaluación de la condición hepática, como se explicaba al comienzo de este capítulo, comienzan a ser no invasivas en la fase 2A de ensayos clínicos, y se espera que en esta década se acaben implantando en fase 2B y 3, en detrimento de las histologías basadas en biopsias (8, 21). Por último, se ha establecido una pauta clara de lo que significa “beneficio clínico significativo”, criterio que deben cumplir los tratamientos para ser aprobados por las instituciones reguladoras. Ante la dificultad de demostrar el impacto en la supervivencia de pacientes con NASH precirróticos, a día de hoy se procura que los fármacos demuestren mejora histológica a corto plazo, siendo aprobados condicionalmente por la europea EMA (*European Medicines Agency*) o la americana FDA (*Food and Drug Administration*) (la llamada ruta de la subparte H) a la espera de demostraciones de supervivencia que necesitan incluso décadas para ser adecuadamente establecidos (180).

1.6. MODELOS PRECLÍNICOS DE NAFLD

Una gran cantidad de compuestos están siendo actualmente testados clínicamente para NASH. Sin embargo, ninguno de los ensayos clínicos llevados a cabo ha demostrado una mejora dramática del estado de la enfermedad y una gran parte no han sido capaces de mostrar mejora. Una forma de aumentar la probabilidad de éxito es desarrollar modelos preclínicos robustos de la enfermedad que sean trasladables a la patología humana. Tales modelos permiten conocer en profundidad la patogénesis de la enfermedad, identificar potenciales dianas de tratamiento y evaluar el potencial terapéutico de fármacos antes de estudios con pacientes humanos.

1.6.1. Modelos de NAFLD *in vivo*

Aunque muchos modelos animales de NAFLD pueden provocar acumulación de lípidos en el hígado y daño hepático, no todos ellos recapitulan la histología, progresión, bases moleculares del NAFLD en humanos. Idealmente, deberían ser inducibles por dieta con una composición de macronutrientes similar a la de la mayoría de humanos con NAFLD. También debería exhibir aumento de adiposidad, ganancia de peso corporal, resistencia a insulina, dislipemia y desarrollo de todo el espectro de NAFLD. Las rutas metabólicas conocidas asociadas a NAFLD deberían ser activadas, y el perfil transcriptómico debería ser acorde al de pacientes humanos. Desafortunadamente, muchos modelos animales de NAFLD actuales no cumplen uno o varios de estos criterios. Los modelos *in vivo* (habitualmente ratones, aunque hay muchos otros) pueden ser agrupados según sean inducidos por dieta o genéticos.

1.6.1.1. Modelos de NAFLD inducido por dieta

La composición de la dieta, la abundancia de nutrientes, el contenido energético y el patrón de alimentación son parámetros que pueden contribuir al desarrollo de NAFLD. Los principales modelos recurren a alto contenido en grasa, glucosa, fructosa, sacarosa, colesterol, deficiencia en colina y/o metionina, etc, individualmente o combinados, en ratones *wild type* o en combinación con los modelos genéticos.

En el modelo clásico de HFD, los animales desarrollan obesidad, resistencia a insulina e inflamación sistémica, recapitulando el contexto metabólico del NAFLD como comorbilidad del síndrome metabólico. El contenido en grasa puede ser muy variable y esto determinará la aparición de NAFL y más específicamente NASH. Sin embargo, la menor severidad de NASH en comparación con humanos (difícilmente manifiestan fibrosis/cirrosis) supone una limitación importante (181).

La dieta deficiente en metionina y colina o MCD (*methionine and choline deficient*) es una de las más ampliamente utilizadas en NASH porque produce un fenotipo más severo de en un menor período de tiempo. Los animales alimentados con esta dieta desarrollan esteatosis macrovesicular, desarrollando tras dos semanas inflamación y a continuación fibrosis (182). La secreción de VLDL está altamente inhibida, la captación hepática de lípidos aumentada (manifiesta hipotrigliceridemia y menores niveles de ácidos grasos en sangre) y no presenta resistencia a insulina (183). Aunque a nivel histológico replica el fenotipo de NASH en pacientes humanos, la pérdida de peso (asociada al daño hepático severo y a la pérdida severa de adiposidad) supone una gran disparidad a nivel metabólico y molecular (184).

La dieta deficiente en colina permite desarrollar NASH con fibrosis (185). Similar a la MCD, produce acumulación de lípidos, inflamación y daño hepático (184). Sin embargo, estos animales no ganan peso (184). Una estrategia que pretende conseguir la severidad de NASH que aporta la deficiencia en colina con el ambiente de desregulación metabólica proporcionado por la dieta alta en grasa es la combinación de ambas, conocida como CD-HFD (*choline deficient and high fat diet*). Estos ratones desarrollan NASH con fibrosis en 3-4 meses y a más largo plazo cirrosis e incluso hepatocarcinoma (186).

La dieta con alto contenido en fructosa mimetiza en parte la presencia cada vez mayor de alimentos ricos en fructosa en la dieta occidental. El alto contenido en fructosa no genera NASH, pero sí lo hace al combinarse con un alto contenido en grasa. La dieta alta en grasa y

fructosa genera NASH y obesidad, agravando la inflamación hepática, el estrés oxidativo y desarrollando fibrosis, en comparación con la dieta alta en grasa (187).

La dieta alta en colesterol también es cada vez más habitual en dietas occidentales. Estos animales desarrollan NAFL y resistencia a insulina, pero incluso tras 6 meses no es capaz de generar NASH en ratones (188).

Por último, existen compuestos que generan daño hepático y se utilizan con el objetivo de modelizar alguna característica de NAFLD o acelerar su progresión. Es el caso de la estreptozotocina y el tetracloruro de carbono. La administración de estreptozotocina (200 ug) en neonatos para neutralizar los islotes pancreáticos, en combinación con dieta alta en grasa, genera NASH con fibrosis en 12 semanas y acaba desarrollando hepatocarcinoma (189). Sin embargo, no recapitula el estado de resistencia a insulina sistémico visto en NASH humano (190). El tetracloruro de carbono es ampliamente utilizado para la generación de fibrosis hepática. Genera activación de HSCs y fibrosis en zona 3 (la parte más próxima a la vena central), de modo similar a lo que sucede en NASH humano, en 4-6 semanas, dependiendo de la dosis y frecuencia de administración (191). Además, existen protocolos donde el uso de dosis más bajas de tetracloruro de carbono combinado con dietas como la que mimetiza la occidental actual (alta en grasa, alta en fructosa y alta en colesterol) genera modelos de NASH con fibrosis a las 12 semanas, así como cirrosis y hepatocarcinoma tras 24 semanas (192).

1.6.2. Modelos de NAFLD en células humanas *in vitro*

Los modelos *in vitro* más empleados son los cultivos de células en dos dimensiones. Las células más atractivas desde el punto de vista de homología funcional con los pacientes con NAFLD son los cultivos primarios humanos de hepatocitos, macrófagos y HSCs, aunque su duración es muy limitada y la variabilidad entre pacientes es alta. Alternativas a ellas, las líneas de humanas inmortalizadas y tumorales son ampliamente utilizadas. En el caso de hepatocitos, las THLE2 son ejemplo de las primeras; y las HepG2 o las Huh7 son ejemplos de las segundas (193). En un mayor nivel de complejidad están los cocultivos de hepatocitos con macrófagos y HSCs (ej: LX-2), y los cultivos en tres dimensiones, por ejemplo mediante el uso de hidrogeles y esferoides, aunque ambos presentan limitaciones (194, 195). Por un lado, existen complicaciones derivadas de las condiciones óptimas de cultivo de más de un tipo celular; por otro, el desarrollo de modelos en tres dimensiones requiere de gran esfuerzo y tiempo y apenas ha sido validado para su uso en NAFLD. Con relación al estímulo desencadenante de NAFLD, habitualmente se utilizan tratamientos con ácidos grasos, especialmente oleico y palmítico, aunque también ejemplos de administraciones de fructosa e insulina, factores proinflamatorios y profibróticos, medio deficiente en metionina y colina, medios condicionados, o fármacos (195-200).

2. Sistema endocannabinoide

2.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL SISTEMA ENDOCANNABINOIDE

En 1964, el THC (*tetrahydrocannabinol*), principal componente psicoactivo de *Cannabis sativa*, fue aislado por primera vez. Este descubrimiento fomentó la búsqueda de los receptores,

que fueron identificados como CB1 y CB2. A estos receptores se les conoce como receptores cannabinoides clásicos y son del tipo GPCR (*G protein-coupled receptor*). El siguiente paso fue el descubrimiento de los ligandos endógenos de estos receptores (llamados endocannabinoides) AEA (*N-arachidonylethanolamine* o anandamida) y 2-AG (*2-arachidonoylglycerol*), ambos derivados del ácido araquidónico (20:4), precursor de un gran número de moléculas endógenas (prostaglandinas, tromboxanos...). Con el tiempo, fueron descubiertos muchos otros endocannabinoides, como PEA (*N-palmitoylethanolamine*) y OEA (*N-oleoylethanolamine*). También muchos otros receptores sensibles a cannabinoides y endocannabinoides, como GPR55 (*GPCR 55*) y GPR119 (*GPCR 119*) del tipo GPCR, pero también canales iónicos como el TRPV1 y TRPV4 (*transient receptor potential cation channel subfamily vanilloid member 1/4*) y dianas nucleares como PPAR α y PPAR γ (201). Sin embargo, la ausencia de ligandos específicos para estos receptores en sus complejas rutas de señalización ha restringido la completa elucidación de su relación con el sistema endocannabinoide (202).

Las afinidades y cinéticas de interacción entre los endocannabinoides y sus receptores es compleja. Por ejemplo, AEA es un agonista parcial de alta afinidad de CB1, y de baja afinidad de CB2, mientras que 2-AG es un agonista completo de ambos con moderada-baja afinidad. A su vez, AEA puede activar TRPV1 y PPAR γ , y 2-AG también se ha visto que interacciona con otros receptores no clásicos (203). Para aumentar todavía más la complejidad, se ha descubierto que otros miembros de la familia de AEA y 2-AG, llamados respectivamente NAEs (*N-acylethanolamines*) y 2-AcGs (*2-acylglycerols*) pueden actuar también sobre los receptores cannabinoides clásicos y no clásicos, modulando su estado de activación/inactivación (204). Por último, numerosos estudios muestran como los receptores GPCRs, receptores cannabinoides incluidos, pueden existir como homodímeros, heterodímeros o complejos de mayor orden, afectando a la unión del ligando y la señalización (205, 206).

Además de endocannabinoides y receptores, el sistema endocannabinoide abarca numerosas enzimas que los metabolizan. La vía canónica para la síntesis de AEA a partir de fosfolípidos de membrana incluye a NAT (*N-acyltransferase*) y NAPE-PLD (*N-acylphosphatidylethanolamine-specific phospholipase D*), mientras que la de 2-AG requiere de DAGL (*diacylglycerol lipase*). Las principales vías de degradación están mediadas por FAAH (*fatty acid amide hydrolase*) para AEA y por MAGL (*monoacylglycerol lipase*) para 2-AG. La síntesis y degradación de estos endocannabinoides es rápida e inducible por diversos estímulos, como la liberación intracelular de calcio, provocando que los endocannabinoides tengan frecuentemente tiempos de vida cortos y acciones rápidas (203).

2.2. DISTRIBUCIÓN DE LOS RECEPTORES CANNABINOIDES

El patrón de distribución de los receptores cannabinoides clásicos es el más estudiado. CB1 fue inicialmente descubierto en el cerebro. Mayoritariamente en la membrana presináptica de áreas como el hipocampo, donde juega un papel en la señalización retrógrada de la transmisión sináptica, CB1 también se expresa en niveles más bajos en hipotálamo, además del sistema nervioso periférico y tejidos periféricos. Es abundante su expresión en el tracto gastrointestinal, y en menor medida en el hígado, tejido adiposo, músculo esquelético, piel, sistema reproductor y otros (203). Como muchos otros GPCR, su localización primaria es la membrana celular, aunque se han observado también intracelularmente asociados a endosomas, lisosomas y mitocondrias (207). CB2, por su parte, se expresa predominantemente en macrófagos y otras células del sistema inmune, y en menor medida en tejidos periféricos (tracto gastrointestinal, hígado, tejido adiposo, etc) y el cerebro (203). Otros receptores cannabinoides, menos

estudiados, parecen presentar una amplia distribución en el organismo. Por ejemplo, TRPV1 se expresa a lo largo del sistema nervioso central y periférico, mientras que GPR55 presenta una expresión más localizada en áreas del cerebro como el hipotálamo, así como en tejidos metabólicamente activos (208).

2.3. RUTAS DE SEÑALIZACIÓN DE LOS RECEPTORES CANNABINOIDES

Una parte importante del conocimiento que existe acerca de las vías de señalización mediadas por los receptores cannabinoides es resultado del estudio de los receptores clásicos en diferentes poblaciones neuronales y líneas celulares tumorales. Se sabe que CB1 y CB2 están acoplados a la proteína $G_{i/o}$, su activación bloquea la adenilato ciclasa y la formación de AMPc. Además, CB1 puede modular la actividad de diferentes tipos de canales iónicos y la activación de la ruta de señalización de PI3K (*phosphatidylinositol-3-kinase*)/AKT y la ruta de las MAPKs, incluyendo ERK1/2 (*extracellular signal-regulated kinase 1/2*), JNK y p38, involucradas en control de ciclo celular, proliferación y muerte celular (203). Sin embargo, la activación de estas rutas es altamente variable dependiendo del tipo celular y el ligando (209). Bajo ciertas circunstancias, CB1 puede cambiar su acoplamiento de $G_{i/o}$ a G_s o G_q . Por último, CB1 está sujeto a desensitización e internalización mediadas por fosforilación de GRKs (*GPCR kinases*) y β -arrestina. Esta fosforilación e internalización es inducida por la unión continuada del ligando (210).

2.4. FUNCIONES FISIOLÓGICAS Y PATOLÓGICAS DE LOS RECEPTORES CANNABINOIDES CLÁSICOS

Dada la amplia distribución de los receptores cannabinoides en el organismo es razonable pensar en un amplio espectro de funciones. CB1 está relacionado con actividades del sistema nervioso central como aprendizaje y memoria, pero su desregulación contribuye al desarrollo de desórdenes como esquizofrenia, *Alzheimer*, epilepsia, ansiedad y depresión, poniendo de relieve su función neuroprotectora (211). En el sistema nervioso periférico su función más conocida es la nocicepción, aunque también juega un papel importante en el sistema reproductivo, regula la motilidad gástrica y está involucrado en desórdenes del músculo esquelético. (203). CB2 fue primero conocido por sus funciones en los tejidos periféricos. Así, ejerce una acción antiinflamatoria ante lesiones cardiovasculares como isquemia, su activación reduce la motilidad e inflamación en el intestino y promueve la remodelación ósea actuando en osteoblastos y osteoclastos (201). A nivel cerebral, la expresión de CB2 es inducible y protege frente a isquemia cerebral, adicción a drogas, *Alzheimer* y dolor crónico. Ensayos de manipulación genética y farmacológica han revelado acciones protectoras de CB2 frente a depresión y ansiedad, también promoviendo la consolidación de la memoria frente a estímulos adversos (212). De forma interesante, CB1 y CB2 también se han visto implicados en el control de la homeostasis energética en el cerebro y los tejidos periféricos.

2.4.1. Sistema endocannabinoide y homeostasis energética

2.4.1.1. Regulación central del balance energético

Los cannabinoides son ampliamente conocidos por sus efectos estimulantes del apetito, y del consumo de alimentos altamente palatables (213, 214). La activación de CB1 estimula la

ingesta de forma dosis dependiente y a través de varios núcleos hipotalámicos (215, 216). En el sistema mesolímbico, los endocannabinoides estimulan a través de CB1 los sistemas de recompensa y motivación de búsqueda de alimentos altamente palatables, es decir, la ingesta hedónica (217). La activación de CB1 en el bulbo olfatorio promueve la búsqueda de comida inducida por cannabinoides (218). La sobreexpresión de CB2 en el cerebro reduce la ingesta de comida y el peso corporal, pero sus mecanismos permanecen ampliamente desconocidos (219). Además de regular la ingesta, el sistema endocannabinoide regula el gasto energético del organismo a través de mecanismos centrales y periféricos. En el cerebro anterior, el sistema endocannabinoide regula el tono simpático del tejido adiposo pardo, especializado en la termogénesis y disipación de energía (220). En el hipotálamo, CB1 controla el tono simpático del tejido adiposo blanco, especializado en la reserva de grasa (221).

2.4.1.2. Tejidos periféricos

El sistema endocannabinoide también participa en la homeostasis energética en los tejidos periféricos. Entre los más destacados se encuentran el tejido adiposo, tracto gastrointestinal, páncreas, el sistema inmune, músculo esquelético e hígado.

CB1 y en menor medida CB2 se expresan en el tejido adiposo blanco (222). La activación de CB1 en adipocitos promueve adipogénesis y lipogénesis e inhibe la biogénesis mitocondrial, y su inhibición en tejido adiposo blanco protege frente a obesidad inducida por dieta alta en grasa en ratones (223-225). Además, AEA puede actuar sobre PPAR γ promoviendo la diferenciación adipocitaria y acumulación de lípidos (226). De hecho, una de las características de la obesidad es la desregulación de los niveles de endocannabinoides y CB1 en el tejido adiposo blanco (227, 228).

La actividad del tracto gastrointestinal también está regulada por el sistema endocannabinoide. CB1 y CB2 en los nervios entéricos reducen la motilidad gástrica (229, 230). Además, la producción de endocannabinoides por los enterocitos estimulada por la ingesta de lípidos regula la sensación de saciedad y la ingesta (231).

En páncreas, la activación de CB1 estimula la secreción de insulina y glucagón, mientras que la activación de CB2 reduce la secreción de insulina dependiente de glucosa en humanos (232). Además, en páncreas de ratones diabéticos se detectaron mayores niveles de AEA y 2-AG, coincidiendo con incremento en la síntesis de endocannabinoides inducida por glucosa en las células β . Esto sugiere que el sistema cannabinoide contribuye a la hiperinsulinemia característica de diabetes tipo 2 asociada a la obesidad (233).

Las células inmunes expresan mayoritariamente CB2. A través de este receptor, 2-AG reduce el reclutamiento de diferentes tipos de células del sistema inmune (234). Además, AEA inhibe la producción de citocinas proinflamatorias en monocitos humanos, como TNF α e IL-6 (235).

En músculo esquelético, la activación de CB1 reduce la sensibilidad a insulina (236). CB1 también reduce la respiración y marcadores de biogénesis mitocondrial *in vitro* (237, 238). Estos factores podrían contribuir al aumento del gasto energético observado tras el antagonismo de CB1 (239).

Por último, en el hígado la expresión basal de los receptores cannabinoides clásicos es baja. Sin embargo, se ha visto que el sistema endocannabinoide juega un papel importante en condiciones fisiopatológicas, como se mostrará a continuación.

2.5. SISTEMA ENDOCANNABINOIDE Y METABOLISMO HEPÁTICO EN NAFLD

2.5.1. Esteatosis

Un gran número de estudios han mostrado la relevancia de la señalización del sistema endocannabinoide en NAFLD. Los niveles de 2-AG y ácido araquidónico en suero están aumentados en pacientes con NAFLD con sobrepeso/obesidad, independientemente del índice de masa corporal (240). Los niveles de 2-AG en sangre de la vena hepática se correlacionan con el grado de esteatosis hepática en pacientes obesos (241). Además, los niveles de proteína CB1 en hígado están aumentados en pacientes obesos con NASH (242). AEA, OEA y CB1 hepáticos se han encontrado aumentados en diferentes modelos de ratón con NAFLD inducido por dieta (243-245). El ratón *knockout* para CB1 está protegido frente a obesidad y NAFL inducidos por dieta, a pesar de que su ingesta de comida es similar (246). El ratón deficiente en CB1 específicamente en los hepatocitos desarrolla obesidad en un grado similar a los ratones *wild type*, pero presenta mejoras en esteatosis, tolerancia a glucosa y sensibilidad a insulina, cuando se alimenta con dieta alta en grasa (244). En la misma línea, el tratamiento con el inhibidor farmacológico de CB1 reduce NAFL inducido por dieta (247). De modo similar, el antagonista periférico de CB1, AM6545, reduce la esteatosis hepática en los modelos de ratón de obesidad inducida por dieta y el ob/ob (248). Mecánicamente, CB1 controla la acumulación de lípidos en el hígado a través de la DNL y la β -oxidación.

CB1 activa la DNL en el hígado. La activación farmacológica de CB1 aumenta los niveles de expresión de los marcadores de lipogénesis SREBP1c, ACC α y FAS, así como la tasa de síntesis de ácidos grasos a partir de tritio marcado *in vivo* e *in vitro*. La inhibición farmacológica o el silenciamiento génico de CB1 bloquean estos efectos (246). Contrariamente, el tratamiento con el antagonista de CB1 en ratones con NAFL inducido por dieta reduce los niveles de expresión de ACC α , ACC β y FAS (243). Ratones sin CB1 hepático presentan menor tasa de DNL (244). Por último, se ha visto que *rimonabant*, agonista inverso de CB1 utilizado como tratamiento de obesidad, inhibe SREBP1c en HepG2 (y con él las principales enzimas involucradas en la DNL) a través de una ruta que involucra a PKA/LKB1/AMPK/LXR (249).

CB1 también controla la β -oxidación hepática. Ratones sin CB1 hepático muestran niveles aumentados de proteína CPT1A, mayor actividad de CPT1 y un incremento en el gasto energético independiente de la ingesta. El bloqueo farmacológico de CB1 reduce el coeficiente respiratorio en los ratones, indicativo de un uso preferente de lípidos sobre glúcidos como sustrato energético (244).

El intercambio de ácidos grasos a través de la sangre también es controlado por CB1. El bloqueo de CB1 periférico aumenta la secreción hepática de VLDL/triglicéridos y esto contribuye a incrementar de los niveles de triglicéridos en suero de ratones (248). Otro estudio, sin embargo, mostró que el antagonismo de CB1 reduce de la secreción de ApoB e incrementa la captación de HDL *ex vivo* (243).

Estudios en los que se manipula genéticamente CB1 también muestran un papel interesante en el metabolismo de la glucosa en el hígado. Los ratones sin CB1 hepático exhiben una mayor sensibilidad a insulina y una mejor tolerancia a glucosa (244). La recuperación de la expresión hepática de CB1 genera resistencia a insulina hepática, donde el hígado es incapaz de inhibir la producción de glucosa hepática inducida por insulina y en donde se observa una alteración del aclaramiento de insulina. En consecuencia, la recuperación de la expresión de CB1 hepática

muestra peores resultados en los test de tolerancia a glucosa y de sensibilidad a insulina (242). En conjunto, diferentes investigaciones apuntan a la activación de CB1 hepático como un promotor de esteatosis en el hígado.

Por otra parte, CB2 también se ha observado desregulado en NAFL, aunque su papel en esta patología es menos conocido. Los ratones sin CB2 están protegidos frente a obesidad inducida por dieta, y presentan en el hígado niveles más bajos de triglicéridos y marcadores de inflamación (250, 251). Sin embargo, la expresión de CB2 es indetectable en hepatocitos, tanto en condiciones fisiológicas como en NAFL, aunque sí en células del sistema inflamatorio y HSCs (252-254). CB2 está aumentado en el hígado de ratones alimentados con dieta alta en grasa y en ratones ob/ob, específicamente en células no parenquimáticas. La activación farmacológica de CB2 en estos ratones incrementa los niveles hepáticos de marcadores de inflamación y esteatosis, mientras que el bloqueo farmacológico los reduce (251). Por tanto, el papel de CB2 en NAFLD podría ser indirecto a través de sus acciones inflamatorias. Estudios acerca de CB2 en ALD (*alcoholic liver disease*) reafirman el papel de CB2 como regulador de la actividad inflamatoria en macrófagos y consecuentemente afectando a la esteatosis hepática (254, 255). Además, la activación farmacológica de CB2 incrementa la resistencia a insulina, contrariamente a lo que sucede en los ratones deficientes en CB2 (250, 251). No se descarta, por tanto, que la activación de CB2 también esté contribuyendo al fenotipo hepático a través de sus acciones en la modulación de la señalización a insulina.

2.5.2. Fibrosis

CB1 y CB2 juegan papeles opuestos en el desarrollo de fibrosis hepática en NASH. Varias evidencias señalan a CB1 como promotor de fibrosis hepática. La proteína CB1 está aumentada en HSCs de pacientes humanos con cirrosis, en HSCs de ratones y ratas con fibrosis hepática y en HSCs activados *in vitro* (256, 257). La administración de *rimonabant* en ratones alimentados durante 9 meses y medio con dieta alta en grasa reduce la fibrosis medida como cantidad de proteína α SMA y tinción histológica de colágeno (*Sirius Red*), junto con reducciones de esteatosis e infiltración de células inflamatorias (258). La inhibición farmacológica de CB1 también redujo la fibrosis hepática en los modelos de fibrosis inducida por tetracloruro de carbono y ligadura de conducto biliar, tanto en ratón como en rata (256, 259, 260). El ratón *knockout* para CB1 está protegido frente a fibrosis en estos modelos, mostrando menores niveles de proteína α SMA y de ARNm de ACTA2 y TGF β . *In vitro*, *rimonabant* induce apoptosis e inhibe la proliferación de las HSCs (256). Por último, CB1 está aumentando en las células endoteliales hepáticas de pacientes cirróticos y AEA está aumentado en suero. La administración de *rimonabant* mejora en ratas la hipertensión portal y la hipotensión arterial características de la cirrosis (261, 262).

CB2, por el contrario, se erige como un supresor de la fibrogénesis hepática. CB2 está aumentado en miofibroblastos fibrogénicos (pero no en hepatocitos) del hígado de pacientes con cirrosis, en la fracción celular no parenquimática de hígados de ratón con fibrosis inducida por tetracloruro de carbono y en HSCs de rata activadas *in vitro* (252, 257, 263). Ratones sin CB2 manifiestan fibrosis hepática más avanzada tras el tratamiento con tetracloruro de carbono que los ratones *wild type*, medida como niveles de hidroxiprolina hepática y en tinción rojo sirio (263). Los ratones sin CB2 también presentan una regeneración hepática atenuada (252). La activación de CB2 en ratones con fibrosis mejora la presión arterial, reduce la infiltración de células inflamatorias en el hígado, aumenta la regeneración hepática y reduce el número de HSCs activadas, además de niveles más bajos de α SMA, del marcador de apoptosis caspasa 3

cortada y de la cantidad de colágeno (252, 257). *In vitro*, la activación de CB2 reduce la proliferación y aumenta la apoptosis de miofibroblastos y HSCs (252, 263).

Además de CB2 en miofibroblastos/HSCs, parece que la activación en células del sistema inmune también es importante en el proceso fibrogénico. El número de linfocitos T colaboradores 17 (Th17) y su secreción de IL-17, citocina proinflamatoria y fibrogénica, están muy aumentados en ratones CB2 *knockout* con fibrosis inducida por ligadura del conducto biliar. La inhibición química de la diferenciación de estos linfocitos reduce la producción de IL-17 y reduce la fibrosis *in vivo*. La activación farmacológica de CB2 inhibe la diferenciación de los Th17 y la producción de IL-17. Además, CB2 reduce el fenotipo proinflamatorio de macrófagos y profibrótico de miofibroblastos inducidos por IL-17 *in vitro*. Por tanto, la activación del receptor CB2 reduce la fibrosis inhibiendo la producción de IL-17 en los Th17 e inhibiendo la señalización de IL-17 en macrófagos y miofibroblastos (253).

La alteración del sistema endocannabinoide en fibrosis y NASH afecta al desarrollo de la patología no solo a través de CB1 y CB2. Esto se ejemplifica en las HSCs, en las que el tratamiento de AEA y 2-AG es capaz de inducir muerte celular a pesar de que CB1 y CB2 estén bloqueados (263, 264). Esto sugiere la existencia de otros receptores sensibles a endocannabinoides.

2.5.3. Evidencias clínicas

Los datos de pacientes humanos pueden ayudar a entender el papel de CB1 y CB2 en la progresión de NAFL-NASH-cirrosis. Una primera evidencia viene proporcionada por un estudio en pacientes con hepatitis C crónica. Al margen de las evidentes diferencias metabólicas y moleculares entre las enfermedades NAFLD y hepatitis C, es llamativa la asociación encontrada en el análisis histológico hepático de estos pacientes, donde se encontró una mayor expresión del receptor CB1 hepático. Por un lado, los pacientes con esteatosis presentan niveles más altos de CB1 que aquéllos sin esteatosis. Por otro, los niveles de CB1 son progresivamente más altos en los pacientes con más fibrosis (265).

Otra evidencia clínica de la importancia de CB1 en NAFLD podría venir de la mano de la experiencia clínica con el *rimonabant*. Este fármaco fue aprobado por la EMA como terapia frente a la obesidad en Europa en 2006, pero retirado dos años más tarde debido a sus efectos secundarios psiquiátricos (266). El uso de este agonista inverso de CB1 en ensayos clínicos revela una reducción muy significativa de la ALT (*alanine transaminase*), marcador de daño hepático, en los pacientes tratados con *rimonabant* durante 1 año. Sin embargo, la pérdida de 6,5 kg de peso en estos pacientes impide discernir si es consecuencia directa de sus acciones hepáticas o indirecta derivada de la mejora del estado metabólico del organismo. (267). En esa cohorte de pacientes tampoco estaba caracterizada la condición hepática, lo que dificulta todavía más la interpretación de este dato.

Un tercer grupo de estudios analizaron la relación entre variables epidemiológicas, demográficas, y metabólicas y la progresión de hepatitis C crónica. Dos estudios encontraron que el consumo diario de cannabis es uno de los mejores predictores del desarrollo rápido de fibrosis y de la progresión a etapas de fibrosis más severas entre los pacientes con hepatitis C crónica (268, 269). La ampliación de uno de ellos permitió detectar, además, una correlación positiva entre el consumo de cannabis, y la severidad de esteatosis hepática entre los pacientes con hepatitis C crónica (270). Estas observaciones podrían estar de acuerdo con el papel de CB1 y CB2 promoviendo la esteatosis hepática y un papel dominante de CB1 (profibrótico)

sobre CB2 (antifibrótico) inducido por cannabinoides. Sin embargo, estos resultados deben ser tomados con mucha cautela debido a la enorme limitación en aspectos como el sesgo que supone el contexto metabólico de la hepatitis C crónica frente a NAFLD, los posibles efectos extrahepáticos y especialmente los efectos centrales del cannabis, y la gran diversidad de efectos de los principios activos del cannabis que no están mediados por CB1 y CB2.

2.6. GPR55

La proteína GPR55 humana está compuesta de 319 aminoácidos, pesa alrededor de 37 kDa y está codificada por el gen GPR55 situado en el cromosoma 2q27. Fue clonado por primera vez en 1999 (271). GPR55 fue descubierto como un receptor que responde a estímulos cannabinoides en estudios de *screening* de las compañías farmacéuticas AstraZeneca y GlaxoSmithKline (272). La secuencia de GPR55 muestra una homología de un 13% con CB1 y de un 14% con CB2 y, sin embargo, tiene la capacidad de interactuar y ser modulado por diferentes endocannabinoides, fitocannabinoides y ligandos sintéticos (272). La homología del receptor GPR55 humano con el de ratón y rata es 78% y 75%, respectivamente (273).

2.6.1. Distribución

GPR55 se expresa ampliamente en cerebro y tejidos periféricos, sugiriendo un papel en múltiples funciones biológicas. En el cerebro, se ha detectado expresión de ARNm de GPR55 en regiones como los núcleos estriado y caudado e hipotálamo (271, 273, 274). A nivel periférico, la GPR55 se encuentra a lo largo del tracto gastrointestinal, con mayor presencia en yeyuno e íleon frente a estómago y colon, y tanto en submucosa como en las neuronas motoras que lo inervan (273, 275). En páncreas, existen diferencias entre roedores y humanos: mientras que en roedores se detectó la presencia de proteína GPR55 en células β , pero no en células α ni δ , la expresión en humanos en células α y células β , pero no en δ , está bastante extendida (276-278). En tejido adiposo, GPR55 es detectado a nivel basal y su expresión está modulada por estado nutricional, hormonas y estrés metabólico, como se explicará más adelante. En el hígado, GPR55 ha sido detectado en ARNm de humanos, ratones y ratas, y en proteína de ratones, aunque la regulación de su expresión y su función siguen siendo desconocidas (271, 273, 278, 279). Por último, células inmunes humanas expresan GPR55, tales como neutrófilos y macrófagos (280, 281).

2.6.2. Rutas de señalización y farmacología

El estudio de las rutas de señalización y funciones celulares de GPR55 está limitado por la ausencia de fármacos selectivos para este receptor. Además, la farmacología de GPR55 es compleja y controvertida, con diferentes publicaciones científicas mostrando resultados de interacción entre cannabinoides y el receptor contradictorios, al menos aparentemente. Varios estudios con HEK293 expresando GPR55 humano, han contribuido a empezar a conocer lo que ocurre *downstream* a la activación de GPR55, como recoge la Figura 3. GPR55 se asocia con las subunidades $G\alpha_{12/13}$ y $G\alpha_q$ para activar diferentes rutas de señalización. $G\alpha_{12/13}$ activa la ruta de la GTPasa RhoA, regulando PLC (*phospholipase C*) y el citoesqueleto. Ambos parecen ser necesarios para la liberación de calcio desde el RE y por tanto su incremento transitorio en el citosol (282, 283). Esto permite la activación del factor de transcripción NFAT (*nuclear factor of activated T cells*) (283, 284). Diferentes publicaciones también recogen la

activación de los factores de transcripción CREB (*cAMP response element-binding protein*), ATF2 (*activating transcription factor 2*) y NF- κ B (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*), posiblemente mediado por la ruta de señalización de las MAPKs (como indica la fosforilación de ERK1/2) y por PKC (*protein kinase C*) (284, 285). G α q en algunos casos también es necesario para la liberación de calcio mediada por PLC e inducida por la activación de GPR55 (282). En conjunto, las rutas de señalización de RhoA y MAPKs controlan una gran variedad de funciones celulares, como división, diferenciación, apoptosis y remodelado del citoesqueleto (286). Adicionalmente, GPR55, al igual que CB1 y CB2, está sujeto a internalización mediada por β -arrestina y podrían formar homodímeros o heterodímeros con los receptores cannabinoides clásicos (285, 287).

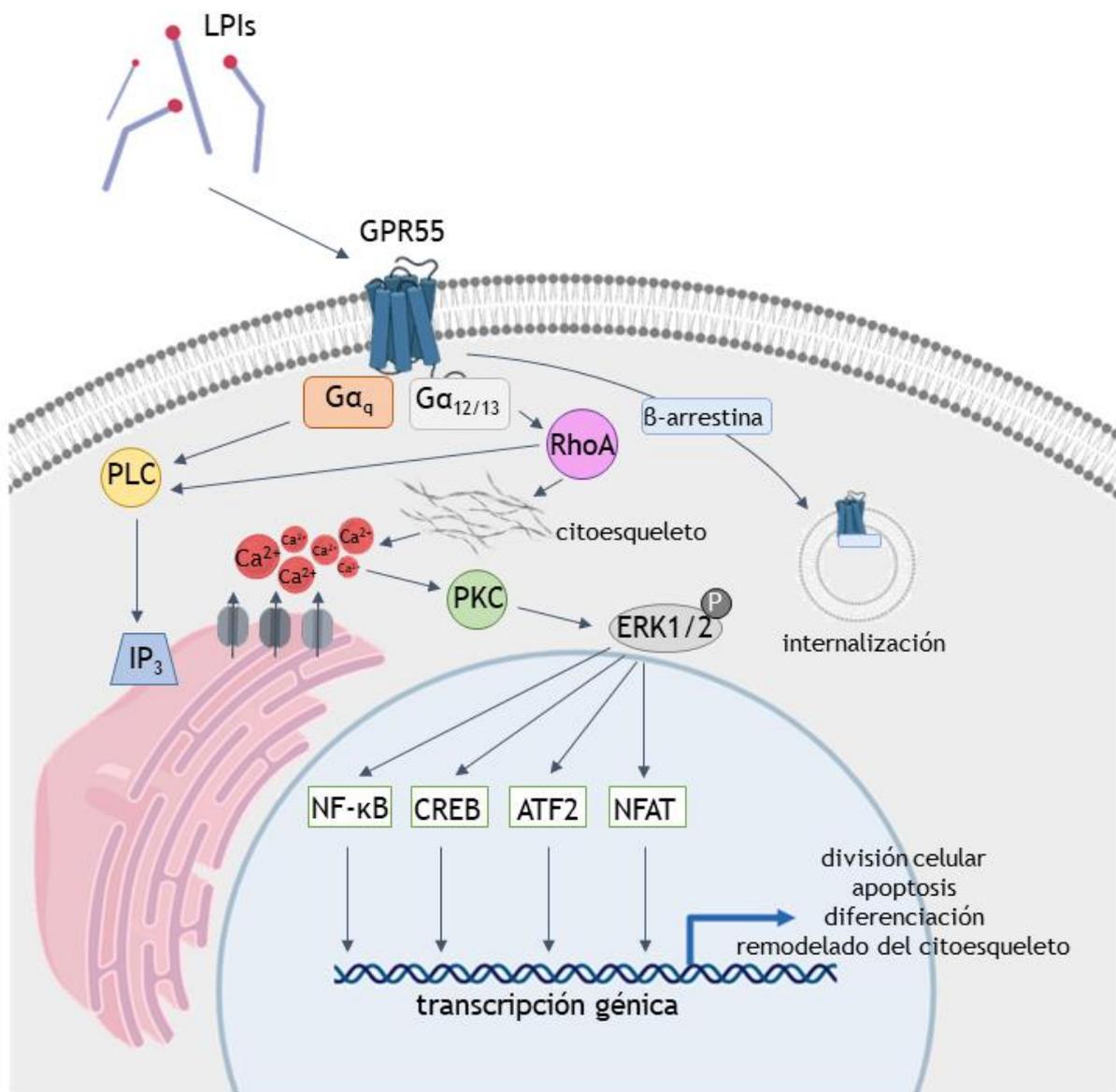


Figura 3. Señalización celular de GPR55 y LPI. Esquema de las rutas de señalización intracelulares activadas en respuesta a la activación del receptor GPR55 por parte de LPI. Fuente: elaboración propia en base a los estudios realizados en HEK293, principalmente los referenciados como 279-282.

Los efectos de los cannabinoides a través de GPR55 han sido evaluados siguiendo diferentes criterios. Uno de ellos es la medición del intercambio GDP-GTP inducido por el agonista como indicador de la activación del receptor (273). Otros, utilizan la liberación de calcio intracelular, la fosforilación de ERK, la internalización mediada por β -arrestina y la activación de proteínas GTPasas como RhoA (283, 285, 288, 289). Estos ensayos han permitido conocer que GPR55 interacciona con una gran variedad de ligandos, pero el uso variable de unos u otros también ha generado resultados difíciles de interpretar.

2.6.2.1. Endocannabinoides

La consideración de los endocannabinoides como ligandos de GPR55 es controvertida. No existe un consenso sobre la capacidad de los endocannabinoides clásicos para activar GPR55. Por ejemplo, un estudio encontró que ni 2-AG ni AEA a 10 μ M eran capaces de fosforilar ERK e inducir un incremento en los niveles intracelulares de calcio en human células HEK293 (*embryonic kidney 293*), mientras que otro estableció valores de EC_{50} de 18 nM para AEA y 3 nM para 2-AG en ensayos de unión de GTP en la misma línea celular (273, 289). A pesar de estos resultados dispares, varios estudios coinciden en la capacidad de AEA para activar GPR55 a concentraciones de entre 5 μ M y 10 μ M, bastante más altas que las necesarias para activar CB1 y CB2 (290). Otros endocannabinoides también han mostrado cierta capacidad de activación de GPR55, como es el caso de OEA y PEA (273).

2.6.2.2. Fitocannabinoides y cannabinoides sintéticos

Varios fitocannabinoides han sido identificados como activadores de GPR55. Aunque no existe un consenso, diversos estudios muestran que el THC (*tetrahydrocannabinol*) y el CBD (*cannabidiol*) son capaces de inducir la liberación de calcio intracelular y/o la fosforilación de ERK dependiente de GPR55 (273, 282, 291). La complejidad de la estructura y señalización de GPR55 ha dificultado el desarrollo de agonistas/antagonistas específicos (292). Fruto de algunos de esos intentos o en base al uso de fármacos preexistentes, el uso de cannabinoides sintéticos han permitido modular la actividad de GPR55 y con ello ayudar a conocer sus funciones. HU210 (un análogo de THC), O-1602 (un análogo de CBD) y Abn-CBD (*abnormal CBD*) funcionan como agonistas de GPR55 mientras que CBD parece que se comporta como un antagonista (273, 293, 294). JWH015, agonista de CB2, activa GPR55, mientras que su análogo WIN55212 no es capaz de hacerlo (282, 288). Por otra parte, potentes antagonistas de CB1, AM215 y AM281, también tienen efectos dispares en GPR55: el primero induce la unión de GTP, pero el segundo no tiene ningún efecto incluso a concentraciones de 30 μ M (273). En relación a *rimonabant*, los resultados son bastante dispares. Análisis de liberación de calcio intracelular e internalización mediado por β -arrestina otorgan al *rimonabant* una propiedad agonista, pero bloquea los efectos de THC, JWH015 y AEA en la liberación de calcio, lo que apunta en la dirección opuesta (282, 284, 285). Por último, CID16020046 inhibe GPR55, pero no a CB1 ni CB2 (295).

2.6.2.3. Lisofosfatidilinositol

El LPI (*lysophosphatidylinositol*) es un lípido que actúa como mensajero químico interaccionando con receptores GPCR (287). LPI ha sido propuesto como el ligando endógeno de GPR55 basado en estudios *in vitro* e *in vivo*. La unión de LPI a GPR55 es capaz de inducir

la unión de GTP, activación de RhoA, incremento transitorio de los niveles de calcio citoplasmático y fosforilación de ERK1/2 (282, 283, 285, 288, 289).

2.6.2.3.1. Lípidos bioactivos y LPI

LPI es un fosfolípido. La estructura básica de los fosfolípidos está compuesta de dos ácidos grasos y un grupo fosfato unidos a una molécula de glicerol. Más concretamente, LPI es un lisofosfolípido, es decir, un derivado fosfolipídico generado por hidrólisis de una de las cadenas de ácidos grasos (sn-1 o sn-2) por las fosfolipasas. La adición, modificación o intercambio de diferentes grupos sobre el grupo fosfato permite generar una diversidad todavía mayor. Específicamente, el LPI presenta un grupo mioinositol unido al grupo fosfato (296). En la Figura 4 se muestran las diferentes partes de la molécula de 1-estearoil LPI o LPI(18:0). Los lisofosfolípidos fueron clásicamente considerados como simples componentes de membranas celulares, con la única función de modificar sus propiedades mecánicas. Sin embargo, LPI y otros lisofosfolípidos han sido descubiertos como parte de un grupo heterogéneo y diverso de lípidos conocidos como *lípidos bioactivos*, caracterizados por su capacidad para actuar como mensajeros químicos en las rutas de señalización y procesos celulares (297). Entre ellos, el LPI ha pasado relativamente desapercibido en comparación con el LPA (*lysophosphatidic acid*) y el SPI (*sphingosine-1-phosphate*). Se ha descubierto que LPA está involucrado en funciones tan variadas como la regulación de presión sanguínea y la inducción de proliferación en fibroblastos (298, 299). SPI, en la que la esfingosina sustituye al glicerol, presenta también un amplio espectro de funciones biológicas, como el crecimiento celular, diferenciación, prevención de la apoptosis y migración (300). Con respecto a LPI, las primeras evidencias de un posible rol fisiológico mostraron que inducía un incremento de calcio intracelular, favoreciendo la liberación de insulina en los islotes pancreáticos y mediando la acción de la vitamina D3 en los hepatocitos (301). También se observó que LPI mediaba la proliferación inducida por RAS en fibroblastos de tiroides, y protegía frente a la muerte neuronal inducida por glutamato e isquemia *in vivo* e *in vitro* (302, 303). El descubrimiento de LPI como potente activador de GPR55 (y por tanto candidato ideal a ser su ligando endógeno) atrajo la atención de los investigadores y permitió el descubrimiento de nuevas funciones, tanto dependientes como independientes de GPR55, como se detallará más adelante.

2.6.2.3.2. Metabolismo de LPI

LPI puede existir como sn-1 o sn-2 lisofosfolípidos. Estos dos isómeros comparten el mismo fosfatidilinositol precursor, pero son producidos por diferentes fosfolipasas. Como se muestra en la Figura 4, la enzima PLA1 (*phospholipase A1*) cortará en posición sn-1 de los fosfatidilinositales, generando 2-acil LPIs. La isoforma enzimática PLA1-DDHD (*DDHD domain containing 1*), intracelular, es la involucrada en esta acción. Sin embargo, no es exclusiva de la síntesis de LPI (304). Por otra parte, la enzima PLA2 (*phospholipase A2*) producirán 1-acil LPIs. La PLA2 involucrada principalmente en este proceso es la isoforma citosólica PLA2 α , regulada por calcio y fosforilación (305).

Aunque la producción de LPI parece bastante directa, el catabolismo de LPI puede seguir varias rutas, siendo hidrolizada por diferentes fosfolipasas o re-acilada en fosfatidilinositol (Figura 4). LPI puede ser desacilada por lyso-PLA para generar un ácido graso y glicerfosfoinositol. Otra ruta catabólica implica a la lyso-PI-PLC (*LPI-specific PLC*), que hidroliza LPI en acilglicerol e inositolfosfato. Una tercera ruta hidrolítica de LPI involucra a la

autotaxina, una lisofosfolipasa D que convierte LPI en ácido lisofosfatídico. Por último, ABHD6 (*α/β hydrolase domain 6*) hidroliza LPI en un ácido graso y glicerfosfoinositol (296).

LPI también puede ser re-acilado a fosfatidilinositol, como un paso más en la ruta de síntesis de fosfolípidos. MBOAT7 (*membrane-bound O-acyltransferase 7*) es una aciltransferasa LPI específica que añade un ácido graso al glicerol del LPI formando el correspondiente fosfatidilinositol. MBOAT7 es necesaria para la incorporación de ácidos grasos poliinsaturados en los LPIs, eminentemente en sn-2. Ratones sin MBOAT7 muestran atrofia cerebral y una esperanza de vida de un mes (306). De forma interesante, la expresión de MBOAT7 está reducida en humanos y ratones obesos, correlacionándose inversamente con la adiposidad (307). Ratones *knockdown* de MBOAT7 alimentados con dieta alta en grasa presentan mayor acumulación hepática de LPI y menor fosfatidilinositol en suero e hígado, y desarrollan NAFLD exacerbado, aunque los mecanismos subyacentes a este fenotipo permanecen desconocidos (307). Este estudio se detallará más adelante. LPI también puede ser esterificado en sn-1 por AGPAT8 (*acylglycerolphosphate acyltransferase 8*), enzima no específica de LPI (297, 308).

El metabolismo de LPI también es dependiente de su transporte a través de las membranas, aunque se sabe poco acerca de este sistema. Un estudio observó que, *in vitro*, ABCB1 (*ATP-binding cassette transporter subfamily C member 1*) participa en la secreción de LPI al medio extracelular (309).

La mayor parte de las enzimas que intervienen en la síntesis, degradación o exporte de LPI son comunes a las rutas de metabolismo de fosfolípidos. Por tanto, la modulación de los niveles de LPI usando estas enzimas como diana genética o farmacológica se presenta como una opción compleja, generando efectos independientes de LPI. Estos incluyen desregulación en los niveles de otros lípidos, alteraciones de la integridad de la membrana plasmática y efectos compensatorios de otras enzimas y rutas metabólicas, como se observa en el ratón deficiente en PLA2 α (305).

2.6.2.3.3. Especies de LPI

Existe una diversidad de especies de LPI que pueden ser encontradas en mamíferos, pero lo que se sabe de su abundancia y actividad es todavía escaso. El estudio que descubrió a LPI como ligando endógeno de GPR55 utilizó LPI de soja, con una composición mayoritaria de palmítico (18:0) y esteárico (18:0) en sn-1, y linoleico (18:2) y araquidónico (20:4) en posición sn-2 (288). Otras fórmulas también han sido utilizadas, pero el uso de LPI con esta composición está ampliamente extendido en la literatura. Un estudio de los niveles de LPI en el cerebro de rata encontró que su composición era de 13% palmítico (16:0), 1% palmitoleico (16:1), 51% esteárico (18:0), 12% oleico (18:1), trazas de linolénico (18:2), 22% araquidónico (20:4) y trazas de docohexanoico (22:6), con una cantidad de LPI total de 38 nmol/g de tejido (289). Curiosamente, se han observado diferentes capacidades de las especies de LPI para movilizar calcio y fosforilar ERK1/2. El LPI(20:4) se mostró como el más efectivo, con EC₅₀ de 30 nM, y el LPI(18:0) como el menos efectivo, con EC₅₀ de 450 nM (289). Sin embargo, las concentraciones de ambos también difieren: se estima que en el cerebro de rata las concentraciones de LPI(20:4) y LPI(18:0) son de 10 μ M y 25 μ M, respectivamente (289, 296). Si bien existen dos estudios que analizan la alteración específica de alguna especie de LPI en suero e hígado de pacientes y ratones obesos, respectivamente (que serán explicados más

adelante), poco se sabe de las especies de LPI presentes en los tejidos y sangre en condiciones fisiológicas y patológicas.

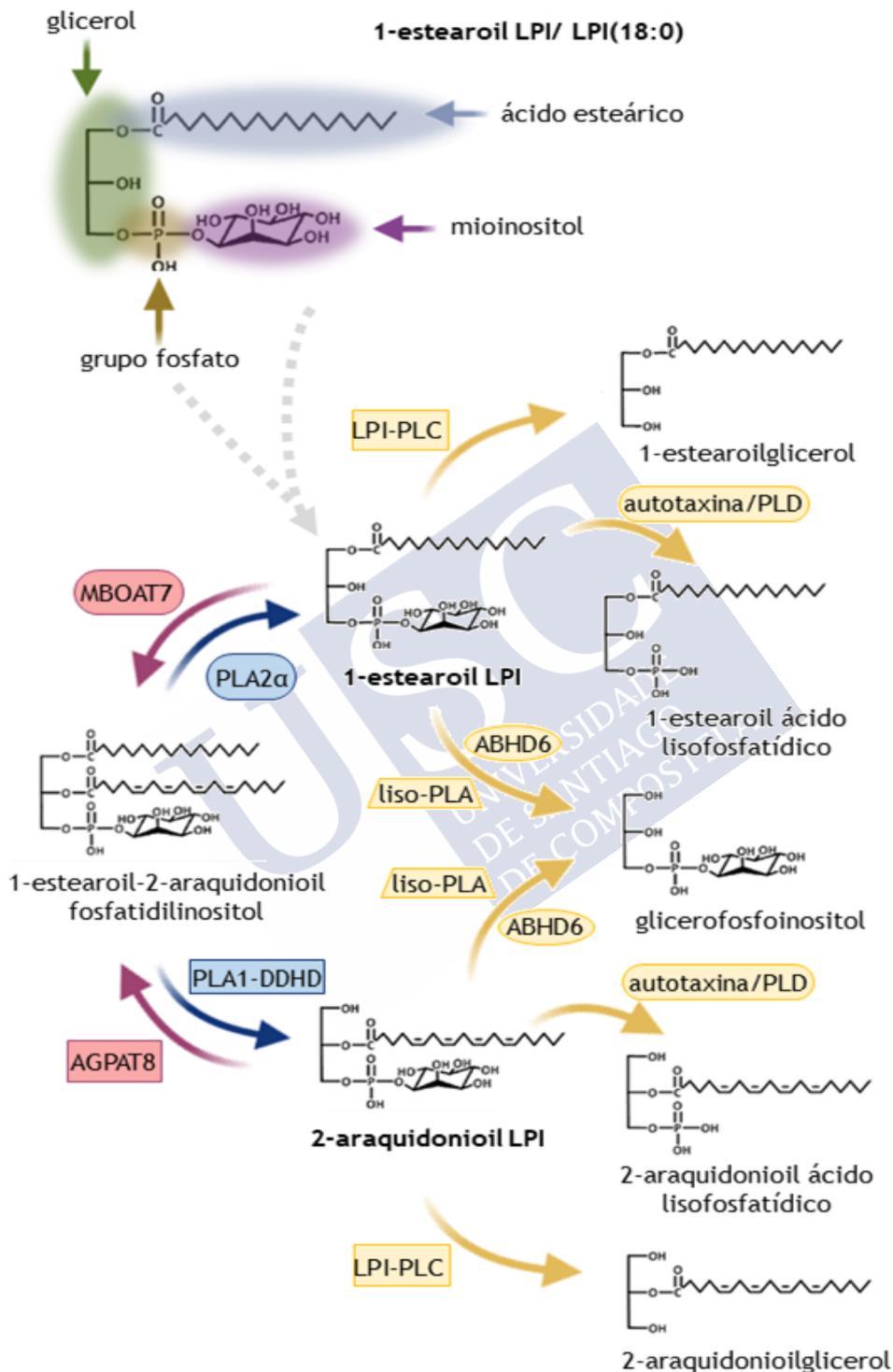


Figura 4. Metabolismo de LPI. Representación de 1-estearoil LPI o LPI(18:0) señalando las partes básicas de su estructura molecular, y principales rutas de síntesis (color azul) y degradación (color rosa: re-acilación; color amarillo: hidrólisis) de LPI, indicando las principales enzimas responsables. Fuente: elaboración propia.

2.6.2.3.4. Funciones de LPI no mediadas por GPR55

Un elevado número de estudios avalan que la mayoría de efectos biológicos de LPI están mediados por GPR55. Sin embargo, se ha propuesto que también podría activar a otros receptores tipo GPCR como GPR119 y canales iónicos como TRPV2 y TREK-1 (*two-pore 2P domain potassium channel 1*). En el primer caso, un estudio encontró que la administración de LPI era capaz de inducir un incremento intracelular de la concentración de calcio en la línea celular de rata RH7777 sobreexpresando GPR119 humano (310). Otro estudio posterior demostró que LPI(18:1) (pero no otras especies de LPI) estimulaba la liberación de GLP-1 *in vitro* y en explantes de colon de ratón, un efecto que no ocurría en células sin GPR119. Este efecto es independiente de GPR55 (311). Sin embargo y a la espera de otros trabajos que confirmen este rol, parece que el receptor GPR119 no es tan sensible como GPR55 a LPI, mostrando valores de EC_{50} de 6 μ M para movilizar calcio intracelular y siendo 20 μ M la dosis mínima efectiva que promueve la liberación de GLP-1. En relación a TRPV2, se descubrió que LPI era capaz de incrementar los niveles de calcio intracelular solamente en presencia de TRPV2 (312). Mecánicamente, en ese artículo se propone que LPI podría mediar la translocación de TRPV2 a la membrana plasmática. Sin embargo, las evidencias que apoyan esta hipótesis son escasas, por lo que no se sabe si este efecto de LPI sobre TRPV2 es directo o indirecto (312).

LPI y en general los lisofosfolípidos pueden llevar a cabo acciones no medidas por receptor, modificando las propiedades de las membranas celulares. La molécula de LPI tiene una estructura cónica invertida en lugar de la forma cilíndrica típica de los fosfolípidos. En consecuencia, en las bicapas lipídicas LPI introduce estrés lateral y tensión, reduciendo la capacidad de unión de moléculas de superficie. Por ejemplo, se ha visto que LPI(18:0) a una concentración de 5 μ M inhibe la unión de Stx (*Shiga toxin*) a la membrana y su señalización *in vitro* (313). LPI también inhibe a concentraciones fisiológicas e *in vitro* los procesos de invaginación de la membrana, como la endocitosis mediada por clatrina y la exocitosis (314, 315).

2.6.3. Funciones del sistema LPI/GPR55

Dada la extensa distribución en el organismo, no es de extrañar que GPR55 esté involucrado en una amplia variedad de funciones fisiológicas y fisiopatológicas, tanto en el cerebro como en los tejidos periféricos.

A nivel de cerebro y sistema nervioso, GPR55 participa en una variedad de procesos fisiológicos que incluyen la coordinación de la actividad motora, la nocicepción, la modulación de la ansiedad y la regulación del balance energético (que será explicada más adelante). En primer lugar, ratones deficientes en GPR55 cometen más errores en pruebas de coordinación motora (316). Además, la deficiencia en GPR55 incrementa la sensibilidad a pruebas de dolor inducidas por temperatura, mientras que la administración de LPI en neuronas de la PAG (*periaqueductal gray*) de ratones *wild type* la reduce (316-318). Por otra parte, la administración de O-1602, agonista sintético de GPR55, en roedores sometidos a pruebas de estrés muestra que éste ejerce un efecto ansiolítico, mientras que el silenciamiento de GPR55 en neuronas del núcleo medial orbital bloquea este efecto (319, 320).

El sistema LPI/GPR55 también regula diferentes procesos a nivel periférico. En hueso, LPI y O-1602 podrían activar la resorción ósea de los osteoclastos a través de GPR55, como se ha observado *in vitro*. *In vivo*, ratones sin GPR55 presentan menos osteoclastos activos y menor

resorción (321). LPI y GPR55 también participan en la función endotelial y plaquetaria. LPI induce vasodilatación en arterias aisladas y reduce la presión arterial sistémica en ratas. El co-tratamiento con CID16020046 bloquea la vasodilatación inducida por LPI pero la deficiencia en GPR55 no evita los efectos de O-1602 (291, 322). LPI inhibe la agregación plaquetaria y promueve el cierre de heridas en cultivos primarios de células endoteliales de pulmón humanas, estos efectos son bloqueados por CID16020046 (295). En sistema inflamatorio, su expresión es destacable entre monocitos, células NK (*natural killers*), neutrófilos, macrófagos y células espumosas de humanos. El tratamiento con O-1602 incrementa la producción de TNF α en monocitos y células NK (323). Los neutrófilos migran de forma concentración-dependiente en respuesta a LPI y 2-AG; el tratamiento con AM251 aumenta su respuesta migratoria mientras que CBD la reduce (281). En células espumosas, la administración de O-1602 incrementa la acumulación lipídica y la producción de TNF α , pero se revierte con el co-tratamiento con CBD (280).

LPI y GPR55 también están involucrados en el desarrollo de cáncer y enfermedades metabólicas. Por un lado, existen evidencias que muestran que el sistema LPI/GPR55 controla la proliferación y migración celular en varios tipos de cáncer. Existe una correlación positiva entre niveles de LPI total (específicamente LPI(16:0), LPI(18:0) y LPI(20:4)) en suero y malignidad de cáncer de ovario (324). También se observó una correlación positiva entre niveles de expresión de GPR55 y agresividad de cáncer de mama. La supervivencia de los pacientes con cáncer de pecho es menor si expresan niveles altos de GPR55 (325). Además, el tratamiento con LPI en ratones inmunodeficientes inyectados con células tumorales, incrementa la metástasis en pulmón de forma GPR55-dependiente (325). Las células transformadas por el oncogén RAS secretan LPI (302). LPI actúa como un factor autocrino/paracrino en células tumorales promoviendo la proliferación (286, 309). Por último, ha sido descubierta una interesante implicación del sistema LPI/GPR55 en una gran variedad de procesos metabólicos y su desregulación en patologías como obesidad y diabetes tipo 2, como se explicará a continuación en detalle.

2.6.3.1. Acciones metabólicas

GPR55 se expresa en tejidos metabólicamente activos. En algunos de ellos, como el páncreas y el tejido adiposo blanco, cumple funciones relevantes en la homeostasis energética. En otros, sin embargo, su papel todavía no está claro. En la Figura 5 se muestra esquemáticamente el conocimiento actual sobre el patrón de expresión de GPR55 y su rol en los órganos metabólicos.

2.6.3.1.1. Acciones metabólicas en el sistema nervioso central

Los estudios que tenían como objetivo estudiar el rol de GPR55 en la ingesta de alimento se encontraron con el obstáculo de la farmacología ya explicado. El tratamiento en ratas con CBD reduce peso corporal e ingesta; sin embargo, la coadministración de AM630, antagonista selectivo de CB2, revierte estos efectos (326). La administración aguda intracerebroventricular (icv) de O-1602 estimula la ingesta; aunque este efecto se mantiene en ratones deficientes en GPR55 (327). Los ratones GPR55^{-/-} no presentan cambios en ingesta en comparación con el grupo control (317, 328). No obstante, no queda descartado que GPR55 en humanos no juegue un papel en la ingesta, ya que un estudio en mujeres japonesas muestra que la presencia de una variante de GPR55 predispone a anorexia nerviosa (329).

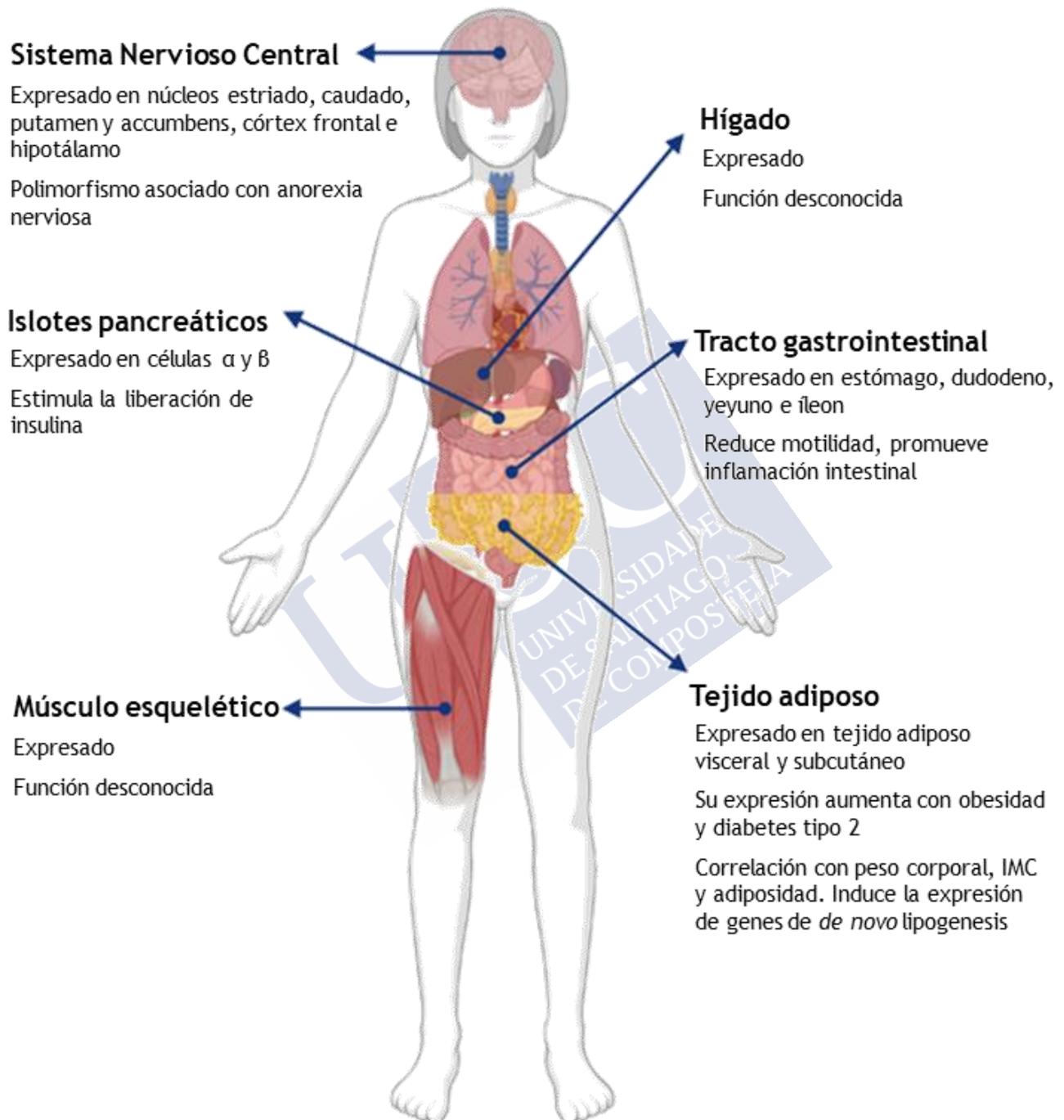


Figura 5. Expresión y función de GPR55 en los órganos involucrados en la homeostasis energética. Diagrama que resume el conocimiento actual de la expresión y función de GPR55 en órganos metabólicamente relevantes. Fuente: elaboración propia.

2.6.3.1.2. Acciones metabólicas en el tracto gastrointestinal

GPR55 regula el funcionamiento del tracto gastrointestinal a nivel motor e inflamatorio. Por un lado, el tratamiento con O-1602 inhibe la contracción del intestino inducida por el sistema nervioso entérico, pero no tiene efecto en ratones deficientes en GPR55 (330). O-1602, administrado icv o intraperitonealmente (ip), también reduce la motilidad gástrica total, pero no provoca cambios en ratones GPR55^{-/-} (294). Por otro lado, la administración de CID16020046 y la deficiencia en GPR55 protegen frente a colitis inducida químicamente, mostrando menores niveles de citocinas proinflamatorias y reclutamiento de células del sistema inmune (331). Además, O-1602 y CBD amortiguan la inflamación e hipomotilidad intestinal inducida por LPS (*lipopolysaccharide*) en ratones (275). Sin embargo, la función antiinflamatoria de O-1602 no parece estar mediada por GPR55, ya que está preservada en ratones GPR55^{-/-} (332).

2.6.3.1.3. Acciones metabólicas en los islotes pancreáticos

La presencia de GPR55 de células β sugiere por sí misma un rol de GPR55 en la regulación de la secreción de insulina. De hecho, se describió hace varias décadas que LPI inducía la liberación de insulina en islotes pancreáticos de rata (301). Más tarde, se descubrió que sucedía lo mismo en islotes de ratón y humanos (333). La administración de O-1602 en islotes pancreáticos humanos y de ratón también estimula la liberación de insulina (276-278). El tratamiento en islotes de ratón o en la línea celular BRIN-BD11 con otros agonistas de GPR55 también estimula la secreción de insulina, y el co-tratamiento con CBD bloquea el efecto (277). Adicionalmente, la administración de O-1602 potencia la secreción de insulina estimulada por glucosa en islotes pancreáticos de humanos y ratones, pero no tiene efecto en los islotes de ratones GPR55^{-/-} (276, 278). *In vivo*, el tratamiento agudo con agonistas de GPR55 en ratones incrementa la tolerancia a glucosa y los niveles de insulina en sangre (277, 278). Curiosamente, los ratones deficientes en GPR55 no presentan cambios en la tolerancia a glucosa, sensibilidad a insulina y secreción de insulina estimulada por glucosa, pero sí muestran una clara resistencia a insulina a nivel molecular en músculo, hígado y tejido adiposo (328, 334). Explorando el potencial efecto clínico de estos resultados, se encontró que la inyección diaria con Abn-CBD incrementaba los niveles de insulina en sangre y el contenido pancreático de insulina en ratones con diabetes inducida por estreptozotocina, al mismo tiempo que los niveles de glucosa en sangre disminuían. Además, estos ratones mostraban una mayor tolerancia a glucosa y sensibilidad a insulina (335, 336).

2.6.3.1.4. Acciones metabólicas en el tejido adiposo blanco

Como se adelantó previamente, la expresión de GPR55 en el tejido adiposo blanco está regulada por una diversidad de contextos metabólicos, fisiológicos y fisiopatológicos. Así, el ayuno aumenta los niveles de GPR55 en tejido adiposo blanco en roedores y este incremento se revierte con la realimentación o con la administración de leptina (337). La expresión de GPR55 también aumenta a lo largo de la vida, tras ovariectomía, y se reduce durante la gestación, orquiectomía e hipertiroidismo (337). Curiosamente, en algunos de estos modelos los niveles de LPI sérico cambian contrariamente a los niveles de mRNA de GPR55 en tejido adiposo blanco. Así, los niveles totales de LPI sérico disminuyen en ayuno y se recuperan tras el tratamiento con leptina. Los niveles séricos de LPI también aumentan durante la gestación, específicamente LPI(16:0) y LPI(20:4), y orquiectomía, particularmente los de LPI(18:0). Sin embargo, bajan los niveles de LPI totales en suero tras ovariectomía, específicamente

LPI(18:0) y LPI(16:0) (337). Estos resultados podrían ser indicativos de que el sistema LPI/GPR55 en el tejido adiposo blanco y en el organismo en general juega un papel en procesos metabólicos inducidos por cambios en el estado energético.

En humanos obesos, la expresión de GPR55 en el tejido adiposo visceral y subcutáneo está aumentada frente a no obesos. Entre los pacientes obesos, los niveles de GPR55 están progresivamente aumentados en los intolerantes a glucosa y en los diabéticos tipo 2. Los niveles de GPR55 en tejido adiposo visceral se correlacionan con el peso corporal, adiposidad e IMC (índice de masa corporal) en pacientes obesos (279). Resulta llamativo que en pacientes obesos existe una correlación positiva entre expresión de GPR55 en tejido adiposo visceral y niveles totales de LPI sérico. Sin embargo, los niveles de LPI en suero no mimetizan completamente el patrón de los niveles de GPR55 en tejido adiposo. Si bien es cierto que los niveles séricos de LPI total, LPI(16:0), LPI(18:0) y LPI(20:4) están aumentados en pacientes obesos frente a no obesos, no existen diferencias entre los obesos según el grado de intolerancia a glucosa. En mujeres obesas, los niveles de LPI séricos se correlacionan con el peso corporal, adiposidad e IMC. Los niveles de LPI sérico no varían entre mujeres y hombres obesos (279).

Para investigar más a fondo la posible contribución del sistema LPI/GPR55 en tejido adiposo blanco a la obesidad de estos pacientes, se estudió el efecto de la administración de LPI en a) explantes de tejido adiposo visceral; y b) adipocitos diferenciados cultivados obtenidos de esos explantes. En el primer caso, el tratamiento de LPI incrementó la expresión de GPR55, de genes relacionados con la DNL (FAS y ACC) y del marcador de diferenciación adipocitario PPAR γ . En el segundo caso, la administración de LPI desencadenó la movilización de calcio (279). En conjunto, se observa que el sistema LPI/GPR55 está alterado en obesidad en humanos, y que LPI regula positivamente la adiposidad induciendo la diferenciación adipocitaria y la DNL en este tejido.

En contraste con lo observado en humanos, en ratones obesos ob/ob y ratas alimentadas con dieta alta en grasa están reducidos los niveles de ARNm y proteína de GPR55 en tejido adiposo blanco, respectivamente (279). Además, los ratones deficientes en GPR55 presentan mayor adiposidad y tendencia a un mayor peso corporal, aunque el hecho de que manifiesten menor actividad locomotora espontánea no permite discernir si es una consecuencia directa de las acciones de GPR55 en tejido adiposo (317, 328). A pesar de los datos obtenidos en el modelo de ratón GPR55 *knockout*, se encontró que la administración subcrónica icv de O-1602 incrementa la adiposidad independientemente de la ingesta, mostrando menores niveles de marcadores de oxidación lipídica en el tejido adiposo blanco. Desafortunadamente, no se ha estudiado si este efecto está mediado por GPR55 (327, 338).

2.6.3.1.5. Acciones metabólicas en el hígado

GPR55 está presente en el hígado de humanos, ratones y ratas (271, 273, 278, 279). El primer estudio en explorar su expresión no logró detectarlo en hígado de humanos mediante *northern blot* (271). Más tarde, sí fue detectado por PCR en tiempo real en pacientes humanos obesos (279). En estos pacientes, no se encontraron diferencias entre normoglucémicos, intolerantes a glucosa y diabéticos tipo 2 (279). En roedores, los niveles de expresión de GPR55 son más bajos que en otros tejidos como yeyuno, íleon, y bazo, pero similares a los niveles en tejido adiposo, indicativo de un posible estado quiescente en condiciones fisiológicas normales (273, 278). La proteína GPR55 también fue detectada en hígado de ratones mediante *western blot*, en unos niveles similares a los encontrados en bazo (278). Los ratones deficientes en GPR55 no muestran cambios en el peso del hígado con respecto al grupo control. A nivel

molecular, estos ratones presentan niveles de expresión hepática más altos para marcadores de DNL, específicamente ACC α , FAS, DGAT1 y SCD1 (328).

Algunas evidencias del papel de LPI en condiciones fisiopatológicas proceden de diferentes estudios sobre el gen MBOAT7 (*Membrane Bound O-Acyltransferase Domain Containing 7*), que específicamente esterifica ácidos grasos a LPI generando fosfatidilinositol. El polimorfismo en rs641738 se ha encontrado en humanos, y la variante T se asocia con una menor expresión de MBOAT7 en los tejidos y niveles bajos de fosfatidilinositol en plasma (339). En el hígado existe una alta expresión de MBOAT7, particularmente en hepatocitos, HSCs y células endoteliales (340). La variante T de rs641738 ha sido identificada en diversos estudios en humanos como factor de riesgo de diferentes patologías hepáticas. Específicamente, la menor expresión de MBOAT7 es un factor de riesgo para: cirrosis entre los pacientes con ALD (339); esteatosis y fibrosis en pacientes con NASH u obesidad severa (340); esteatosis y fibrosis en pacientes con NASH (341); inflamación y fibrosis en pacientes con hepatitis C crónica (342); niveles de ALT en niños (343); fibrosis en pacientes con NAFLD (344); e inflamación y fibrosis en pacientes con hepatitis B crónica (345), sugiriendo que MBOAT7 podría ser importante en patologías hepáticas en las que la esteatosis, inflamación y/o fibrosis son relevantes.

Recientemente, un estudio abordó experimentalmente el papel de MBOAT7 específicamente en NAFLD. En primer lugar, encontraron que la expresión hepática de MBOAT7 está reducida en humanos y ratones obesos. Los ratones *knockdown* de MBOAT7 desarrollan una esteatosis más severa, y niveles más altos de marcadores de inflamación y fibrosis cuando son alimentados con dieta alta en grasa durante 12 y 20 semanas, sin cambios en peso corporal, ingesta, adiposidad y gasto energético. También muestran a nivel molecular resistencia hepática a insulina. En resumen, el fenotipo de estos ratones es eminentemente hepático, manifestando un NAFL inducido por dieta exacerbado. Sorprendentemente, los niveles de todas las especies de LPI medidas no están aumentados en suero, tejido adiposo blanco, cerebro ni páncreas tras el silenciamiento de MBOAT7, pero sí en el hígado, específicamente LPI(16:0) y LPI(18:1) y en las vesículas lipídicas hepáticas, específicamente LPI(18:0) y LPI(20:4). Para discernir si LPI(16:0) y LPI(18:1) causan daño hepático, se midieron sus niveles en suero de pacientes con fibrosis (etiología no especificada) y se encontraron aumentados. La administración de estas dos especies incrementó los niveles de marcadores de inflamación y fibrosis en el hígado de ratones silenciando MBOAT7, pero no causaron cambios en el grupo control. Globalmente, parece que la deficiencia global en MBOAT7 en situaciones de estrés metabólico promueve la acumulación de LPI en el hígado y genera daño hepático. Sin embargo, el mecanismo de acción de LPI en el metabolismo hepático en NAFLD permanece desconocido y deja preguntas importantes por resolver. Por ejemplo, no se sabe si LPI regula directamente el metabolismo lipídico. De hecho, en ratones *knockdown* para MBOAT7, los niveles hepáticos de marcadores de DNL no cambian, mientras que CPT1A está muy aumentado, a pesar de exhibir mayor acumulación lipídica. Tampoco queda clara la contribución de LPI en la fibrosis en contexto de NASH. Está ampliamente recogido en la literatura que el modelo de dieta alta en grasa no genera en muchos casos fibrosis a pesar de ser mantenida en el tiempo, como se explicó previamente. De confirmarse la función profibrogénica de LPI, sería interesante discernir si se debe a los hepatocitos, o bien LPI tiene acciones directas sobre HSCs. Por último, no se sabe nada de la expresión ni el posible papel de GPR55 en este proceso. La potencial contribución del sistema LPI/GPR55 en el metabolismo hepático y en el desarrollo de patologías estrechamente relacionadas con el metabolismo como

NAFLD está todavía por descubrir. Este interés queda reflejado en las últimas revisiones científicas acerca de GPR55 y metabolismo (336, 338, 346, 347).





OBJETIVOS





OBJETIVOS

Los objetivos de la presente tesis fueron:

- Investigar la función del sistema GPR55 en el metabolismo lipídico en el hígado.
- Estudiar el posible papel del sistema LPI/GPR55 en el desarrollo de NAFLD.





HIPÓTESIS





HIPÓTESIS

Nosotros hipotetizamos que el sistema LPI/GPR55 podría modular el metabolismo lipídico hepático y su desregulación podría contribuir al desarrollo de NAFLD.





***MATERIAL Y
MÉTODOS***





1. Muestras de pacientes humanos

1.1. MUESTRAS HEPÁTICAS DE HUMANOS

1.1.1. Cohorte 1

La población de estudio incluyó un grupo de 35 pacientes adultos con $IMC \geq 35 \text{ kg/ m}^2$ y una biopsia hepática compatible con NAFLD (colección C.0002959, Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Ciencia e Innovación, Gobierno de España) (Anexo 1). Los participantes fueron recluidos de entre los pacientes sometidos a cirugía bariátrica electiva en el Hospital Universitario de Salamanca, España. Como controles, fueron incluidos 11 individuos con $IMC < 35 \text{ kg/ m}^2$ sometidos a colecistectomía laparoscópica por cálculos biliares. Las biopsias hepáticas fueron obtenidas por visión directa durante la cirugía. Las características basales de estos grupos y los criterios de exclusión fueron publicados en (348) y se muestran en la Tabla 5. Brevemente, se excluyeron del estudio pacientes que habían padecido enfermedades hepáticas relacionadas con el consumo de alcohol ($> 30 \text{ g/ día}$ en hombres y $> 20 \text{ g/ día}$ en mujeres), hepatitis C o B crónicas o si en laboratorio los datos histopatológicos revelan otras causas de enfermedad hepática distinta a NAFLD. Los datos recopilados incluyeron información demográfica (edad, sexo y etnia), medidas antropométricas (IMC), historial sobre alcoholismo y tabaquismo y otras condiciones médicas o fármacos utilizados. Antes de la cirugía, se tomaron muestras de sangre del paciente en ayuno para realizar un análisis completo: bilirrubina total, ALT y AST (*aspartate aminotransferase*), colesterol total, HDL, LDL (*low-density lipoprotein*), triglicéridos, creatinina, glucosa y albúmina. Estas muestras fueron analizadas y estudiadas en colaboración con el Departamento de Medicina Interna, el Departamento de Cirugía General y Gastrointestinal, y el Departamento de Patología del Hospital Universitario de Salamanca-IBSAL (Salamanca, España).

1.1.2. Cohorte 2

La población de estudio consta de 21 pacientes adultos con NAFLD diagnosticado por biopsia (13 con sólo NAFL, 8 con NASH), y 18 pacientes con hígados histológicamente normales, en ambos grupos con $IMC < 30 \text{ kg/ m}^2$ (colección C.0002717, Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Ciencia e Innovación, Gobierno de España) (Anexo 2). Los criterios de exclusión incluyeron el consumo de alcohol superior a 20 g/ día , el tratamiento con fármacos potencialmente hepatotóxicos, evidencia clínica de sobrecarga de hierro, seropositivos para autoanticuerpos y para hepatitis B y C o virus de inmunodeficiencia adquirido. Las biopsias hepáticas de todos los participantes estudiados fueron obtenidas por visión directa durante

intervenciones de colecistectomía en el Hospital Universitario Santa Cristina en Madrid, España. La caracterización de esta cohorte está incluida en la Tabla 6. Estas muestras fueron obtenidas y estudiadas en colaboración con la Unidad de Investigación Hepática, Hospital Universitario Santa Cristina-Instituto de Investigación Sanitaria Princesa (Madrid, España).

1.1.3. Cohorte 3

La población de estudio incluyó un grupo de 109 pacientes adultos con $IMC \geq 25 \text{ kg/m}^2$ y una biopsia hepática compatible con NAFLD (ID 14-244 e ID 14-019, Secretarías Regionales Mionisteriales, Ministerio de Salud, Estado de Chile) (Anexo 3). Todos los pacientes fueron sometidos a biopsia hepática llevada a cabo bajo sedación y anestesia local y guiados por ultrasonido utilizando la técnica de *Menghini* en el Hospital Clínico Universidad Católica de Chile en Santiago, Chile. Las características de esta cohorte aparecen representadas en la Tabla 7. Los criterios de inclusión fueron persistentes niveles altos de aminotransferasas en suero (AST y ALT), un estudio de imagen consistente con hígado graso y biopsia consistente con la diagnosis de NAFLD. Estas muestras fueron obtenidas y estudiadas en colaboración con el Departamento de Gastroenterología, Escuela de Medicina, Pontificia Universidad Católica de Chile (Santiago, Chile). Las muestras de suero obtenidas de estos pacientes fueron utilizadas para los análisis de LPI en suero.

1.1.4. Obtención de muestras hepáticas, diagnóstico y aspectos éticos

Mientras que los pacientes ambulatorios fueron sometidos a biopsia hepática por punción percutánea, los pacientes quirúrgicos fueron sometidos a biopsia hepática en cuña. Las biopsias con aguja son consideradas tan efectivas como las realizadas en cuña en el establecimiento del grado de esteatosis e inflamación, que son las principales variables histológicas consideradas en este estudio. El diagnóstico histológico de biopsias hepáticas de pacientes con NAFLD permitió la clasificación en dos grupos: esteatosis simple sin *ballooning* hepatocelular ni inflamación lobular, es decir, NAFL; y NASH, en el que los criterios mínimos incluyeron la presencia combinada de grado 1 en esteatosis, *ballooning* hepatocelular e inflamación lobular con o sin fibrosis. Los pacientes de los grupos control (sin NAFLD) no eran diabéticos, no presentaban rasgos de síndrome metabólico y mostraban una histología hepática normal. El estudio fue llevado a cabo de acuerdo con la Declaración de Helsinki, así como con las leyes locales y nacionales. Los Comités de Ética de Investigación Clínica de los tres hospitales aprobaron los procedimientos de estudio y todos los participantes firmaron un consentimiento informado escrito para someterse a biopsia hepática (Anexos 1-3). En manejo de las biopsias hepáticas en todos los pacientes de estudio fue similar entre hospitales y una pieza de tejido hepático de 1,5 cm de largo fue inmediatamente fijado y embebido en parafina para análisis histológicos, congelando la porción de tejido restante y siendo almacenado a -80°C hasta su uso con fines experimentales. Todas las muestras de biopsias fueron analizadas en un estudio ciego por un patólogo.

1.2. ANÁLISIS DE LPI EN SUERO DE HUMANOS

La extracción de metabolitos fue llevada a cabo por fraccionamiento de muestras en grupos de especies con similares propiedades fisicoquímicas, usando combinaciones apropiadas de solventes orgánicos. Brevemente, las proteínas fueron precipitadas de las muestras de suero descongeladas añadiendo 4 volúmenes de metanol frío enriquecido en metabolitos no

detectados en extractos de suero humano no enriquecidos. Tras un breve *vortex*, las muestras fueron incubadas durante la noche a -20°C . Los sobrenadantes fueron recogidos tras centrifugación a $18.000 \times g$ durante 15 minutos, secados y reconstituidos en metanol antes de ser transferidos a viales de análisis UHPLC-MS (*ultrahigh pressure liquid chromatography-mass spectrometry*). Las condiciones de separación cromatográfica y detección por espectrometría de masas utilizadas fueron previamente descritas (349).

El pre-procesado de datos fue llevado a cabo utilizando el administrador de aplicaciones TargetLynx para el *software* MassLynx 4.1 (Waters Corporation). Las características de LC-MS (*liquid chromatography-mass spectrometry*) (definidas por los pares de tiempo de retención y las ratios masa/carga, R_t - m/z) incluidas en el estudio fueron identificadas previamente al análisis. La normalización de datos incluyó una calibración intra-lote (corrección de respuesta del instrumental a un patrón de referencia interno múltiple) e inter-lote (calibración externa en un punto entre lotes de la variable específica usando extractos repetidos de una muestra de suero comercial), siguiendo el procedimiento previamente descrito (350). Todos los cálculos fueron hechos usando el paquete estadístico R v.3.1.1 (R Development Core Team, 2011; <https://cran.r-project.org/>). Este estudio fue llevado a cabo en colaboración con la empresa OWL Metabolomics (Bilbao, España) y el grupo *Liver Metabolism*, BRTA CIC bioGUNE, Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBERehd) (Bilbao, España).

2. Procedimientos experimentales *in vivo*

2.1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Los procedimientos experimentales con animales incluidos en esta tesis fueron aprobados por el Comité Ético de la Universidad de Santiago de Compostela bajo responsabilidad de Rubén Nogueiras Pozo y registrados con los números de procedimiento 5005E/12/FUN01/FIS02/RNP2 (bajo el cumplimiento del RD 1201/2005 del 10 de octubre) y el ID 15010/17/007 (bajo el cumplimiento del actual y vigente RD 53/2013 del 1 de febrero) (Anexo 4). Estos procedimientos se han realizado bajo el amparo del marco legislativo vigente: Directiva 2010/63/UE del Parlamento y Consejo Europeo del 22 de septiembre de 2010 relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos; Real Decreto 53/2013, del 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia. El certificado de capacitación (según el orden ECC/566/2015) del autor de la tesis es CAP-T-0718-015, expedido por la Dirección General de Agricultura y Ganadería, de la Consejería de Medio Ambiente, Administración Local y Ordenación del Territorio (Anexo 5). El centro usuario autorizado en el que el autor de la tesis llevó a cabo la experimentación con animales fue el CEBEGA (Centro de Biomedicina Experimental, número de registro REGA ES150780292901), de la Universidad de Santiago de Compostela.

El uso de animales con fines científicos tiene unas implicaciones éticas que deben ser respetadas. Los diseños experimentales se llevaron a cabo considerando el principio de reemplazo, reducción y refinamiento. En esta tesis doctoral se han utilizado métodos alternativos (cultivos celulares) cuando ha sido posible, se ha evitado la duplicación innecesaria de experimentos, se han usado el menor número de animales posible para obtener los datos suficientes para resolver la cuestión experimental y se ha evitado el estrés, sufrimiento y la

angustia de los animales. Con el fin de reducir al máximo el número de animales utilizado, el dolor y angustia, se ha calculado el número mínimo de individuos a utilizar que nos permitan alcanzar nuestros objetivos, empleándose la herramienta web EDA (*Experimental Design Assis-tant, National Centre for the Replacement, Refinement and Reduction of Animals in Research*) para este cálculo.

2.2. ANIMALES Y DIETAS

Ratones C57BL/6 de 8 semanas de edad procedentes del Animalario Central de la Universidad de Santiago de Compostela fueron mantenidos en condiciones SPF (*specific-pathogen-free*), estables de temperatura ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$) en un ciclo de 12 horas de luz/oscuridad y con un periodo de aclimatación mínimo de 7 días previos a cualquier procedimiento. La asignación de los animales en los grupos experimentales se realizó de forma aleatoria. Los animales fueron mantenidos con acceso libre a agua y dieta estándar (Teklad Global 18% Protein Rodent Diet, Envigo), HFD (D12451, Research Diets), vHFD (*very high fat diet*, D12492, Research Diets), MCD (A02082002BR, 0% colina, suplementada o no con 0,1% en metionina, Research Diets) o CD-HFD (D05010402, Research Diets) durante los tiempos especificados. La composición calórica de macronutrientes para cada dieta aparece representada en la Tabla 2. La estabulación de los animales fue colectiva para preservar el comportamiento social de los animales, y se procedió a la aplicación de elementos de enriquecimiento ambiental cuando fue considerado necesario. Se valoró periódicamente su correcto aspecto físico y acostumarlos al manejo por parte del personal de laboratorio para reducir el estrés generado durante los experimentos. Se monitorizó periódicamente la masa corporal del animal y la ingesta de alimento: semanalmente en los ensayos crónicos, y diariamente durante los ensayos subcrónicos, a la misma hora. La determinación de la masa corporal e ingesta de alimento se realizó mediante una balanza de precisión. La ingesta de alimento se promedió en función del número de individuos por caja.

Composición	Dieta estándar (Teklad Global 18% Protein Rodent Diet)	HFD (D12451)	vHFD (D12492)	MCD (A02082002BR)	CD-HFD (D05010402)
Lípidos (%kcal)	6	45	60	21	45
Glúcidos (%kcal)	44	35	20	62	35
Proteínas (%kcal)	19	20	20	16	20
Total (kcal/g)	3,10	4,73	5,21	4,17	4,74
Metionina (% masa)	S	S	S	D (0 o 0,1%)	S
Colina (% masa)	S	S	S	D (0)	D (0)

2.1. ADMINISTRACIÓN INTRAPERITONEAL DE LPI

La administración ip no requiere anestesia; se realiza en la parte ventro-caudal del ratón por debajo del peritoneo. Se inmoviliza al animal por la espalda se inclina la cabeza ligeramente hacia abajo para prevenir la afeción de las vísceras durante el procedimiento y se inserta la aguja (25G 5/8", 300600, BD Medical Surgicals Systems) acoplada a una jeringa (303172, BD Medical Surgicals Systems) en el abdomen, a la altura de la línea de las rodillas, preferiblemente en el lado derecho del ratón. La aguja debe alcanzar una profundidad de 0,5 cm y debe ser insertada con un ángulo de 30° con respecto a la superficie del abdomen. En nuestros estudios con LPI (L7635, composición media 58% LPI(16:0), 42% LPI(18:0) y LPI(18:2), MERCK), ratones alimentados con dieta estándar recibieron la inyección i.p. de 0,5 mg/kg LPI durante 7 días, utilizando salino con 10% (v/v) DMSO (*dimethylsulfoxide*) como vehículo. La dosis fue seleccionada de estudios previos que muestran que parece ser una concentración cercana a la fisiológica y que no provoca cambios en peso corporal, ingesta de alimento ni composición corporal (289, 296, 327). También se administraron vía inyección ip el inhibidor farmacológico de ACC GS-0976 y el tetracloruro de carbono, como se explicará en los respectivos apartados.

2.2. PRODUCCIÓN DE LENTIVIRUS E INYECCIÓN EN LA VENA DE LA COLA

Tabla 2. Composición de las dietas utilizadas en los procedimientos experimentales con ratones. S (suplementada), D (deficiente)

2.2.1. Generación de partículas lentivirales

Las secuencias específicas de shARN para silenciar GPR55 o shARN control fueron diseñados usando la herramienta web de Genetic Perpetuation Platform (disponible en <https://portals.broadinstitute.org/gpp/public/>). Los oligos con dianas transcripcionales de interés fueron sintetizados y subclonados en vectores pLKO.1 puro GFP (*green fluorescent protein*) (Addgene). La producción de lentivirus fue llevada a cabo según lo previamente descrito (351). Brevemente, células HEK293T mantenidas en *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) con alta concentración de glucosa suplementado con 10% FBS (*fetal bovine serum*), 2 mM L-glutamina y 1% penicilina y estreptomicina fueron sembradas a una densidad de 8×10^6 células por placa de 150 mm para ser transfectadas 24 horas más tarde con PEI (*polyethylenimine*, 408727, Sigma-Aldrich) y 20 µg de plásmidos pLKO.shARNs junto con 10 µg de una mezcla de ensamblaje que contenía psPAX2 y pMD2.G. 24 horas después el medio de cultivo fue cambiado, y 4 horas y 72 horas post-transfección fueron recogidos los sobrenadantes, que contenían los virus. Las partículas lentivirales fueron concentradas usando unidades de filtración por centrifugación con tamaño de poro de 0,22 µm (UFC903024, Amicon). Las secuencias diana de los shARNs utilizados en este estudio fueron:

- shGPR55 #1: 5'-TCTGGTGAGGAACCGCTTTAT-3'
- shGPR55 #2: 5'-GCGAAAGGGCAGGGAATTTAG-3'
- shARN control: 5'-CCTAAGGTTAAGTCGCCCTCG-3'

Este procedimiento fue llevado a cabo en colaboración con el *Stem Cells & Human Diseases Lab*, Departamento de Fisiología, CiMUS, Universidad de Santiago de Compostela (Santiago de Compostela, España).

2.2.1. Inyección en la vena de la cola

La inyección en la vena de la cola o TVI (*tail vein injection*) es un método ampliamente utilizado y eficiente de administrar vectores virales dirigidos al hígado (352). Esta vía de administración no requiere anestesia, pero sí el uso de cepo (Tailveiner, TV-150, Bioseb) para inmovilizar al animal durante el procedimiento. Para poder maximizar el rendimiento de la inyección es necesario previamente dilatar la vena de la cola del ratón, en este caso se llevó a cabo mediante la aplicación directa de calor con lámpara de luz infrarroja durante 30 segundos aproximadamente. A continuación, inyectamos 100 μ l de lentivirus codificante de shARN control (1×10^9 UT/ml) o shGPR55 (mezcla 1:1 de shGPR55#1 y shGPR55#2, 1×10^9 UT/ml) con una jeringa con aguja acoplada (27G x 3/8", 305502, BD Medical Surgical Systems) sobre las venas laterales de la cola, de forma superficial y prácticamente paralela al eje longitudinal de la cola. La inyección debe realizarse lentamente para evitar la saturación de la vena. Una vez administrado, la aguja debe retirarse con cuidado para no provocar el sangrado, presionando la zona si se produce una ligera hemorragia. En el experimento donde se administró LPI en ratones alimentados con dieta estándar, la TVI fue llevada a cabo 3 semanas antes de la administración de LPI durante 7 días; en el estudio donde se alimentó a los ratones con vHFD durante 10 semanas, la TVI se realizó durante la semana 6; en el experimento donde se utilizó dieta MCD, la TVI fue llevada a cabo 4 semanas antes de comenzar a alimentarlos con la dieta MCD durante 4 semanas; en el experimento donde se usó el modelo de fibrosis en ratón de tetracloruro de carbono durante 6 semanas, la TVI fue realizada durante la semana 1. La eficiencia de silenciamiento génico lentiviral de GPR55 en el hígado fue establecida por PCR en tiempo real y *western blot*.

2.3. TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO DE GS-0976

GS-0976 (HY-16901, MedChemExpress), un inhibidor dual de ACC α y ACC β , fue administrado diariamente ip en dosis de 10 mg/kg durante 7 días consecutivos en ratón. La dosis y tiempo fueron elegidos en base a lo previamente descrito en la literatura científica, mostrando capacidad de inhibir la DNL y la acumulación de triglicéridos en el hígado (353). Estos animales recibieron el co-tratamiento de LPI o su vehículo durante el mismo periodo de tiempo.

2.4. MODELO DE FIBROSIS INDUCIDA POR TETRACLORURO DE CARBONO

El tetracloruro de carbono (06-3545, Strem Chemicals) fue administrado por inyección ip a una dosis de 0,6 ml/kg semanalmente durante 6 semanas. La dosis y tiempo aparecen recogidos en la literatura científica como ampliamente utilizados para generar fibrosis hepática en ratones (191, 199). Como vehículo, se utilizó aceite de maíz.

2.5. SACRIFICIO, RECOGIDA DE TEJIDOS Y MUESTRAS

Al final de los experimentos, los animales fueron sacrificados por decapitación. Se recogieron muestras de sangre del tronco y se mantuvieron a 4°C para posteriormente separar el suero. Se registró la masa del hígado de los ratones, así como de otros tejidos. Las muestras hepáticas fueron obtenidas preferentemente como sectores circulares procedentes del lóbulo lateral izquierdo y fueron rápidamente congeladas y almacenadas a -80°C hasta el momento del análisis. Para tinciones histológicas de muestras hepáticas que requieren fijación de la pieza en

parafina, porciones con forma de sección circular procedentes del lóbulo lateral izquierdo fueron introducidas en 4% paraformaldehído. Muestras de otros tejidos también fueron obtenidas para su posterior análisis.

2.6. AISLAMIENTO Y CULTIVO DE HEPATOCITOS Y CÉLULAS ESTELARES PRIMARIAS

Ratones alimentados con dieta estándar o MCD (suplementada con 0,1% de metionina) fueron anestesiados con isoflurano (1,5% de isoflurano en O₂). Tras abrir el abdomen, un catéter intravenoso (SR+OX2419C1, Terumo) fue insertado en la vena cava. El hígado fue perfundido con el *buffer A* (PBS -phosphate buffered saline- 5 mM EGTA) (37°C, oxigenado) y la vena porta fue cortada. A continuación, el hígado fue perfundido con el *buffer B* (PBS, 1mM CaCl₂, colagenasa tipo I (LS004196, Worthington) (37°C, oxigenado). Después de la perfusión, el hígado fue trasladado a una placa de cultivo que contenía *buffer C* (PBS, 2 mM CaCl₂, 0,6% BSA) y disgregado mecánicamente con un fórceps. El hígado ya digerido fue filtrado a través de una gasa estéril. A continuación, los hepatocitos primarios de ratón y las HSCs fueron aisladas según lo descrito (199). Los hígados fueron centrifugados a 48 x g durante 5 minutos. El sobrenadante fue descartado y los hepatocitos presentes en el pellet fueron resuspendidos en medio de cultivo fresco *Minimun Essential Medium* (MEM, Gibco) suplementado con 10% FBS, 100 U/ml penicilina, 100U/ml estreptomycin y 2 mM glutamina. Las HSCs fueron aisladas del sobrenadante por centrifugación en gradiente con Percoll Plus (17-5445-01, GE Healthcare) y adherencia selectiva. Este procedimiento fue llevado a cabo en colaboración con el *Liver Disease Lab*, BRTA CIC bioGUNE, Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBERehd) (Derio, Bizkaia, España).

3. Procedimientos experimentales *in vitro*

3.1. CULTIVOS CELULARES

3.1.1. THLE2

La línea celular THLE2 (CRL-2706, ATCC, *American Type Culture Collection*) presenta morfología epitelial y procede de la inmortalización con el *SV40 large tumor antigen* de hepatocitos no tumorales del lóbulo izquierdo de un humano adulto (354). Las THLE2 crecen en *Bronchial Epithelial cell Basal Medium* (BEBM, cc-3171, Lonza/Clonetic Corporation) suplementado con los factores de crecimiento *Bullekit* (excluyendo epinefrina y gentamicina/anfotericina, cc-3170, Lonza/Clonetics), 70 ng/ml de fosfoetanolamina (P0503, MERCK), 5 ng/ml de factor de crecimiento epidérmico (E9644, MERCK), 10% (v/v) FBS y 1% (v/v) solución de glutamina-penicilina-estreptomycin (G6784, MERCK). Este medio de crecimiento completo se conoce como *Bronchial Epithelial cell Growth Medium* (BEGM). Las células fueron mantenidas a 37°C con 5% CO₂. El subcultivo se produjo en ratios 1:3 – 1:4 y el medio fue renovado cada 48 horas durante la fase de mantenimiento. La adherencia de las células THLE2 depende del pretratamiento de las placas de cultivo durante 15 minutos con una mezcla de 0,01 mg/ml de fibronectina (33010-018, Gibco), 0,03 mg/ml de colágeno tipo I (sc-136157, Santa Cruz Biotechnology) y 0,01 mg/ml de BSA (*bovine serum albumin*, A4503 MERCK) disuelto en medio BEBM sin suplementar.

3.1.2. HepG2

La línea celular de hepatocitos HepG2 (85011430, ECACC, *European Collection of Authenticated Cell Cultures*) procede de la biopsia hepática de carcinoma hepatocelular bien diferenciado de un individuo caucásico. Estas células fueron mantenidas en crecimiento en monocapa usando *Minimum Essential Medium Eagle* (EMEM, M2279, MERCK) suplementado con 10% (v/v) FBS, 1% (v/v) solución de glutamina-penicilina-estreptomocina y 1% (v/v) aminoácidos no esenciales (M7145, MERCK) como medio de crecimiento. Las células fueron mantenidas a 37°C con 5% CO₂. El subcultivo se produjo en ratios 1:4 – 1:6 y el medio fue renovado cada 48 horas durante la fase de mantenimiento.

3.1.3. LX-2

La línea de HSCs humanas LX-2 (SCC064, MERCK) procede de la inmortalización de HSCs primarias con el *SV40 large tumor antigen* seguido de un cultivo selectivo (355), manteniendo propiedades clave de las HSCs (356). Como medio de crecimiento, se usó DMEM con alta concentración de glucosa (D5796, MERCK) suplementado con 2% (v/v) FBS y 1% (v/v) solución de glutamina-penicilina-estreptomocina. Las células fueron mantenidas a 37°C con 5% CO₂. El subcultivo se produjo en ratios 1:4 – 1:6 y el medio fue renovado cada 48 horas durante la fase de mantenimiento.

3.2. SILENCIAMIENTO GÉNICO

THLE2, HepG2 y LX-2 fueron transfectadas con *small-interference* ARN (siARN) para inhibir la expresión de los genes GPR55 y ACC α humanos. Específicamente hicimos uso de los diseños siGENOME SMARTPool (GPR55: M-005581-02; ACC α : L-004551-00-0005, Dharmacon). El grupo control fue administrado con la cantidad equivalente de siARN no dirigido (siGENOME Non-Targeting RNA Pool, D-001206-13-05, Dharmacon). Las secuencias diana de los siARNs utilizados en este estudio fueron:

- siGPR55 #1: 5'-GAGAACAGCUUUAUCGUA-3'
- siGPR55 #2: 5'-GAACAGGUGGCCCGAUUAU-3'
- siGPR55 #3: 5'-CAACAUGUCUGAUGAUACC-3'
- siGPR55 #4: 5'-GGAAGCAUCCUAUCUACA-3'
- siACC α #1: 5'-GAUGUGAGCCUGCGGAAUA-3'
- siACC α #2: 5'-CCACUUGGCUGAGCGAUUG-3'
- siACC α #3: 5'-GCAAUUAGAUUCGUUGUCA-3'
- siACC α #4: 5'-GAUCUUAGCGGACCAAUAU-3'
- siCTL #1: 5'-UAGCGACUAAACACAUCAA-3'
- siCTL #2: 5'-UAAGGCUAUGAAGAGAUAC-3'
- siCTL #3: 5'-AUGUAUUGGCCUGUAUUAG-3'
- siCTL #4: 5'-AUGAACGUGAAUUGCUCAA-3'

Los reactivos de transfección utilizados fueron Dharmafect 1 (T-2001-03, Dharmacon) para THLE2, TransIT-siQUEST (MIR2115, Mirus) para HepG2 o Lipofectamine 2000 (11668-019, Invitrogen) para LX-2. El protocolo utilizado fue el siguiente (volúmenes indicados para cada

pocillo de una placa de cultivo de 6 pocillos): 0,05 nmol de cada siARN diluidos en 200 μ l de optiMEM (31985070, Life Technologies) fueron mezclados con 6,5 μ l de Dharmafect 1 para THLE2 (7,5 μ l de TransIT-siQUEST para HepG2; 6 μ l de Lipofectamine 2000 para LX-2) diluidos en 193,5 μ l de optiMEM; esta mezcla (400 μ l) fue añadida a cada pocillo, donde se incorporó 1 ml de medio de crecimiento fresco, resultado en un volumen final de 1,4 ml por pocillo. Tras 8 horas de incubación a 37°C con 5% CO₂, el medio fue reemplazado por medio fresco de crecimiento, y las células fueron recogidas tras un total de 48 horas para comprobar la eficiencia de silenciamiento por PCR en tiempo real y/o *western blot*.

3.3. TRATAMIENTO DE LPI *IN VITRO*

1x10⁵ células THLE2 fueron sembradas en placas de 6 pocillos e incubadas en medio de crecimiento durante 24 horas. A continuación, se aspiró el medio y se añadió medio de crecimiento fresco suplementado con LPI (1 μ M o 10 μ M, según lo indicado en cada caso) utilizando en el grupo control el volumen equivalente de vehículo, es decir, PBS con 10% (v/v) DMSO. Las dosis de LPI fueron escogidas en base a lo recogido en la literatura como capaz de activar la cascada de señalización *downstream* de GPR55 y modular la expresión de marcadores de metabolismo lipídico en las células (279, 288, 296, 318). En los ensayos con células HepG2 se utilizaron 5x10⁵ células iniciales. Las células fueron expuestas a LPI durante 30 minutos, 1 hora o 6 horas y recogidas para extracción de ARNm y/o proteína. También fueron expuestas durante 24 horas para evaluar la acumulación de lípidos por tinción Bodipy y *Oil Red*, como se explicará más adelante. En los ensayos con células LX-2, se sembraron en placas de 6 pocillos 3x10⁵ células y, tras 24 horas, se trataron con LPI 10 μ M durante 1 y 12 horas para extracción de ARNm y/o proteína o durante 24 horas para tinción Bodipy.

3.4. ADMINISTRACIÓN DE TGF β 1

TGF β 1 es un potente activador de HSCs y un inductor de fibrosis (137). Las HSCs humanas LX-2 transfectadas con siARN GPR55, siARN ACC α o siARN control fueron incubadas con medio suplementado con TGF β 1 recombinante de humanos (100-21, PreproTech) a una concentración 8 ng/ml o vehículo (PBS) durante 24 horas, como previamente indicado (199). Después de eso, las células LX-2 fueron recogidas para extracción de ARNm.

3.5. TRATAMIENTO DE ÁCIDO OLEICO

El tratamiento con ácido oleico es ampliamente utilizado como un modelo de esteatosis hepática *in vitro*, siendo efectivo en la inducción de la acumulación de lípidos en los hepatocitos (357). Para el tratamiento de ácido oleico en THLE2 silenciando GPR55 se siguió el siguiente protocolo (volúmenes indicados para cada pocillo de una placa de cultivo de 6 pocillos):

- Día previo al ensayo:
 - Se atemperó el medio de crecimiento no suplementado con FBS.
 - Una vez atemperado, se procedió a la adición de componentes:
 - Medio con ácido oleico: medio libre de FBS suplementado con 1 mM ácido oleico (solución stock preparada como 1M ácido oleico en etanol; es decir, 1,5 μ l de 1 M ácido oleico en 1,5 ml de medio por pocillo) (O1383, MERCK), 1 mM KOH (ratio molar 1:1 entre

ácido oleico y KOH; es decir, 1,5 µl de 1 M KOH en 1,5 ml de medio por pocillo), y 0,05 mM BSA sin ácidos grasos (ratio molar 2:1 entre ácido oleico y BSA sin ácidos grasos; es decir, 50 mg de BSA sin ácidos grasos en 1,5 ml de medio por pocillo) (BSA-FAF-1U, Capricorn).

- Medio control: medio libre de FBS suplementado con etanol (vehículo del stock de ácido oleico), 1 mM KOH y 0,05 mM BSA sin ácidos grasos.

La secuencia de adición de los componentes es clave para una maximizar la solubilización del ácido oleico: 1) mezclar ácido oleico con la cantidad equimolar de KOH; 2) *vortex*; 3) resuspender la mezcla ácido oleico + KOH en el medio sin FBS ya atemperado y con la cantidad requerida de BSA sin ácidos grasos disuelta; 4) incubar el medio a 4°C durante la noche sin agitación para permitir que el ácido oleico forme complejos.

- Día del ensayo:
 - Se atemperaron los medios de cultivo con ácido oleico y control.
 - Se filtraron los medios de cultivo con ácido oleico y control (0,2 µm).
 - Se aspiró el medio de crecimiento de las células THLE2 (silenciando GPR55) y se reemplazó con medio de cultivo atemperado y fresco con ácido oleico o control.
 - Se incubaron las placas de cultivo a 37°C con 5% CO₂.
- Día siguiente:
 - Tras 24 horas de incubación con los medios con ácido oleico o control, se evaluó la acumulación de lípidos en células THLE2 silenciando GPR55 mediante tinción con *Oil Red*.

3.6. ESTUDIOS FUNCIONALES DE METABOLISMO LIPÍDICO

Estos estudios permiten evaluar el metabolismo de lípidos de los hepatocitos midiendo directamente el flujo metabólico a través de la ruta de DNL y la tasa de oxidación de ácidos grasos. Se sembraron 4×10^5 células HepG2 y se incubaron con medio de crecimiento. Las células fueron transfectadas con el siARN control o siARN GPR55 y, tras 6 horas, fueron mantenidas en medio fresco durante 36 horas. Entonces las células HepG2 fueron tratadas con 10 µM LPI o vehículo durante 12 horas. Los ensayos metabólicos fueron realizados en presencia de LPI o vehículo.

3.6.1. Lipogénesis *de novo*

Para análisis de DNL, las células fueron incubadas durante la noche en medio sin FBS suplementado con 0,5% (m/v) BSA sin ácidos grasos y glucosa a una concentración final de 22 mM (4 g/l) en presencia de LPI o vehículo. A continuación, las células fueron incubadas durante 4 horas con medio fresco suplementado con 100 nM insulina y 20 µM acetato con 20 µCi/ml [³H]-acetato (Perkin Elmer) en presencia de vehículo o LPI (358). Después de la incubación, las células fueron recogidas y lavadas cuatro veces con PBS frío (pH 7,4). Las células y el

medio fueron separados; los lípidos fueron extraídos y separados por cromatografía de capa fina (359). Las diferentes clases de lípidos fueron visualizados por exposición a vapor de yodo, se seleccionaron las bandas correspondientes y el marcaje incorporado a los lípidos fue determinado mediante recuento por centelleo, expresándolo en relación a la cantidad de proteína (360).

3.6.1. Oxidación de ácidos grasos

La tasa de oxidación de ácidos grasos fue determinada midiendo la cantidad de $^{14}\text{CO}_2$ (oxidación completa) y la cantidad de $^{14}\text{CO}_2$ marcada en metabolitos ácido-solubles (oxidación incompleta) liberada, como fue descrito previamente (361, 362). Las células fueron incubadas durante 4 horas con LPI o vehículo en medio suplementado con 0,5% (m/v) BSA libre de ácidos grasos formando complejos con 0,2 mM palmitato con 0,5 $\mu\text{Ci/ml}$ [$1\text{-}^{14}\text{C}$]-palmitato (Perkin Elmer). El medio fue entonces recogido en un tubo con papel de filtro *Whatman* humedecido con 0,1 M NaOH en la tapa. Se añadieron 500 μl de 3M ácido perclórico para liberar el CO_2 , que fue capturado en el papel de filtro. El medio acidificado fue centrifugado a 21.000 x g durante 10 minutos para eliminar la materia particulada. La radioactividad de CO_2 capturada por los papeles de filtro y la radioactividad de los metabolitos ácido-solubles (los sobrenadantes del medio de cultivo) fueron determinadas mediante recuento por centelleo, expresándolo en relación a la cantidad de proteína.

Estos estudios fueron llevados a cabo en colaboración con el grupo *Lipids & Liver*, Departamento de Fisiología, Universidad del País Vasco (Bilbao, España) y el Instituto de Investigación Biocruces (Bilbao, España).

3.7. MEDICIÓN DE CONSUMO DE OXÍGENO CELULAR

La respiración de las células HepG2 fue medida a 37°C por respirometría de alta resolución con XFp Extracellular Flux Analyzer (Seahorse Bioscience, Agilent Technologies). Este equipo permite medir en células vivas las tasas de consumo de oxígeno (OCR, *oxygen consumption rate*) y de acidificación del medio (ECAR, *extracellular acidification rate*), indicadores clave de la respiración mitocondrial y la glucólisis, respectivamente. Para las mediciones de OCR, expresadas como tasa de cambio de O_2 disuelto en el medio de cultivo, las células HepG2 fueron sembradas en una placa de cultivo multipocillo (*XFp cell culture microplate* 103022-100, Seahorse Bioscience, Agilent Technologies), utilizando 2×10^4 células por pocillo. Tras 6 horas para permitir la adhesión celular, el medio de crecimiento fue aspirado y reemplazado por medio de ensayo fresco y atemperado, específicamente medio DMEM pH 7,4 sin bicarbonato y baja capacidad de tamponamiento de pH (103575-100, Seahorse Bioscience, Agilent Technologies) suplementado con 1 mM piruvato sódico, 2 mM glutamina and 10 mM glucosa, e incubado a 37°C sin inyección de CO_2 . Tras el equilibrado los cultivos celulares en medio de ensayo durante 1 hora, se realizaron tres medidas basales de OCR. A continuación, se inyectó 10 μM LPI o vehículo y se monitorizó el OCR durante 6 horas. En el experimento con *etomoxir* (103260-100, Seahorse Bioscience, Agilent Technologies), un inhibidor específico de CPT1 y de la β -oxidación cuando es utilizado a bajas concentraciones (363), éste fue administrado a una concentración de 4 μM 15 minutos antes de comenzar las mediciones basales de OCR, siguiendo lo indicado por el fabricante. Los datos fueron corregidos por los valores de fondo de la placa de cultivo y por la cantidad de proteína y expresados como porcentaje de cambio de OCR con respecto a la última medición basal previa a la inyección aguda de LPI.

3.8. ENSAYOS DE PROLIFERACIÓN CELULAR

La evaluación de la proliferación *in vitro* fue llevada a cabo mediante el test de bromuro de 3(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio (MTT, M2003, MERCK). Se sembraron las células LX-2 a una densidad inicial de 1×10^5 células por pocillo en placas de 96 pocillos. Después de 24 horas, las células LX-2 fueron transfectadas con siARN GPR55, siARN ACC α o siARN control. 36 horas después, se administró 10 μ M LPI durante 12 horas. A continuación, se añadieron 100 μ l de una solución de 0,5 mg/ml MTT y las células se incubaron a 37°C. Tras 4 horas, se añadieron 100 μ l de solución de solubilización (0,01 M HCl, 10% SDS - *sodium dodecyl sulfate*) e incubaron a 37°C durante 8 horas, para finalmente medir la viabilidad celular de cada pocillo como densidad óptica a la longitud de onda de 570 nm con un equipo ThermoScientific Multiskan GO. La viabilidad celular en cada pocillo fue calculada fue expresada en porcentaje de proliferación frente al grupo control.

4. Técnicas analíticas

4.1. TINCIONES CITOLÓGICAS E HISTOLÓGICAS

4.1.1. *Oil Red*

Esta tinción específica de lípidos permite evaluar la esteatosis hepática. Las muestras de tejido hepático congelado fueron cortadas en secciones de 8 μ m con un criostato, fijadas en 4% paraformaldehído durante 2 horas y teñidas en solución *Oil Red* (MERCK) filtrado durante 20 minutos. Tras ser lavadas en agua destilada, las secciones fueron contrateñidas con hematoxilina de Harris durante 5 minutos y montadas con medio de montaje acuoso. En el caso de las tinciones de cultivos celulares de HepG2, THLE2 y LX-2, las células fueron sembradas sobre láminas circulares vidrio (633029, Carolina) que cubren la base de los pocillos en las placas de cultivo, tratadas previamente con poli-L-lisina (P8920, MERCK) a 37°C durante 15 minutos (en el caso de HepG2) o con colágeno (C3867, MERCK) a 37°C durante 10 minutos (en el caso de THLE2). Al terminar el experimento, las células fueron fijadas con 4% paraformaldehído durante 15 minutos y las láminas circulares de cristal fueron extraídas de las placas de cultivo y teñidas con solución *Oil Red*, siguiendo el protocolo previamente indicado.

4.1.2. *Bodipy*

La tinción de cultivos celulares con Bodipy 493/503 (4,4-Difluoro-1,3,5,7,8-Pentametil-4-Bora-3a,4a-Diaza-s-Indaceno; D3922, ThermoFisher) tiñe de color verde los lípidos, permitiendo en este estudio estudiar la acumulación de vesículas lipídica en el citoplasma de los hepatocitos. Las células HepG2 fueron sembradas sobre láminas circulares vidrio pre-tratadas con poli-L-lisina a 37°C durante 15 minutos. Una vez realizado el experimento, las células fueron incubadas con 16 μ g/ml Bodipy a 37°C durante 40 minutos, lavadas 3 veces con PBS y fijadas en 4% paraformaldehído. Las láminas de vidrio fueron montadas con medio de montaje acuoso Fluoro-Gel (17985-10, Ectron Microscopy Sciences) con 1:1000 DAPI (4,6-diamino-2-fenilindol) para teñir los núcleos de color azul.

4.1.3. Hematoxilina y eosina

Esta tinción histológica tiñe diferencialmente de azul y rosa las partes ácidas y básicas de las células, permitiendo analizar la estructura general del tejido, en este caso el hepático, y detectar esteatosis (microvesicular o macrovesicular), *ballooning*, infiltración de células inflamatorias y fibrosis, dependiendo de la intensidad de estas características y de la habilidad del observador (11). Las secciones de tejido fijadas en 4% paraformaldehído fueron deshidratadas tras 24 horas e incluidas en parafina. Se cortaron secciones de 4 μm con un microtomo y se trataron con xilol para eliminar los restos de parafina. Las secciones fueron expuestas a soluciones alcohólicas de concentración decreciente (100°, 95° y 70°). Las secciones fueron lavadas con agua destilada, se sumergieron en solución de hematoxilina (BioOptica) durante 10 minutos, se lavaron de nuevo y fueron sometidas a alcohol ácido. Se sumergieron 30 segundos en eosina (BioOptica). Después, las secciones fueron lavadas en agua destilada, deshidratadas, secadas a 37°C durante 30 minutos y montadas en medio de montaje permanente (sin alcohol y xileno).

4.1.4. Sirius Red

La tinción histológica de secciones de tejido con *Sirius Red*, específica de colágeno, permiten evaluar la fibrosis del tejido hepático. Las muestras fueron fijadas en parafina, cortadas, tratadas con xilol e hidratadas y tratadas con solución PicroSirius durante 1 hora. A continuación, se lavaron las muestras con agua destilada, se deshidrataron con etanol y se montaron en medio resinoso.

4.1.5. Inmunohistoquímica

La tinción inmunohistoquímica o IHC (*immunohistochemistry*) permite detectar sobre el tejido la presencia de la proteína de estudio. En este caso particular, la IHC de F4/80, proteína de superficie de membrana celular presente en macrófagos, permite estudiar la presencia de células de *Kupffer* y macrófagos infiltrados en el hígado (364), desencadenantes clave del proceso inflamatorio en NAFLD. Las muestras fueron fijadas en parafina, cortadas, desparafinadas, hidratadas, pre-tratadas con PTLINK TE *buffer* pH 9 y bloqueadas con 3% peroxidasa durante 10 minutos. Después, las secciones fueron incubadas con el anticuerpo primario (ab111101, Abcam) a una concentración 1:100 durante la noche y a temperatura ambiente, seguido de una incubación con el anticuerpo secundario (EnVision, DAKO) durante 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se usó revelador DAB durante 1 minuto y las secciones fueron contrateñidas con hematoxilina de Mayer durante 10 minutos, deshidratadas y montadas.

Los análisis histológicos se llevaron a cabo utilizando un microscopio óptico BX51 equipado con una cámara digital DP70 (Olympus), utilizando el objetivo 20X y 40X. Para la tinción fluorescente de Bodipy y DAPI, se usó un microscopio confocal Leica A0B5 equipado con una lente apocromática con plan de corrección de color de alta calidad para un objetivo confocal 63x/1.32. Se utilizó el *software* de microscopía confocal de Leica para adquisición y procesado. Las imágenes son combinaciones de secciones ópticas realizadas sobre el eje z a intervalos de 0,5 μm . Para el Bodipy, las células fueron excitadas a 492 nm con un láser y la emisión de fluorescencia fue adquirida en la banda de 414-479 nm.

En todos los estudios de tinciones histológicas de este trabajo se tomaron 4 microfotografías representativas por pocillo de cultivo o sección de hígado. Los lípidos en las tinciones Bodipy y *Oil Red*, los depósitos de colágeno en la tinción *Sirius Red*, y el área ocupada por los macrófagos F4/80 positivos fueron cuantificados con los programas ImageJ (versión 1.8, *National Institutes of Health*) y FRIDA (*Framework for Image Dataset Analysis*, Johns Hopkins University), y expresados como porcentaje de cambio sobre el grupo control. Además, los análisis de las tinciones de cultivos celulares incluyeron una corrección del área teñida por número de núcleos celulares presentes en cada campo.

4.2. CONTENIDO HEPÁTICO DE TRIGLICÉRIDOS EN EL HÍGADO

La cantidad de triglicéridos fue utilizada como medida de la esteatosis hepática en el hígado. El procedimiento de extracción de triglicéridos fue adaptada de métodos descritos previamente (365). Se añadió una mezcla 2:1 (v/v) de cloroformo:metanol a 4°C sobre 100 mg de tejido hepático. A continuación, se procedió a la homogeneización mecánica del tejido usando un TissueLyser II (Quiagen) durante 3 minutos a 25 RPMs (revoluciones por minuto). Este homogeneizado de tejido fue mantenido en agitación durante 3 horas a temperatura ambiente. Para la separación de fases, se añadió agua destilada, se centrifugaron las muestras y se recogió la fase orgánica. El solvente orgánico se evaporó completamente durante la noche en campana de extracción de gases a temperatura ambiente. La absorbancia de cada muestra fue entonces cuantificada por duplicado mediante espectrofotometría a 505 nm (1001310, Spinreact) con un equipo ThermoScientific Multiskan GO y se calculó el contenido de triglicéridos comparando los valores con los obtenidos para una recta patrón incluida en el propio kit. Los datos fueron corregidos por la masa de la pieza de tejido original, siendo presentados como mg de triglicéridos por g de tejido hepático.

4.3. CUANTIFICACIÓN DE MALONIL-COA HEPÁTICO

Los niveles de malonil-CoA, producto de la reacción catalizada por ACC, precursor de ácidos grasos en la ruta de DNL e inhibidor de la β -oxidación, fueron utilizados como un indicador de la actividad enzimática de ACC en el hígado. La cuantificación de malonil-CoA fue llevada a cabo con el *Mouse Malonyl coenzyme A ELISA Kit* (MBS705127, MyBioSource) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se homogeneizaron 30 mg de tejido en PBS, se centrifugaron las muestras a 5.000 x g a 4°C durante 5 minutos. El sobrenadante fue transferido a otro tubo y se calculó la concentración de proteína por el método de *Bradford*. Se utilizó el volumen correspondiente a 0,5 mg de extracto de proteína para los pasos de incubación secuencial en la placa de fondo plano de 96 pocillos proporcionada en el kit. La absorbancia fue leída a 450 nm con un equipo ThermoScientific Multiskan GO y el contenido de malonil-CoA fue calculado en base a lo proporcionado por la recta patrón, corrigiendo los datos por la masa de tejido inicial y expresándolos como nmol de malonil-CoA por g de tejido hepático.

4.4. DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE HIDROXIPROLINA

La hidroxiprolina es un aminoácido no proteínogénico formado por la modificación postraduccional de la prolina. La hidroxiprolina es un componente mayoritario del colágeno, sobre el que estabiliza la estructura en hélice. Ya que la hidroxiprolina aparece restringida en el colágeno, la medición de los niveles de hidroxiprolina es un indicador ampliamente utilizado de contenido de colágeno. En este proyecto, se midieron los niveles de hidroxiprolina en piezas

de tejido con el *Hydroxyproline Assay Kit* (MAK008, MERCK) siguiendo las instrucciones del fabricante. 10 mg de muestras hepáticas fueron hidrolizadas en 100 μ l de ácido hidroclicórico concentrado (12M) a 120°C durante 3 horas. A continuación, fueron sometidos a *vortex* y centrifugación a 10.000 x g durante 3 minutos. 50 μ l de sobrenadantes fueron transferidos a una placa de fondo plano y evaporados en campana de extracción de gases a temperatura ambiente durante la noche. Al día siguiente se añadieron secuencialmente 100 μ l de una mezcla de cloramina T y *buffer* de oxidación (incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente), y 100 μ l de reactivo DMAB, y se dejó incubando durante 90 minutos a 60°C. La absorbancia fue leída a 560 nm con un equipo ThermoScientific Multiskan GO y el contenido de hidroxiprolina calculado en base a una recta patrón. Los resultados fueron corregidos por la masa de tejido inicial y finalmente expresados como porcentaje de cambio sobre el grupo control.

4.5. CUANTIFICACIÓN DE METABOLITOS Y TRANSAMINASAS EN SUERO

Durante el sacrificio, se recogieron muestras de sangre del tronco en tubos de 1,5 ml y se mantuvieron a 4°C durante un máximo de 2 horas, para posteriormente ser centrifugadas a 6.000 x g durante 15 minutos a 4°C. Los sobrenadantes fueron transferidos a un nuevo tubo para obtener el suero. La presencia de hemólisis fue considerada un criterio de exclusión de muestras. Para la determinación cuantitativa de metabolitos en suero, se utilizaron kits comerciales basados en espectrofotometría, que fue medida con un equipo ThermoScientific Multiskan GO a las longitudes de onda indicadas por el fabricante en cada caso. Para medir los niveles de colesterol, se añadieron 200 μ l de una mezcla de reactivo 1 y reactivo 2 (4:1 v/v, 1001093, Spinreact) en 2 μ l de suero, se incubó a 37°C durante 5 minutos y se midió la absorbancia a 505 nm. El uso de una solución patrón incluida en el kit permitió la transformación de los valores de la absorbancia de cada muestra problema en la concentración de colesterol en suero, que fueron expresados como mg de colesterol por dl de suero. En el caso de los ácidos grasos libres (no esterificados), se añadieron 300 μ l del reactivo 1 (434-91795, DAKO) sobre 7 μ l de suero, se incubó a 37°C durante 3 minutos, después se añadieron 150 μ l del reactivo 2 (436-91995, WAKO), se incubó a 37°C durante 4 minutos y finalmente se leyó la absorbancia a 546 nm. El uso de una solución patrón (270-77000, WAKO), permitió la transformación de los valores de la absorbancia de cada muestra en la concentración de ácidos grasos libres en suero, que fueron expresados como mg de ácidos grasos por dl de suero. Para la medición de triglicéridos se añadió sobre la muestra de suero (2 μ l de suero) una mezcla de reactivo 1 y reactivo 2 (4:1 v/v, 1001310, Spinreact), se incubó a 37°C durante 5 minutos y se midió la absorbancia a 505 nm. El uso de una solución patrón incluida en el kit permitió la transformación de los valores de la absorbancia de cada muestra en la concentración de triglicéridos en suero, que fueron expresados como mg de triglicéridos por dl de suero. La cuantificación de transaminasas ALT y AST en suero fue medida añadiendo 3 μ l de muestra de suero y 200 μ l de una mezcla de reactivo (ALT 41283, Spinreact) (AST 41273, Spinreact), incubando a 37°C y leyendo la absorbancia cada minuto durante un mínimo de 3 minutos, calculando posteriormente la tasa de cambio de absorbancia por minuto y por tanto la tasa de transformación de sustrato por minuto de la enzima transaminasa estudiada en el suero.

4.6. PCR A TIEMPO REAL

Los niveles de expresión de ARNm en extractos celulares o piezas de tejido fueron determinados cuantitativamente por PCR en tiempo real.

4.6.1. Extracción de ARN

El proceso completo de extracción de ARN se llevó a cabo a 4°C. Se añadieron 650 µl de Trizol (15596018, Invitrogen) sobre fragmentos de tejido congelado de aproximadamente 50 mg en un tubo de 2 ml y se homogeneizaron mecánicamente con TissueLyser II (Quiagen) durante 3 minutos. En el caso de extractos celulares, una vez terminado el experimento se aspiró el medio, se lavaron los pocillos con PBS a 4°C y se añadió 1 ml de Trizol, siendo transferido a nuevos tubos con la ayuda de una micropipeta y luego a *vortex* para homogeneizar los extractos celulares. En ambos casos, se centrifugaron los homogeneizados a 10.000 x g durante 10 minutos y se transfirieron los sobrenadantes a nuevos tubos, se añadieron 250 µl de cloroformo, se mezclaron vigorosamente y se centrifugaron de nuevo las muestras a 10.000 x g durante 15 minutos. Se transfirieron las fases acuosas (ARN) a nuevos tubos, se añadieron 3 volúmenes de 2-propanol y las mezclas resultantes se mantuvieron 10 minutos a -20°C. Después, se centrifugaron las mezclas a 10.000 x g durante 10 minutos y se desecharon los sobrenadantes. Los *pellets* (ARN) se lavaron con 70% (v/v) etanol, se eliminaron cuidadosamente los restos de alcoholes y finalmente se resuspendieron en 300 µl de H₂O 0,1% dietilpírocarbonato (DEPC) calentando las muestras a 60°C. La determinación de la concentración de ARN presente en cada muestra se realizó con un espectrofotómetro de gota en pedestal (NanoDrop 2000, ThermoScientific) siguiendo las instrucciones del fabricante. Una vez cuantificado el ARN, se prepararon alícuotas de concentración 0,01 µg/µl para cada muestra.

4.6.1. Retrotranscripción

A partir del ARN extraído se generaron las formas de complementarias de ADN (ADNc). El volumen de los reactivos utilizados se corresponde con un volumen de reacción de 30 µl:

- 10,00 µl de muestra de 0,01 µg/µl ARN
- 3,58 µl de H₂O 0,1% DEPC.
- 6,00 µl de 100 mM dNTPs (dTTp, dCTp, dGTP, dATp) (10297-018, Invitrogen).
- 1,50 µl de 25 mM MgCl₂ (A351B, Promega).
- 1,00 µl de 200 U/µl M-MLV (28025013, ThermoFisher)
- 0,25 µl de 40 U/µl ARNse OUT (10777-019, Invitrogen).
- 0,17 µl de 3 µg/µl Random Primer Mix (48190011, Invitrogen).

Las condiciones de PCR (*polymerase chain reaction*) fueron las siguientes: 25°C durante 10 minutos; 37°C durante 50 minutos; 70°C durante 15 minutos.

4.6.1. PCR a tiempo real

Una vez obtenido el ADNc, se cuantificaron los niveles de ARNm de los diferentes genes mediante PCR en tiempo real con el equipo 7500 Real Time PCR System (Applied BioSystems) siguiendo las instrucciones del fabricante. Específicamente, se usó la técnica de PCR en tiempo real conocida como *SYBR Green*. Los pares de *primers* específicos para cada gen y especie estudiada aparecen reflejados en la Tabla 3. El volumen de los reactivos utilizados se corresponde con un volumen de reacción de 12 µl:

- 6,00 µl de *Precision PLUS qPCR Master Mix with ROX at a reduced level premixed with SYBR Green* (PPLUS-LR-SY, PrimerDesign).

- 3,28 µl de H₂O 0,1% DEPC.
- 0,36 µl 10 µM *primer* directo (EurofinsDNA).
- 0,36 µl 10 µM *primer* reverso (EurofinsDNA).
- 2 µl de muestra de ADNc.

Las condiciones de PCR fueron las siguientes: 1) 95°C durante 3 minutos; 2) 40 ciclos de 95°C durante 5 segundos + 60°C durante 32 segundos; 3) Fase de disociación (95°C durante 15 segundos, 60°C durante 1 minuto, 95°C durante 15 segundos).

Todas las muestras fueron sometidas a PCR en tiempo real por duplicado. Se usaron controles negativos de las reacciones, que contenían todos los reactivos excepto las muestras, para asegurarse de la especificidad de la amplificación por PCR. Los resultados fueron corregidos por los niveles ARNm del gen de expresión constitutiva HPRT (*hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1*) y representados como porcentaje de expresión frente al grupo control.



Espece y nombre	Secuencia de los <i>primers</i> 5' → 3'
<i>Homo sapiens</i> ACC α	Directo ACCACCAATGCCAAAGTAGC Reverso CTGCAGGTTCTCAATGCAAA
<i>Homo sapiens</i> ACTA2	Directo TTCAATGTCCCAGCCATGTA Reverso GAAGGAATAGCCACGCTCAG
<i>Homo sapiens</i> Colágeno 1 α 1	Directo GCTCGTGGAAATGATGGTGC Reverso ACCCTGGGGACCTTCAGAG
<i>Homo sapiens</i> Colágeno 1 α 2	Directo GCAGGAGGTTTCGGCTAAGT Reverso CAGACTCCTTGTGTGTCGAGA
<i>Homo sapiens</i> GPR55	Directo AAGAACCCACAGACCAGGTG Reverso CTCTGCCCAAGACACTCTCC
<i>Homo sapiens</i> HPRT	Directo ACCCCACGAAGTGTTGGATA Reverso AAGCAGATGGCCACAGAACT
<i>Homo sapiens</i> TGF β 1	Directo GGACCAGTGGGGAACACTAC Reverso AGAGTCCCTGCATCTCAGAGT
<i>Mus musculus</i> Colágeno 1 α 1	Directo CCTAATGCTGCCTTTTCTGC Reverso ATGTCCCAGCAGGATTTGAG
<i>Mus musculus</i> Colágeno 1 α 2	Directo CCGTGCTTCTCAGAACATCA Reverso CTTGCCCCATTTCATTTGTCT
<i>Mus musculus</i> GPR55	Directo AGTCCATATCCCCACCTTCC Reverso AGGGAGAGCACCAGCAGTAA
<i>Mus musculus</i> HPRT	Directo AAGCTTGCTGGTGAAAAGGA Reverso TTGCGCTCATCTTAGGCTTT
<i>Mus musculus</i> IL-6	Directo AGTTGCCTTCTTGGGACTGA Reverso TCCACGATTTCCAGAGAAC
<i>Mus musculus</i> α SMA	Directo CTGACAGAGGCACCACTGAA Reverso CATCTCCAGAGTCCAGCACA
<i>Mus musculus</i> SREBP1	Directo GCGGCTGTTGTCTACCATAAG Reverso TGTTGCCATGGAGATAGCATCTC
<i>Mus musculus</i> TGF β 1	Directo TTGCTTCAGCTCCACAGAGA Reverso TGGTTGTAGAGGGCAAGGAC
<i>Mus musculus</i> TNF α	Directo AGCCCCCAGTCTGTATCCTT Reverso CTCCCTTTGCAGAACTCAGG

Tabla 3. Secuencia de *primers* utilizados para análisis de expresión génica.

4.7. WESTERN BLOT

Los niveles de la proteína de estudio en extractos celulares o piezas de tejido fueron determinados cuantitativamente por la técnica de *western blot*, siguiendo lo previamente descrito (348, 366, 367).

4.7.1. Extracción de proteínas

El proceso completo de extracción de proteínas se llevó a cabo a 4°C. Se añadió 1 ml de *buffer* de lisis sobre fragmentos de tejido congelado de aproximadamente 50 mg en tubos de 2 ml y se homogeneizaron mecánicamente con un TissueLyser II (Quiagen) durante 5 minutos. En el caso de extractos celulares, una vez terminado el experimento se aspiró el medio, se lavaron los pocillos con PBS a 4°C y se añadió *buffer* de lisis, siendo transferido a nuevos tubos con la ayuda de una micropipeta y un *Cell Scraper* (353086, Corning), luego los extractos celulares fueron homogeneizados mediante *vortex*. Los componentes del *buffer* de lisis disueltos en H₂O destilada son los siguientes:

- 50 mM Tris-HCl pH 7,5 (Trizma base T6066, MERCK)
- 1 mM EGTA (E3889, MERCK)
- 1 mM EDTA (E9884, MERCK)
- 1% (v/v) Triton X-100 (X100, MERCK)
- 1 mM ortovanadato sódico (S6508, MERCK)
- 50 mM fluoruro sódico (S7920, MERCK)
- 5 mM pirofosfato sódico (221368, MERCK)
- 0,27 M sacarosa (84097, MERCK)
- 1 mM fluoruro de fenilmetilsulfonio (P7626, MERCK)
- 1 pastilla cóctel de inhibidores de proteasas (11836145001, ROCHE) por cada 50 ml de *buffer* de lisis.

A continuación, se centrifugaron los homogeneizados a 12.000 x g durante 20 minutos y se transfirieron los sobrenadantes a nuevos tubos, evitando la película de lípidos que se forma en la parte superior del sobrenadante. En el caso de hígados con esteatosis, este paso de centrifugación se repitió las veces necesarias hasta eliminar por completo la presencia de la mencionada película lipídica.

4.7.1. Cuantificación de proteína

La cuantificación de proteínas en los extractos se llevó a cabo mediante el método de *Bradford* (*Protein Assay Kit*, Bio-Rad), siguiendo las indicaciones del fabricante. Diluciones de los extractos de proteínas fueron mezcladas con la solución Bradford, incubadas a 37°C durante 5 minutos y posteriormente se midió la absorbancia a 590 nm por duplicado con un equipo ThermoScientific Multiskan GO. La concentración de cada muestra fue calculada en relación a los valores de absorbancia obtenidos en una recta patrón de BSA. Se prepararon alícuotas de 16 µl que contenían 20 µg para cada muestra (10 µg en el caso de extractos de cultivos celulares) utilizando *buffer* de *Laemmli* y se calentaron a 95°C durante 5 minutos. La composición del *buffer* de *Laemmli* (en H₂O destilada) es la siguiente:

- 250 mM Tris-HCl pH 6,7

- 50% (v/v) glicerol (G5516, MERCK)
- 10% (m/v) SDS (L4509, MERCK)
- 5% (v/v) β -mercaptoetanol (M3148, MERCK)
- 0,0005% (m/v) azul de bromofenol (8122, MERCK)

4.7.2. Electroforesis SDS-PAGE

La separación de las proteínas presentes en los extractos en función de su peso molecular fue llevada a cabo mediante SDS-PAGE (*polyacrylamide gel electrophoresis*). Los geles, de 15 pocillos y porcentaje variable en función del tamaño de las proteínas de estudio en cada caso, fueron preparados a mano en dos partes:

- Gel concentrador:
 - 4,10 ml H₂O destilada
 - 1,00 ml 30% acrilamida/Bis 29:1 (1610156, Bio-Rad)
 - 0,75 ml 1 M Tris-HCl pH 6,8
 - 0,06 ml 10% (m/v) SDS
 - 0,06 ml persulfato amónico (A3678, MERCK)
 - 6 μ l TEMED (*tetramethyl-ethylenediamine*) (T9281, MERCK)
- Gel separador (ejemplo: 8%):
 - 11,50 ml H₂O destilada
 - 6,70 ml 30% acrilamida/Bis 29:1
 - 6,30 ml 1 M Tris-HCl pH 8,8
 - 0,25 ml 10% (m/v) SDS
 - 0,25 ml persulfato amónico
 - 15 μ l TEMED

Alternativamente, en ciertos casos se usaron geles comerciales (5671105, Bio-Rad) de 25 pocillos. Los geles, colocados en un equipo Mini-PROTEAN Tetra Cell (165-8004, Bio-Rad) se sumergieron en *buffer* de electroforesis, y se cargaron 16 μ l de cada muestra en los pocillos del gel. En el primer pocillo de todos los geles se cargó el marcador de peso molecular (*Precision Plus Protein Standards-Dual Color*, Bio-Rad). Las condiciones de electroforesis fueron: voltaje constante de 120 V aplicados con un equipo *PowerPac HC High Current Power Supply* (164-5052, Bio-Rad) durante 1-2 horas. La composición del *buffer* de electroforesis (en H₂O destilada) es la siguiente:

- 200 mM Tris-HCl
- 20 mM glicina (G7126, MERCK)
- 1% (m/v) SDS

4.7.3. Transferencia semi-húmeda

Las proteínas fueron transferidas a membranas de polifluoruro de vinilideno (PVDF, 1620177, Bio-Rad) mediante un equipo *Trans-blot Semi-Dry Transfer Cell* (170-3940, Bio-

Rad) y utilizando papel de transferencia (*Extra Thick Blot Paper*, Bio-Rad) y *buffer* de transferencia de composición (en H₂O destilada):

- 40 mM Tris-HCl
- 40 mM glicina
- 0,36% (m/v) SDS
- 20% (v/v) metanol (414816, Carlo Erba Reagents)

Las condiciones de electroforesis fueron: amperaje constante 0,8 mA/ cm² aplicados con un equipo *PowerPac HC High Current Power Supply* durante 1 hora y 40 minutos.

4.7.4. Inmunodetección de proteínas

Tras la transferencia de las proteínas a membranas de PVDF, éstas se incubaron en una solución 5% (m/v) BSA en *buffer* de lavado TBS-T en agitación a temperatura ambiente durante 1 hora. La composición del *buffer* de lavado TBS-T es la siguiente (en H₂O destilada):

- 20 mM Tris-HCl
- 146 mM NaCl
- 0,1% (v/v) Tween-20 (P9416, MERCK)

A continuación, las membranas se incubaron con una solución 3% (m/v) BSA en *buffer* de lavado TBS-T que contiene el anticuerpo primario específico de la proteína de estudio (Tabla 4) a una concentración 1:1.000 o 1:5.000 (según las indicaciones del fabricante), en agitación a 4°C durante la noche. Al día siguiente, las membranas fueron lavadas con *buffer* de lavado TBS-T, tres veces durante 5 minutos. Entonces se incubaron las membranas con una solución 3% (m/v) BSA en *buffer* de lavado TBS-T que contiene el anticuerpo secundario específico (Tabla 4) para el anticuerpo primario utilizado, a una concentración 1:5.000, en agitación y a temperatura ambiente durante 1 hora. Los anticuerpos secundarios utilizados están asociados a la enzima peroxidasa. Después del lavado de membranas con *buffer* de lavado TBS-T, tres veces durante 5 minutos, se procedió a la incubación con una mezcla 1:1 de sustrato de la peroxidasa y potenciador de la quimioluminiscencia (*Pierce ECL western blot substrate*, Thermo Scientific) durante 5 minutos en oscuridad. Inmediatamente después se colocaron las membranas en un casete de autorradiografía (Hypercassette, Amersham Biosciences) y se expusieron a películas fotográficas (FujiMedical X-Ray Film Super RX, Fujifilm Corporation) en oscuridad durante un tiempo variable, siendo finalmente reveladas utilizando reactivo revelador (G150, Developer/Replenisher, Agfa-Gevaert Group) y reactivo fijador (G354, Manual Fixing Bath, Agfa-Gevaert Group). Las imágenes de las películas fotográficas fueron digitalizadas con un escáner de alta resolución (resolución 400-800 ppp, CanonScan 9900F, Canon).

La determinación semicuantitativa de señal se realizó midiendo la densidad óptica con el *software* ImageJ y permitió asociar a cada señal la cantidad de proteína presente en la muestra. Los valores obtenidos en cada muestra para la proteína de estudio fueron corregidos por la densidad óptica de la región adyacente a la señal de cada muestra en las películas fotográficas, y por los niveles de proteína del gen de expresión constitutiva GAPDH (*glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*) o α -tubulina. Los resultados fueron expresados como porcentaje de niveles de proteína frente al grupo control.

Proteína	Fabricante (número de catálogo)	Reactividad	Dilución
Acetyl-Coa Carboxylase, ACC	Abcam (Ab45174)	Conejo, monoclonal	1:1.000
Phospho- acetyl-Coa Carboxylase (Ser 79), pACC	Cell Signaling (3661)	Conejo, policlonal	1:1.000
Phospho-AMPK α (Thr172)	Cell Signaling (2535)	Conejo, monoclonal	1:1.000
Carnitine Palmitoyltransferase 1A, CPT1A	Abcam (Ab128568)	Ratón, monoclonal	1:1.000
Cleaved caspase 3	Cell Signaling (9664)	Conejo, monoclonal	1:1.000
Cleaved caspase 7	Cell Signaling (9491)	Conejo, policlonal	1:1.000
Phospho- EIF2 α (Ser 52)	Santa Cruz Biotechnology (Sc-101670)	Conejo, policlonal	1:1.000
Fatty Acid Synthase, FAS	Abcam (b128870)	Conejo, monoclonal	1:1.000
Glyceraldehyde 3- phosphate dehydrogenase, GAPDH	Merck (CB1001)	Ratón, monoclonal	1:5.000
GPR55	Abcam (Ab203663)	Conejo, policlonal	1:1.000
Phospho- IRE1 (Ser 724)	Novus Biologicals (NB100-2323)	Conejo, policlonal	1:1.000
Lipoprotein lipase, LPL	Santa Cruz Biotechnology (Sc-32885)	Conejo, policlonal	1:1.000
Phospho- PERK (Thr 981)	Santa Cruz Biotechnology (Sc-32577)	Conejo, policlonal	1:1.000
Sterol Regulatory Element-Binding Transcription Factor 1, SREBP1	Abcam (ab3259)	Ratón, monoclonal	1:1.000
α -Tubulina	Merck (T5168)	Ratón, monoclonal	1:5.000
X-box binding protein 1 spliced isoform, XBP1s	Santa Cruz Biotechnology (Sc-7160)	Conejo, policlonal	1:1.000
Anti-Mouse Immunoglobulins/HRP (anticuerpo secundario)	DAKO (P0260)	Conejo, monoclonal	1:5.000
Anti-Rabbit Immunoglobulins/HRP (anticuerpo secundario)	DAKO (P0448)	Cabra, monoclonal	1:5.000

Tabla 4. Anticuerpos utilizados para *western blot*.

5. Análisis de datos y estadística

Los datos obtenidos en los experimentos fueron analizados mediante el programa estadístico *Prism Software Version 6.0* (GraphPad). Los datos aparecen expresados como media \pm error estándar de la media. El tamaño muestral de cada grupo experimental aparece detallado en los pies de figura del apartado Resultados. Se excluyeron las muestras y/o animales cuyo valor se desviaba más de 2 veces la desviación estándar. En todos los análisis, se consideraron significativos (*) los resultados con una $p < 0,05$; muy significativos (**) con una $p < 0,01$ y extremadamente significativos (***) con $p < 0,001$. Para el test de normalidad de la distribución de los datos, se utilizó el test Shapiro-Wilks cuando $n \geq 7$ y el test de Kolmogorov-Smirnov cuando $n < 6$. En base a lo obtenido es este test, se aplicaron tests paramétricos (distribución normal) o no paramétricos:

- Prueba T de student. Compara las medias de dos poblaciones desapareadas asumiendo que siguen una distribución normal.
- ANOVA. Se utilizó el test el análisis de la varianza (ANOVA) para determinar si había diferencia entre las medias de tres o más grupos experimentales asumiendo una distribución normal. En caso de aceptar la hipótesis alternativa que indica que sí hay diferencias entre las medias, se realizó un test post-hoc de Bonferroni para comprobar qué medias son las que causaron significación.
- Test Mann-Whitney. Permite comparar la media de dos poblaciones que no siguen una distribución normal.
- Test Krustal-Wallis. Fue la prueba utilizada para realizar comparaciones entre múltiples poblaciones que no siguen una distribución normal. Posteriormente se aplicó el test de Dunn para determinar entre qué grupos existían diferencias significativas.

En los estudios con pacientes humanos, se evaluó la relación lineal entre las variables niveles de ARNm de GPR55 e IMC (cohorte 1), así como entre expresión de GPR55 y puntuación NAS (cohorte 2) mediante el test de correlación de Pearson, paramétrico.



RESULTADOS





1. El sistema LPI/GPR55 está desregulado en NAFLD en humanos y ratones

1.1. GPR55 ESTÁ SOBREEXPRESADO EN HÍGADO HUMANOS CON NAFL Y NASH

Análisis de biopsias hepáticas de pacientes obesos (IMC > 35 kg/m²) con diferentes grados de NAFLD revelaron una elevada expresión de ARNm de GPR55 en comparación con no obesos sin NAFLD (Figura 6A). Los niveles de GPR55 están similarmente aumentados en pacientes con sólo NAFL y en aquéllos con NASH frente al grupo de individuos sin daño hepático (Figura 6B). Los niveles de GPR55 hepático no se correlacionan con el índice de masa corporal, sugiriendo que su expresión podría ser independientemente del factor obesidad (Figura 6C). La caracterización de estos pacientes (cohorte 1) se muestra en la tabla 5.

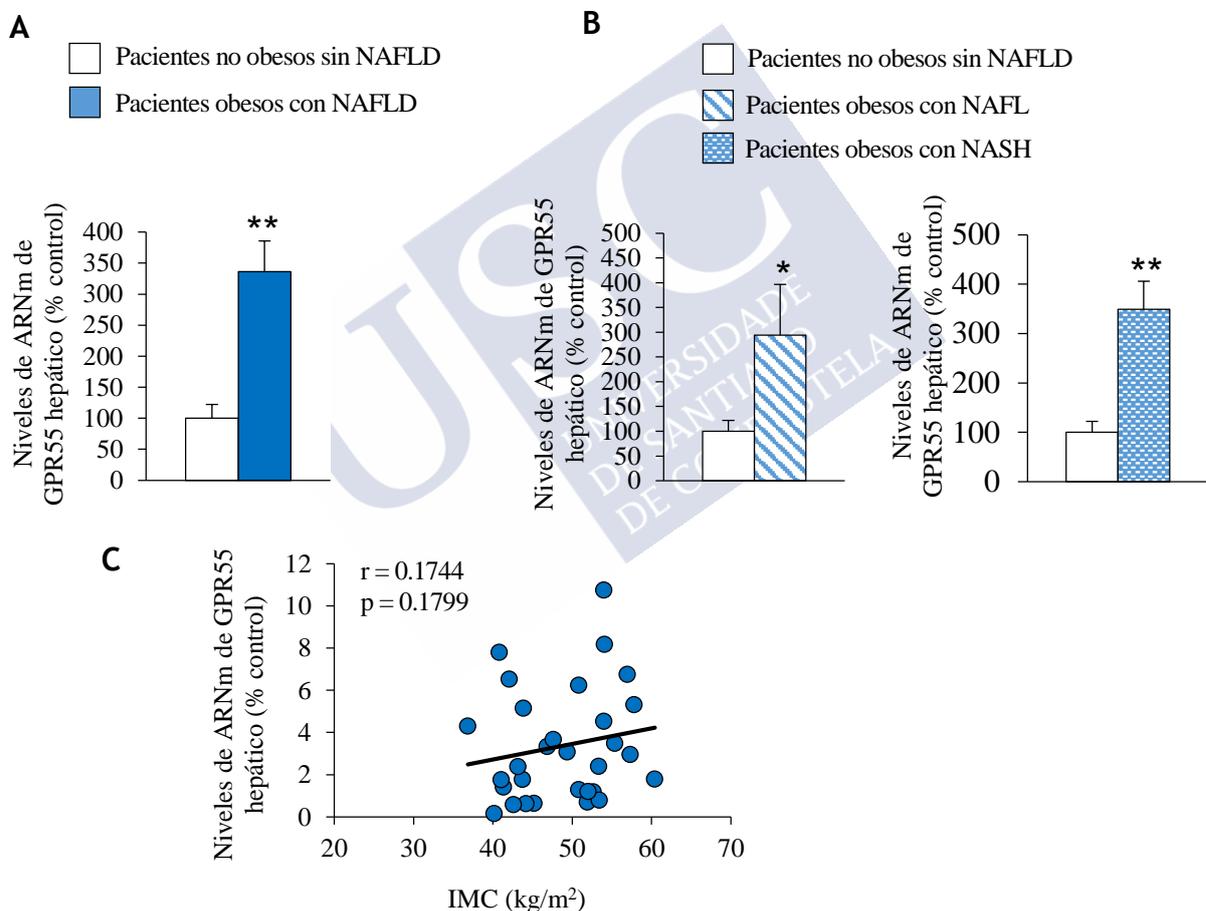


Figura 6. Niveles de GPR55 en pacientes obesos con NAFLD. Niveles de ARNm de GPR55 en el hígado de pacientes no obesos sin NAFLD (n=11) y de pacientes obesos con NAFLD, ya sea agrupados (A) (n=35) o considerando los estadios NAFL (n=8) y NASH (n=27) en dos grupos diferentes (B). (C) Correlación entre expresión hepática de GPR55 e IMC en pacientes obesos con NAFLD (n=35) (test de correlación de Pearson). Los pacientes estudiados forman parte de la cohorte 1. HPRT fue utilizado para normalizar los niveles de ARNm. Los datos están representados como media ± error estándar de la media. Las diferencias estadísticas están indicadas como *p<0,05, **p<0,01.

Variable	Controles (n=11)	Pacientes obesos con NAFLD (n=35)	P valor
Edad (años)	50,4 (17,5)	43,7 (11,4)	0,140
Ratio hombres: mujeres	7:4	29:9	0,451
Hipertensión (n)	2 (18,2)	15 (39,5)	0,287
Diabetes mellitus (n)	0 (0)	8 (21,1)	0,172
IMC (kg/ m ²)	27,2 (4,24)	49,2 (6,9)	<0,001***
Niveles de glucosa en sangre en ayuno (mg/dl)	93,67 (14,3)	104,2 (34,4)	0,376
AST (IU/l)	21,0 (3,8)	24,8 (13,4)	0,137
ALT (IU/l)	28,4 (12,6)	30,8 (17,6)	0,703
Bilirrubina (mg/dl)	0,9 (0,27)	0,43 (0,2)	0,383
Total colesterol (mg/dl)	207,0 (37,3)	199,1 (33,6)	0,563
Triglicéridos (mg/dl)	97,6 (38,3)	129,9 (50,0)	0,096
LDL-colesterol (mg/dl)	124,8 (36,0)	118,7 (35,6)	0,668
HDL-colesterol (mg/dl)	62,7 (18,5)	49,0 (13,2)	0,020*
NAS	0	4,9 (1,5)	<0,001***
Esteatosis	0	2,1 (0,9)	<0,001***
Lobular inflamación	0	1,6 (0,8)	<0,001***
<i>Ballooning</i>	0	1,4 (0,6)	<0,001***

Tabla 5. Características de pacientes obesos y controles no obesos utilizados para medir los niveles de ARNm de GPR55 hepático (cohorte 1). Las variables están representadas como media (\pm error estándar de la media) o frecuencia absoluta (porcentaje). Las diferencias estadísticas están indicadas como *P<0,05, ***P<0,001.

Además, se estudió la expresión de GPR55 en otra cohorte de pacientes en la que los pacientes con y sin NAFLD presentaban un IMC < 30 kg/m². Los niveles de mRNA de GPR55 están significativamente aumentados en los pacientes con NAFLD en comparación con los que no lo exhiben (Figura 7A). Considerando los individuos con NAFLD en función del estadio de la enfermedad, tanto aquellos que padecen NAFL como los que sufren NASH presentan mayor expresión de GPR55 que el grupo control (Figura 7B). Existe una correlación positiva entre niveles de mRNA de GPR55 y la puntuación NAS en los pacientes de esta cohorte (Figura 7C). La caracterización de los pacientes (cohorte 2) se muestra en la tabla 6.

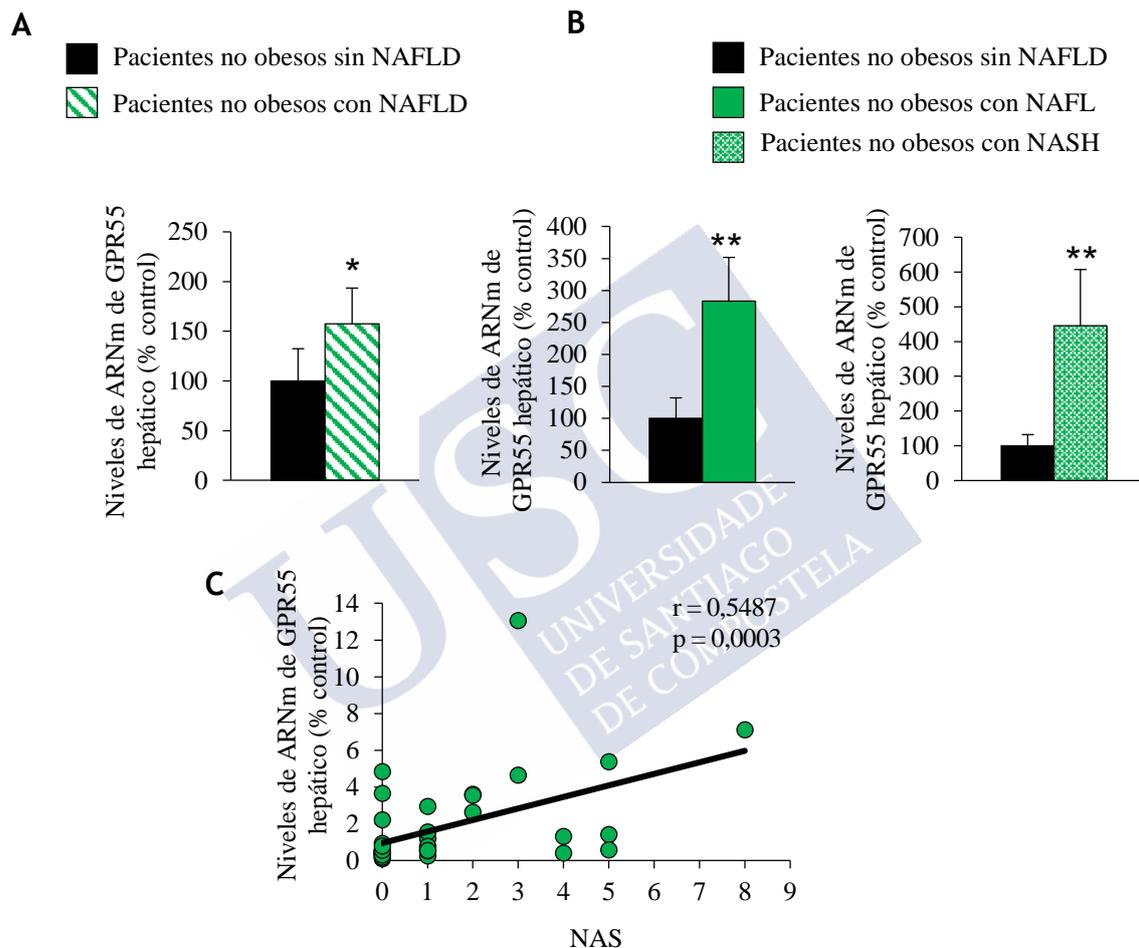


Figura 7. Niveles de GPR55 en pacientes no obesos con NAFLD. Niveles de ARNm de GPR55 en el hígado de pacientes no obesos sin NAFLD (n=18) y con NAFLD, ya sea agrupados (A) (n=21) o considerando los estadios NAFL (n=13) y NASH (n=8) en dos grupos diferentes (B). (C) Correlación entre expresión hepática de GPR55 y NAS en pacientes obesos con NAFLD (test de correlación de Pearson) (n=39). Los pacientes estudiados forman parte de la cohorte 2. HPRT fue utilizado para normalizar los niveles de ARNm. Los datos están representados como media ± error estándar de la media. Las diferencias estadísticas están indicadas como *p<0,05, **p<0,01.

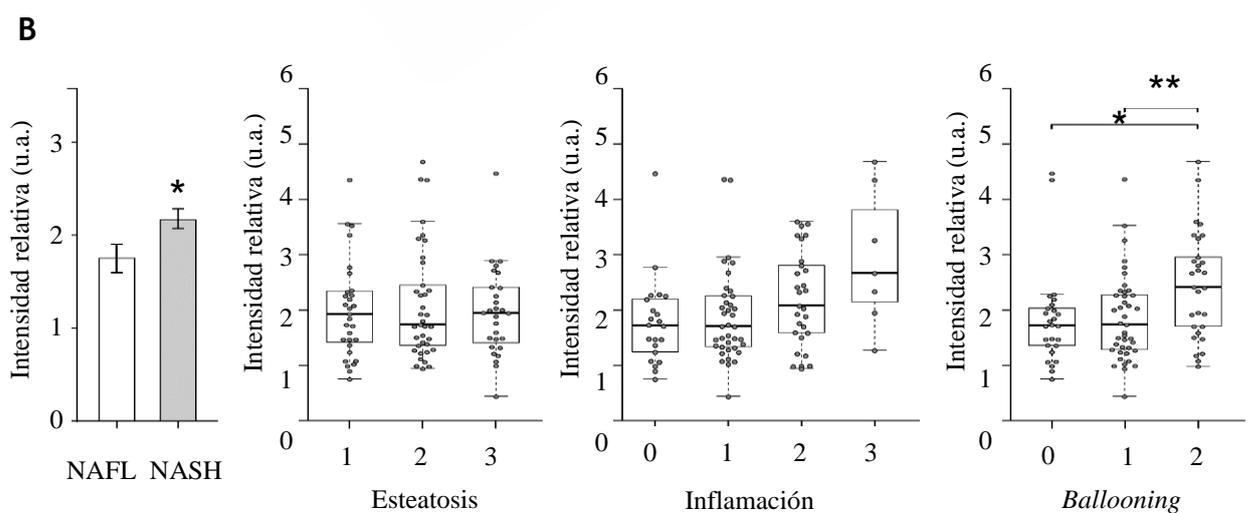
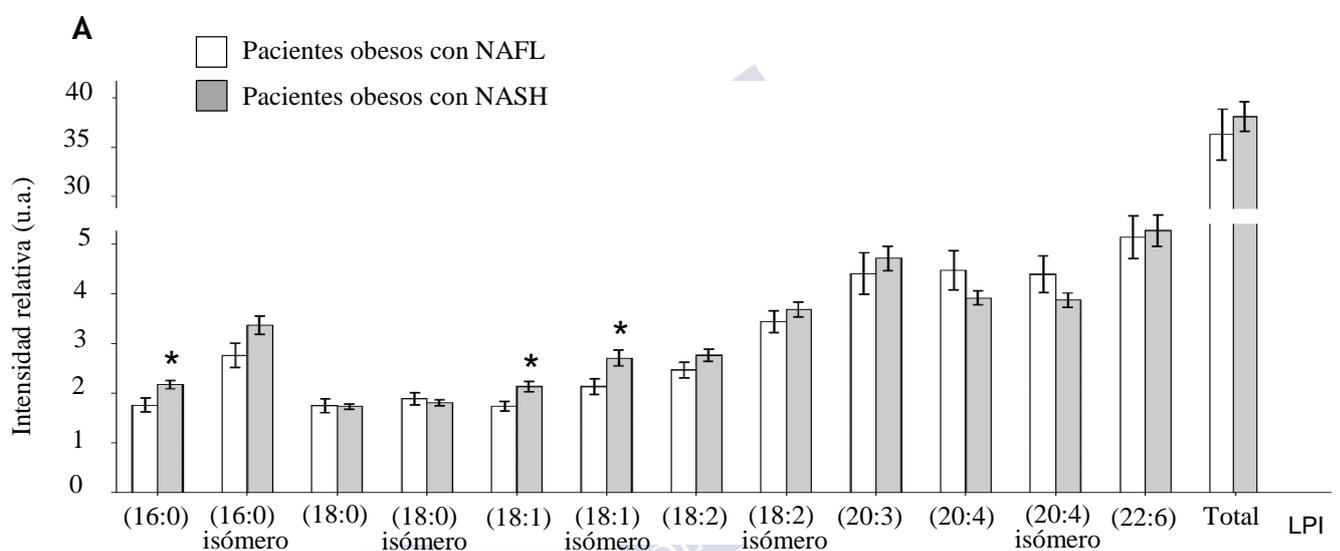
MARCOS FERNÁNDEZ FONDEVILA

Variable	Controles (n=18)	Pacientes no obesos con NAFLD (n=21)	P valor
Edad (años)	51,6 (13,5)	51,1 (14,2)	ns
IMC (kg/m ²)	25,16 (2,5)	27,03 (2,8)	0,071
Niveles de glucosa en sangre en ayuno (mg/dl)	99,5 (33,5)	90,8 (10,5)	ns
Niveles de insulina (□U/L)	7,5 (3,9)	9,3 (5,9)	ns
Índice HOMA	1,9 (1,7)	2,1 (1,4)	ns
Triglicéridos (mg/dl)	135,5 (62,5)	142,3 (79,3)	0,003**
Total colesterol	193,7 (85,8)	204,6 (98,4)	ns
ALT (IU/L)	17,3 (6,3)	37,7 (31,2)	< 0,001***
AST (IU/L)	17,5 (3,9)	25,5 (14,1)	0,025*
GGT (IU/L)	34,2 (36,6)	57,9 (51,7)	0,049*
Fosfatasa alcalina (IU/L)	68,1 (18,7)	64,8 (17,7)	ns
Esteatosis			
Grado 0	18 (100)	0 (0)	
Grado 1	0 (0)	14 (66,7)	
Grado 2	0 (0)	5 (23,8)	
Grado 3	0 (0)	2 (9,5)	
Inflamación			
Grado 0	18 (100)	13 (61,9)	
Grado 1	0 (0)	5 (23,8)	
Grado 2	0 (0)	2 (9,5)	
Grado 3	0 (0)	1 (4,8)	
Ballooning			
Grado 0	18 (100)	13 (61,9)	
Grado 1	0 (0)	5 (23,8)	
Grado 2	0 (0)	2 (9,5)	
Grado 3	0 (0)	1 (4,8)	
Fibrosis			
Estadio 0	18 (100)	13 (61,9)	
Estadio 1	0 (0)	6 (28,6)	
Estadio 2	0 (0)	2 (9,5)	

Tabla 6. Características de pacientes no obesos utilizados para medir los niveles de ARNm de GPR55 hepático (cohorte 2). Las variables están representadas como media (± error estándar de la media) o frecuencia absoluta (porcentaje). Las diferencias estadísticas están indicadas como *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.

1.2. LOS NIVELES DE VARIAS ESPECIES DE LPI ESTÁN AUMENTADOS EN SUERO DE PACIENTES CON NASH FRENTE A LOS QUE TIENEN SÓLO NAFL

Los niveles de LPI fueron medidos en suero de pacientes obesos con NAFLD (cohorte 3). Los resultados revelan niveles más elevados de LPI(16:0), LPI(18:1) y el isómero LPI(18:1), en pacientes con NASH comparados con los que manifiestan sólo NAFL (Figura 8A). Además, los niveles de estas especies de LPI están incrementados progresivamente a medida que aumentan las puntuaciones de inflamación y *ballooning* en las histologías hepáticas de estos pacientes (Figura 8B-D). Cuando los pacientes de la cohorte 3 se agrupan en función de la presencia o ausencia de diabetes tipo 2, no existen cambios en ninguna de las especies de LPI medidas (Figura 8E), sugiriendo que los cambios en LPI son independientes de la disfunción del metabolismo de glucosa. Las características de los pacientes de la cohorte 3 se muestra en la tabla 7.



(Continuación en siguiente página)

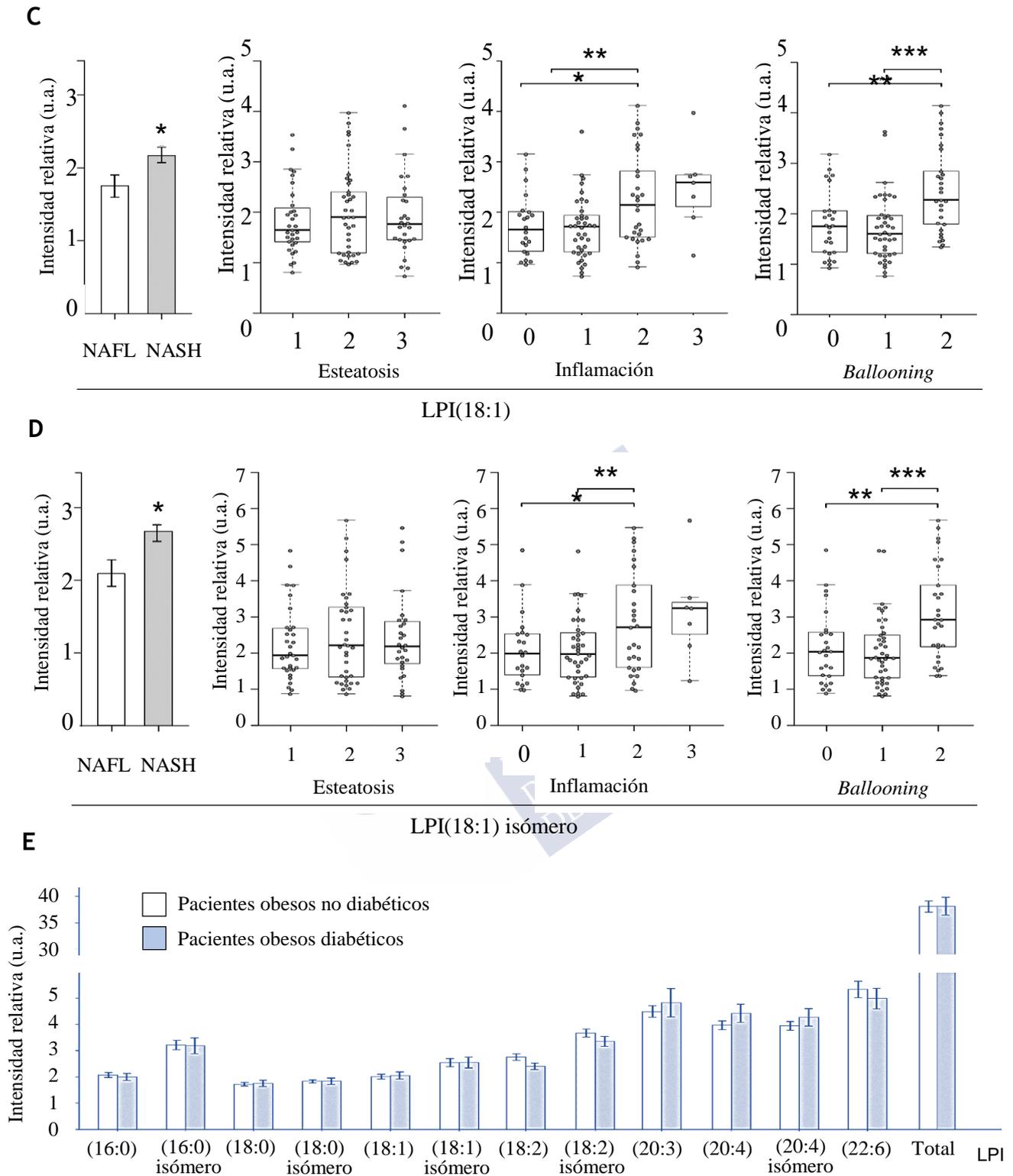


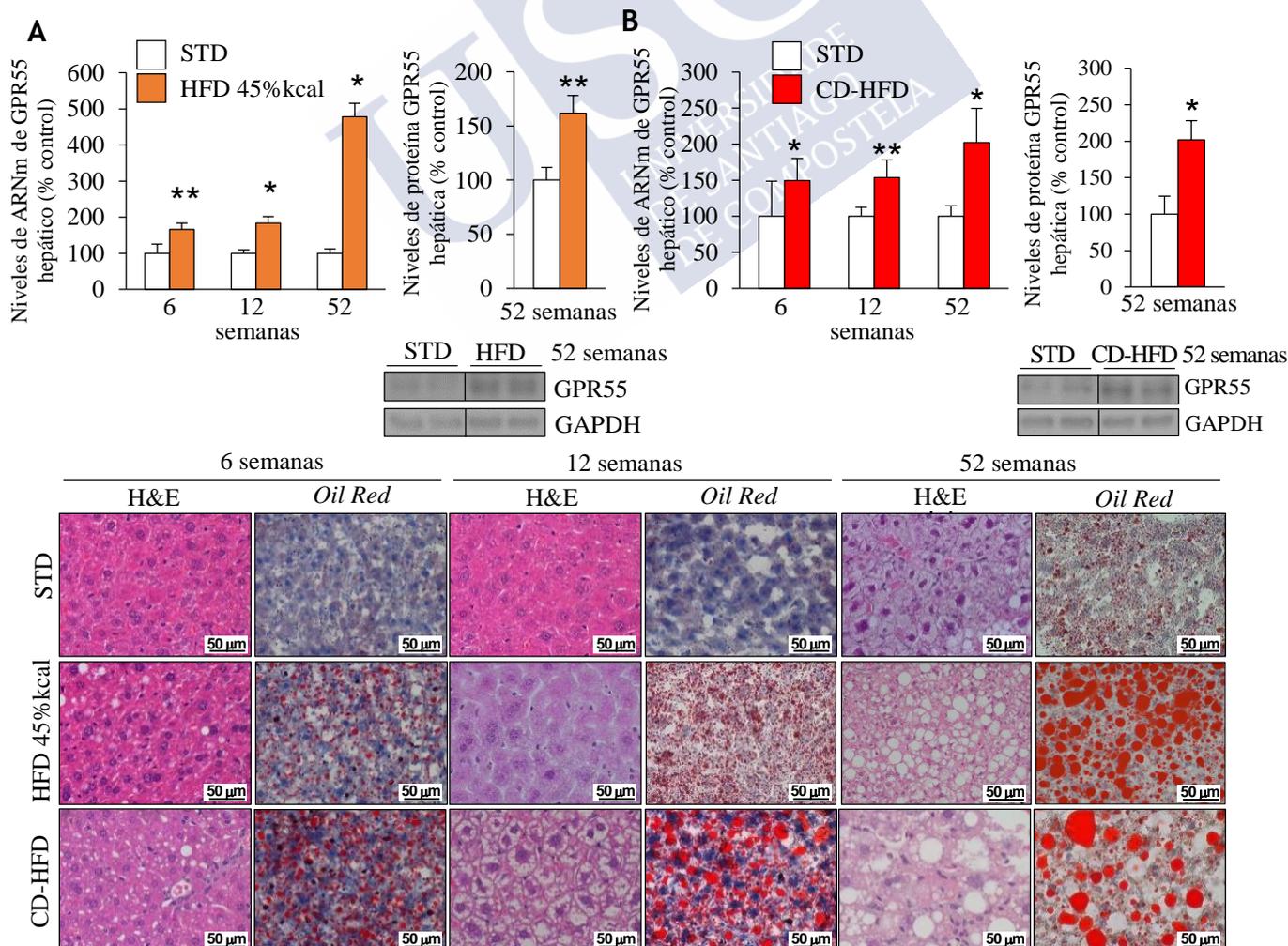
Figura 8. Niveles de LPI en suero de pacientes obesos con NAFLD. (A) Niveles séricos de diferentes especies de LPI en pacientes obesos con NASH (n=78) comparados con pacientes con NAFL (n=31). (B) Niveles de LPI(16:0), LPI(18:1) y LPI(18:1) isómero en pacientes obesos con NAFLD (n=109) en función del grado (NAS) de esteatosis, inflamación y ballooning. (C) Niveles séricos de diferentes especies de LPI en pacientes obesos con NAFLD, comparando los diabéticos (n=26) con los no diabéticos (n=83). Los datos están representados como media \pm error estándar de la media. Las diferencias estadísticas están indicadas como * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Variable	NAFL (n=31)	NASH (n=78)
Ratio hombres: mujeres	15:16	25:53
Edad (años)	47,1 (12,27)	48,18 (12,84)
IMC (kg/m ²)	31,66 (4,22)	31,63 (4,54)
Diabéticos (mujeres)	9 (4)	17 (12)
ALT (IU/l)	50,15 (47,21)	96,53 (69,24)
AST (IU/l)	30,19 (17,80)	66,67 (49,60)
GGT (IU/l)	59,1 (70,87)	74,04 (70,43)
Total colesterol (mg/dl)	206,96 (50,54)	190,60 (42,42)
Triglicéridos (mg/dl)	163,7 (71,02)	160 (64,10)
Glucemia (mg/dl)	100,07 (25,71)	101,85 (22,38)
Esteatosis		
Grado 1	16	16
Grado 2	9	27
Grado 3	4	24
Inflamación		
Grado 0	19	3
Grado 1	9	29
Grado 2	1	28
Grado 3	0	7
Ballooning		
Grado 0	23	3
Grado 1	5	36
Grado 2	1	28

Tabla 7. Características de pacientes obesos utilizados para medir los niveles de LPI en suero (cohorte 3). Las variables están representadas como media (\pm error estándar de la media) o frecuencia absoluta.

1.3. GPR55 HEPÁTICO ESTÁ AUMENTADO EN DIFERENTES MODELOS DE NAFLD *IN VIVO* E *IN VITRO*

A continuación estudiamos los niveles de GPR55 en diversos modelos de ratón con NAFLD inducido por dieta. El uso de una variedad de dietas y tiempos de alimentación permite generar una gama de estadios de NAFLD, como se muestra en las tinciones histológicas de muestras hepáticas de hematoxilina y eosina, *Oil Red* y *Sirius Red*. Ratones alimentados con HFD (45%kcal) y con CD-HFD (45% kcal) durante 6, 12 o 52 semanas muestran un aumento en los niveles de ARNm y proteína de GPR55 frente a los que son alimentados con dieta estándar (Figura 9A-B). El mismo resultado se obtiene al medir los niveles de GPR55 en el hígado de ratones alimentados con vHFD (60%kcal) y con dieta MCD (Figura 9C-D). La expresión hepática de GPR55 también está aumentada en hepatocitos aislados de ratones alimentados con dieta MCD (Figura 9E). Finalmente, el tratamiento en la línea celular humana de hepatocitos THLE2 con ácido oleico, modelo de NAFLD *in vitro*, indujo la expresión de GPR55 (Figura 9F). Estos resultados indican que GPR55 está aumentado consistentemente en ratones con la enfermedad hepática desde etapas muy tempranas de NAFL (6 semanas de alimentación con HFD), permaneciendo elevado a medida que aumenta el grado de esteatosis (microvesicular, 12 semanas de HFD; macrovesicular, MCD) conforme aparece inflamación y *balloning* (CD-HFD 12 semanas) y se desarrolla fibrosis (MCD, CD-HFD 52 semanas).



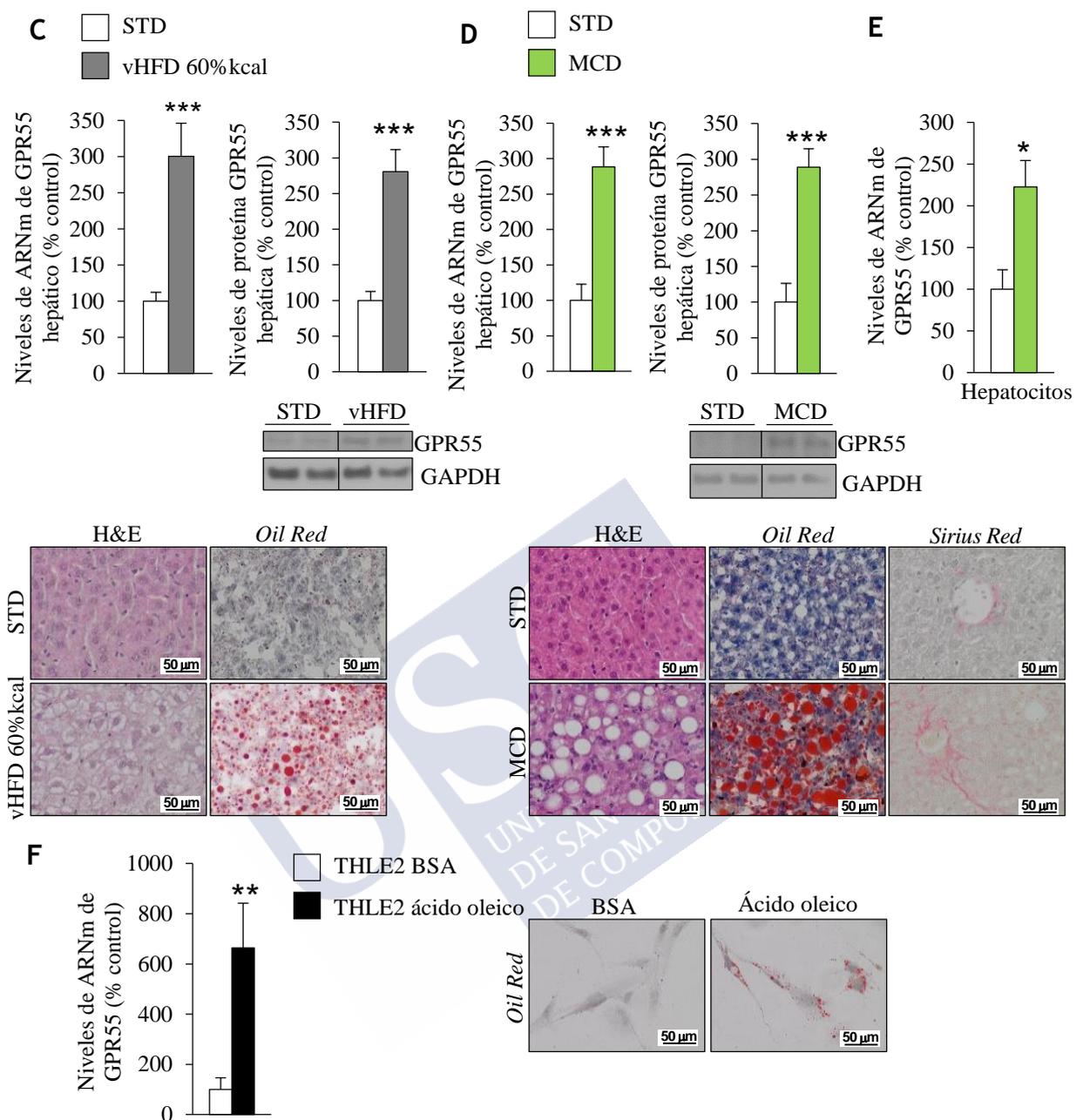


Figura 9. Niveles de GPR55 en diferentes modelos *in vivo* e *in vitro* de NAFLD. Niveles de ARNm de GPR55, niveles de proteína GPR55, tinción Hemaloxilina y Eosina, tinción *Oil Red* y tinción *Sirius Red* en el hígado de ratones alimentados con (A) dieta alta en grasa (HFD) o dieta estándar (STD) durante 6, 12 y 52 semanas (n=5-14); (B) dieta deficiente en colina y alta en grasa (CD-HFD) o STD durante 6, 12 y 52 semanas (n=5-10); (C) dieta muy alta en grasa (vHFD) o STD durante 10 semanas (n=9-10); (D) dieta deficiente en metionina y colina (MCD) o STD durante 4 semanas (n=7-10). (E) Expresión de GPR55 en hepatocitos aislados de hígado de ratones alimentados con dieta MCD o STD durante 4 semanas (n=5). (F) Expresión de GPR55 en hepatocitos humanos THLE2 cultivados con BSA o ácido oleico (n=6). HPRT y GAPDH fueron utilizados para normalizar los niveles de ARNm y proteína, respectivamente. Los datos están representados como media \pm error estándar de la media. Las diferencias estadísticas están indicadas como * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

2. LPI activa la lipogénesis *de novo* e inhibe la β -oxidación vía GPR55 y ACC en hepatocitos

2.1. LPI INDUCE ACUMULACIÓN LIPÍDICA EN HEPATOCITOS

La administración de LPI, el ligando endógeno de GPR55, incrementa tras 1 hora la expresión de GPR55 en las líneas celulares de hepatocitos humanos THLE2 (Figura 10A) y HepG2 (Figura 10B). Tras 24 horas de tratamiento, LPI incrementa la acumulación de vesículas lipídicas intracelulares en ambas líneas celulares (Figura 10C-D).

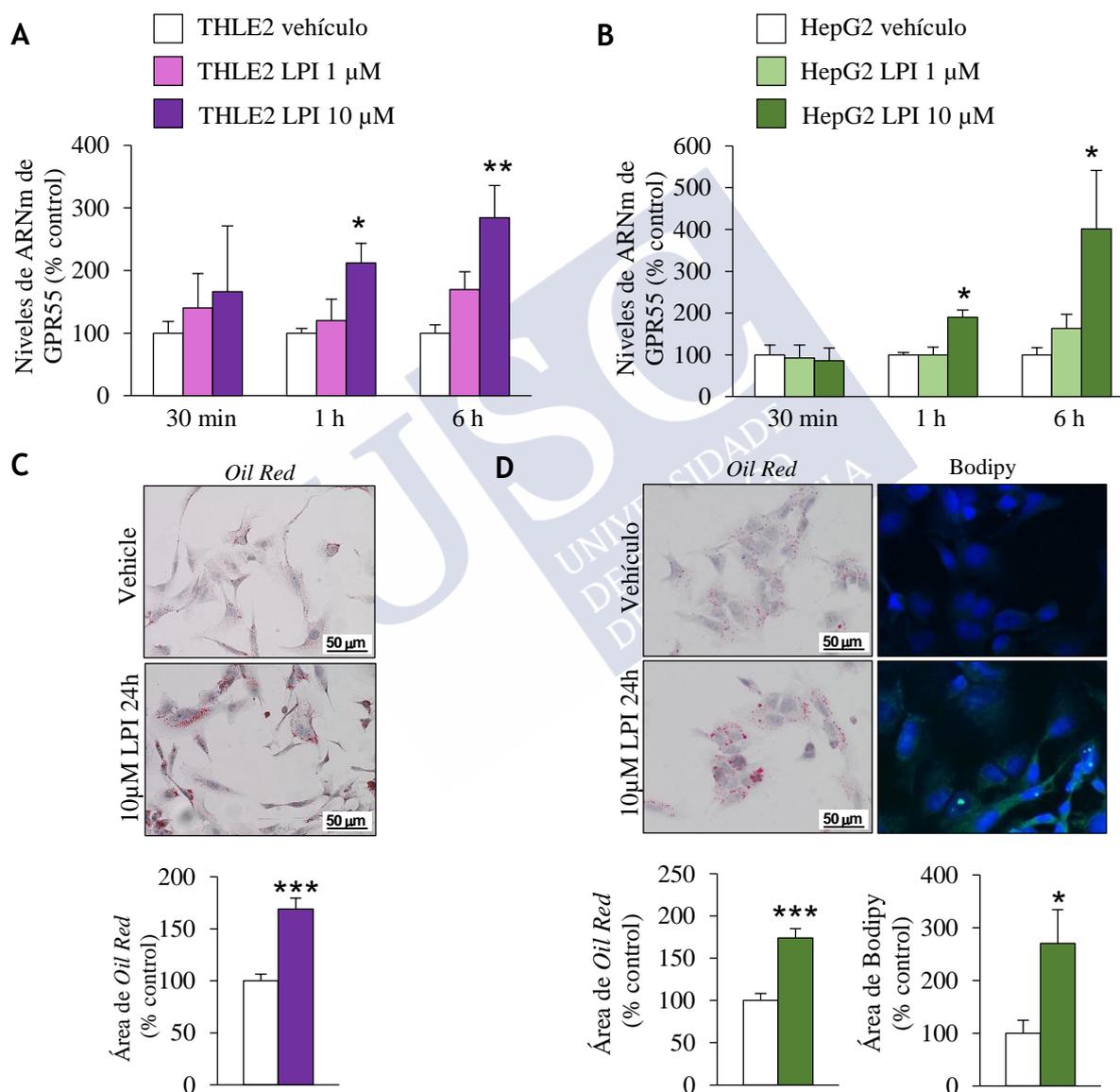


Figura 10. Expresión de GPR55 y acumulación de lípidos en hepatocitos humanos THLE2 y HepG2 tras la administración de LPI. Niveles de ARNm de GPR55 en (A) THLE2 (n=6) y (B) HepG2 (n=4-6) tratados con diferentes dosis de LPI. THLE2 (C) y HepG2 (D) fueron teñidas con Oil Red o Bodipy 493/503 (lípidos, color verde) y DAPI (núcleos, color azul) tras la administración de LPI 10 μ M durante 24 horas. Los lípidos fueron cuantificados y normalizados por el número de núcleos totales por campo (n=6-8). HPRT fue utilizado para normalizar los niveles de ARNm. Los datos están representados como media \pm error estándar de la media. Las diferencias estadísticas están indicadas como *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.

A nivel molecular, encontramos que la administración de LPI reduce los niveles de la forma fosforilada de ACC (pACC) y de su principal regulador, AMPK α (pAMPK α), así como los de CPT1A en ambas líneas celulares (Figura 11A-B), sugiriendo la activación de la DNL y la inhibición de la β -oxidación. La dosis de LPI utilizada (10 μ M) no altera los niveles de proteína de marcadores de apoptosis (Figura 11C), indicando que los efectos sobre el metabolismo de lípidos no están relacionados con una posible muerte celular.

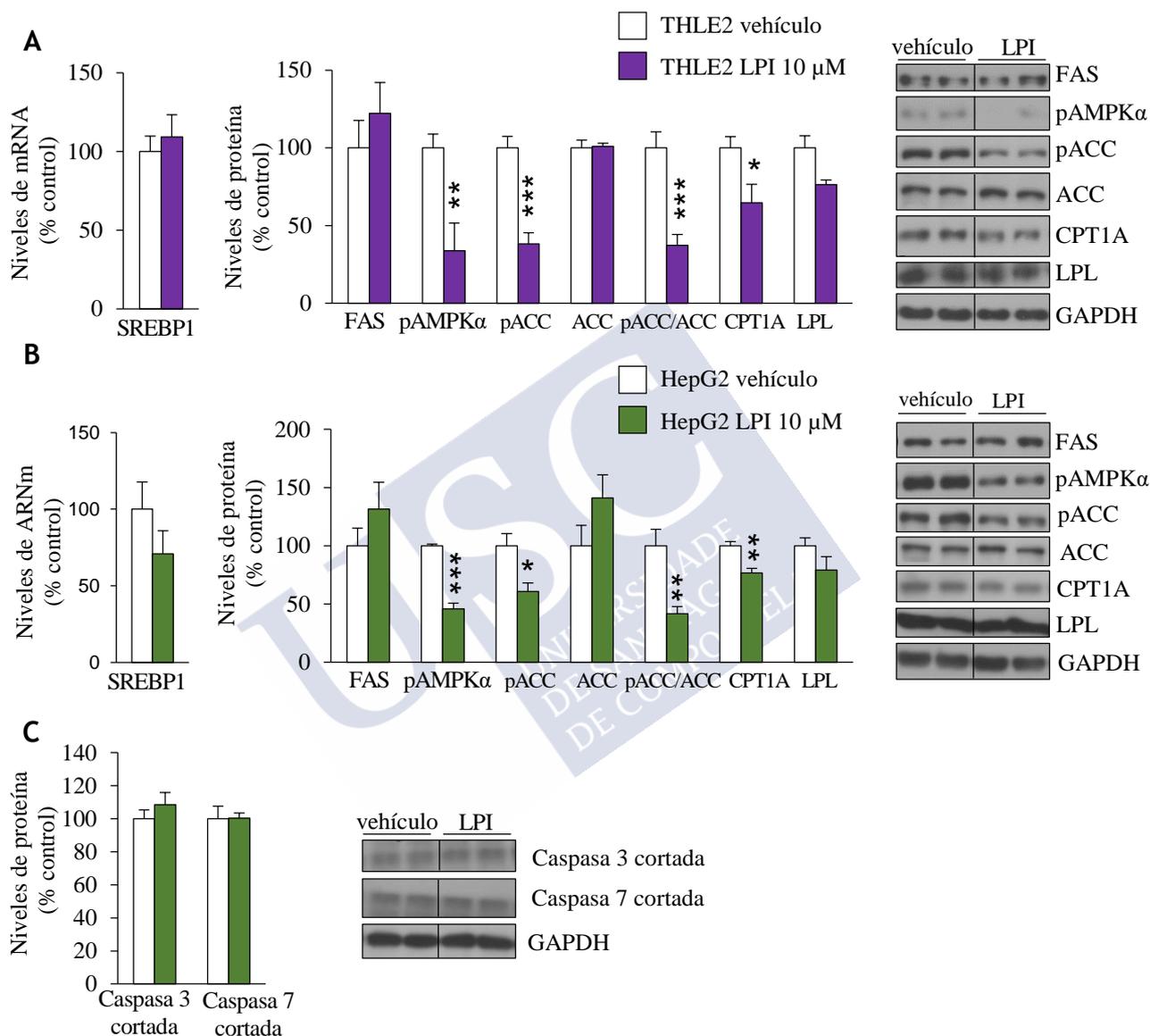


Figura 11. Niveles de marcadores de metabolismo de lípidos y apoptosis en THLE2 y HepG2 tras la administración de LPI. Niveles de ARNm y proteína de marcadores de metabolismo lipídico en (A) THLE2 (n=6) y (B) HepG2 (n=4) tras la administración de LPI 10 μ M durante 6 horas. (C) Niveles de proteína de las formas activas de los marcadores de apoptosis caspasa 3 y caspasa 7 (n=4). HPRT y GAPDH fueron utilizados para normalizar los niveles de ARNm y proteína, respectivamente. Los datos están representados como media \pm error estándar de la media. Las diferencias estadísticas están indicadas como *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.

2.2. LPI REGULA A TRAVÉS DE GPR55 LA ACUMULACIÓN LIPÍDICA EN LOS HEPATOCITOS

Para averiguar si los efectos de LPI en la acumulación lipídica están mediados por GPR55, silenciamos el receptor y encontramos que LPI no es capaz de incrementar el contenido lipídico en THLE2 (Figura 12A-B) ni en HepG2 (Figura 12C-D). Consistentemente, LPI tampoco es capaz de reducir los niveles de pAMPK α ni pACC cuando GPR55 está inhibido (Figura 12B-D).

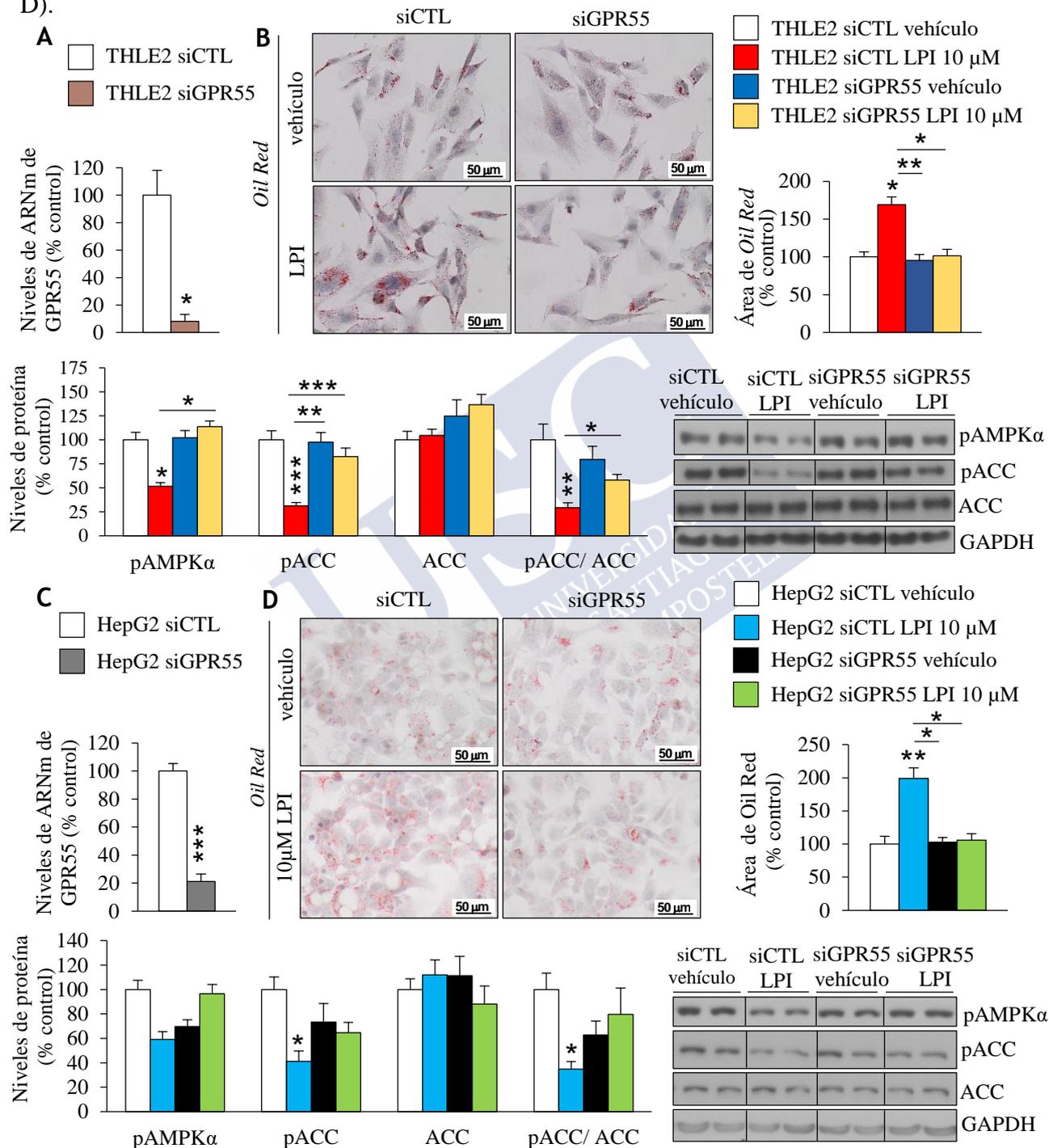


Figura 12. Efectos de LPI en la acumulación lipídica y niveles de marcadores de metabolismo lipídico en hepatocitos silenciando GPR55. Niveles de ARNm de GPR55 en (A) THLE2 (n=3) y (C) HepG2 (n=4) transfectadas con siARN GPR55 o siARN control durante 48 horas. Tinción *Oil Red* de (B) THLE2 (n=6) y (D) HepG2 (n=6) tras el silenciamiento de GPR55, tratadas con vehículo o LPI. Los lípidos fueron cuantificados y normalizados por el número de núcleos totales por campo. Los niveles proteicos de pAMPK α , pACC y ACC fueron también medidos (n=4-6). Las diferencias estadísticas están indicadas como *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.

Dado que GPR55 media los efectos de la acumulación lipídica inducida por LPI, estudiamos si el silenciamiento de GPR55 podría prevenir la acumulación lipídica inducida por otro estímulo. Uno de estos estímulos más utilizados es el ácido oleico, que incrementa de manera muy marcada la acumulación de lípidos. La inhibición de GPR55 reduce la acumulación lipídica inducida por ácido oleico (Figura 13).

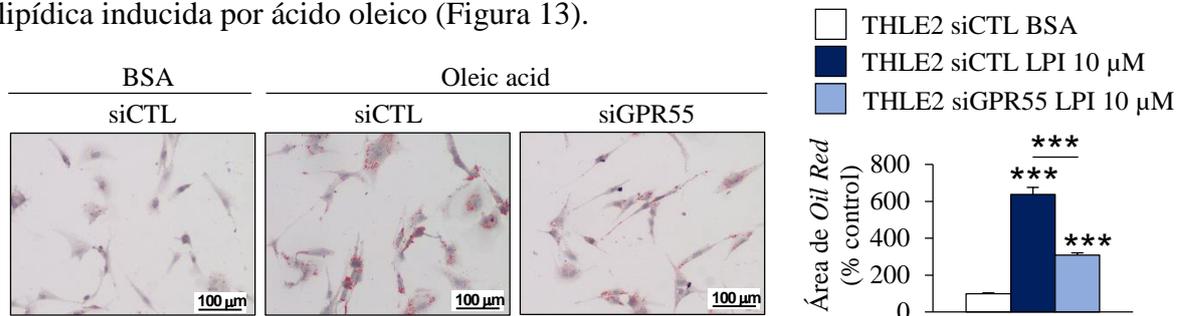


Figura 13. Acumulación lipídica tras el tratamiento con ácido oleico en hepatocitos humanos THLE2 silenciando GPR55. Tinción Oil Red de THLE2 silenciando GPR55, tratadas con BSA o ácido oleico 1 mM durante 24 horas. Los lípidos fueron cuantificados y normalizados por el número de núcleos totales por campo (n=6). Los datos están representados como media ± error estándar de la media. Las diferencias estadísticas están indicadas como ***p<0,001.

2.3. LPI REGULA A TRAVÉS DE ACCα LA ACUMULACIÓN LIPÍDICA EN LOS HEPATOCITOS

A continuación, ya que LPI activa ACC, investigamos si la inhibición de ACC afecta a los efectos de LPI en acumulación de lípidos. Encontramos que LPI no incrementa el contenido lipídico en THLE2 (Figura 14A-B) y tampoco en HepG2 (Figura 14C-D) tras el silenciamiento de ACCα.

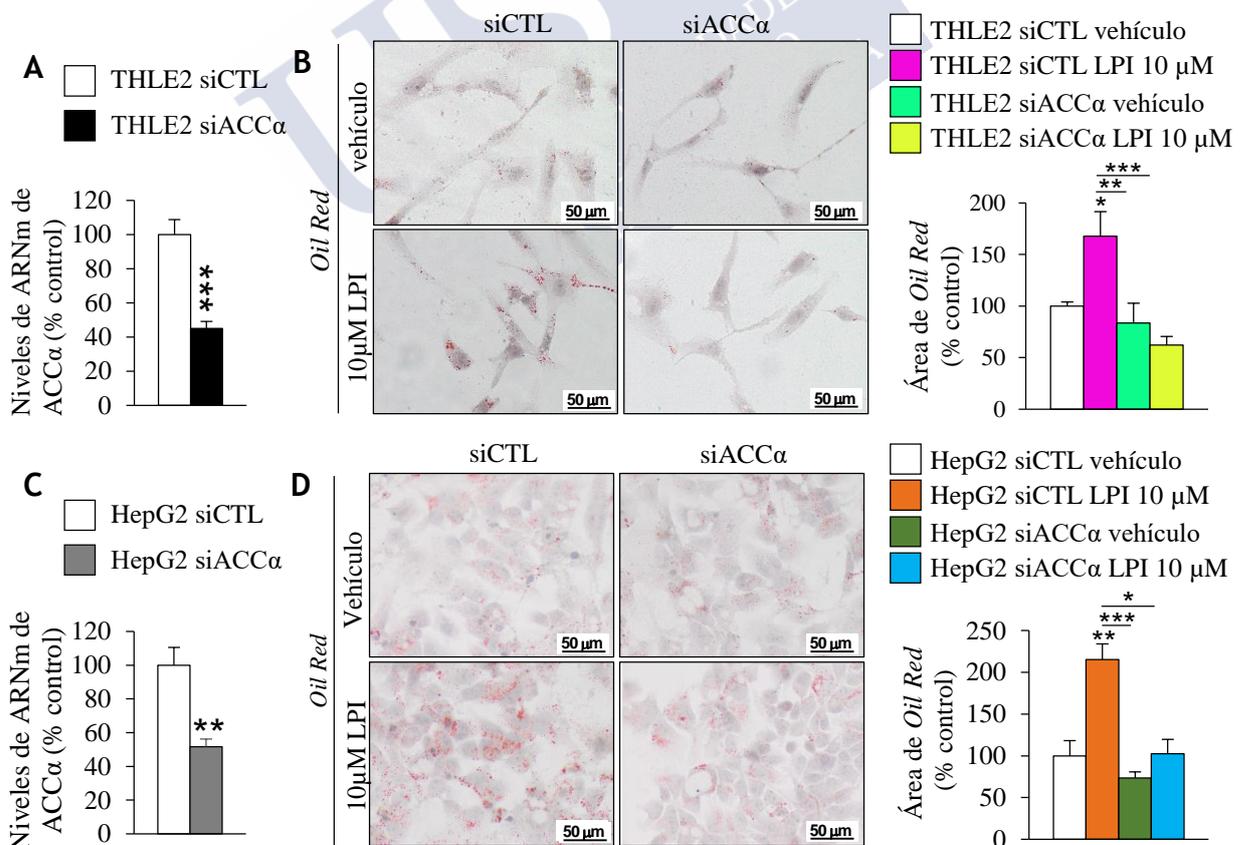


Figura 14. Acumulación lipídica en hepatocitos silenciando ACCα y tratados con LPI. Niveles de mRNA de ACCα en (A) THLE2 (n=5-6) y (C) HepG2 (n=5-6) transfectadas con siARN ACCα o siARN control durante 48 horas. Tinción Oil Red de (B) THLE2 (n=6) y (D) HepG2 (n=6) tras el silenciamiento de ACCα, tratadas con vehículo o LPI. Los lípidos fueron cuantificados y normalizados por el número de núcleos totales por campo. HPRT fue utilizado para normalizar los niveles de ARNm. Las diferencias estadísticas están indicadas como *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.

2.4. LPI ESTIMULA LA LIPOGÉNEIS *DE NOVO* E INHIBE LA B-OXIDACIÓN DE FORMA GPR55-DEPENDIENTE

Ya que los resultados obtenidos hasta el momento indican, de manera indirecta, que el sistema LPI/GPR55 modula la síntesis y oxidación de lípidos, decidimos medir directamente estos procesos utilizando [³H]-acetato y [¹⁴C]-palmitato, respectivamente. Detectamos que LPI incrementa la síntesis *de novo* de triglicéridos, diglicéridos y ácidos grasos (Figura 15A) a la vez que disminuye la oxidación completa de ácidos grasos (Figura 15B). Estas acciones de LPI son bloqueadas cuando se silencia GPR55 (Figura 15C-D).

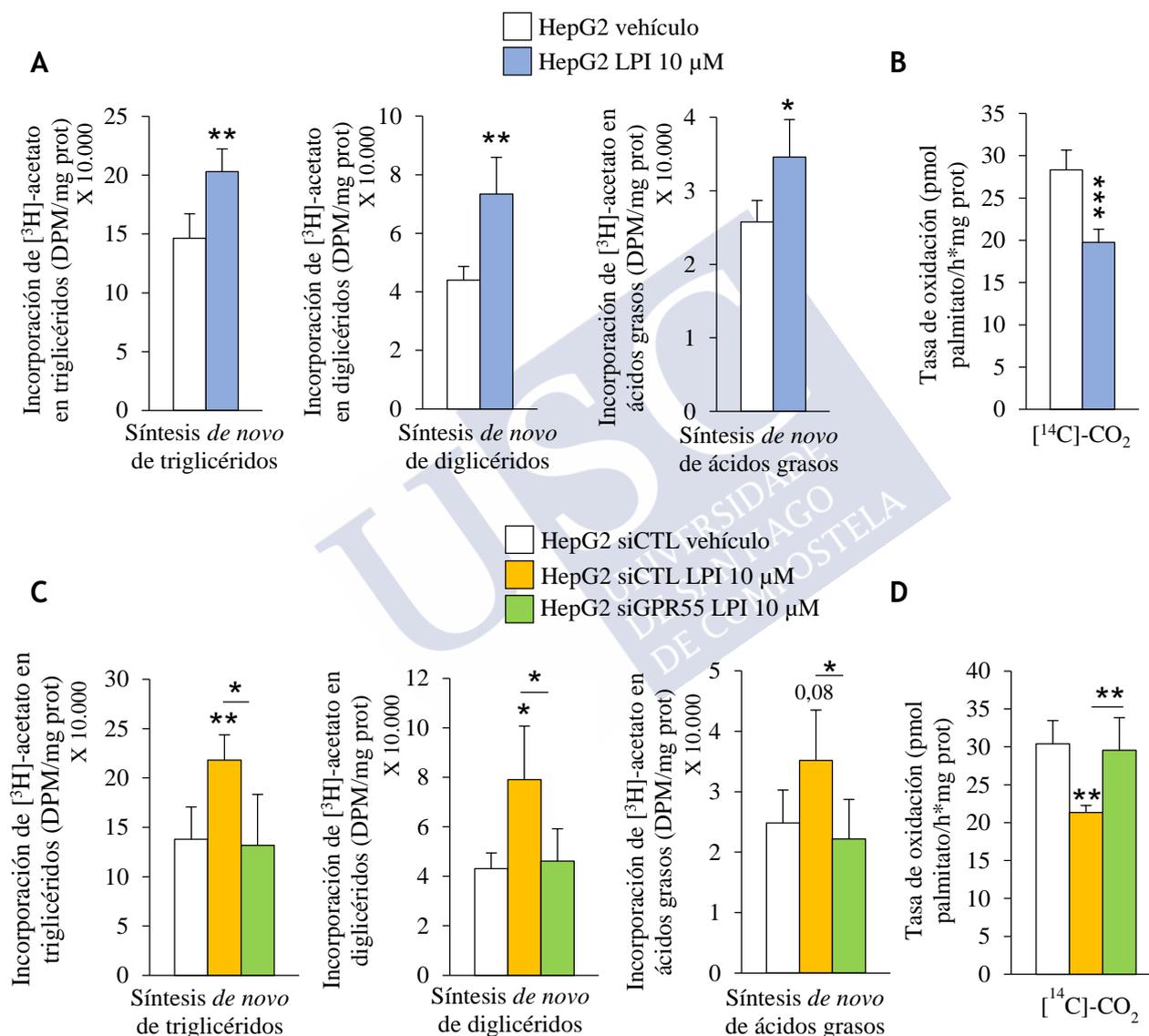


Figura 15. Efectos de LPI/GPR55 en *de novo* lipogénesis (DNL) y β-oxidación en hepatocitos. DNL de triglicéridos, diglicéridos y ácidos grasos (A) (n=5) y oxidación completa de palmitato (B) (n=5) en células HepG2 tratadas con LPI o vehículo. DNL de triglicéridos, diglicéridos y ácidos grasos (C) (n=4-5) y oxidación completa de palmitato (D) (n=4-5) en células HepG2 silenciando GPR55 y tratadas con LPI o vehículo. Los datos están representados como media ± error estándar de la media. Las diferencias estadísticas están indicadas como *p<0,05, **p<0,01.

Adicionalmente, para corroborar el impacto de LPI en la β -oxidación, monitorizamos la tasa de consumo de oxígeno u OCR, indicativo de la respiración mitocondrial, en hepatocitos tratados con LPI. Encontramos que la administración de LPI induce una disminución de OCR (Figura 16A). Este efecto no es observado cuando las células son pre-tratadas con etomoxir, un inhibidor de CPT1A (Figura 16B).

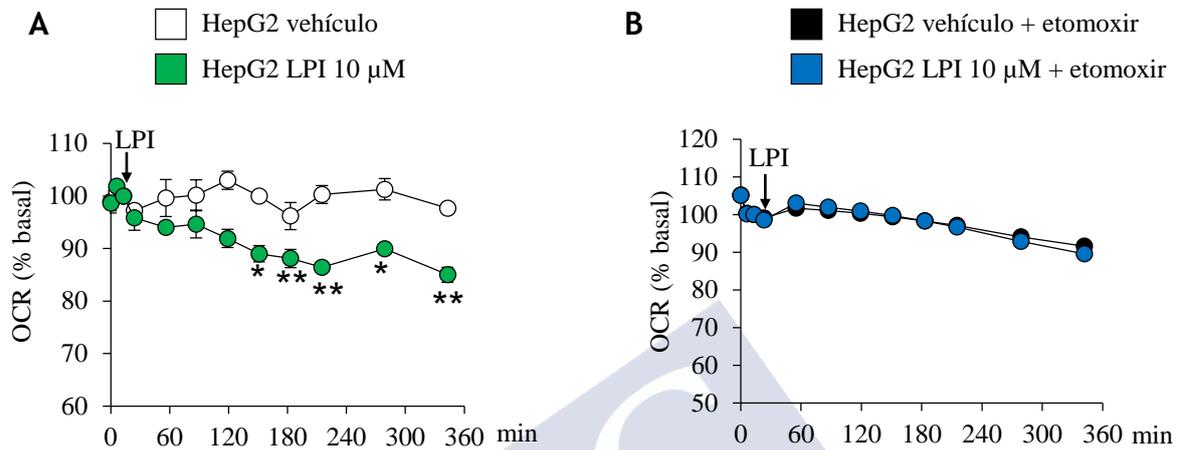


Figura 16. Consumo de oxígeno (OCR) de hepatocitos tratados con LPI y bloqueando la β -oxidación. (A) OCR en HepG2 administradas con LPI o vehículo (n=3). (B) OCR en HepG2 administradas con LPI o vehículo, recibiendo 4 μ M etomoxir 30 minutos antes (n=3). Los datos están representados como media \pm error estándar de la media. Las diferencias estadísticas están indicadas como * p <0,05, ** p <0,01.

3. LPI induce esteatosis hepática en ratones a través de GPR55 y ACC

3.1. LA ADMINISTRACIÓN DE LPI PROVOCA LA ACUMULACIÓN DE LÍPIDOS EN EL HÍGADO DE RATONES

Ratones C57BL/6 fueron tratados diariamente con LPI (0,5 mg/kg) intraperitonealmente durante 7 días. Esta dosis no afecta al peso corporal (Figura 17A) y a la ingesta de alimento (Figura 17B). Tampoco encontramos diferencias en mediciones de suero del marcador de daño hepático AST, ni colesterol, pero sí detectamos incrementos en triglicéridos y ácidos grasos no esterificados tras el tratamiento con LPI (Figura 17C). A nivel hepático, la expresión de GPR55 y el contenido lipídico y de triglicéridos son mayores en los ratones que recibieron LPI en comparación con los tratados con el vehículo (Figura 17D-F).

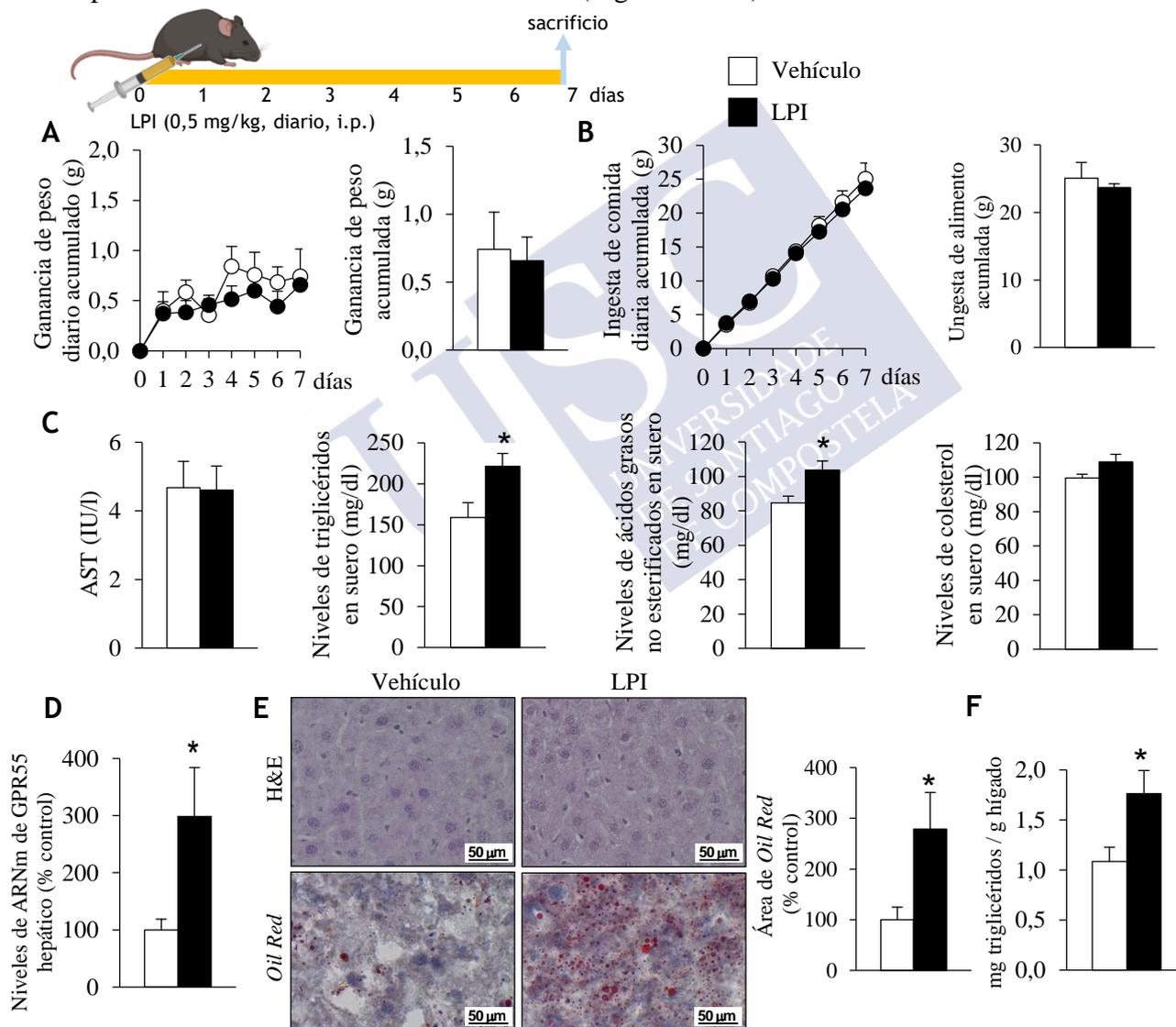


Figura 17. Efectos de LPI en la acumulación lipídica en el hígado de ratones. Ratones C57BL/6 alimentados con dieta estándar fueron aleatoriamente tratados con vehículo o LPI (0,5mg/kg) i.p. durante 7 días (n=7). (A) Peso corporal. (B) Ingesta de comida. (C) Niveles en suero de AST, triglicéridos, ácidos grasos no esterificados y colesterol. (D) Expresión hepática de ARNm de GPR55. (E) Tinción de Hematoxilina y Eosina (panel superior) y *Oil Red* (panel inferior) en secciones de hígado. Los lípidos fueron cuantificados en las secciones teñidas con *Oil Red*. (F) Contenido hepático de triglicéridos (método cloroformo-metanol). HPRT fue utilizado para normalizar los niveles de ARNm. Los datos están representados como media ± error estándar de la media. Las diferencias estadísticas están indicadas como *p<0,05.

El análisis de marcadores del metabolismo lipídico en el hígado reveló que los niveles de proteína FAS están significativamente aumentados en ratones tratados con LPI frente a los tratados con el vehículo, mientras que los niveles de pAMPK α , la ratio pACC/ACC y CPT1A están reducidos (Figura 18). Estos resultados sugieren un incremento de DNL una reducción de β -oxidación inducidos por LPI.

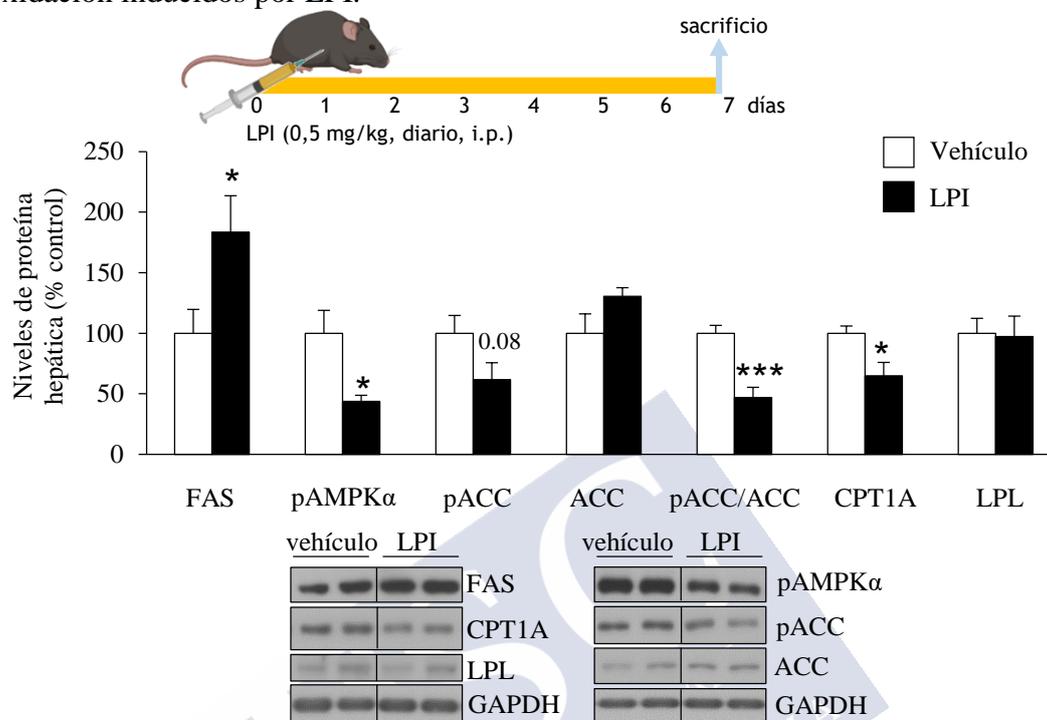


Figura 18. Niveles de marcadores de metabolismo lipídico en el hígado de ratones tratados con LPI. Niveles de proteína de marcadores de metabolismo lipídico en hígado de ratones tratados con vehículo o LPI (0,5mg/kg) durante 7 días (n=7). GAPDH fue utilizado para normalizar los niveles de proteína. Los datos están representados como media \pm error estándar de la media. Las diferencias estadísticas están indicadas como *p<0,05.

3.2. LA ADMINISTRACIÓN DE LPI PROVOCA LA ACUMULACIÓN DE LÍPIDOS EN EL HÍGADO DE RATONES DE FORMA GPR55-DEPENDIENTE

Para averiguar si GPR55 media los efectos de LPI *in vivo*, llevamos a cabo el mismo tratamiento farmacológico, pero administrando LPI o vehículo a ratones en los que se inyectó previamente en la vena de la cola un lentivirus codificante de shARN frente a GPR55 para silenciar la expresión del gen o shARN control. Los ratones que recibieron shGPR55 muestran una expresión notablemente reducida de GPR55 en el hígado (Figura 19A). LPI incrementa la expresión hepática de GPR55 en los ratones que recibieron shARN control, pero no en aquéllos que recibieron shGPR55 (Figura 19A). LPI no es tampoco capaz de inducir esteatosis hepática en ratones tratados con shGPR55 (Figura 19B-C). Además, la reducción de pAMPK α y pACC causada por LPI no ocurre en ratones silenciando GPR55 hepático (Figura 19D). Consistente con la activación de ACC por LPI, los niveles hepáticos de malonil-CoA, producto de la reacción catalizada por ACC, están incrementados por LPI y reducidos tras el *knockdown* de GPR55 (Figura 19E).

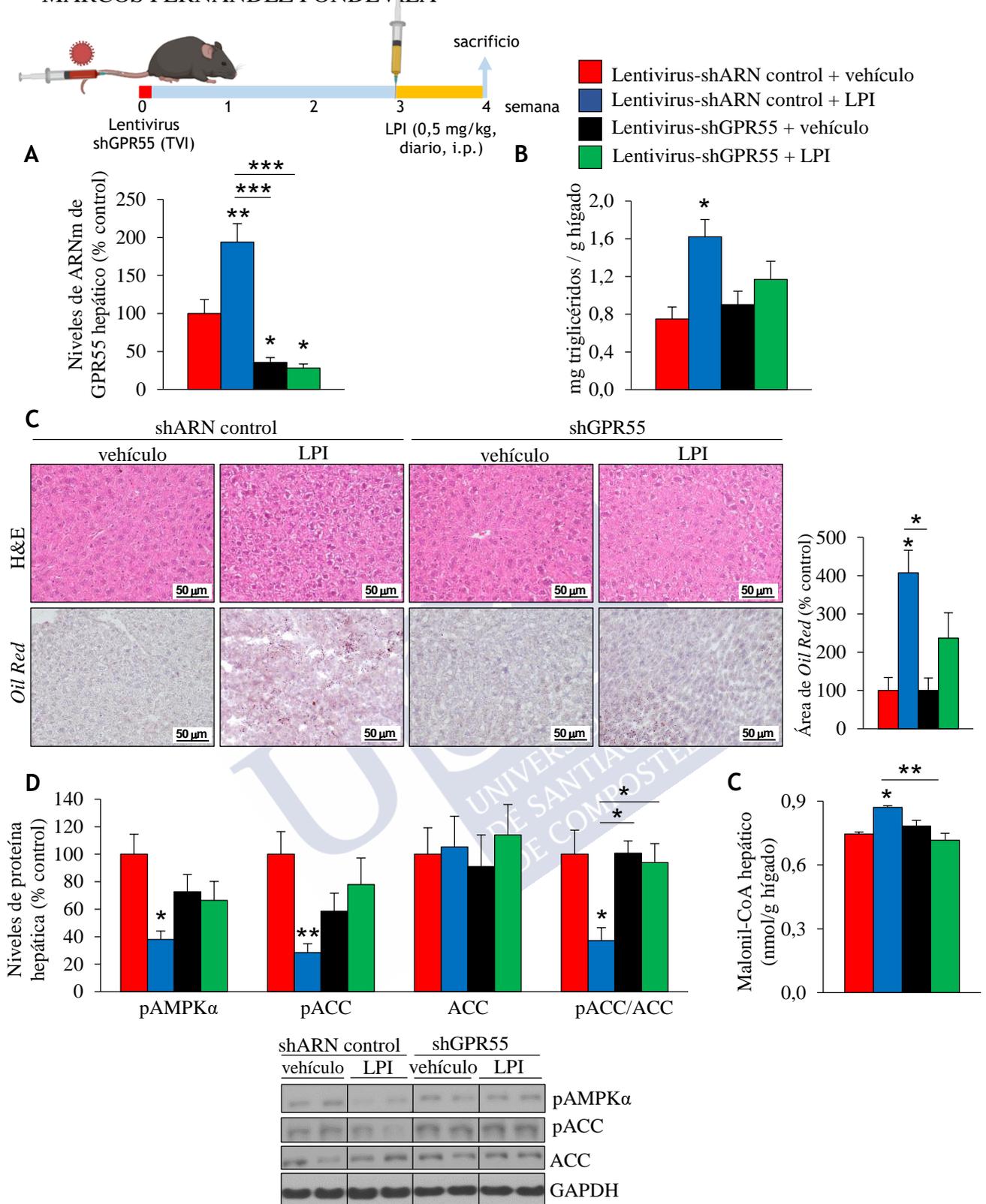


Figura 19. Acumulación lipídica en el hígado de ratones silenciando GPR55 hepático y administrados con LPI. Ratones C57BL/6 alimentados con dieta estándar recibieron una inyección en la vena de la cola (TVI) con vectores lentivirales codificando shARN frente a GPR55 o shARN control, y 3 semanas después tratados con LPI (0,5mg/kg) o vehículo durante 7 días (n=6). (A) Niveles de ARNm de GPR55 en el hígado. (B) Contenido hepático de triglicéridos (método cloroformo-metanol). (C) Tinción de Hematoxilina y Eosina (panel superior) y *Oil Red* (panel inferior) en secciones de hígado. Los lípidos fueron cuantificados en las secciones teñidas con *Oil Red*. (D) Niveles de proteína de marcadores de metabolismo lipídico en hígado. (E) Niveles de malonil-CoA hepático. HPRT y GAPDH fueron utilizados para normalizar los niveles de ARNm y proteína, respectivamente. Los datos están representados como media ± error estándar de la media. Las diferencias estadísticas están indicadas como *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.

3.3. LA ADMINISTRACIÓN DE LPI INDUCE ACUMULACIÓN DE LÍPIDOS *IN VIVO* DE FORMA DEPENDIENTE DE ACC

Para establecer si ACC está jugando un rol como mediador de las acciones de LPI/GPR55 en el hígado, utilizamos el inhibidor de ACC GS-0976, que como se explicó previamente está siendo evaluado en ensayos clínicos para el tratamiento de NAFLD. Se inyectó diariamente LPI o vehículo intraperitonealmente durante 7 días en los ratones, co-administrando GS-0976 (10 mg/kg) o vehículo. Encontramos que los efectos hepáticos de LPI en la acumulación de lípidos (Figura 20A), triglicéridos (Figura 20B) y malonil-CoA (Figura 20C) son bloqueados en los ratones que reciben GS-0976.

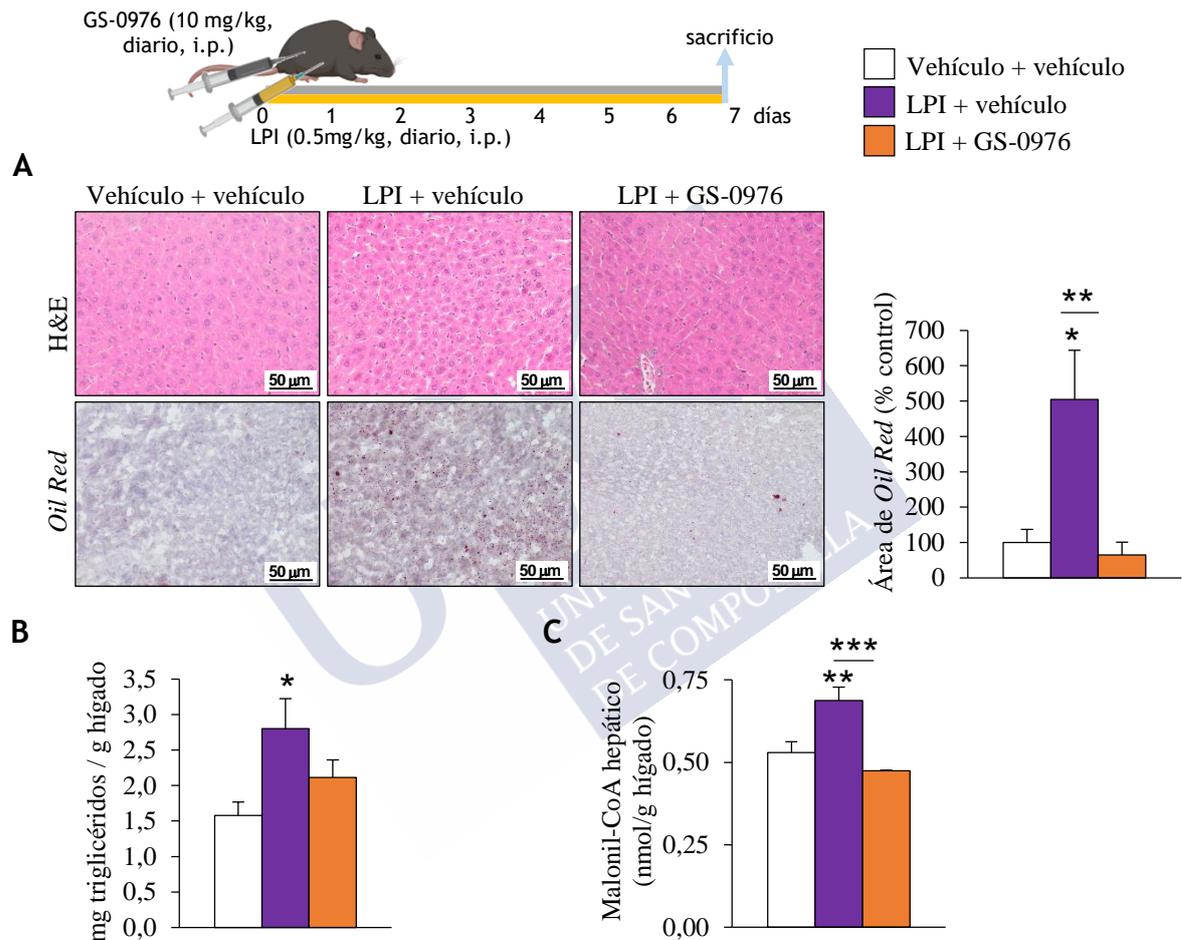


Figura 20. Acumulación lipídica en el hígado de ratones tratados con LPI e inhibiendo ACC. Ratones C57BL/6 alimentados con dieta estándar recibieron una inyección diaria de LPI (0,5 mg/kg) o vehículo intraperitonealmente durante 7 días, siendo co-tratados con el inhibidor farmacológico de ACC GS-0976 (10 mg/kg) (n=8). (A) Tinción de Hematoxilina y Eosina (panel superior) y *Oil Red* (panel inferior) en secciones de hígado. Los lípidos fueron cuantificados en las secciones teñidas con *Oil Red*. (B) Contenido hepático de triglicéridos (método cloroformo-metanol). (C) Niveles de malonil-CoA hepático. Los datos están representados como media \pm error estándar de la media. Las diferencias estadísticas están indicadas como * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

4. El silenciamiento de GPR55 hepático mejora el NAFL inducido por dieta muy alta en grasa

Tras demostrar que la activación farmacológica de GPR55 induce esteatosis hepática, evaluamos si su silenciamiento sería capaz de reducir la esteatosis inducida por dieta. Para ello, los ratones fueron alimentados con vHFD durante 10 semanas, recibiendo durante la sexta semana una inyección en la vena de la cola con lentivirus codificando shARN frente a GPR55 o shARN control. Corroboramos la eficiencia de la transfección midiendo los niveles de ARNm y proteína (Figura 21A). No encontramos cambios en peso ni en ingesta (Figura 21B). Los niveles séricos de AST, triglicéridos y ácidos grasos no esterificados están reducidos tras el silenciamiento de GPR55 (Figura 21C). A nivel hepático, encontramos una disminución en el contenido lipídico y de triglicéridos (Figura 21D-E).

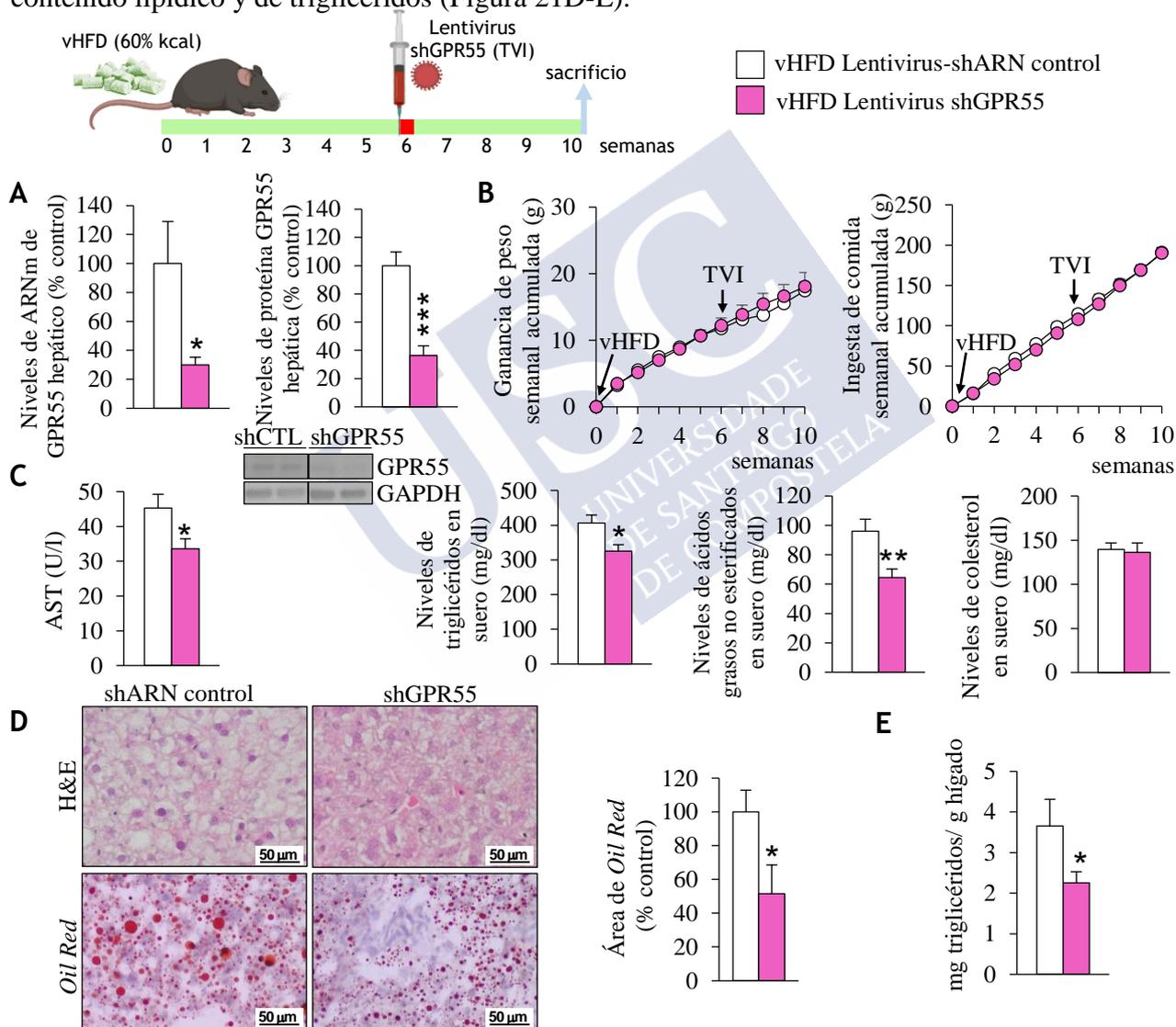


Figura 21. Acumulación lipídica en el hígado de ratones alimentados con dieta muy alta en grasa (vHFD, 60% kcal) silenciando GPR55 hepático. Ratones C57BL/6 alimentados con dieta vHFD durante 6 semanas recibieron una inyección en la vena de la cola (TVI) con vectores lentivirales codificando shARN control o shARN frente a GPR55, manteniendo la dieta vHFD 4 semanas más (n=7). (A) Niveles en hígado de ARNm y proteína GPR55. (B) Peso corporal e ingesta de alimentos. (C) Niveles en suero de AST, triglicéridos, ácidos grasos no esterificados y colesterol. (D) Tinción de Hematoxilina y Eosina (panel superior) y Oil Red (panel inferior) en secciones de hígado. Los lípidos fueron cuantificados en las secciones teñidas con Oil Red. (E) Contenido hepático de triglicéridos (método cloroformo-metanol). Los datos están representados como media ± error estándar de la media. Las diferencias estadísticas están indicadas como *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.

Consistente con la menor acumulación lipídica en el hígado de ratones que recibieron shGPR55, se observa que la inhibición de GPR55 en el hígado inactiva ACC, como lo demuestran los menores niveles de pAMPK α y pACC y malonil-CoA, y activa CPT1A (Figura 22A-B).

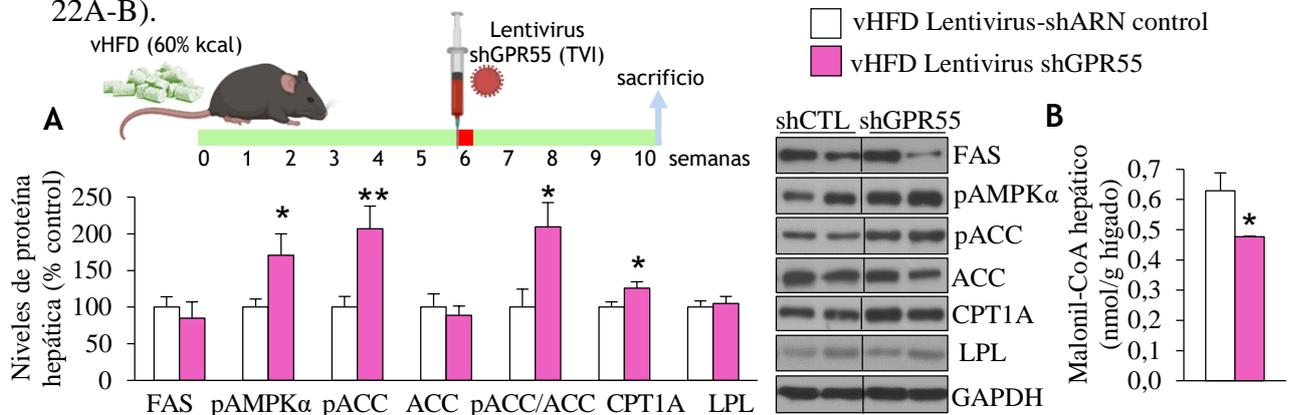


Figura 22. Niveles de marcadores de metabolismo lipídico hepático en ratones alimentados con dieta muy alta en grasa (vHFD, 60%kcal) silenciando GPR55 hepático. Niveles hepáticos de (A) marcadores de metabolismo lipídico en el hígado y (B) malonil-CoA en ratones C57BL/6 alimentados con dieta vHFD durante 6 semanas, recibiendo una inyección en la vena de la cola (TVI) con vectores lentivirales codificando shARN control o shGPR55, y mantenidos con dieta vHFD 4 semanas más (n=7). GAPDH fue utilizado para normalizar los niveles de proteína. Los datos están representados como media \pm error estándar de la media. Las diferencias estadísticas están indicadas como *p<0,05, **p<0,01.

La mejora de la esteatosis hepática en ratones con silenciamiento de GPR55 en el hígado va asociada con una reducción de células F4/80 positivas (Figura 23A) y de los diferentes marcadores de inflamación (Figura 23B), estrés del RE (Figura 23C) y apoptosis (Figura 23D).

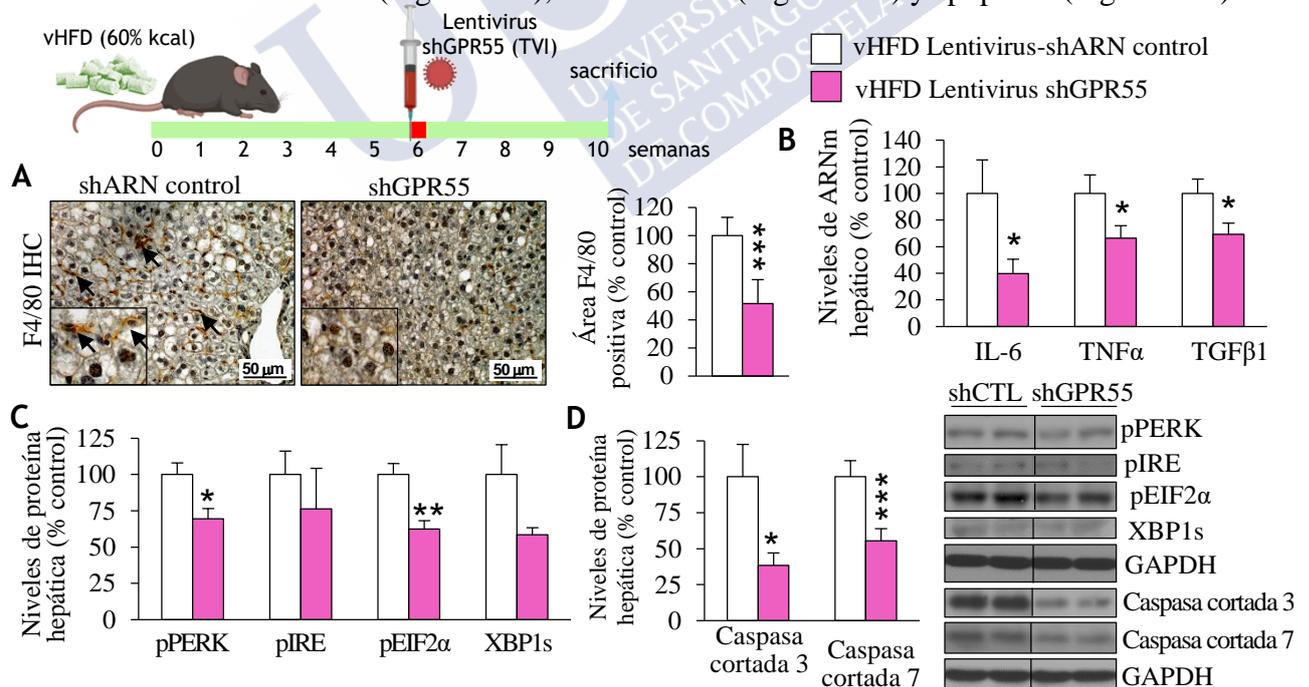


Figura 23. Análisis de inflamación, estrés del retículo endoplasmático (RE) y apoptosis en el hígado de ratones alimentados con dieta muy alta en grasa (vHFD, 60%kcal) silenciando GPR55 hepático. Tinción inmunohistoquímica (IHC) de la proteína F4/80 en secciones de hígado (A) y niveles hepáticos de marcadores de inflamación (B), estrés del ER (C) y apoptosis (D) en ratones C57BL/6 alimentados con dieta vHFD durante 6 semanas, recibiendo una inyección en la vena de la cola (TVI) con lentivirus shARN control o shGPR55, y mantenidos con dieta vHFD 4 semanas más (n=7). El área F4/80-positiva fue cuantificada. HPRT y GAPDH fueron utilizados para normalizar los niveles de ARNm y proteína, respectivamente. Los datos están representados como media \pm error estándar de la media. Las diferencias estadísticas están indicadas como *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.

5. El silenciamiento de GPR55 hepático reduce esteatosis y fibrosis en NASH inducido por dieta deficiente en metionina y colina

5.1. RATONES CON NASH INDUCIDO POR DIETA DEFICIENTE EN METIONINA Y COLINA PRESENTAN MENOR ESTEATOSIS HEPÁTICA TRAS LA INHIBICIÓN DE GPR55

Ya que la expresión de GPR55 en el hígado está aumentada en humanos y roedores con NASH, evaluamos el potencial de la inhibición de GPR55 para mejorar NASH. Para ello, inyectamos en la vena de la cola lentivirus shARN frente a GPR55 en ratones y 4 semanas después los alimentamos durante 4 semanas con dieta MCD hasta ser sacrificados. La eficiencia del silenciamiento fue establecida al detectar expresión de GPR55 hepático notablemente más baja en los ratones que recibieron shGPR55 (Figura 24A). Encontramos que en el grupo que silencia GPR55 hepático los niveles séricos de AST están reducidos (Figura 24B), así como el contenido hepático de lípidos y triglicéridos (Figura 24C-D). Además, comprobamos que ACC está inactivado en el hígado de los ratones *knockdown* de GPR55, como así lo demuestran los elevados niveles de pAMPK α , pACC y la reducción en malonil-CoA (Figura 24E-F).

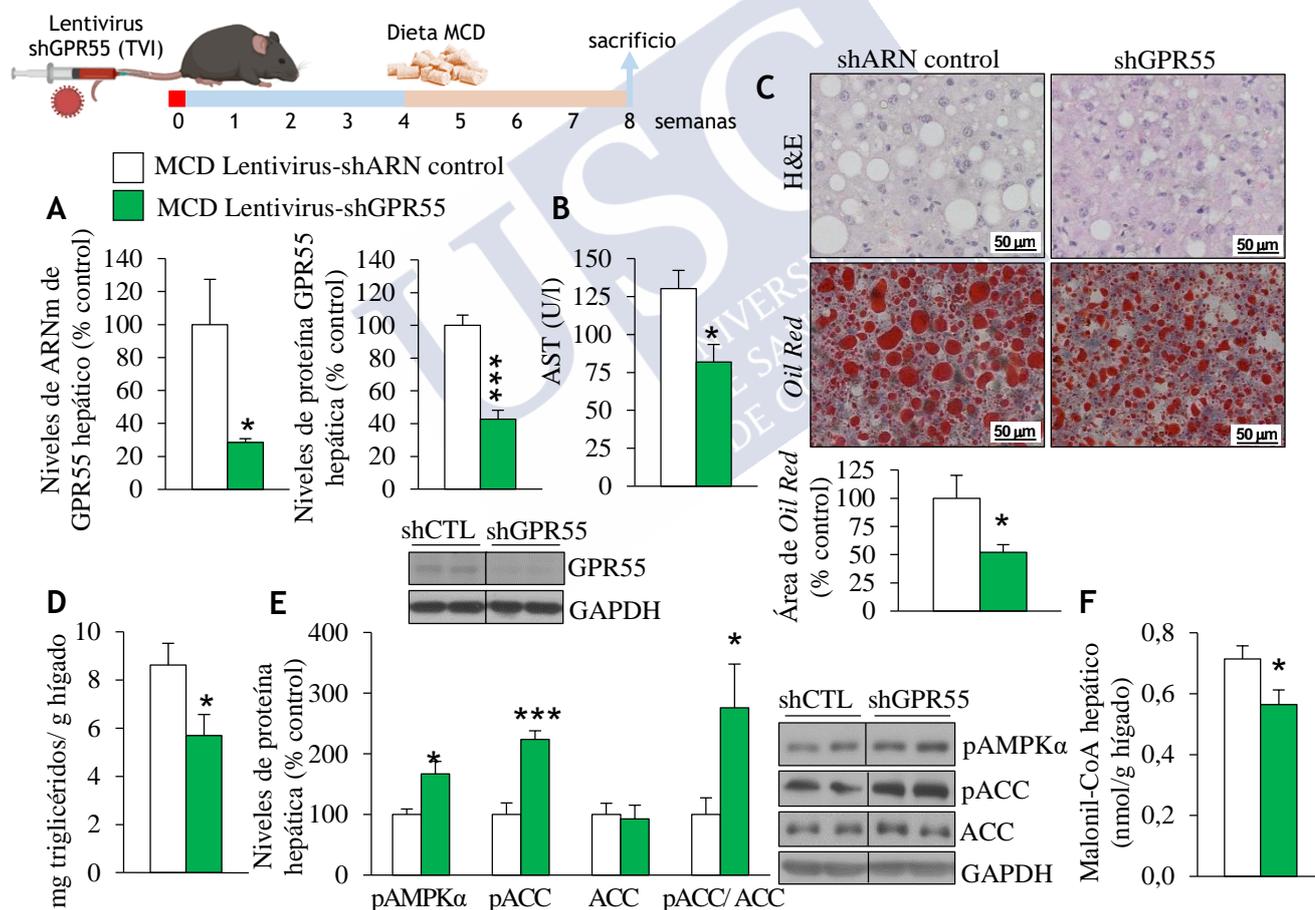


Figura 24. Efectos del silenciamiento de GPR55 en el metabolismo lipídico hepático de ratones alimentados con dieta deficiente en metionina y colina (MCD). Ratones C57BL/6 alimentados con dieta estándar recibieron una inyección en la vena de la cola (TVI) con vectores lentivirales codificando shARN control o shARN frente a GPR55, y 4 semanas después fueron alimentados con dieta MCD durante 4 semanas (n=7). (A) Niveles hepáticos de ARNm y proteína GPR55. (B) Niveles en suero de AST. (C) Tinción de Hematoxilina y Eosina (panel superior) y *Oil Red* (panel inferior) en secciones de hígado. Los lípidos fueron cuantificados en las secciones teñidas con *Oil Red*. (D) Contenido hepático de triglicéridos (método cloroformo-metanol). (E) Niveles de proteínas involucradas en el metabolismo lipídico. (F) Niveles hepáticos de malonil-CoA. HPRT y GAPDH fueron utilizados para normalizar los niveles de ARNm y proteína, respectivamente. Los datos están representados como media \pm error estándar de la media. Las diferencias estadísticas están indicadas como * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$.

5.2. EL SILENCIAMIENTO DE GPR55 HEPÁTICO REDUCE LA FIBROSIS EN RATONES CON NASH INDUCIDO POR DIETA DEFICIENTE EN METIONINA Y COLINA

A continuación evaluamos el posible efecto del silenciamiento de GPR55 en la fibrosis hepática causada por la dieta MCD. Encontramos que los ratones que recibieron shGPR55 muestran menos depósitos de colágeno hepático (Figura 25A) e hidroxiprolina, aminoácido presente mayoritariamente en el colágeno (Figura 25B). Consistentemente, la expresión de marcadores fibrogénicos y de activación de HSCs tales como colágeno 1 α 1 (COL1 α 1), colágeno 1 α 2 (COL1 α 2) y α SMA están reducidos (Figura 25C).

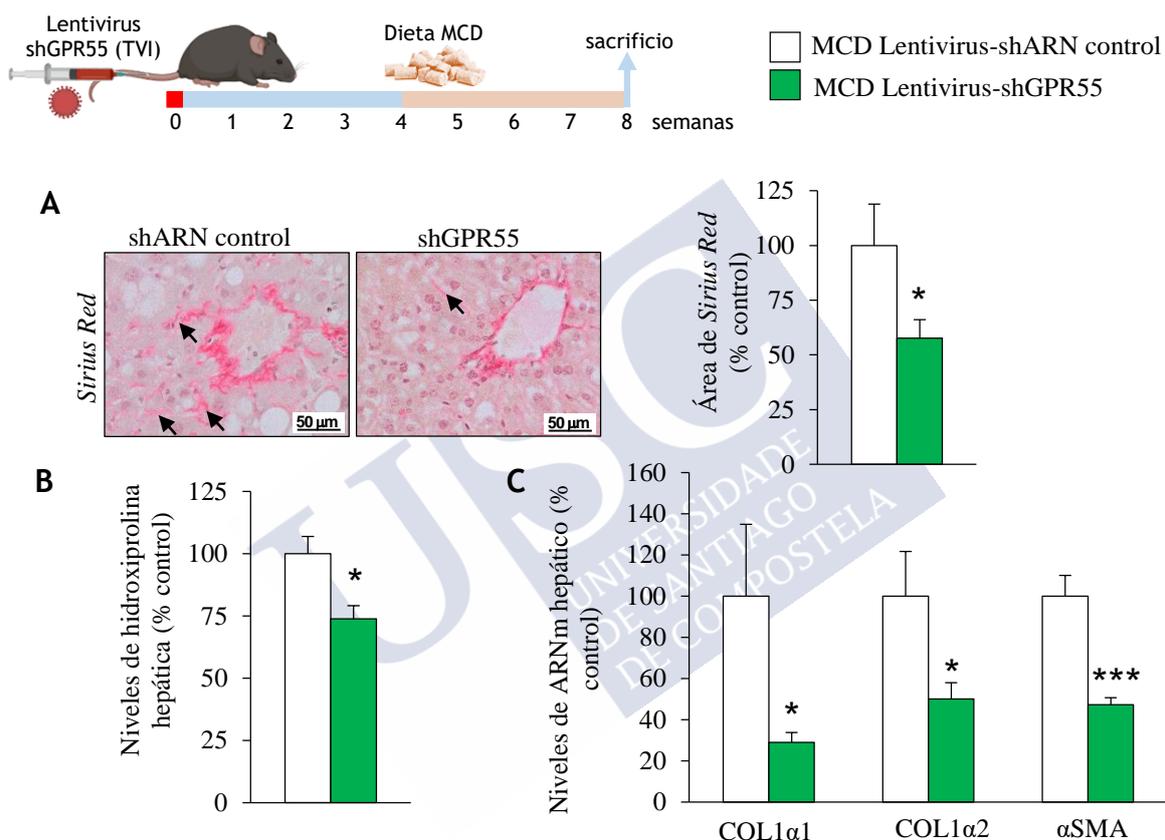


Figura 25. Efectos en fibrosis hepática del silenciamiento de GPR55 en ratones alimentados con dieta deficiente en metionina y colina (MCD). Ratones C57BL/6 alimentados con dieta estándar recibieron una inyección en la vena de la cola (TVI) con vectores lentivirales codificando shARN control o shARN frente a GPR55, y 4 semanas después fueron alimentados con dieta MCD durante 4 semanas (n=7). (A) Tinción *Sirius Red* en secciones de hígado. Los depósitos de colágeno fueron cuantificados en las secciones teñidas con *Sirius Red*. (B) Contenido hepático de hidroxiprolina. (C) Expresión de marcadores de fibrosis y activación de HSCs. HPRT fue utilizado para normalizar los niveles de ARNm. Los datos están representados como media \pm error estándar de la media. Las diferencias estadísticas están indicadas como *p<0,05, ***p<0,001.

De acuerdo con la reducción de la esteatosis y fibrosis hepáticas, los ratones alimentados con MCD manifiestan mejoras en marcadores de diferentes tipos de estrés celular y tisular tras ser tratados con shGPR55. Así, encontramos menor presencia de células inflamatorias F4/80 positivas (Figura 26A) y niveles de marcadores de inflamación (Figura 26B), estrés del RE (Figura 26C) y apoptosis (Figura 26D).

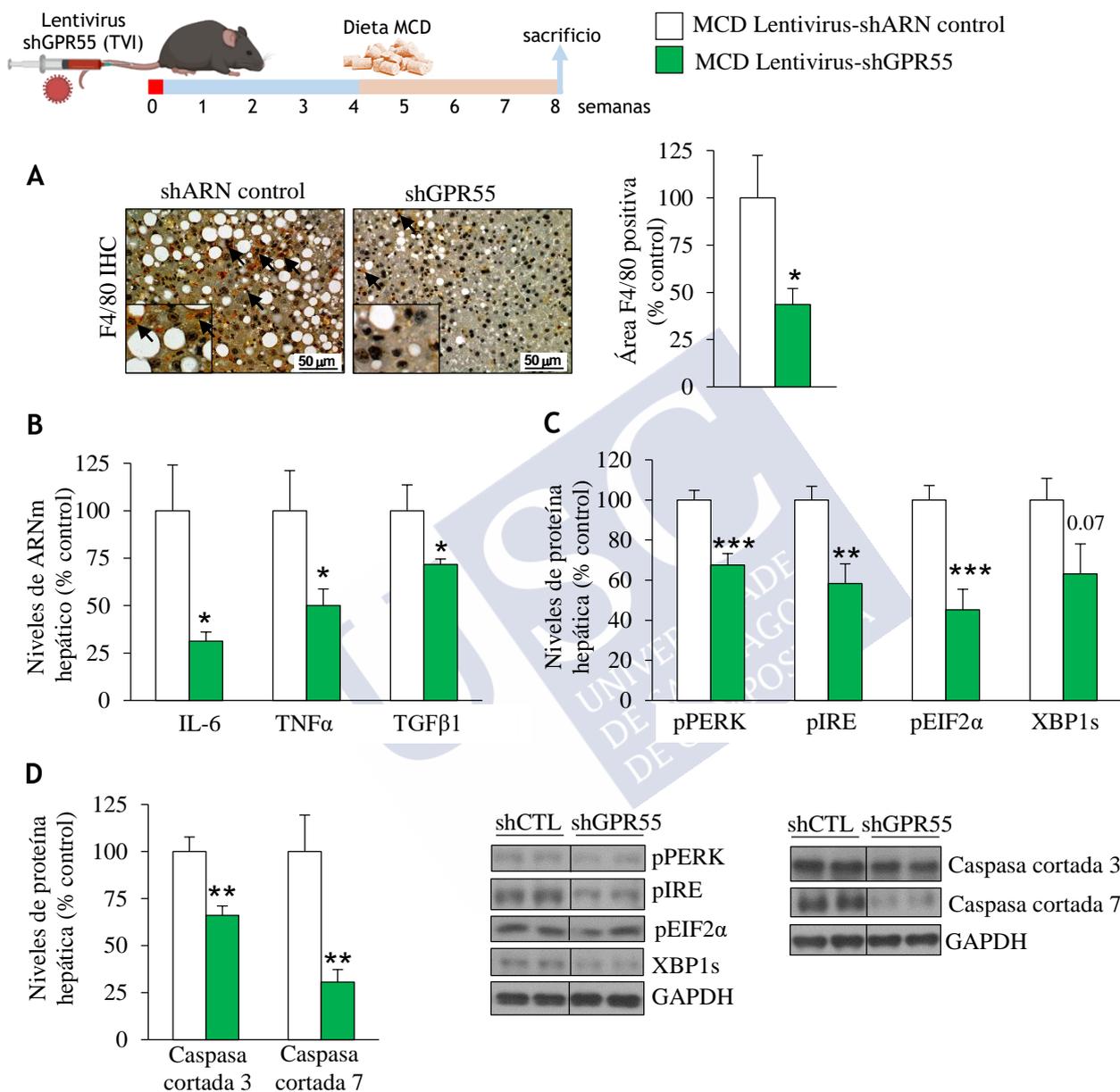


Figura 26. Análisis de inflamación, estrés del retículo endoplasmático (RE) y apoptosis en el hígado de ratones silenciando GPR55 hepático y alimentados con dieta deficiente en metionina y colina (MCD). Tinción inmunohistoquímica (IHC) de la proteína F4/80 en secciones de hígado (A) y niveles hepáticos de marcadores de inflamación (B), estrés del RE (C) y apoptosis (D) en ratones C57BL/6 que fueron alimentados con dieta estándar y recibieron una inyección en la vena de la cola (TVI) con vectores lentivirales codificando shARN control o shARN frente a GPR55, y 4 semanas después fueron alimentados con dieta MCD durante 4 semanas (n=7). El área F4/80-positiva fue cuantificada. HPRT y GAPDH fueron utilizados para normalizar los niveles de ARNm y proteína, respectivamente. Los datos están representados como media \pm error estándar de la media. Las diferencias estadísticas están indicadas como * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

6. El silenciamiento de GPR55 en el hígado reduce la fibrosis hepática inducida por tetracloruro de carbono *in vivo*

Para corroborar los efectos beneficiosos del silenciamiento de GPR55 en fibrosis hepática, utilizamos un modelo *in vivo* de fibrosis inducida por tetracloruro de carbono. Administramos semanalmente tetracloruro de carbono en ratones que también recibieron una inyección en la vena de la cola de lentivirus codificantes de shARN control o shARN frente a GPR55. Tras 6 semanas, encontramos que el tetracloruro de carbono induce un aumento en la expresión de GPR55 hepático (Figura 27A). Junto a ello, encontramos que están aumentados los niveles de AST en suero (Figura 27B), así como los depósitos de colágeno y la expresión de marcadores fibrogénicos y de activación de HSCs en el hígado (Figura 27C-D). Además, observamos que el tetracloruro de carbono induce reducciones en pAMPK α y pACC hepáticos (Figura 27E). El silenciamiento de GPR55 bloquea todos estos efectos del tetracloruro de carbono (Figura 27A-E).

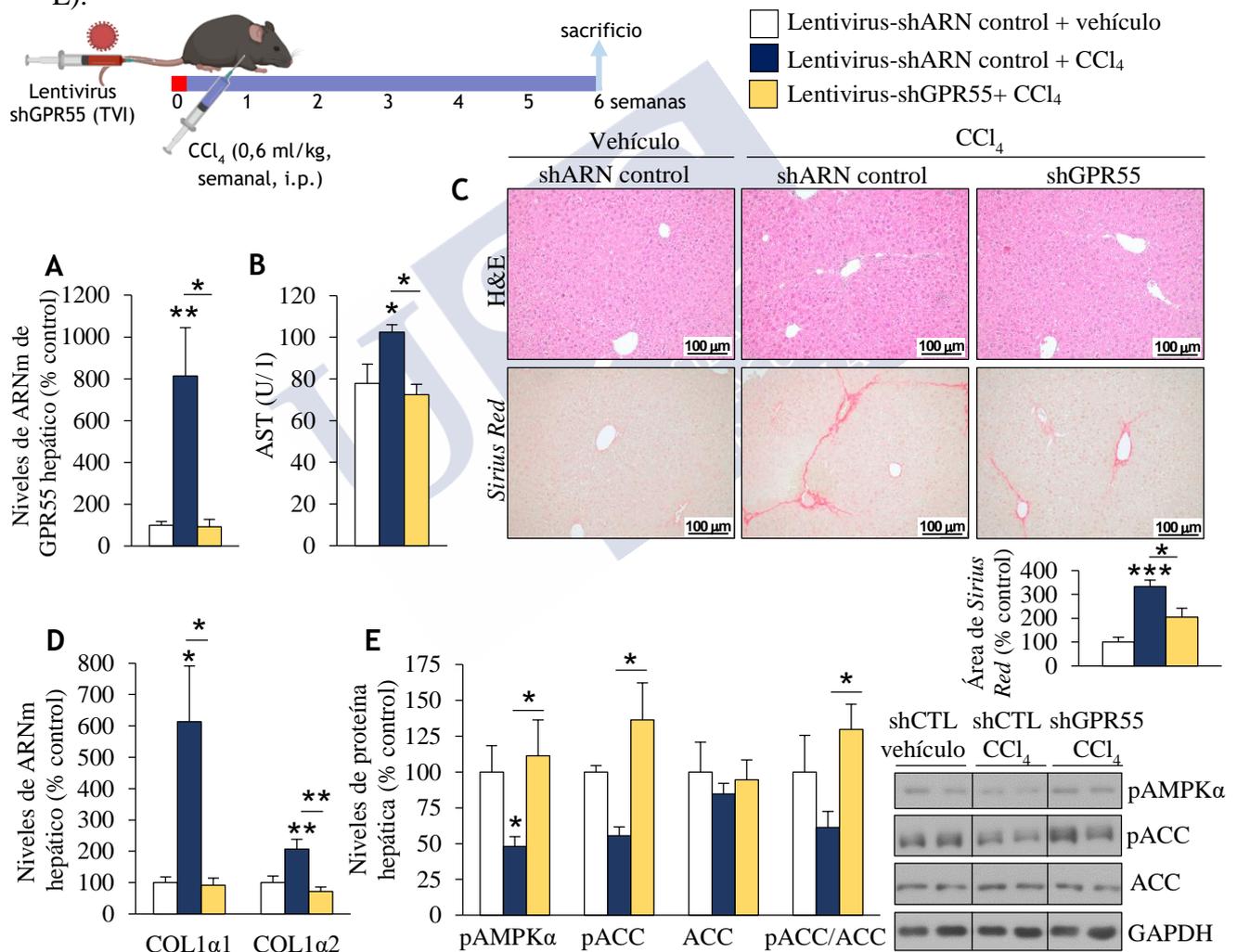


Figura 27. Efectos del silenciamiento de GPR55 hepático en ratones con fibrosis inducida por tetracloruro de carbono (CCl₄). Ratones C57BL/6 recibieron una inyección en la vena de la cola (TVI) con vectores lentivirales codificando shARN control o shARN frente a GPR55, y fueron tratados con CCl₄ semanalmente durante 6 semanas (n=8). (A) Expresión hepática de GPR55. (B) Niveles de AST en suero. (C) Tinción de Hematoxilina y Eosina y *Sirius Red* en secciones de hígado. Los depósitos de colágeno fueron cuantificados en las secciones teñidas con *Sirius Red*. (D) Expresión de marcadores de fibrosis y activación de HSCs. (E) Niveles de proteína hepática de marcadores de metabolismo lipídico. HPRT y GAPDH fueron utilizados para normalizar los niveles de ARNm. Los datos están representados como media \pm error estándar de la media. Las diferencias estadísticas están indicadas como *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.

7. El sistema LPI/GPR55 modula la activación de células estelares hepáticas a través de ACC

7.1. GPR55 SE EXPRESA EN CÉLULAS ESTELARES HEPÁTICAS Y SU EXPRESIÓN ESTÁ AUMENTADA EN RATONES CON NASH

Tras demostrar que la expresión de GPR55 es inducida en el hígado de ratones alimentados con dieta MCD y en ratones tratados con tetracloruro de carbono, y que el silenciamiento de GPR55 hepático reduce la fibrosis en ambos casos, el siguiente objetivo fue estudiar si el sistema LPI/GPR55 juega un papel en la activación de HSCs, clave en la fibrosis hepática. Para ello, el primer paso es estudiar si GPR55 se expresa en HSCs. La expresión de GPR55 fue detectada en altos niveles en HSCs primarias frente a hepatocitos primarios de ratón (Figura 28A), así como en la línea celular de HSCs humanas LX-2 frente a hepatocitos humanos THLE2 (Figura 28B). Además, HSCs aisladas de hígados de ratones alimentados con dieta MCD muestran unos niveles de ARNm de GPR55 aumentados frente a los obtenidos de ratones alimentados con dieta estándar (Figura 28C).

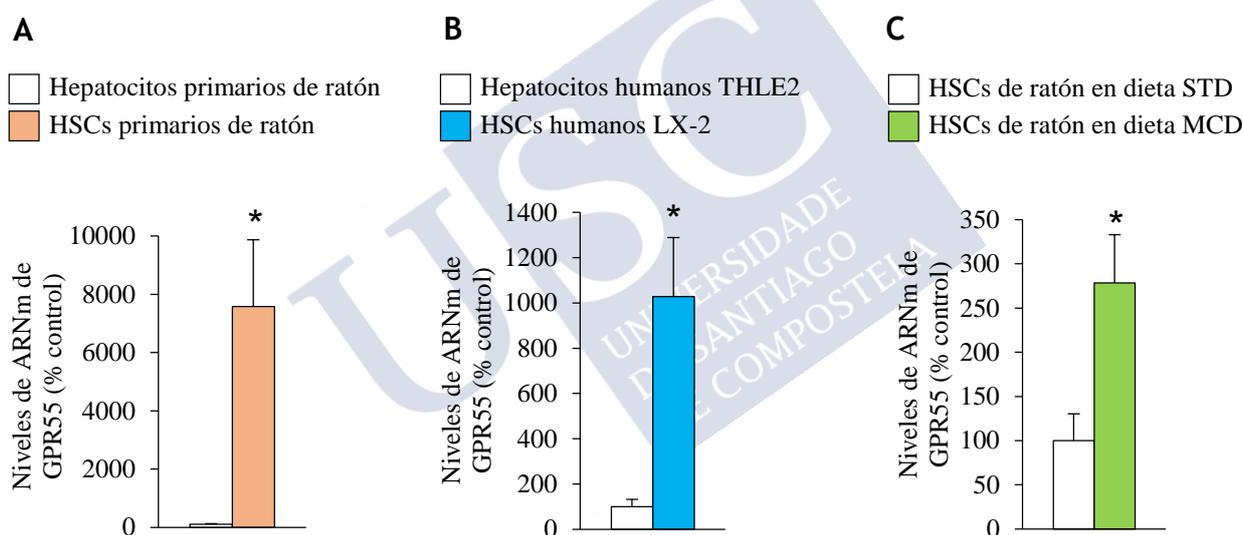


Figura 28. Expresión de GPR55 en *hepatic stellate cells* (HSCs) de ratones y humanas. Niveles de ARNm de GPR55 en: (A) HSCs primarios frente a hepatocitos primarios obtenidos de ratones alimentados con dieta estándar (n=4-5); (B) HSCs humanos LX-2 frente a hepatocitos humanos THLE2(4-8); (C) HSCs aisladas de ratones alimentados con dieta MCD o estándar durante 4 semanas (n=2-4). HPRT fue utilizado para normalizar los niveles de ARNm. Los datos están representados como media \pm error estándar de la media. Las diferencias estadísticas están indicadas como * $p < 0,05$.

7.2. LPI ACTIVA LAS CÉLULAS ESTELARES HEPÁTICAS

El siguiente paso fue estudiar el posible efecto de LPI en HSCs. La administración de LPI incrementa la expresión de GPR55 tras 1 hora, y tras 12 horas es capaz de estimular la expresión de *actin alpha 2* (ACTA2), colágeno 1 α 1 (COL1 α 1) y colágeno 1 α 2 (COL1 α 2), marcadores de activación de HSC y producción de matriz extracelular, y estimular la proliferación (Figura 29A-C). Ya que el metabolismo lipídico es esencial para el estado de activación de las HSCs, evaluamos el efecto de LPI sobre ACC. En línea con los hallazgos mostrados en hepatocitos, el LPI incrementa pAMPK α y pACC (Figura 29D). Curiosamente, las células LX-2 tratadas con LPI incrementan la acumulación de lípidos (Figura 29E).

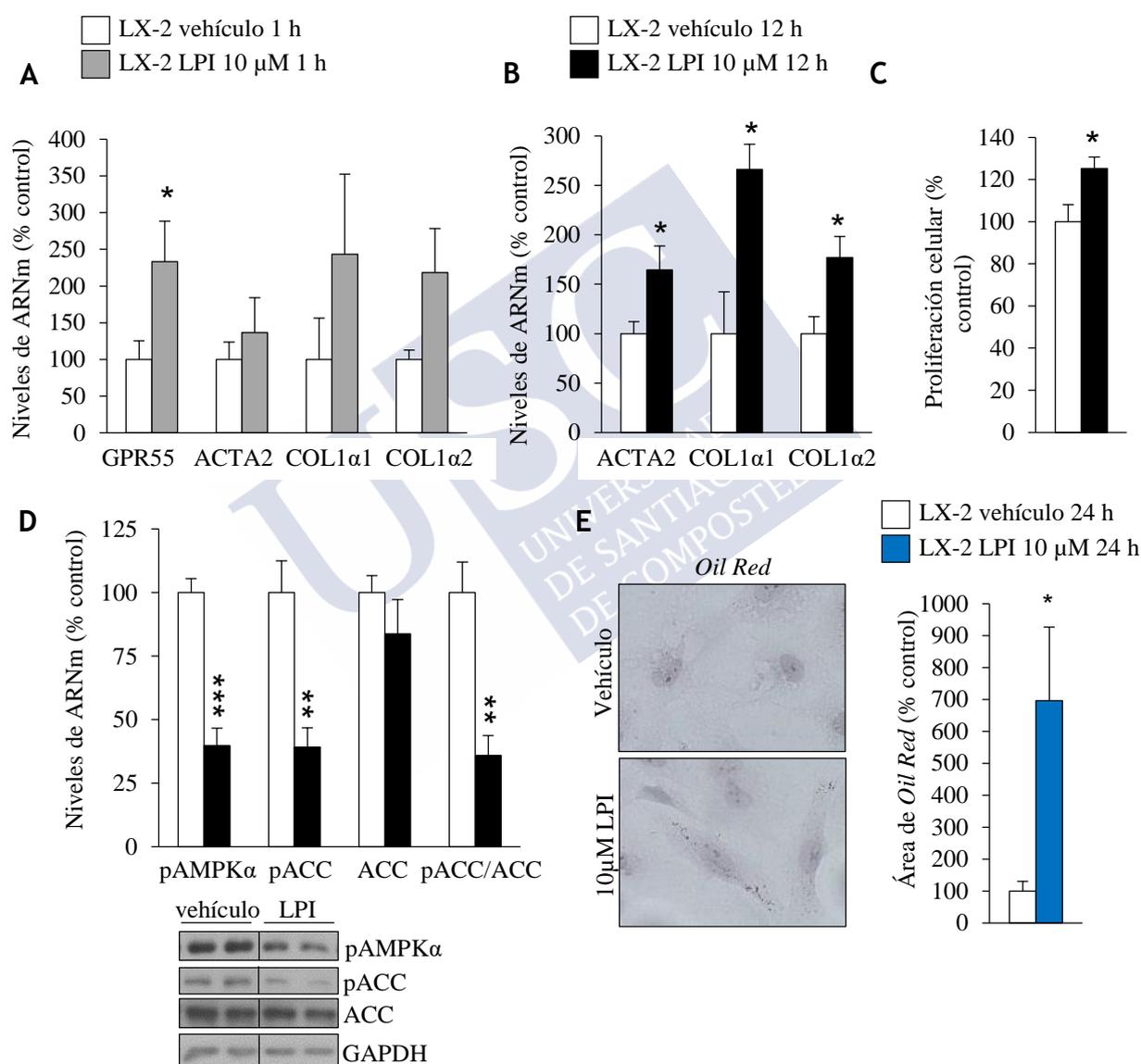


Figura 29. Efectos de LPI en la activación de hepatic stellate cells (HSCs) LX-2 humanas. Niveles de ARNm de GPR55, ACTA2, COL1 α 1 and COL1 α 2 en células LX-2 tras ser tratadas con 10 μ M LPI o vehículo durante 1 hora (A) o 12 horas (B) (n=8). Tras 12 horas de administración de LPI, también fue medida (C) la proliferación relativa de LX-2 por ensayo MTT (3(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide), y (D) los niveles de proteína de pAMPK α , pACC y ACC (n=6-12). (E) Células LX-2 mostrando tinción de lípidos tras la administración de LPI durante 24 horas (n=6). Los lípidos fueron cuantificados y normalizados por el número de núcleos totales por campo. HPRT y GAPDH fueron utilizados para normalizar los niveles de ARNm y proteínas, respectivamente. Las diferencias estadísticas están indicadas como *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.

7.3. LPI ACTIVA LAS CÉLULAS ESTELARES HEPÁTICAS A TRAVÉS DE GPR55

A continuación, quisimos averiguar si GPR55 estaba mediando los efectos de LPI en HSCs. Para ello, silenciamos GPR55 en las células LX-2 (Figura 30A) y encontramos que el aumento de la expresión de ACTA2, COL1 α 1 y COL1 α 2 y de la proliferación de las células LX-2 inducidas por LPI son bloqueadas cuando se silencia GPR55 (Figura 30B-C). Similar a lo observado en hepatocitos, la inhibición de GPR55 conlleva también que LPI no sea capaz de disminuir los niveles de pAMPK α y pACC (Figura 30D).

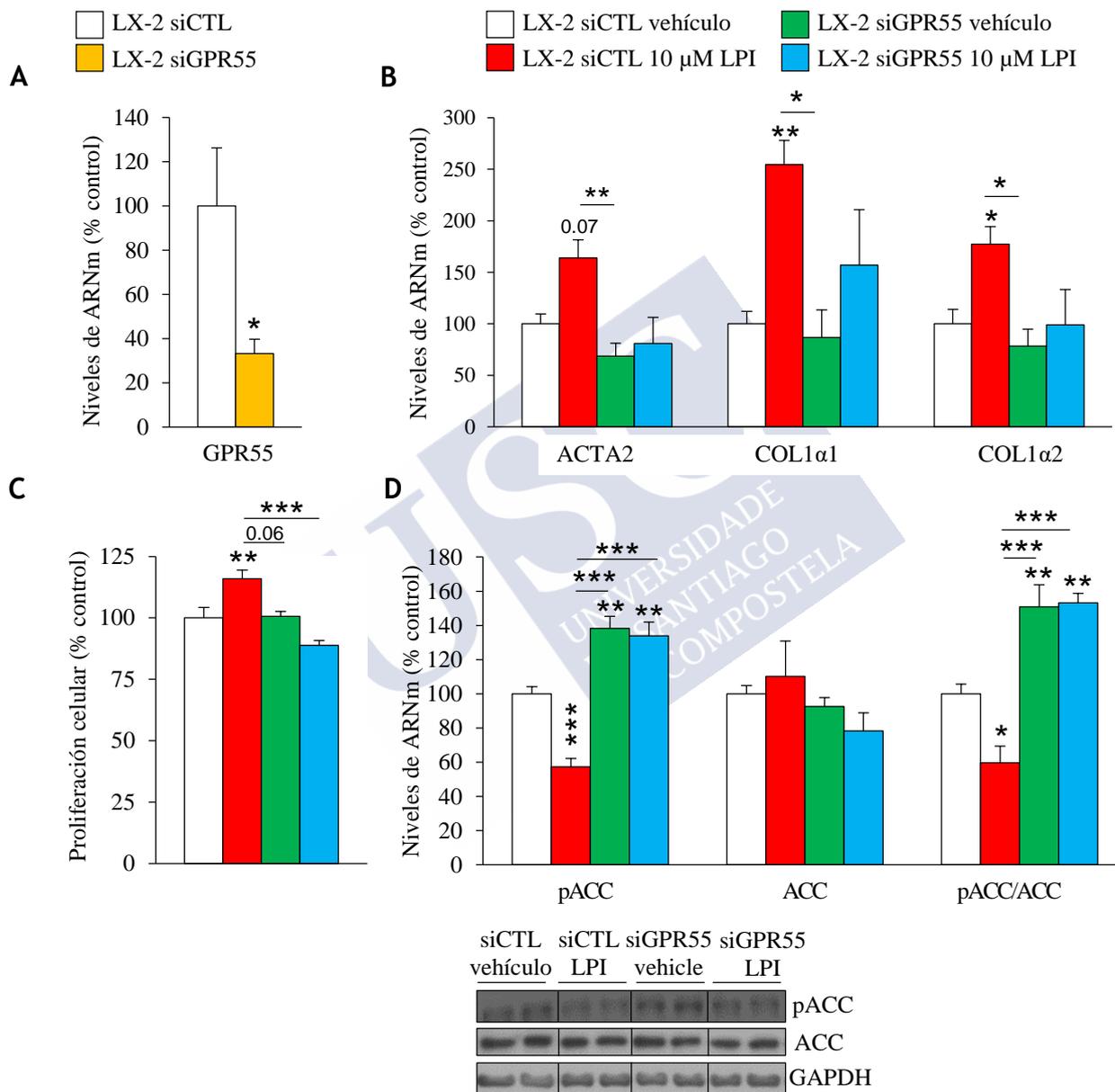


Figura 30. Efectos de LPI en la activación de LX-2 silenciando GPR55. Expresión de GPR55 (A) (n=6), ACTA2, COL1 α 1 y COL1 α 1 (B) (n=11), proliferación relativa (C) (n=12) y niveles proteicos de pACC y ACC (D) (n=6) en células LX-2 transfectadas con siARN control o siARN frente a GPR55. HPRT y GAPDH fueron utilizados para normalizar los niveles de ARNm y proteínas, respectivamente. Las diferencias estadísticas están indicadas como *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.

7.4. ACC MEDIA LOS EFECTOS DE LPI/GPR55 EN LA ACTIVACIÓN DE CÉLULAS ESTELARES HEPÁTICAS

Para evaluar la posible relevancia de ACC mediando las acciones de LPI en células LX-2, silenciamos ACC α en células LX-2 (Figura 31A). Encontramos que la inhibición de ACC α bloquea las acciones de LPI como inductor de la expresión de ACTA2, COL1 α 1 y COL1 α 2 y de la proliferación en LX-2 (Figura 31B-C).

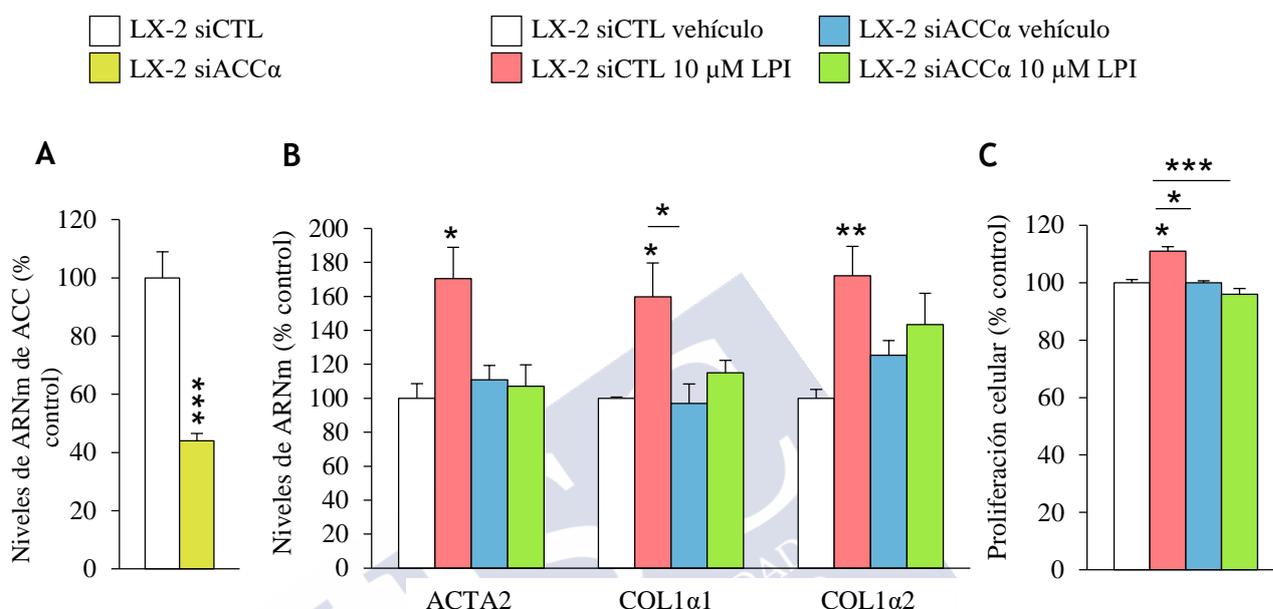


Figura 31. Efectos de LPI en la activación de LX-2 silenciando ACC α . Expresión de ACC α (A) (n=6), ACTA2, COL1 α 1 y COL1 α 2 (B) (n=6) y proliferación relativa (C) (n=7-8) en células LX-2 transfectadas con siARN control o siARN frente a ACC α . HPRT fue utilizado para normalizar los niveles de ARNm. Las diferencias estadísticas están indicadas como *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.

7.5. EL SILENCIAMIENTO DE GPR55 EN CÉLULAS LX-2 PROTEGE FRENTE A LA ACTIVACIÓN INDUCIDA POR TGF β 1.

Una vez descubierto el nuevo papel del sistema LPI/GPR55 en la activación de las HSCs, quisimos estudiar si GPR55 podía modular la activación de HSCs inducida por TGF β 1, uno de los más potentes factores profibrogénicos conocidos. Para ello, tratamos con TGF β 1 a células LX-2 y encontramos que la expresión de GPR55 está aumentada, además de los esperados incrementos en la expresión de ACTA2, COL1 α 1 y COL1 α 2 (Figura 32A-B). A continuación, silenciamos GPR55 y vimos que la capacidad de TGF β 1 para inducir la expresión de estos marcadores de activación y fibrogénesis estaba atenuada (Figura 32C). Sin embargo, el tratamiento con LPI no incrementa significativamente la expresión de TGF β 1, sugiriendo que, a pesar de que tanto el LPI como el TGF β 1 actúan a través de GPR55 para promover un estado profibrótico, no existe una relación mecánica entre ambas moléculas (Figura 32D).

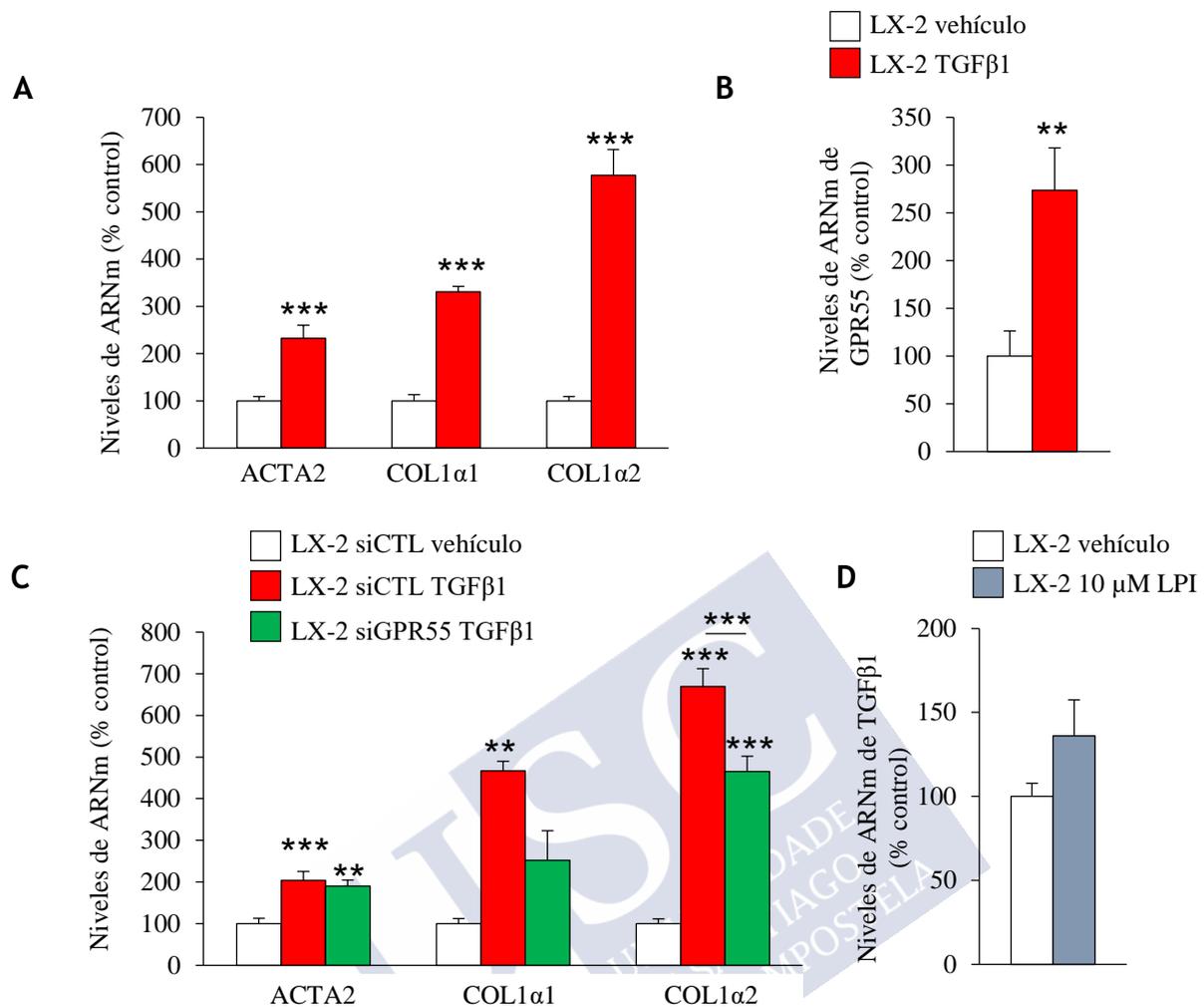


Figura 32. Silenciamiento de GPR55 en células LX-2 tratadas con TGFβ1. Expresión de (A) ACTA2, COL1α1 y COL1α2, y (B) GPR55 en células LX-2 tratadas con TGFβ1 durante 24 horas (n=6). (C) Expresión de ACTA2, COL1α1 y COL1α2 en células LX-2 transfectadas con siARN control o siARN frente a GPR55 y tratadas con TGFβ1 durante 24 horas (n=6-8). Expresión de TGFβ1 tras 12 horas de tratamiento con 10 μM LPI en LX-2 (n=8). HPRT fue utilizado para normalizar los niveles de ARNm. Las diferencias estadísticas están indicadas como **p<0,01, ***p<0,001.

DISCUSIÓN





En el presente estudio se muestra por primera vez que GPR55 está sobreexpresado en el hígado de humanos y ratones con NAFLD, y que la activación de GPR55 por LPI tiene un impacto en el metabolismo en el hígado. Por un lado, promueve la acumulación lipídica, participando en la progresión de la esteatosis hepática en NAFL. Por otro, activa los procesos fibrogénicos y acelera el desarrollo de NASH. Demostramos *in vivo* que el silenciamiento de GPR55 tiene potencial terapéutico, ya que mejora el NAFL inducido por dieta vHFD, el NASH inducido por dieta MCD, y la fibrosis inducida por tetracloruro de carbono. Nuestros hallazgos apuntan en la misma dirección que un creciente cuerpo de literatura científica que muestra que el sistema endocannabinoide está sobreactivado en enfermedades metabólicas como obesidad, diabetes tipo 2 y NAFLD (368). En la enfermedad hepática, esta desregulación se manifiesta en los elevados niveles de AEA, 2-AG en suero y de CB1 y CB2 en el hígado de humanos y roedores (240, 242-244, 251, 256, 263). Las principales acciones del sistema endocannabinoide en NAFL han sido atribuidas a CB1. El aumento de su expresión es inducido por dieta alta en grasa y conlleva una mayor acumulación de lípidos, mientras que su inhibición farmacológica o deficiencia hepática bloquean este efecto (244, 247, 248). Específicamente, CB1 promueve la DNL, con diversos estudios indicando que regula el factor de transcripción SREBP1c, e inhibe β -oxidación (244, 246, 249). Lo que se conoce de CB1 en NASH y específicamente en la fibrogénesis es menos claro. Si bien se ha observado que el bloqueo farmacológico de CB1 es beneficioso en fibrosis, el mecanismo subyacente es poco conocido (256, 259, 260). CB2 parece jugar un papel opuesto a CB1 en este proceso, dado que su activación reduce el daño en modelos de fibrosis *in vivo* (252, 257, 263). Nuestro estudio muestra que la activación de GPR55 hepática regula directamente la actividad enzimática de ACC y consecuentemente regula el metabolismo lipídico de hepatocitos y HSCs, promoviendo la esteatosis hepática y la fibrosis, respectivamente, dando como resultado global la progresión de NAFLD.

Algunos tipos de lisofosfolípidos han emergido como lípidos bioactivos con una función señalizadora relevante en inflamación y NAFLD (369). De hecho, algunos han sido propuestos como marcadores circulantes de diagnóstico de la enfermedad hepática (370). En línea con esto, nuestro estudio indica que los niveles de LPI están incrementados en pacientes con NASH frente a los que manifiestan sólo NAFL. Los mecanismos por los que LPI desencadena las alteraciones celulares características de NASH parecen involucrar la reprogramación del metabolismo de ácidos grasos de los hepatocitos y las HSCs. LPI promueve la DNL reduciendo la fosforilación de ACC, haciéndola enzimáticamente más activa. Además, encontramos que LPI inhibe la β -oxidación, consistente con la disminución de CPT1A, que es imprescindible en el transporte de ácidos grasos de cadena media a través de la membrana mitocondrial y paso limitante en esta ruta catalítica. Nuestros datos mostrando la repercusión de LPI en el metabolismo celular hepático concuerdan con estudios previos que muestran que los lisofosfolípidos son capaces de inhibir la oxidación de ácidos grasos (371) y generar daño hepático (307). Se ha publicado recientemente que MBOAT7, que cataliza la esterificación de ácidos grasos específicamente en LPI, está involucrada en NAFLD. El silenciamiento de MBOAT7 en ratones alimentados con dieta alta en grasa provoca la acumulación de las especies LPI(16:0) y LPI(18:1) en el hígado y una esteatosis hepática exacerbada. Llama la atención que esas dos especies de LPI son las que nosotros observamos correlacionadas con el NAS, particularmente con la inflamación y el *ballooning*. Un tercer estudio encontró que bajos niveles hepáticos de fosfatidilinositol(18:1/20:4), pero no otras especies, permite discriminar NASH frente a NAFL, enfatizando el posible papel de la especie LPI(18:1) en la enfermedad hepática (372). En conjunto, estos estudios implican a LPI como mediador en el desarrollo de NAFLD. No se nos escapa, sin embargo, que en estos estudios existen ciertas diferencias relevantes que merece la pena valorar. En primer lugar, los autores que caracterizaron el fenotipo del ratón

knockdown de MBOAT7 no observaron cambios en los niveles de marcadores de DNL en el hígado, pero sí un incremento en CPT1A, inesperado en base al mayor grado de esteatosis que manifiestan (307). La detección de aumentos en los niveles de las proteínas perilipinas PLIN 2 y PLIN3, implicadas en la formación de vesículas lipídicas, en los ratones silenciando MBOAT7 llevan a los autores a sugerir que su desregulación, junto con la inducción de la inflamación, son potencialmente responsables de la acumulación de lípidos. Sin embargo, la ausencia de resultados con demostración causal les impide constatar si LPI tiene acciones directas en el metabolismo lipídico y secundariamente afecta a la inflamación, o viceversa. Contrariamente, nosotros sí llevamos a cabo experimentos bloqueando la acción de ACC tras el tratamiento de LPI *in vivo* e *in vitro*, y observamos que los efectos en inflamación inducidos por LPI desaparecen. Esto demuestra que la esteatosis precede a la inflamación en NAFLD inducido por LPI. En segundo lugar, los mismos autores proponen que LPI promueve la fibrosis en el hígado, apoyándose en la observación de que el tratamiento agudo con LPI induce *in vivo* la expresión de genes marcadores de fibrosis en el hígado. Sin embargo, no aportan datos sobre si LPI tiene acciones directas en miofibroblastos, o bien se debe a un efecto derivado del daño hepático generado en los hepatocitos. Esta cuestión nos llevó a testar los efectos de LPI separadamente en hepatocitos y células HSCs, y es en estas últimas donde observamos que el tratamiento con LPI tiene efectos directos en la fibrogénesis, y no a través de señales de estrés celular procedentes de los hepatocitos. *In vivo*, no hemos sido capaces de detectar fibrosis histológicamente relevante en hígado simplemente tras el tratamiento subcrónico de LPI, en ausencia de cualquier otro estímulo fibrogénico adicional como la dieta. Las aparentes diferencias entre los resultados de ambos grupos podrían deberse a variaciones en el protocolo (aunque las dosis de LPI por cada inyección fueron similares en los dos estudios, el número de inyecciones no: dos veces en 24 horas en su estudio frente a tratamiento diario durante 7 días en el nuestro) o a las diferencias entre los análisis de expresión y los análisis histológicos. Ejemplo de ello es el uso de la dieta alta en grasa para inducir estadios avanzados de NASH, causando aumento de los niveles de expresión de COL1 α 2 tras 20 semanas, pero que difícilmente generará fibrosis detectada histológicamente (307). Es por ello que hemos querido utilizar diversas técnicas de evaluación de la fibrogénesis y activación de HSCs, como la expresión de marcadores de proteínas de ECM, morfología celular y proliferación *in vitro*, y análisis de expresión, tinción histológica específica y niveles de hidroxiprolina *in vivo*. En tercer lugar, el silenciamiento de MBOAT7 se asocia con alteraciones muy notables en la tolerancia a glucosa, sensibilidad a insulina y resistencia hepática a insulina. Nosotros estudiamos la posible relación entre los niveles de LPI en suero de pacientes con NAFLD y la desregulación de la homeostasis de la glucosa y fuimos incapaces de detectar cambios en ninguna de las doce especies de LPI estudiadas o en los niveles de LPI totales cuando comparamos los pacientes diabéticos con los no diabéticos, sugiriendo que los efectos de LPI en NAFLD son independientes de la desregulación del metabolismo de la glucosa del organismo. Las discrepancias entre ambos estudios podrían deberse a un posible efecto extrahepático del *knockdown* de MBOAT7 en todo el organismo, pudiendo afectar a órganos relevantes en el metabolismo de glucosa (por ejemplo, MBOAT7 se expresa abundantemente en el cerebro, clave en esta función) (340) y consecuentemente repercutiendo en la sensibilidad a insulina y tolerancia a glucosa del ratón. También es posible que la mejora en el metabolismo hepático de la glucosa se deba simplemente a la reducción de la esteatosis y la inflamación. A pesar de estas diferencias, es muy destacable el hecho de que ambos estudios coinciden en la acción dual de LPI como promotor de acumulación lipídica y de fibrogénesis hepática en NAFLD.

GPR55, receptor de LPI, está aumentado en el hígado de pacientes obesos con NAFLD. Sin embargo, parece que este incremento no es dependiente de la obesidad, ya que no

encontramos correlación entre expresión de GPR55 e IMC en estos pacientes, y aumentos similares de GPR55 fueron encontrados en el hígado de pacientes no obesos con NAFLD. Resulta llamativa la relación entre la mayor expresión del receptor GPR55 y el grado de desarrollo de NAFLD. Si bien es cierto que en pacientes obesos y no obesos, la expresión del receptor está aumentada tanto en los que tienen sólo NAFL como en aquéllos con NASH, encontramos una correlación positiva entre la expresión de GPR55 y el NAS en la cohorte de pacientes no obesos, indicando que GPR55 hepático aumenta con la severidad de la enfermedad. En cualquier caso, un rasgo común a los estudios con humanos es la activación de GPR55 como un evento temprano en la aparición de NAFL, contribuyendo a la dislipidemia y desregulación metabólica. Esta observación es corroborada con las mediciones en los diferentes modelos de NAFLD en ratones. Los ratones alimentados con HFD que desarrollan NAFLD en contexto de obesidad, pero también los alimentados con MCD que presentan reducido peso corporal, muestran aumento de expresión de GPR55 en el hígado. Además, este incremento es ya detectable en etapas tempranas de NAFL (6 semanas de alimentación con HFD son suficientes para inducir la sobreexpresión del receptor), pero también está presente en etapas más severas de la enfermedad, como el NASH provocado por la alimentación con CDHFD durante 52 semanas o la fibrosis inducida por tetracloruro de carbono. Es importante destacar que los datos de GPR55 en el hígado son homogéneos entre roedores y humanos. Este no es el caso de GPR55 en tejido adiposo blanco, donde la expresión de ARNm está reducida en roedores obesos pero incrementada en el tejido adiposo de pacientes obesos (279). Además, mientras que la activación *ex vivo* de GPR55 en tejido adiposo humano induce la expresión de marcadores de DNL, el tratamiento con LPI en células de ratón 3T3-L1 no induce una mayor acumulación de lípidos (328).

De acuerdo con la estimulación de la acumulación de lípidos generada por LPI en dos líneas celulares humanas diferentes (THLE2 y HepG2) y ratones, el silenciamiento de GPR55 hepático mejora el NAFL inducido por vHFD, así como el NASH causado por MCD y la fibrosis inducida por tetracloruro de carbono *in vivo*. El silenciamiento específico de tejido es una herramienta muy relevante para elucidar su función, ya que GPR55 está ampliamente expresado en tejidos reguladores del metabolismo energético de la glucosa y los lípidos, como cerebro, páncreas, músculo y tejido adiposo blanco (338). Varios estudios recogen que el fenotipado metabólico del ratón GPR55^{-/-} muestra resultados inconsistentes. Mientras dos estudios muestran incrementos de adiposidad y resistencia a insulina en estos ratones (328, 334) otros no encuentran diferencias significativas (317). Además, diferencias en la composición corporal no son reproducibles (317, 328, 334). Curiosamente, un estudio muestra que la ablación genética de GPR55 en ratones provoca un aumento de expresión hepática de marcadores de DNL, específicamente ACC α , FAS, DGAT1 y SCD1, pero en esta investigación no se muestran datos de la evaluación directa de la esteatosis hepática y es posible que factores extrahepáticos estén condicionando la expresión de estos genes (325). Otro estudio muestra datos que apuntan a la existencia de resistencia hepática a insulina en ratones sin GPR55 (334). En esta investigación se presentan los niveles de proteínas de varios marcadores de la ruta de la señalización de la insulina tras su administración. Sin embargo, es probable que todos los órganos que expresen GPR55 estén contribuyendo al fenotipo observado (por ejemplo, GPR55 en islotes pancreáticos regula la glucemia y la secreción de insulina) (336) y que existan compensaciones metabólicas a causa de la ausencia de GPR55 desde la etapa inicial del desarrollo. Por tanto, estos resultados no demuestran por sí solo que GPR55 tenga efectos en la señalización de la insulina. De hecho, nosotros no encontramos diferencias en el test de tolerancia a glucosa tras la inhibición hepática de GPR55 en ratones alimentados con vHFD (datos no mostrados), aunque sí una tendencia no significativa a la mejora, posiblemente

secundaria a la reducción clara en el contenido lipídico, así como menor inflamación, estrés del RE y apoptosis hepáticos. Apoyando este planteamiento, un estudio no encontró que la expresión de GPR55 variase en pacientes humanos obesos en función de su grado de intolerancia a la glucosa (279). El uso de nuestra herramienta virogenética reveló que una reducción parcial de GPR55 hepático en ratones (60-70%), es suficiente para alcanzar una mejora en el daño hepático en ratones con NAFLD. Estos resultados *in vivo* son consistentes con lo obtenido con líneas celulares de hepatocitos humanos, donde el silenciamiento de GPR55 reduce notablemente la acumulación lipídica inducida por ácido oleico y bloquea la esteatosis inducida por LPI, indicando, en conjunto, que el sistema GPR55/LPI regula directamente el metabolismo lipídico en el hígado.

Ya que la expresión de GPR55 está aumentada en hepatocitos y HSCs procedentes de ratones con NASH inducido por dieta MCD, consideramos importante investigar si la ruta LPI/GPR55 era relevante en ambos tipos celulares hepáticos. Nuestros resultados indican que LPI incrementa el contenido lipídico en los hepatocitos, un efecto que no se observa al silenciar GPR55. Además, LPI incrementa la expresión de genes profibróticos como ACTA2, COL1 α 1 y COL1 α 2 en HSCs, y la proliferación celular, pero no tiene efecto cuando GPR55 es inhibido. De este modo, describimos por primera vez GPR55 es expresado en HSCs y que media los efectos de LPI en activación y fibrogénesis. El rol de GPR55 en fibrosis, sin embargo, parece ir más allá de ser un mediador de las acciones de LPI. Así, observamos que TGF β 1, uno de los factores más potentes y ampliamente conocidos en relación a la activación de las HSCs, no es capaz de inducir un incremento tan marcado en la expresión de ACTA2, COL1 α 1 y COL1 α 2 de HSCs cuando éstas silencian GPR55. Este resultado indica que GPR55 contribuye a las acciones fibrogénicas de TGF β 1, lo cual encaja con el conocimiento existente sobre la ruta de señalización de TGF β 1, fuertemente controlada por una gran variedad de circuitos de retroalimentación positiva y negativa (137). El hecho de que LPI no induzca un incremento significativo (aunque sí una tendencia) de la expresión de TGF β 1 hace pensar que el sistema LPI/GPR55 activa las células HSCs de manera independiente de TGF β 1. En otras palabras, nuestros resultados apuntan a que tanto LPI como TGF β 1 necesitan total o parcialmente a GPR55 para inducir fibrosis, pero mecanísticamente no parecen estar estrechamente relacionados. El sistema LPI/GPR55 puede ser añadido a la lista de señales que llevan a la activación de HSCs, como TGF β 1, PDGF y CTGF. Nuestros resultados obtenidos *in vitro* concuerdan con la mejora de fibrosis inducida por tetracloruro de carbono o por MCD en ratones cuando se silencia GPR55. Por tanto, nuestros resultados indican que GPR55 está implicado directamente en la fibrosis hepática regulando la activación de las HSCs.

ACC produce malonil-CoA a partir de acetil-CoA, y ambos son los precursores biosintéticos de los ácidos grasos en la ruta de DNL. Estudios preclínicos han demostrado que el silenciamiento génico o la inhibición farmacológica de las dos isoformas de ACC reducen la esteatosis hepática (52-55, 353). Ensayos clínicos mostraron que PF-05221304 y GS-0976, ambos inhibidores de ACC α y ACC β , reducen respectivamente la esteatosis hepática en pacientes con NAFL y la esteatosis hepática y marcadores de fibrosis en pacientes con NASH (174, 175, 373). En nuestro estudio, apoyamos que el sistema LPI/GPR55 modula el metabolismo lipídico en el hígado a través de ACC basándonos en que: a) existe una correlación entre los niveles de pACC (y su actividad enzimática) y la activación de la vía LPI/GPR55 *in vivo* e *in vitro*, b) el silenciamiento de ACC α bloquea totalmente los efectos de LPI en hepatocitos y HSCs, c) la inhibición farmacológica de ACC α y ACC β por GS-0976 suprime la esteatosis hepática inducida por LPI y d) la sobreexpresión de GPR55 hepático en humanos y ratones con NAFLD. Es un hecho que la DNL está sobreactivada en NAFLD (25, 31). La

enzima ACC controla el flujo de la DNL catalizando el primer paso de la ruta. Aunque su función es eminentemente anabólica, ACC controla también la β -oxidación. Esta acción dual de ACC es razonable desde el punto de vista bioenergético de la célula y es ejercido mayoritariamente de manera isoforma-específica. Mientras que ACC α , citosólica y la más abundante, proporciona malonil-CoA que será usado por FAS en DNL, ACC β , mitocondrial, genera incrementos locales de malonil-CoA que inhiben CPT1A y consecuentemente la β -oxidación (51-54). De forma interesante, en nuestro estudio hemos encontrado que tanto la acumulación lipídica en hepatocitos como la fibrogénesis de HSCs inducidas por la activación de LPI/GPR55 son totalmente bloqueados tras el silenciamiento de ACC α , indicando que esta isoforma es la que media sus efectos. Sin embargo, no se nos escapa que podría haber otras vías por las que LPI y GPR55 ejercen parte de sus acciones en el metabolismo lipídico. Existen ciertos indicios que sugieren que la β -oxidación, dependiente o independiente de ACC β , también está controlada por el sistema LPI/GPR55. En primer lugar, ensayos funcionales revelaron una reducción en la β -oxidación inducida por LPI y dependiente de GPR55 de hepatocitos. Además, el bloqueo farmacológico de la β -oxidación anula totalmente el efecto inhibitorio de LPI en la tasa de consumo de oxígeno en hepatocitos. En la misma línea, la administración de LPI *in vivo* e *in vitro* desencadena una reducción en los niveles de proteína CPT1A, así como incrementos en CPT1A hepático tras el silenciamiento de GPR55 en varios modelos de NAFLD en ratón. Curiosamente, en ratones alimentados con dieta MCD, que mecanísticamente propicia la acumulación por aumento de captación de ácidos grasos e inhibición de su exportación antes que por cambios en DNL (183), el silenciamiento de GPR55 reduce notablemente la esteatosis, lo que podría significar la implicación de mecanismos subyacentes modulados por GPR55 independientes de DNL (y por tanto, de ACC α). Por último, a diferencia de los estudios preclínicos y ensayos clínicos que muestran hipertrigliceridemia en individuos tratados con el doble inhibidor farmacológico de ACC α/β GS-0976 para NAFLD (174, 353, 373), nosotros hemos observado reducciones en los niveles de triglicéridos en suero tras el silenciamiento hepático de GPR55 en ratones alimentados con vHFD, dejando la puerta entreabierta a una posible modulación de la exportación y captación de lípidos desde el hígado por parte de GPR55 *in vivo*. Consideramos que nuevos experimentos manipulando específicamente ACC α , ACC β , y la β -oxidación en el hígado de ratones tratados con LPI arrojaría luz en esta cuestión. En resumen, hemos demostrado que ACC, y específicamente ACC α , media los efectos de LPI/GPR55 en el metabolismo lipídico hepático, aunque sería totalmente esperado que existiesen mecanismos adicionales de regulación lo que puede implicar un mejor potencial terapéutico de esta vía.

ACC está fuertemente regulado por una gran variedad de factores transcripcionales y postraduccionales que determinan su abundancia y actividad. Destacan sobre las demás la regulación transcripcional por parte de SREBP1c y el control de la actividad por fosforilación inhibitoria directa de la enzima AMPK. En este estudio, no hemos encontrado diferencias en los niveles de proteína ACC total en ninguno de los modelos *in vitro* e *in vivo* utilizados, y tampoco hemos encontrado diferencias en los niveles de ARNm de SREBP1 ni de la forma activa de la proteína SREBP1c (datos no mostrados). Los resultados obtenidos en hepatocitos humanos y animales indican que el mecanismo que media la activación de ACC implica a AMPK α , la principal enzima reguladora de la actividad enzimática de ACC a través de fosforilación. AMPK ha sido ampliamente estudiada en relación a su papel en NAFLD y está siendo evaluada como diana de tratamiento para la esteatosis hepática en ensayos clínicos (58, 65, 67, 69, 70, 374, 375). Desafortunadamente, el modo en que el eje LPI/GPR55 regula la fosforilación de AMPK α no ha sido abordado en este estudio. Entre los reguladores *upstream* de AMPK se encuentran LKB1, CaMKK β y TAK1. LKB1 promueve la fosforilación de

AMPK α dependiente de AMP/ADP, aunque también se ha visto que es capaz de activarlo de forma independiente (63, 376). LKB1 parece ser necesario en la inhibición de ACC mediada por AMPK en el hígado, ya que la fosforilación de AMPK y la fosforilación de ACC están casi totalmente suprimidas en ratones deficientes en LKB1 (65, 377, 378). Curiosamente LKB1 ha sido relacionado con el sistema endocannabinoide, mediando las acciones inhibitorias de *rimonabant* sobre la expresión de SREBP1 *in vitro* (249, 377). En conjunto, estos dos hechos sitúan a LKB1 como un potencial candidato para mediar los efectos de GPR55 sobre AMPK/ACC, aunque no se debe pasar por alto que éste puede actuar a través de vías independientes de AMPK, como es el caso de la vía de supervivencia mediada por AKT (379). Alternativamente, CamKK β puede fosforilar a AMPK en respuesta a incrementos de calcio y modular su actividad (380). La deficiencia hepática de CamKK β en ratones genera esteatosis hepática y promueve la DNL (381, 382). Se ha observado que CamKK2 puede ser dependiente de señales extracelulares, operando *downstream* de GPCRs (383), por lo que no sería del todo sorprendente que GPR55 lo regulase. En tercer lugar, TAK1 puede regular la fosforilación de AMPK y es activada por los receptores de IL-1, TGF β , además de TNF α (384). La ablación hepática de TAK1 genera daño hepático, esteatosis, apoptosis, inflamación, fibrosis y hepatocarcinoma de forma espontánea en ratones, pero no se ha estudiado la implicación de AMPK/ACC en estos efectos y parece que este fenotipo se explica por las acciones de TAK1 en autofagia e inflamación (385-387). Tampoco existe un consenso sobre si TAK1 regula la acumulación de lípidos en los hepatocitos de forma dependiente o independiente de AMPK (387, 388). En resumen, hemos descubierto que GPR55 modula la actividad y fosforilación de ACC a través de AMPK, sin embargo, el regulador *upstream* de AMPK en esta ruta de señalización permanece desconocido.

Mientras la promoción de la esteatosis hepática por LPI no es inesperada para una molécula que activa ACC y por tanto induce la DNL en hepatocitos, las consecuencias de la activación de ACC en HSCs no son tan fácilmente predecibles en base a lo recogido en la literatura científica. Las células HSCs expresan ACC y otros genes implicados en DNL, sugiriendo que la ruta es operativa durante la quiescencia (152). El tratamiento con cócteles adipogénicos o sobreexpresión adenoviral de SREBP1c es capaz de reducir la activación de HSCs *in vitro*, sugiriendo que la DNL se reduce durante el proceso de activación (149, 152). Sin embargo, recientemente un artículo mostró que las HSCs activadas muestran incrementos en los niveles de ARNm y proteína de ACC α (pero no ACC β), y en la cantidad de lípidos totales (153). En el momento de escribir estas líneas, Bates *et al.* acaban de publicar un estudio evaluando la importancia de ACC en el proceso fibrogénico de las HSCs (389). *In vivo*, la inhibición farmacológica de ACC α/β en ratones con NASH inducido por 12 semanas de CD-HFD o NASH inducido por DEN reduce la fibrosis hepática medida como proteína α SMA e hidroxiprolina hepáticas. *In vitro*, la inhibición farmacológica o genética de ACC α/β o FAS impide los incrementos en glucólisis y fosforilación oxidativa inducidos por TGF β 1. Los autores concluyen que la DNL, y en particular ACC, son necesarios en la reprogramación metabólica de las HSCs durante la activación. Desafortunadamente, el mecanismo molecular por el que la inhibición de la DNL repercute en la activación de glucólisis y fosforilación oxidativa no son abordados en el estudio. En relación a AMPK, la activación farmacológica y la sobreexpresión de AMPK proporciona efectos beneficiosos en fibrosis hepática *in vivo* e *in vitro*, aunque la posible contribución de ACC en estas acciones no ha sido explorada todavía (151, 157, 158, 160). Nuestros resultados indican que la activación del sistema LPI/GPR55 reduce la activación de AMPK y estimula la actividad de ACC y la expresión de marcadores fibróticos en HSCs. Estos efectos son totalmente suprimidos tras el silenciamiento de ACC α , apoyando un papel de ACC y la DNL en la activación de HSCs.

En conjunto, en la presente tesis se ha descubierto un nuevo rol de GPR55 hepático en metabolismo lipídico, específicamente en enfermedad hepática crónica. Como se representa en la Figura 33, el sistema LPI/GPR55 está activado en NAFLD. Esta activación promueve esteatosis, induciendo DNL e inhibiendo β -oxidación en los hepatocitos. También estimula la fibrosis, activando las HSCs. En ambos casos, LPI/GPR55 ejerce sus acciones a través de ACC vía AMPK. El silenciamiento hepático de GPR55 ejerce efectos beneficiosos en diferentes modelos de NAFL y NASH. Este estudio identifica al sistema LPI-GPR55 como potencial desencadenante y diana terapéutica frente a NAFLD.

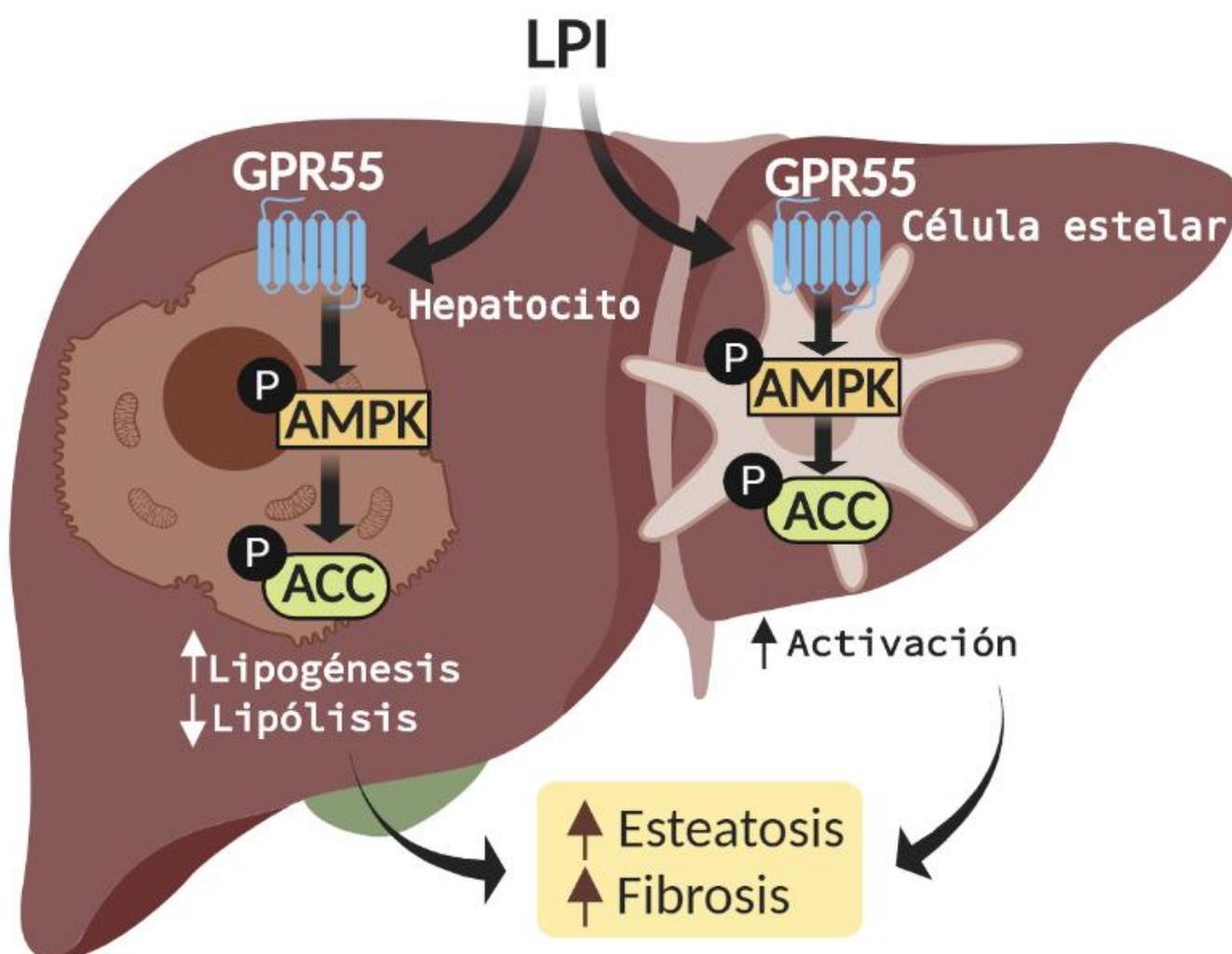


Figura 33. Esquema resumen de los principales hallazgos de este estudio.



CONCLUSIONES





CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos durante la realización de esta tesis nos permiten establecer las siguientes conclusiones:

- La expresión de GPR55 está aumentada en el hígado de pacientes con NAFLD y en modelos animales con la enfermedad hepática.
- Los niveles séricos de LPI, ligando endógeno de GPR55, se correlacionan con la puntuación NAS en humanos.
- LPI causa esteatosis hepática y activación de HSCs de manera dependiente de GPR55.
- El silenciamiento de GPR55 hepático en ratones mejora el NAFL inducido por LPI y vHFD.
- El silenciamiento de GPR55 hepático en ratones mejora la fibrosis inducida por dieta y MCD y tetracloruro de carbono.
- El sistema LPI/GPR55 promueve el desarrollo de NAFLD activando ACC vía AMPK.
- En su conjunto, estos datos nos permiten postular al sistema LPI-GPR5 como factor desencadenante y potencial diana terapéutica en NAFLD.



BIBLIOGRAFÍA





BIBLIOGRAFÍA

1. Chalasani N, Younossi Z, Lavine JE, Charlton M, Cusi K, Rinella M, Harrison SA, et al. The diagnosis and management of nonalcoholic fatty liver disease: Practice guidance from the American Association for the Study of Liver Diseases. *Hepatology* 2018;67:328-357.
2. Puri P, Sanyal AJ. Nonalcoholic fatty liver disease: Definitions, risk factors, and workup. *Clin Liver Dis (Hoboken)* 2012;1:99-103.
3. Younossi ZM, Koenig AB, Abdelatif D, Fazel Y, Henry L, Wymer M. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease-Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology* 2016;64:73-84.
4. Mitra S, De A, Chowdhury A. Epidemiology of non-alcoholic and alcoholic fatty liver diseases. *Transl Gastroenterol Hepatol* 2020;5:16.
5. Than NN, Newsome PN. A concise review of non-alcoholic fatty liver disease. *Atherosclerosis* 2015;239:192-202.
6. Alexander M, Loomis AK, van der Lei J, Duarte-Salles T, Prieto-Alhambra D, Ansell D, Pasqua A, et al. Risks and clinical predictors of cirrhosis and hepatocellular carcinoma diagnoses in adults with diagnosed NAFLD: real-world study of 18 million patients in four European cohorts. *BMC medicine* 2019;17:95-95.
7. Williams CD, Stengel J, Asike MI, Torres DM, Shaw J, Contreras M, Landt CL, et al. Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis among a largely middle-aged population utilizing ultrasound and liver biopsy: a prospective study. *Gastroenterology* 2011;140:124-131.
8. Sanyal AJ. Past, present and future perspectives in nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2019;16:377-386.
9. Estes C, Razavi H, Loomba R, Younossi Z, Sanyal AJ. Modeling the epidemic of nonalcoholic fatty liver disease demonstrates an exponential increase in burden of disease. *Hepatology* 2018;67:123-133.
10. Idilman IS, Aniktar H, Idilman R, Kabacam G, Savas B, Elhan A, Celik A, et al. Hepatic steatosis: quantification by proton density fat fraction with MR imaging versus liver biopsy. *Radiology* 2013;267:767-775.
11. Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, Behling C, Contos MJ, Cummings OW, Ferrell LD, et al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2005;41:1313-1321.
12. Brunt EM, Janney CG, Di Bisceglie AM, Neuschwander-Tetri BA, Bacon BR. Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions. *Am J Gastroenterol* 1999;94:2467-2474.

13. Brunt EM, Wong VW, Nobili V, Day CP, Sookoian S, Maher JJ, Bugianesi E, et al. Nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Rev Dis Primers* 2015;1:15080.
14. Rockey DC, Caldwell SH, Goodman ZD, Nelson RC, Smith AD, American Association for the Study of Liver D. Liver biopsy. *Hepatology* 2009;49:1017-1044.
15. Park CC, Nguyen P, Hernandez C, Bettencourt R, Ramirez K, Fortney L, Hooker J, et al. Magnetic Resonance Elastography vs Transient Elastography in Detection of Fibrosis and Noninvasive Measurement of Steatosis in Patients With Biopsy-Proven Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology* 2017;152:598-607 e592.
16. Vilar-Gomez E, Chalasani N. Non-invasive assessment of non-alcoholic fatty liver disease: Clinical prediction rules and blood-based biomarkers. *J Hepatol* 2018;68:305-315.
17. Castera L, Vilgrain V, Angulo P. Noninvasive evaluation of NAFLD. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2013;10:666-675.
18. Boursier J, Guillaume M, Leroy V, Irlès M, Roux M, Lannes A, Foucher J, et al. New sequential combinations of non-invasive fibrosis tests provide an accurate diagnosis of advanced fibrosis in NAFLD. *J Hepatol* 2019;71:389-396.
19. Brunt EM. Non-alcoholic fatty liver disease: what's new under the microscope? *Gut* 2011;60:1152-1158.
20. Day CP, James OFW. Steatohepatitis: A tale of two “hits”? *Gastroenterology* 1998;114:842-845.
21. Friedman SL, Neuschwander-Tetri BA, Rinella M, Sanyal AJ. Mechanisms of NAFLD development and therapeutic strategies. *Nat Med* 2018;24:908-922.
22. Alonso C, Fernández-Ramos D, Varela-Rey M, Martínez-Arranz I, Navasa N, Van Liempd SM, Lavín Trueba JL, et al. Metabolomic Identification of Subtypes of Nonalcoholic Steatohepatitis. *Gastroenterology* 2017;152:1449-1461.e1447.
23. Meex RCR, Watt MJ. Hepatokines: linking nonalcoholic fatty liver disease and insulin resistance. *Nat Rev Endocrinol* 2017;13:509-520.
24. Lindeboom L, de Graaf RA, Nabuurs CI, van Ewijk PA, Hesselink MK, Wildberger JE, Schrauwen P, et al. Quantum coherence spectroscopy to measure dietary fat retention in the liver. *JCI Insight* 2016;1:e84671.
25. Donnelly KL, Smith CI, Schwarzenberg SJ, Jessurun J, Boldt MD, Parks EJ. Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Invest* 2005;115:1343-1351.
26. Cedó L, Santos D, Roglans N, Julve J, Pallarès V, Rivas-Urbina A, Llorente-Cortes V, et al. Human hepatic lipase overexpression in mice induces hepatic steatosis and obesity through promoting hepatic lipogenesis and white adipose tissue lipolysis and fatty acid uptake. *PLoS One* 2017;12:e0189834.
27. Lucero D, Miksztowicz V, Gualano G, Longo C, Landeira G, Álvarez E, Zago V, et al. Nonalcoholic fatty liver disease associated with metabolic syndrome: Influence of liver fibrosis stages on characteristics of very low-density lipoproteins. *Clin Chim Acta* 2017;473:1-8.
28. Miksztowicz V, Lucero D, Zago V, Cacciagiú L, Lopez G, Gonzalez Ballerga E, Sordá J, et al. Hepatic lipase activity is increased in non-alcoholic fatty liver disease beyond insulin resistance. *Diabetes Metab Res Rev* 2012;28:535-541.

29. Ameer F, Scandiuzzi L, Hasnain S, Kalbacher H, Zaidi N. De novo lipogenesis in health and disease. *Metabolism* 2014;63:895-902.
30. Jump DB. Mammalian fatty acid elongases. *Methods Mol Biol* 2009;579:375-389.
31. Timlin MT, Parks EJ. Temporal pattern of de novo lipogenesis in the postprandial state in healthy men. *Am J Clin Nutr* 2005;81:35-42.
32. Higuchi N, Kato M, Tanaka M, Miyazaki M, Takao S, Kohjima M, Kotoh K, et al. Effects of insulin resistance and hepatic lipid accumulation on hepatic mRNA expression levels of apoB, MTP and L-FABP in non-alcoholic fatty liver disease. *Exp Ther Med* 2011;2:1077-1081.
33. Adiels M, Taskinen MR, Packard C, Caslake MJ, Soro-Paavonen A, Westerbacka J, Vehkavaara S, et al. Overproduction of large VLDL particles is driven by increased liver fat content in man. *Diabetologia* 2006;49:755-765.
34. Charlton M, Sreekumar R, Rasmussen D, Lindor K, Nair KS. Apolipoprotein synthesis in nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2002;35:898-904.
35. Fujita K, Nozaki Y, Wada K, Yoneda M, Fujimoto Y, Fujitake M, Endo H, et al. Dysfunctional very-low-density lipoprotein synthesis and release is a key factor in nonalcoholic steatohepatitis pathogenesis. *Hepatology* 2009;50:772-780.
36. Schulz H: Fatty Acid Oxidation. In: Lennarz WJ, Lane MD, eds. *Encyclopedia of Biological Chemistry (Second Edition)*. Waltham: Academic Press, 2013; 281-284.
37. Ipsen DH, Lykkesfeldt J, Tveden-Nyborg P. Molecular mechanisms of hepatic lipid accumulation in non-alcoholic fatty liver disease. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2018;75:3313-3327.
38. Basaranoglu M, Basaranoglu G, Senturk H. From fatty liver to fibrosis: a tale of "second hit". *World J Gastroenterol* 2013;19:1158-1165.
39. Rao MS, Reddy JK. Peroxisomal beta-oxidation and steatohepatitis. *Semin Liver Dis* 2001;21:43-55.
40. Kotronen A, Seppala-Lindroos A, Vehkavaara S, Bergholm R, Frayn KN, Fielding BA, Yki-Jarvinen H. Liver fat and lipid oxidation in humans. *Liver Int* 2009;29:1439-1446.
41. Bugianesi E, Gastaldelli A, Vanni E, Gambino R, Cassader M, Baldi S, Ponti V, et al. Insulin resistance in non-diabetic patients with non-alcoholic fatty liver disease: sites and mechanisms. *Diabetologia* 2005;48:634-642.
42. Croci I, Byrne NM, Choquette S, Hills AP, Chachay VS, Clouston AD, O'Moore-Sullivan TM, et al. Whole-body substrate metabolism is associated with disease severity in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Gut* 2013;62:1625-1633.
43. Koliaki C, Szendroedi J, Kaul K, Jelenik T, Nowotny P, Jankowiak F, Herder C, et al. Adaptation of hepatic mitochondrial function in humans with non-alcoholic fatty liver is lost in steatohepatitis. *Cell Metab* 2015;21:739-746.
44. Mansouri A, Gattolliat C-H, Asselah T. Mitochondrial Dysfunction and Signaling in Chronic Liver Diseases. *Gastroenterology* 2018;155:629-647.
45. Nakamuta M, Kohjima M, Morizono S, Kotoh K, Yoshimoto T, Miyagi I, Enjoji M. Evaluation of fatty acid metabolism-related gene expression in nonalcoholic fatty liver disease. *Int J Mol Med* 2005;16:631-635.

46. Singh R, Kaushik S, Wang Y, Xiang Y, Novak I, Komatsu M, Tanaka K, et al. Autophagy regulates lipid metabolism. *Nature* 2009;458:1131-1135.
47. Koga H, Kaushik S, Cuervo AM. Altered lipid content inhibits autophagic vesicular fusion. *FASEB J* 2010;24:3052-3065.
48. Kashima J, Shintani-Ishida K, Nakajima M, Maeda H, Unuma K, Uchiyama Y, Yoshida K. Immunohistochemical study of the autophagy marker microtubule-associated protein 1 light chain 3 in normal and steatotic human livers. *Hepatol Res* 2014;44:779-787.
49. González-Rodríguez A, Mayoral R, Agra N, Valdecantos MP, Pardo V, Miquilena-Colina ME, Vargas-Castrillón J, et al. Impaired autophagic flux is associated with increased endoplasmic reticulum stress during the development of NAFLD. *Cell Death Dis* 2014;5:e1179.
50. Sanders FWB, Griffin JL. De novo lipogenesis in the liver in health and disease: more than just a shunting yard for glucose. *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society* 2016;91:452-468.
51. Abu-Elheiga L, Brinkley WR, Zhong L, Chirala SS, Woldegiorgis G, Wakil SJ. The subcellular localization of acetyl-CoA carboxylase 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:1444-1449.
52. Mao J, DeMayo FJ, Li H, Abu-Elheiga L, Gu Z, Shaikenov TE, Kordari P, et al. Liver-specific deletion of acetyl-CoA carboxylase 1 reduces hepatic triglyceride accumulation without affecting glucose homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:8552-8557.
53. Choi CS, Savage DB, Abu-Elheiga L, Liu Z-X, Kim S, Kulkarni A, Distefano A, et al. Continuous fat oxidation in acetyl-CoA carboxylase 2 knockout mice increases total energy expenditure, reduces fat mass, and improves insulin sensitivity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2007;104:16480-16485.
54. Savage DB, Choi CS, Samuel VT, Liu Z-X, Zhang D, Wang A, Zhang X-M, et al. Reversal of diet-induced hepatic steatosis and hepatic insulin resistance by antisense oligonucleotide inhibitors of acetyl-CoA carboxylases 1 and 2. *The Journal of clinical investigation* 2006;116:817-824.
55. Chow JD, Lawrence RT, Healy ME, Dominy JE, Liao JA, Breen DS, Byrne FL, et al. Genetic inhibition of hepatic acetyl-CoA carboxylase activity increases liver fat and alters global protein acetylation. *Mol Metab* 2014;3:419-431.
56. Hunkeler M, Hagmann A, Stutfeld E, Chami M, Guri Y, Stahlberg H, Maier T. Structural basis for regulation of human acetyl-CoA carboxylase. *Nature* 2018;558:470-474.
57. Lally JSV, Ghoshal S, DePeralta DK, Moaven O, Wei L, Masia R, Erstad DJ, et al. Inhibition of Acetyl-CoA Carboxylase by Phosphorylation or the Inhibitor ND-654 Suppresses Lipogenesis and Hepatocellular Carcinoma. *Cell Metab* 2019;29:174-182.e175.
58. Fullerton MD, Galic S, Marcinko K, Sikkema S, Pulinilkunnil T, Chen ZP, O'Neill HM, et al. Single phosphorylation sites in Acc1 and Acc2 regulate lipid homeostasis and the insulin-sensitizing effects of metformin. *Nat Med* 2013;19:1649-1654.
59. Cho YS, Lee JI, Shin D, Kim HT, Jung HY, Lee TG, Kang LW, et al. Molecular mechanism for the regulation of human ACC2 through phosphorylation by AMPK. *Biochem Biophys Res Commun* 2010;391:187-192.

60. Meng X, Li M, Guo J, Tang W, Wang S, Man Y, Huang X, et al. Protein phosphatase 4 promotes hepatic lipogenesis through dephosphorylating acetyl-CoA carboxylase 1 on serine 79. *Mol Med Rep* 2014;10:1959-1963.
61. Gaussin V, Hue L, Stalmans W, Bollen M. Activation of hepatic acetyl-CoA carboxylase by glutamate and Mg²⁺ is mediated by protein phosphatase-2A. *Biochem J* 1996;316 (Pt 1):217-224.
62. Rui L. Energy metabolism in the liver. *Comprehensive Physiology* 2014;4:177-197.
63. Zong Y, Zhang C-S, Li M, Wang W, Wang Z, Hawley SA, Ma T, et al. Hierarchical activation of compartmentalized pools of AMPK depends on severity of nutrient or energy stress. *Cell Research* 2019;29:460-473.
64. Cheung PC, Salt IP, Davies SP, Hardie DG, Carling D. Characterization of AMP-activated protein kinase gamma-subunit isoforms and their role in AMP binding. *The Biochemical journal* 2000;346 Pt 3:659-669.
65. Boudaba N, Marion A, Huet C, Pierre R, Viollet B, Foretz M. AMPK Re-Activation Suppresses Hepatic Steatosis but its Downregulation Does Not Promote Fatty Liver Development. *EBioMedicine* 2018;28:194-209.
66. Garcia D, Shaw RJ. AMPK: Mechanisms of Cellular Energy Sensing and Restoration of Metabolic Balance. *Mol Cell* 2017;66:789-800.
67. Zhao P, Sun X, Chaggan C, Liao Z, In Wong K, He F, Singh S, et al. An AMPK-caspase-6 axis controls liver damage in nonalcoholic steatohepatitis. *Science* 2020;367:652-660.
68. Garcia D, Hellberg K, Chaix A, Wallace M, Herzig S, Badur MG, Lin T, et al. Genetic Liver-Specific AMPK Activation Protects against Diet-Induced Obesity and NAFLD. *Cell Rep* 2019;26:192-208.e196.
69. Woods A, Williams JR, Muckett PJ, Mayer FV, Liljevald M, Bohlooly YM, Carling D. Liver-Specific Activation of AMPK Prevents Steatosis on a High-Fructose Diet. *Cell Rep* 2017;18:3043-3051.
70. Rena G, Hardie DG, Pearson ER. The mechanisms of action of metformin. *Diabetologia* 2017;60:1577-1585.
71. Jiao Y, Lu Y, Li XY. Farnesoid X receptor: a master regulator of hepatic triglyceride and glucose homeostasis. *Acta Pharmacol Sin* 2015;36:44-50.
72. Cave MC, Clair HB, Hardesty JE, Falkner KC, Feng W, Clark BJ, Sidey J, et al. Nuclear receptors and nonalcoholic fatty liver disease. *Biochim Biophys Acta* 2016;1859:1083-1099.
73. Pawlak M, Lefebvre P, Staels B. Molecular mechanism of PPAR α action and its impact on lipid metabolism, inflammation and fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol* 2015;62:720-733.
74. Palomer X, Barroso E, Pizarro-Delgado J, Peña L, Botteri G, Zarei M, Aguilar D, et al. PPAR β/δ : A Key Therapeutic Target in Metabolic Disorders. *Int J Mol Sci* 2018;19.
75. Tong L, Wang L, Yao S, Jin L, Yang J, Zhang Y, Ning G, et al. PPAR δ attenuates hepatic steatosis through autophagy-mediated fatty acid oxidation. *Cell Death & Disease* 2019;10:197.
76. Lee YK, Park JE, Lee M, Hardwick JP. Hepatic lipid homeostasis by peroxisome proliferator-activated receptor gamma 2. *Liver Res* 2018;2:209-215.

77. Piccinin E, Villani G, Moschetta A. Metabolic aspects in NAFLD, NASH and hepatocellular carcinoma: the role of PGC1 coactivators. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* 2019;16:160-174.
78. Mallat A, Teixeira-Clerc F, Deveaux V, Manin S, Lotersztajn S. The endocannabinoid system as a key mediator during liver diseases: new insights and therapeutic openings. *Br J Pharmacol* 2011;163:1432-1440.
79. Ruiz de Azua I, Lutz B. Multiple endocannabinoid-mediated mechanisms in the regulation of energy homeostasis in brain and peripheral tissues. *Cell Mol Life Sci* 2019;76:1341-1363.
80. Laplante M, Sabatini DM. Regulation of mTORC1 and its impact on gene expression at a glance. *J Cell Sci* 2013;126:1713-1719.
81. Han J, Wang Y. mTORC1 signaling in hepatic lipid metabolism. *Protein & Cell* 2018;9:145-151.
82. Loomba R, Abraham M, Unalp A, Wilson L, Lavine J, Doo E, Bass NM. Association between diabetes, family history of diabetes, and risk of nonalcoholic steatohepatitis and fibrosis. *Hepatology* 2012;56:943-951.
83. Moslehi A, Hamidi-Zad Z. Role of SREBPs in Liver Diseases: A Mini-review. *J Clin Transl Hepatol* 2018;6:332-338.
84. Tilg H. The role of cytokines in non-alcoholic fatty liver disease. *Dig Dis* 2010;28:179-185.
85. Ghorpade DS, Ozcan L, Zheng Z, Nicoloso SM, Shen Y, Chen E, Bluher M, et al. Hepatocyte-secreted DPP4 in obesity promotes adipose inflammation and insulin resistance. *Nature* 2018;555:673-677.
86. Marchesini G, Brizi M, Morselli-Labate AM, Bianchi G, Bugianesi E, McCullough AJ, Forlani G, et al. Association of nonalcoholic fatty liver disease with insulin resistance. *Am J Med* 1999;107:450-455.
87. Sanyal AJ, Campbell-Sargent C, Mirshahi F, Rizzo WB, Contos MJ, Sterling RK, Luketic VA, et al. Nonalcoholic steatohepatitis: association of insulin resistance and mitochondrial abnormalities. *Gastroenterology* 2001;120:1183-1192.
88. Cao J, Dai DL, Yao L, Yu HH, Ning B, Zhang Q, Chen J, et al. Saturated fatty acid induction of endoplasmic reticulum stress and apoptosis in human liver cells via the PERK/ATF4/CHOP signaling pathway. *Mol Cell Biochem* 2012;364:115-129.
89. Henkel A, Green RM. The unfolded protein response in fatty liver disease. *Semin Liver Dis* 2013;33:321-329.
90. Lee AH, Scapa EF, Cohen DE, Glimcher LH. Regulation of hepatic lipogenesis by the transcription factor XBP1. *Science* 2008;320:1492-1496.
91. Ota T, Gayet C, Ginsberg HN. Inhibition of apolipoprotein B100 secretion by lipid-induced hepatic endoplasmic reticulum stress in rodents. *J Clin Invest* 2008;118:316-332.
92. Puri P, Mirshahi F, Cheung O, Natarajan R, Maher JW, Kellum JM, Sanyal AJ. Activation and dysregulation of the unfolded protein response in nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 2008;134:568-576.

93. Kim SY, Jeong JM, Kim SJ, Seo W, Kim MH, Choi WM, Yoo W, et al. Pro-inflammatory hepatic macrophages generate ROS through NADPH oxidase 2 via endocytosis of monomeric TLR4-MD2 complex. *Nat Commun* 2017;8:2247.
94. Vladykovskaya E, Sithu SD, Habertzettl P, Wickramasinghe NS, Merchant ML, Hill BG, McCracken J, et al. Lipid peroxidation product 4-hydroxy-trans-2-nonenal causes endothelial activation by inducing endoplasmic reticulum stress. *J Biol Chem* 2012;287:11398-11409.
95. Seki S, Kitada T, Yamada T, Sakaguchi H, Nakatani K, Wakasa K. In situ detection of lipid peroxidation and oxidative DNA damage in non-alcoholic fatty liver diseases. *J Hepatol* 2002;37:56-62.
96. Köroğlu E, Canbakan B, Atay K, Hatemi İ, Tuncer M, Dobrucalı A, Sonsuz A, et al. Role of oxidative stress and insulin resistance in disease severity of non-alcoholic fatty liver disease. *Turk J Gastroenterol* 2016;27:361-366.
97. Li ZZ, Berk M, McIntyre TM, Feldstein AE. Hepatic lipid partitioning and liver damage in nonalcoholic fatty liver disease: role of stearyl-CoA desaturase. *J Biol Chem* 2009;284:5637-5644.
98. Wasilewska N, Bobrus-Chociej A, Harasim-Symbor E, Tarasow E, Wojtkowska M, Chabowski A, Lebensztejn DM. Increased serum concentration of ceramides in obese children with nonalcoholic fatty liver disease. *Lipids Health Dis* 2018;17:216.
99. Kurek K, Piotrowska DM, Wiesiołek-Kurek P, Łukaszuk B, Chabowski A, Górski J, Zendzian-Piotrowska M. Inhibition of ceramide de novo synthesis reduces liver lipid accumulation in rats with nonalcoholic fatty liver disease. *Liver Int* 2014;34:1074-1083.
100. Musso G, Cassader M, Gambino R. Non-alcoholic steatohepatitis: emerging molecular targets and therapeutic strategies. *Nat Rev Drug Discov* 2016;15:249-274.
101. Marí M, Caballero F, Colell A, Morales A, Caballeria J, Fernandez A, Enrich C, et al. Mitochondrial free cholesterol loading sensitizes to TNF- and Fas-mediated steatohepatitis. *Cell Metab* 2006;4:185-198.
102. Puri P, Baillie RA, Wiest MM, Mirshahi F, Choudhury J, Cheung O, Sargeant C, et al. A lipidomic analysis of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2007;46:1081-1090.
103. Bijnen M, Josefs T, Cuijpers I, Maalsen CJ, van de Gaar J, Vroomen M, Wijnands E, et al. Adipose tissue macrophages induce hepatic neutrophil recruitment and macrophage accumulation in mice. *Gut* 2018;67:1317-1327.
104. Brandl K, Schnabl B. Intestinal microbiota and nonalcoholic steatohepatitis. *Curr Opin Gastroenterol* 2017;33:128-133.
105. Boursier J, Mueller O, Barret M, Machado M, Fizanne L, Araujo-Perez F, Guy CD, et al. The severity of nonalcoholic fatty liver disease is associated with gut dysbiosis and shift in the metabolic function of the gut microbiota. *Hepatology* 2016;63:764-775.
106. Schuster S, Cabrera D, Arrese M, Feldstein AE. Triggering and resolution of inflammation in NASH. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2018;15:349-364.
107. Tosello-Trampont AC, Landes SG, Nguyen V, Novobrantseva TI, Hahn YS. Kupffer cells trigger nonalcoholic steatohepatitis development in diet-induced mouse model through tumor necrosis factor- α production. *J Biol Chem* 2012;287:40161-40172.

108. Tacke F. Cenicriviroc for the treatment of non-alcoholic steatohepatitis and liver fibrosis. *Expert Opin Investig Drugs* 2018;27:301-311.
109. Morinaga H, Mayoral R, Heinrichsdorff J, Osborn O, Franck N, Hah N, Walenta E, et al. Characterization of distinct subpopulations of hepatic macrophages in HFD/obese mice. *Diabetes* 2015;64:1120-1130.
110. Gadd VL, Skoien R, Powell EE, Fagan KJ, Winterford C, Horsfall L, Irvine K, et al. The portal inflammatory infiltrate and ductular reaction in human nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2014;59:1393-1405.
111. Pradere JP, Kluwe J, De Minicis S, Jiao JJ, Gwak GY, Dapito DH, Jang MK, et al. Hepatic macrophages but not dendritic cells contribute to liver fibrosis by promoting the survival of activated hepatic stellate cells in mice. *Hepatology* 2013;58:1461-1473.
112. Yang YM, Seki E. TNF α in liver fibrosis. *Current pathobiology reports* 2015;3:253-261.
113. Wang PX, Ji YX, Zhang XJ, Zhao LP, Yan ZZ, Zhang P, Shen LJ, et al. Targeting CASP8 and FADD-like apoptosis regulator ameliorates nonalcoholic steatohepatitis in mice and nonhuman primates. *Nat Med* 2017;23:439-449.
114. Yamaguchi K, Itoh Y, Yokomizo C, Nishimura T, Niimi T, Fujii H, Okanoue T, et al. Blockade of interleukin-6 signaling enhances hepatic steatosis but improves liver injury in methionine choline-deficient diet-fed mice. *Lab Invest* 2010;90:1169-1178.
115. Sabio G, Das M, Mora A, Zhang Z, Jun JY, Ko HJ, Barrett T, et al. A stress signaling pathway in adipose tissue regulates hepatic insulin resistance. *Science (New York, N.Y.)* 2008;322:1539-1543.
116. Park EJ, Lee JH, Yu G-Y, He G, Ali SR, Holzer RG, Osterreicher CH, et al. Dietary and genetic obesity promote liver inflammation and tumorigenesis by enhancing IL-6 and TNF expression. *Cell* 2010;140:197-208.
117. Ramesh S, Qi X-J, Wildey GM, Robinson J, Molkenin J, Letterio J, Howe PH. TGF β mediated BIM expression and apoptosis are regulated through SMAD3-dependent expression of the MAPK phosphatase MKP2. *EMBO reports* 2008;9:990-997.
118. Dooley S, ten Dijke P. TGF- β in progression of liver disease. *Cell Tissue Res* 2012;347:245-256.
119. Malhi H, Barreyro FJ, Isomoto H, Bronk SF, Gores GJ. Free fatty acids sensitise hepatocytes to TRAIL mediated cytotoxicity. *Gut* 2007;56:1124-1131.
120. Feldstein AE, Canbay A, Angulo P, Taniai M, Burgart LJ, Lindor KD, Gores GJ. Hepatocyte apoptosis and fas expression are prominent features of human nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology* 2003;125:437-443.
121. Schwabe RF, Luedde T. Apoptosis and necroptosis in the liver: a matter of life and death. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology* 2018;15:738-752.
122. Thapaliya S, Wree A, Povero D, Inzaugarat ME, Berk M, Dixon L, Papouchado BG, et al. Caspase 3 inactivation protects against hepatic cell death and ameliorates fibrogenesis in a diet-induced NASH model. *Digestive diseases and sciences* 2014;59:1197-1206.
123. Malhi H, Guicciardi ME, Gores GJ. Hepatocyte death: a clear and present danger. *Physiol Rev* 2010;90:1165-1194.

124. Wree A, Eguchi A, McGeough MD, Pena CA, Johnson CD, Canbay A, Hoffman HM, et al. NLRP3 inflammasome activation results in hepatocyte pyroptosis, liver inflammation, and fibrosis in mice. *Hepatology* 2014;59:898-910.
125. Gautheron J, Vucur M, Reisinger F, Cardenas DV, Roderburg C, Koppe C, Kreggenwinkel K, et al. A positive feedback loop between RIP3 and JNK controls non-alcoholic steatohepatitis. *EMBO molecular medicine* 2014;6:1062-1074.
126. Schuppan D, Surabattula R, Wang XY. Determinants of fibrosis progression and regression in NASH. *J Hepatol* 2018;68:238-250.
127. Higashi T, Friedman SL, Hoshida Y. Hepatic stellate cells as key target in liver fibrosis. *Adv Drug Deliv Rev* 2017;121:27-42.
128. Greenhalgh SN, Conroy KP, Henderson NC. Cre-activity in the liver: transgenic approaches to targeting hepatic nonparenchymal cells. *Hepatology* 2015;61:2091-2099.
129. Kisseleva T, Brenner DA. The phenotypic fate and functional role for bone marrow-derived stem cells in liver fibrosis. *J Hepatol* 2012;56:965-972.
130. Barreyro FJ, Holod S, Finocchietto PV, Camino AM, Aquino JB, Avagnina A, Carreras MC, et al. The pan-caspase inhibitor Emricasan (IDN-6556) decreases liver injury and fibrosis in a murine model of non-alcoholic steatohepatitis. *Liver Int* 2015;35:953-966.
131. Aoyama T, Paik YH, Watanabe S, Laleu B, Gaggini F, Fioraso-Cartier L, Molango S, et al. Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase in experimental liver fibrosis: GKT137831 as a novel potential therapeutic agent. *Hepatology* 2012;56:2316-2327.
132. Pellicoro A, Ramachandran P, Iredale JP, Fallowfield JA. Liver fibrosis and repair: immune regulation of wound healing in a solid organ. *Nature Reviews Immunology* 2014;14:181-194.
133. De Minicis S, Rychlicki C, Agostinelli L, Saccomanno S, Candelaresi C, Trozzi L, Mingarelli E, et al. Dysbiosis contributes to fibrogenesis in the course of chronic liver injury in mice. *Hepatology* 2014;59:1738-1749.
134. Wells RG. The role of matrix stiffness in regulating cell behavior. *Hepatology* 2008;47:1394-1400.
135. Bonnans C, Chou J, Werb Z. Remodelling the extracellular matrix in development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2014;15:786-801.
136. Shi Y, Massagué J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* 2003;113:685-700.
137. Dewidar B, Meyer C, Dooley S, Meindl-Beinker AN. TGF- β in Hepatic Stellate Cell Activation and Liver Fibrogenesis-Updated 2019. *Cells* 2019;8.
138. Di Guglielmo GM, Le Roy C, Goodfellow AF, Wrana JL. Distinct endocytic pathways regulate TGF-beta receptor signalling and turnover. *Nat Cell Biol* 2003;5:410-421.
139. Hong F, Chou H, Fiel MI, Friedman SL. Antifibrotic activity of sorafenib in experimental hepatic fibrosis: refinement of inhibitory targets, dosing, and window of efficacy in vivo. *Dig Dis Sci* 2013;58:257-264.
140. Kocabayoglu P, Lade A, Lee YA, Dragomir AC, Sun X, Fiel MI, Thung S, et al. β -PDGF receptor expressed by hepatic stellate cells regulates fibrosis in murine liver injury, but not carcinogenesis. *J Hepatol* 2015;63:141-147.

141. Hao C, Xie Y, Peng M, Ma L, Zhou Y, Zhang Y, Kang W, et al. Inhibition of connective tissue growth factor suppresses hepatic stellate cell activation in vitro and prevents liver fibrosis in vivo. *Clin Exp Med* 2014;14:141-150.
142. Neuschwander-Tetri BA, Loomba R, Sanyal AJ, Lavine JE, Van Natta ML, Abdelmalek MF, Chalasani N, et al. Farnesoid X nuclear receptor ligand obeticholic acid for non-cirrhotic, non-alcoholic steatohepatitis (FLINT): a multicentre, randomised, placebo-controlled trial. *Lancet* 2015;385:956-965.
143. Xu W, Lu C, Zhang F, Shao J, Yao S, Zheng S. Dihydroartemisinin counteracts fibrotic portal hypertension via farnesoid X receptor-dependent inhibition of hepatic stellate cell contraction. *Febs j* 2017;284:114-133.
144. Zhang F, Kong D, Chen L, Zhang X, Lian N, Zhu X, Lu Y, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor- γ interrupts angiogenic signal transduction by transrepression of platelet-derived growth factor- β receptor in hepatic stellate cells. *J Cell Sci* 2014;127:305-314.
145. Qian J, Niu M, Zhai X, Zhou Q, Zhou Y. β -Catenin pathway is required for TGF- β 1 inhibition of PPAR γ expression in cultured hepatic stellate cells. *Pharmacol Res* 2012;66:219-225.
146. Chen Y, Choi SS, Michelotti GA, Chan IS, Swiderska-Syn M, Karaca GF, Xie G, et al. Hedgehog controls hepatic stellate cell fate by regulating metabolism. *Gastroenterology* 2012;143:1319-1329.e1311.
147. Li J, Ghazwani M, Liu K, Huang Y, Chang N, Fan J, He F, et al. Regulation of hepatic stellate cell proliferation and activation by glutamine metabolism. *PLoS One* 2017;12:e0182679.
148. Li YH, Woo SH, Choi DH, Cho EH. Succinate causes α -SMA production through GPR91 activation in hepatic stellate cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2015;463:853-858.
149. Molenaar MR, Vaandrager AB, Helms JB. Some Lipid Droplets Are More Equal Than Others: Different Metabolic Lipid Droplet Pools in Hepatic Stellate Cells. *Lipid insights* 2017;10:1178635317747281-1178635317747281.
150. Tuohetahuntala M, Molenaar MR, Spee B, Brouwers JF, Houweling M, Vaandrager AB, Helms JB. ATGL and DGAT1 are involved in the turnover of newly synthesized triacylglycerols in hepatic stellate cells. *Journal of lipid research* 2016;57:1162-1174.
151. Lian N, Jin H, Zhang F, Wu L, Shao J, Lu Y, Zheng S. Curcumin inhibits aerobic glycolysis in hepatic stellate cells associated with activation of adenosine monophosphate-activated protein kinase. *IUBMB Life* 2016;68:589-596.
152. She H, Xiong S, Hazra S, Tsukamoto H. Adipogenic transcriptional regulation of hepatic stellate cells. *J Biol Chem* 2005;280:4959-4967.
153. de Oliveira da Silva B, Alberici LC, Ramos LF, Silva CM, da Silveira MB, Dechant CRP, Friedman SL, et al. Altered global microRNA expression in hepatic stellate cells LX-2 by angiotensin-(1-7) and miRNA-1914-5p identification as regulator of pro-fibrogenic elements and lipid metabolism. *Int J Biochem Cell Biol* 2018;98:137-155.
154. Hernández-Gea V, Ghiassi-Nejad Z, Rozenfeld R, Gordon R, Fiel MI, Yue Z, Czaja MJ, et al. Autophagy releases lipid that promotes fibrogenesis by activated hepatic stellate cells in mice and in human tissues. *Gastroenterology* 2012;142:938-946.

155. Hernández-Gea V, Hilscher M, Rozenfeld R, Lim MP, Nieto N, Werner S, Devi LA, et al. Endoplasmic reticulum stress induces fibrogenic activity in hepatic stellate cells through autophagy. *J Hepatol* 2013;59:98-104.
156. Koo JH, Lee HJ, Kim W, Kim SG. Endoplasmic Reticulum Stress in Hepatic Stellate Cells Promotes Liver Fibrosis via PERK-Mediated Degradation of HNRNPA1 and Up-regulation of SMAD2. *Gastroenterology* 2016;150:181-193.e188.
157. Nguyen G, Park SY, Le CT, Park WS, Choi DH, Cho EH. Metformin ameliorates activation of hepatic stellate cells and hepatic fibrosis by succinate and GPR91 inhibition. *Biochem Biophys Res Commun* 2018;495:2649-2656.
158. Fan K, Wu K, Lin L, Ge P, Dai J, He X, Hu K, et al. Metformin mitigates carbon tetrachloride-induced TGF- β 1/Smad3 signaling and liver fibrosis in mice. *Biomed Pharmacother* 2017;90:421-426.
159. Morais AdS, Abarca-Quinones J, Hue L, Viollet B, Horsmans Y, Leclercq IA. 467 IMPACT OF AMP-ACTIVATED PROTEIN KINASE (AMPK) ON THE CONTROL OF HEPATIC STELLATE CELLS (HSCS) ACTIVATION IN VITRO. *Journal of Hepatology* 2008;48:S178.
160. Lim JY, Oh MA, Kim WH, Sohn HY, Park SI. AMP-activated protein kinase inhibits TGF- β -induced fibrogenic responses of hepatic stellate cells by targeting transcriptional coactivator p300. *J Cell Physiol* 2012;227:1081-1089.
161. Chen M, Liu J, Yang L, Ling W. AMP-activated protein kinase regulates lipid metabolism and the fibrotic phenotype of hepatic stellate cells through inhibition of autophagy. *FEBS open bio* 2017;7:811-820.
162. Romero-Gómez M, Zelber-Sagi S, Trenell M. Treatment of NAFLD with diet, physical activity and exercise. *J Hepatol* 2017;67:829-846.
163. Vilar-Gomez E, Martinez-Perez Y, Calzadilla-Bertot L, Torres-Gonzalez A, Gra-Oramas B, Gonzalez-Fabian L, Friedman SL, et al. Weight Loss Through Lifestyle Modification Significantly Reduces Features of Nonalcoholic Steatohepatitis. *Gastroenterology* 2015;149:367-378.e365; quiz e314-365.
164. Mathurin P, Hollebecque A, Arnalsteen L, Buob D, Leteurtre E, Caiazzo R, Pigeyre M, et al. Prospective Study of the Long-Term Effects of Bariatric Surgery on Liver Injury in Patients Without Advanced Disease. *Gastroenterology* 2009;137:532-540.
165. Mosko JD, Nguyen GC. Increased perioperative mortality following bariatric surgery among patients with cirrhosis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2011;9:897-901.
166. EASL-EASD-EASO Clinical Practice Guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol* 2016;64:1388-1402.
167. Haldar D, Kern B, Hodson J, Armstrong MJ, Adam R, Berlakovich G, Fritz J, et al. Outcomes of liver transplantation for non-alcoholic steatohepatitis: A European Liver Transplant Registry study. *J Hepatol* 2019;71:313-322.
168. Wang X, Li J, Riaz DR, Shi G, Liu C, Dai Y. Outcomes of liver transplantation for nonalcoholic steatohepatitis: a systematic review and meta-analysis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2014;12:394-402.e391.

169. Ratziu V, Charlotte F, Bernhardt C, Giral P, Halbron M, Lenaour G, Hartmann-Heurtier A, et al. Long-term efficacy of rosiglitazone in nonalcoholic steatohepatitis: results of the fatty liver improvement by rosiglitazone therapy (FLIRT 2) extension trial. *Hepatology* 2010;51:445-453.
170. Sanyal AJ, Chalasani N, Kowdley KV, McCullough A, Diehl AM, Bass NM, Neuschwander-Tetri BA, et al. Pioglitazone, vitamin E, or placebo for nonalcoholic steatohepatitis. *N Engl J Med* 2010;362:1675-1685.
171. Lavine JE, Schwimmer JB, Van Natta ML, Molleston JP, Murray KF, Rosenthal P, Abrams SH, et al. Effect of vitamin E or metformin for treatment of nonalcoholic fatty liver disease in children and adolescents: the TONIC randomized controlled trial. *Jama* 2011;305:1659-1668.
172. Ratziu V, Sanyal AJ, Loomba R, Rinella M, Harrison S, Anstee QM, Goodman Z, et al. REGENERATE: Design of a pivotal, randomised, phase 3 study evaluating the safety and efficacy of obeticholic acid in patients with fibrosis due to nonalcoholic steatohepatitis. *Contemp Clin Trials* 2019;84:105803.
173. Ratziu V, Harrison SA, Francque S, Bedossa P, Leheret P, Serfaty L, Romero-Gomez M, et al. Elafibranor, an Agonist of the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- α and - δ , Induces Resolution of Nonalcoholic Steatohepatitis Without Fibrosis Worsening. *Gastroenterology* 2016;150:1147-1159.e1145.
174. Loomba R, Kayali Z, Nouredin M, Ruane P, Lawitz EJ, Bennett M, Wang L, et al. GS-0976 Reduces Hepatic Steatosis and Fibrosis Markers in Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology* 2018;155:1463-1473.e1466.
175. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/results/NCT03248882>.
176. Anstee QM, Neuschwander-Tetri BA, Wong VW, Abdelmalek MF, Younossi ZM, Yuan J, Pecoraro ML, et al. Cenicriviroc for the treatment of liver fibrosis in adults with nonalcoholic steatohepatitis: AURORA Phase 3 study design. *Contemp Clin Trials* 2019;89:105922.
177. Harrison SA, Wai-Sun Wong V, Okanoue T, Bzowej N, Vuppalanchi R, Younes Z, Kohli A, et al. Selonsertib for Patients with Bridging Fibrosis or Compensated Cirrhosis Due to NASH: Results from Randomized Ph III STELLAR Trials. *J Hepatol* 2020.
178. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03449446>.
179. Drew L. Drug development: Sprint finish. *Nature* 2017;551.
180. Sanyal AJ, Friedman SL, McCullough AJ, Dimick-Santos L. Challenges and opportunities in drug and biomarker development for nonalcoholic steatohepatitis: findings and recommendations from an American Association for the Study of Liver Diseases-U.S. Food and Drug Administration Joint Workshop. *Hepatology* 2015;61:1392-1405.
181. Velázquez KT, Enos RT, Bader JE, Sougiannis AT, Carson MS, Chatzistamou I, Carson JA, et al. Prolonged high-fat-diet feeding promotes non-alcoholic fatty liver disease and alters gut microbiota in mice. *World J Hepatol* 2019;11:619-637.
182. Lee SJ, Kang JH, Iqbal W, Kwon OS. Proteomic analysis of mice fed methionine and choline deficient diet reveals marker proteins associated with steatohepatitis. *PLoS One* 2015;10:e0120577.
183. Montandon SA, Somm E, Loizides-Mangold U, de Vito C, Dibner C, Jornayvaz FR. Multi-technique comparison of atherogenic and MCD NASH models highlights changes in sphingolipid metabolism. *Scientific Reports* 2019;9:16810.

184. Veteläinen R, van Vliet A, van Gulik TM. Essential pathogenic and metabolic differences in steatosis induced by choline or methionine-choline deficient diets in a rat model. *J Gastroenterol Hepatol* 2007;22:1526-1533.
185. Fujita K, Nozaki Y, Yoneda M, Wada K, Takahashi H, Kirikoshi H, Inamori M, et al. Nitric oxide plays a crucial role in the development/progression of nonalcoholic steatohepatitis in the choline-deficient, l-amino acid-defined diet-fed rat model. *Alcohol Clin Exp Res* 2010;34 Suppl 1:S18-24.
186. Matsumoto M, Hada N, Sakamaki Y, Uno A, Shiga T, Tanaka C, Ito T, et al. An improved mouse model that rapidly develops fibrosis in non-alcoholic steatohepatitis. *Int J Exp Pathol* 2013;94:93-103.
187. Lee JS, Jun DW, Kim EK, Jeon HJ, Nam HH, Saeed WK. Histologic and Metabolic Derangement in High-Fat, High-Fructose, and Combination Diet Animal Models. *ScientificWorldJournal* 2015;2015:306326.
188. Savard C, Tartaglione EV, Kuver R, Haigh WG, Farrell GC, Subramanian S, Chait A, et al. Synergistic interaction of dietary cholesterol and dietary fat in inducing experimental steatohepatitis. *Hepatology* 2013;57:81-92.
189. Fujii M, Shibazaki Y, Wakamatsu K, Honda Y, Kawauchi Y, Suzuki K, Arumugam S, et al. A murine model for non-alcoholic steatohepatitis showing evidence of association between diabetes and hepatocellular carcinoma. *Med Mol Morphol* 2013;46:141-152.
190. Saito K, Uebanso T, Maekawa K, Ishikawa M, Taguchi R, Nammo T, Nishimaki-Mogami T, et al. Characterization of hepatic lipid profiles in a mouse model with nonalcoholic steatohepatitis and subsequent fibrosis. *Scientific Reports* 2015;5:12466.
191. Scholten D, Trebicka J, Liedtke C, Weiskirchen R. The carbon tetrachloride model in mice. *Lab Anim* 2015;49:4-11.
192. Tsuchida T, Lee YA, Fujiwara N, Ybanez M, Allen B, Martins S, Fiel MI, et al. A simple diet- and chemical-induced murine NASH model with rapid progression of steatohepatitis, fibrosis and liver cancer. *J Hepatol* 2018;69:385-395.
193. Chavez-Tapia NC, Rosso N, Tiribelli C. In vitro models for the study of non-alcoholic fatty liver disease. *Curr Med Chem* 2011;18:1079-1084.
194. Barbero-Becerra VJ, Giraudi PJ, Chávez-Tapia NC, Uribe M, Tiribelli C, Rosso N. The interplay between hepatic stellate cells and hepatocytes in an in vitro model of NASH. *Toxicol In Vitro* 2015;29:1753-1758.
195. Kozyra M, Johansson I, Nordling Å, Ullah S, Lauschke VM, Ingelman-Sundberg M. Human hepatic 3D spheroids as a model for steatosis and insulin resistance. *Scientific Reports* 2018;8:14297.
196. Tolosa L, Gómez-Lechón MJ, Jiménez N, Hervás D, Jover R, Donato MT. Advantageous use of HepaRG cells for the screening and mechanistic study of drug-induced steatosis. *Toxicol Appl Pharmacol* 2016;302:1-9.
197. Ji G, Wang Y, Deng Y, Li X, Jiang Z. Resveratrol ameliorates hepatic steatosis and inflammation in methionine/choline-deficient diet-induced steatohepatitis through regulating autophagy. *Lipids Health Dis* 2015;14:134.

198. Gómez-Lechón MJ, Donato MT, Martínez-Romero A, Jiménez N, Castell JV, O'Connor JE. A human hepatocellular in vitro model to investigate steatosis. *Chem Biol Interact* 2007;165:106-116.
199. Zubieta-Franco I, Fernández-Tussy P, Barbier-Torres L, Simon J, Fernández-Ramos D, Lopitz-Otsoa F, Gutiérrez-de Juan V, et al. Deregulated neddylation in liver fibrosis. *Hepatology* 2017;65:694-709.
200. Bechmann LP, Zahn D, Gieseler RK, Fingas CD, Marquitan G, Jochum C, Gerken G, et al. Resveratrol amplifies profibrogenic effects of free fatty acids on human hepatic stellate cells. *Hepatol Res* 2009;39:601-608.
201. Maccarrone M, Bab I, Bíró T, Cabral GA, Dey SK, Di Marzo V, Konje JC, et al. Endocannabinoid signaling at the periphery: 50 years after THC. *Trends Pharmacol Sci* 2015;36:277-296.
202. Abood MaA, Stephen P.H. and Barth, Francis and Bonner, Tom I. and Bradshaw, Heather and Cabral, Guy and Casellas, Pierre and Cravatt, Ben F. and Devane, William A. and Di Marzo, Vincenzo and Elphick, Maurice R. and Felder, Christian C. and Greasley, Peter and Herkenham, Miles and Howlett, Allyn C. and Kunos, George and Mackie, Ken and Mechoulam, Raphael and Pertwee, Roger G. and Ross, Ruth A. Cannabinoid receptors (version 2019.4) in the IUPHAR/BPS Guide to Pharmacology Database. *IUPHAR/BPS Guide to Pharmacology CITE* 2019;2019.
203. Zou S, Kumar U. Cannabinoid Receptors and the Endocannabinoid System: Signaling and Function in the Central Nervous System. *Int J Mol Sci* 2018;19.
204. Di Marzo V. New approaches and challenges to targeting the endocannabinoid system. *Nat Rev Drug Discov* 2018;17:623-639.
205. Farran B. An update on the physiological and therapeutic relevance of GPCR oligomers. *Pharmacol Res* 2017;117:303-327.
206. Martínez-Pinilla E, Reyes-Resina I, Oñatibia-Astibia A, Zamarbide M, Ricobaraza A, Navarro G, Moreno E, et al. CB1 and GPR55 receptors are co-expressed and form heteromers in rat and monkey striatum. *Exp Neurol* 2014;261:44-52.
207. Bénard G, Massa F, Puente N, Lourenço J, Bellocchio L, Soria-Gómez E, Matias I, et al. Mitochondrial CB1 receptors regulate neuronal energy metabolism. *Nature Neuroscience* 2012;15:558-564.
208. Premkumar LS, Sikand P. TRPV1: a target for next generation analgesics. *Curr Neuropharmacol* 2008;6:151-163.
209. Flores-Otero J, Ahn KH, Delgado-Peraza F, Mackie K, Kendall DA, Yudowski GA. Ligand-specific endocytic dwell times control functional selectivity of the cannabinoid receptor 1. *Nat Commun* 2014;5:4589.
210. Morgan DJ, Davis BJ, Kearn CS, Marcus D, Cook AJ, Wager-Miller J, Straiker A, et al. Mutation of putative GRK phosphorylation sites in the cannabinoid receptor 1 (CB1R) confers resistance to cannabinoid tolerance and hypersensitivity to cannabinoids in mice. *J Neurosci* 2014;34:5152-5163.
211. Pacher P, Bátkai S, Kunos G. The endocannabinoid system as an emerging target of pharmacotherapy. *Pharmacol Rev* 2006;58:389-462.

212. Jordan CJ, Xi ZX. Progress in brain cannabinoid CB(2) receptor research: From genes to behavior. *Neurosci Biobehav Rev* 2019;98:208-220.
213. Koch M, Varela L, Kim JG, Kim JD, Hernández-Nuño F, Simonds SE, Castorena CM, et al. Hypothalamic POMC neurons promote cannabinoid-induced feeding. *Nature* 2015;519:45-50.
214. Parsons LH, Hurd YL. Endocannabinoid signalling in reward and addiction. *Nat Rev Neurosci* 2015;16:579-594.
215. Koch M. Cannabinoid Receptor Signaling in Central Regulation of Feeding Behavior: A Mini-Review. *Front Neurosci* 2017;11:293.
216. Bellocchio L, Lafenêtre P, Cannich A, Cota D, Puente N, Grandes P, Chaouloff F, et al. Bimodal control of stimulated food intake by the endocannabinoid system. *Nature Neuroscience* 2010;13:281-283.
217. Solinas M, Justinova Z, Goldberg SR, Tanda G. Anandamide administration alone and after inhibition of fatty acid amide hydrolase (FAAH) increases dopamine levels in the nucleus accumbens shell in rats. *J Neurochem* 2006;98:408-419.
218. Soria-Gómez E, Bellocchio L, Reguero L, Lepousez G, Martin C, Bendahmane M, Ruehle S, et al. The endocannabinoid system controls food intake via olfactory processes. *Nat Neurosci* 2014;17:407-415.
219. Romero-Zerbo SY, Garcia-Gutierrez MS, Suárez J, Rivera P, Ruz-Maldonado I, Vida M, Rodriguez de Fonseca F, et al. Overexpression of cannabinoid CB2 receptor in the brain induces hyperglycaemia and a lean phenotype in adult mice. *J Neuroendocrinol* 2012;24:1106-1119.
220. Quarta C, Bellocchio L, Mancini G, Mazza R, Cervino C, Braulke LJ, Fekete C, et al. CB(1) signaling in forebrain and sympathetic neurons is a key determinant of endocannabinoid actions on energy balance. *Cell Metab* 2010;11:273-285.
221. Cardinal P, André C, Quarta C, Bellocchio L, Clark S, Elie M, Leste-Lasserre T, et al. CB1 cannabinoid receptor in SF1-expressing neurons of the ventromedial hypothalamus determines metabolic responses to diet and leptin. *Mol Metab* 2014;3:705-716.
222. Roche R, Hoareau L, Bes-Houtmann S, Gonthier MP, Laborde C, Baron JF, Haffaf Y, et al. Presence of the cannabinoid receptors, CB1 and CB2, in human omental and subcutaneous adipocytes. *Histochem Cell Biol* 2006;126:177-187.
223. Bellocchio L, Cervino C, Vicennati V, Pasquali R, Pagotto U. Cannabinoid type 1 receptor: another arrow in the adipocytes' bow. *J Neuroendocrinol* 2008;20 Suppl 1:130-138.
224. Ruiz de Azua I, Mancini G, Srivastava RK, Rey AA, Cardinal P, Tedesco L, Zingaretti CM, et al. Adipocyte cannabinoid receptor CB1 regulates energy homeostasis and alternatively activated macrophages. *J Clin Invest* 2017;127:4148-4162.
225. Tedesco L, Valerio A, Dossena M, Cardile A, Ragni M, Pagano C, Pagotto U, et al. Cannabinoid receptor stimulation impairs mitochondrial biogenesis in mouse white adipose tissue, muscle, and liver: the role of eNOS, p38 MAPK, and AMPK pathways. *Diabetes* 2010;59:2826-2836.
226. Bouaboula M, Hilairt S, Marchand J, Fajas L, Le Fur G, Casellas P. Anandamide induced PPARgamma transcriptional activation and 3T3-L1 preadipocyte differentiation. *Eur J Pharmacol* 2005;517:174-181.

227. Yan ZC, Liu DY, Zhang LL, Shen CY, Ma QL, Cao TB, Wang LJ, et al. Exercise reduces adipose tissue via cannabinoid receptor type 1 which is regulated by peroxisome proliferator-activated receptor-delta. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;354:427-433.
228. D'Eon TM, Pierce KA, Roix JJ, Tyler A, Chen H, Teixeira SR. The role of adipocyte insulin resistance in the pathogenesis of obesity-related elevations in endocannabinoids. *Diabetes* 2008;57:1262-1268.
229. Duncan M, Mouihate A, Mackie K, Keenan CM, Buckley NE, Davison JS, Patel KD, et al. Cannabinoid CB2 receptors in the enteric nervous system modulate gastrointestinal contractility in lipopolysaccharide-treated rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2008;295:G78-g87.
230. Izzo AA, Sharkey KA. Cannabinoids and the gut: new developments and emerging concepts. *Pharmacol Ther* 2010;126:21-38.
231. Tellez LA, Medina S, Han W, Ferreira JG, Licon-Limón P, Ren X, Lam TT, et al. A gut lipid messenger links excess dietary fat to dopamine deficiency. *Science* 2013;341:800-802.
232. Bermúdez-Silva FJ, Suárez J, Baixeras E, Cobo N, Bautista D, Cuesta-Muñoz AL, Fuentes E, et al. Presence of functional cannabinoid receptors in human endocrine pancreas. *Diabetologia* 2008;51:476-487.
233. Matias I, Gonthier MP, Orlando P, Martiadis V, De Petrocellis L, Cervino C, Petrosino S, et al. Regulation, function, and dysregulation of endocannabinoids in models of adipose and beta-pancreatic cells and in obesity and hyperglycemia. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91:3171-3180.
234. Liu YJ, Fan HB, Jin Y, Ren CG, Jia XE, Wang L, Chen Y, et al. Cannabinoid receptor 2 suppresses leukocyte inflammatory migration by modulating the JNK/c-Jun/Alox5 pathway. *J Biol Chem* 2013;288:13551-13562.
235. Berdyshev EV, Boichot E, Germain N, Allain N, Anger JP, Lagente V. Influence of fatty acid ethanalamides and delta9-tetrahydrocannabinol on cytokine and arachidonate release by mononuclear cells. *Eur J Pharmacol* 1997;330:231-240.
236. Eckardt K, Sell H, Taube A, Koenen M, Platzbecker B, Cramer A, Horrichs A, et al. Cannabinoid type 1 receptors in human skeletal muscle cells participate in the negative crosstalk between fat and muscle. *Diabetologia* 2009;52:664-674.
237. Cavuoto P, McAinch AJ, Hatzinikolas G, Cameron-Smith D, Wittert GA. Effects of cannabinoid receptors on skeletal muscle oxidative pathways. *Mol Cell Endocrinol* 2007;267:63-69.
238. Mendizabal-Zubiaga J, Melser S, Bénard G, Ramos A, Reguero L, Arrabal S, Elezgarai I, et al. Cannabinoid CB(1) Receptors Are Localized in Striated Muscle Mitochondria and Regulate Mitochondrial Respiration. *Front Physiol* 2016;7:476.
239. Liu YL, Connoley IP, Wilson CA, Stock MJ. Effects of the cannabinoid CB1 receptor antagonist SR141716 on oxygen consumption and soleus muscle glucose uptake in Lep(ob)/Lep(ob) mice. *Int J Obes (Lond)* 2005;29:183-187.
240. Zelber-Sagi S, Azar S, Nemirovski A, Webb M, Halpern Z, Shibolet O, Tam J. Serum levels of endocannabinoids are independently associated with nonalcoholic fatty liver disease. *Obesity (Silver Spring)* 2017;25:94-101.

241. Westerbacka J, Kotronen A, Fielding BA, Wahren J, Hodson L, Perttilä J, Seppänen-Laakso T, et al. Splanchnic balance of free fatty acids, endocannabinoids, and lipids in subjects with nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 2010;139:1961-1971.e1961.
242. Liu J, Zhou L, Xiong K, Godlewski G, Mukhopadhyay B, Tam J, Yin S, et al. Hepatic cannabinoid receptor-1 mediates diet-induced insulin resistance via inhibition of insulin signaling and clearance in mice. *Gastroenterology* 2012;142:1218-1228.e1211.
243. Jourdan T, Djaouti L, Demizieux L, Gresti J, Vergès B, Degrace P. CB1 antagonism exerts specific molecular effects on visceral and subcutaneous fat and reverses liver steatosis in diet-induced obese mice. *Diabetes* 2010;59:926-934.
244. Osei-Hyiaman D, Liu J, Zhou L, Godlewski G, Harvey-White J, Jeong WI, Bátkai S, et al. Hepatic CB1 receptor is required for development of diet-induced steatosis, dyslipidemia, and insulin and leptin resistance in mice. *J Clin Invest* 2008;118:3160-3169.
245. Liu J, Cinar R, Xiong K, Godlewski G, Jourdan T, Lin Y, Ntambi JM, et al. Monounsaturated fatty acids generated via stearoyl CoA desaturase-1 are endogenous inhibitors of fatty acid amide hydrolase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013;110:18832-18837.
246. Osei-Hyiaman D, DePetrillo M, Pacher P, Liu J, Radaeva S, Bátkai S, Harvey-White J, et al. Endocannabinoid activation at hepatic CB1 receptors stimulates fatty acid synthesis and contributes to diet-induced obesity. *J Clin Invest* 2005;115:1298-1305.
247. Gary-Bobo M, Elachouri G, Gallas JF, Janiak P, Marini P, Ravinet-Trillou C, Chabbert M, et al. Rimonabant reduces obesity-associated hepatic steatosis and features of metabolic syndrome in obese Zucker fa/fa rats. *Hepatology* 2007;46:122-129.
248. Tam J, Vemuri VK, Liu J, Bátkai S, Mukhopadhyay B, Godlewski G, Osei-Hyiaman D, et al. Peripheral CB1 cannabinoid receptor blockade improves cardiometabolic risk in mouse models of obesity. *J Clin Invest* 2010;120:2953-2966.
249. Wu HM, Yang YM, Kim SG. Rimonabant, a cannabinoid receptor type 1 inverse agonist, inhibits hepatocyte lipogenesis by activating liver kinase B1 and AMP-activated protein kinase axis downstream of $G\alpha$ i/o inhibition. *Mol Pharmacol* 2011;80:859-869.
250. Agudo J, Martin M, Roca C, Molas M, Bura AS, Zimmer A, Bosch F, et al. Deficiency of CB2 cannabinoid receptor in mice improves insulin sensitivity but increases food intake and obesity with age. *Diabetologia* 2010;53:2629-2640.
251. Deveaux V, Cadoudal T, Ichigotani Y, Teixeira-Clerc F, Louvet A, Manin S, Nhieu JT, et al. Cannabinoid CB2 receptor potentiates obesity-associated inflammation, insulin resistance and hepatic steatosis. *PLoS One* 2009;4:e5844.
252. Teixeira-Clerc F, Belot MP, Manin S, Deveaux V, Cadoudal T, Chobert MN, Louvet A, et al. Beneficial paracrine effects of cannabinoid receptor 2 on liver injury and regeneration. *Hepatology* 2010;52:1046-1059.
253. Guillot A, Hamdaoui N, Bizy A, Zoltani K, Souktani R, Zafrani ES, Mallat A, et al. Cannabinoid receptor 2 counteracts interleukin-17-induced immune and fibrogenic responses in mouse liver. *Hepatology* 2014;59:296-306.
254. Denaës T, Lodder J, Chobert M-N, Ruiz I, Pawlotsky J-M, Lotersztajn S, Teixeira-Clerc F. The Cannabinoid Receptor 2 Protects Against Alcoholic Liver Disease Via a Macrophage Autophagy-Dependent Pathway. *Scientific Reports* 2016;6:28806.

255. Louvet A, Teixeira-Clerc F, Chobert MN, Deveaux V, Pavoine C, Zimmer A, Pecker F, et al. Cannabinoid CB2 receptors protect against alcoholic liver disease by regulating Kupffer cell polarization in mice. *Hepatology* 2011;54:1217-1226.
256. Teixeira-Clerc F, Julien B, Grenard P, Van Nhieu JT, Deveaux V, Li L, Serriere-Lanneau V, et al. CB1 cannabinoid receptor antagonism: a new strategy for the treatment of liver fibrosis. *Nature Medicine* 2006;12:671-676.
257. Muñoz-Luque J, Ros J, Fernández-Varo G, Tugues S, Morales-Ruiz M, Alvarez CE, Friedman SL, et al. Regression of fibrosis after chronic stimulation of cannabinoid CB2 receptor in cirrhotic rats. *J Pharmacol Exp Ther* 2008;324:475-483.
258. DeLeve LD, Wang X, Kanel GC, Atkinson RD, McCuskey RS. Prevention of hepatic fibrosis in a murine model of metabolic syndrome with nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Pathol* 2008;173:993-1001.
259. Domenicali M, Caraceni P, Giannone F, Pertosa AM, Principe A, Zambruni A, Trevisani F, et al. Cannabinoid type 1 receptor antagonism delays ascites formation in rats with cirrhosis. *Gastroenterology* 2009;137:341-349.
260. Yang YY, Lin HC, Huang YT, Lee TY, Hou MC, Wang YW, Lee FY, et al. Effect of chronic CB1 cannabinoid receptor antagonism on livers of rats with biliary cirrhosis. *Clin Sci (Lond)* 2007;112:533-542.
261. Bátkai S, Járαι Z, Wagner JA, Goparaju SK, Varga K, Liu J, Wang L, et al. Endocannabinoids acting at vascular CB1 receptors mediate the vasodilated state in advanced liver cirrhosis. *Nature Medicine* 2001;7:827-832.
262. Ros J, Clària J, To-Figueras J, Planagumà A, Cejudo-Martín P, Fernández-Varo G, Martín-Ruiz R, et al. Endogenous cannabinoids: a new system involved in the homeostasis of arterial pressure in experimental cirrhosis in the rat. *Gastroenterology* 2002;122:85-93.
263. Julien B, Grenard P, Teixeira-Clerc F, Van Nhieu JT, Li L, Karsak M, Zimmer A, et al. Antifibrogenic role of the cannabinoid receptor CB2 in the liver. *Gastroenterology* 2005;128:742-755.
264. Siegmund SV, Uchinami H, Osawa Y, Brenner DA, Schwabe RF. Anandamide induces necrosis in primary hepatic stellate cells. *Hepatology* 2005;41:1085-1095.
265. van der Poorten D, Shahidi M, Tay E, Sessa J, Tran K, McLeod D, Milliken JS, et al. Hepatitis C virus induces the cannabinoid receptor 1. *PLoS One* 2010;5.
266. Christensen R, Kristensen PK, Bartels EM, Bliddal H, Astrup A. Efficacy and safety of the weight-loss drug rimonabant: a meta-analysis of randomised trials. *Lancet* 2007;370:1706-1713.
267. Van Gaal L, Pi-Sunyer X, Després J-P, McCarthy C, Scheen A. Efficacy and Safety of Rimonabant for Improvement of Multiple Cardiometabolic Risk Factors in Overweight/Obese Patients. Pooled 1-year data from the Rimonabant in Obesity (RIO) program 2008;31:S229-S240.
268. Hézode C, Roudot-Thoraval F, Nguyen S, Grenard P, Julien B, Zafrani ES, Pawlotsky JM, et al. Daily cannabis smoking as a risk factor for progression of fibrosis in chronic hepatitis C. *Hepatology* 2005;42:63-71.

269. Ishida JH, Peters MG, Jin C, Louie K, Tan V, Bacchetti P, Terrault NA. Influence of cannabis use on severity of hepatitis C disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2008;6:69-75.
270. Hézode C, Zafrani ES, Roudot-Thoraval F, Costentin C, Hessami A, Bouvier-Alias M, Medkour F, et al. Daily cannabis use: a novel risk factor of steatosis severity in patients with chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 2008;134:432-439.
271. Sawzdargo M, Nguyen T, Lee DK, Lynch KR, Cheng R, Heng HH, George SR, et al. Identification and cloning of three novel human G protein-coupled receptor genes GPR52, PsiGPR53 and GPR55: GPR55 is extensively expressed in human brain. *Brain Res Mol Brain Res* 1999;64:193-198.
272. Baker D, Pryce G, Davies WL, Hiley CR. In silico patent searching reveals a new cannabinoid receptor. *Trends Pharmacol Sci* 2006;27:1-4.
273. Ryberg E, Larsson N, Sjögren S, Hjorth S, Hermansson NO, Leonova J, Elebring T, et al. The orphan receptor GPR55 is a novel cannabinoid receptor. *Br J Pharmacol* 2007;152:1092-1101.
274. Henstridge CM, Balenga NA, Kargl J, Andradas C, Brown AJ, Irving A, Sanchez C, et al. Minireview: recent developments in the physiology and pathology of the lysophosphatidylinositol-sensitive receptor GPR55. *Mol Endocrinol* 2011;25:1835-1848.
275. Lin XH, Yucee B, Li YY, Feng YJ, Feng JY, Yu LY, Li K, et al. A novel CB receptor GPR55 and its ligands are involved in regulation of gut movement in rodents. *Neurogastroenterol Motil* 2011;23:862-e342.
276. Liu B, Song S, Ruz-Maldonado I, Pingitore A, Huang GC, Baker D, Jones PM, et al. GPR55-dependent stimulation of insulin secretion from isolated mouse and human islets of Langerhans. *Diabetes Obes Metab* 2016;18:1263-1273.
277. McKillop AM, Moran BM, Abdel-Wahab YH, Flatt PR. Evaluation of the insulin releasing and antihyperglycaemic activities of GPR55 lipid agonists using clonal beta-cells, isolated pancreatic islets and mice. *Br J Pharmacol* 2013;170:978-990.
278. Romero-Zerbo SY, Rafacho A, Díaz-Arteaga A, Suárez J, Quesada I, Imbernon M, Ross RA, et al. A role for the putative cannabinoid receptor GPR55 in the islets of Langerhans. *J Endocrinol* 2011;211:177-185.
279. Moreno-Navarrete JM, Catalán V, Whyte L, Díaz-Arteaga A, Vázquez-Martínez R, Rotellar F, Guzmán R, et al. The L- α -lysophosphatidylinositol/GPR55 system and its potential role in human obesity. *Diabetes* 2012;61:281-291.
280. Lanuti M, Talamonti E, Maccarrone M, Chiurchiù V. Activation of GPR55 Receptors Exacerbates oxLDL-Induced Lipid Accumulation and Inflammatory Responses, while Reducing Cholesterol Efflux from Human Macrophages. *PLoS One* 2015;10:e0126839.
281. Balenga NAB, Aflaki E, Kargl J, Platzer W, Schröder R, Blättermann S, Kostenis E, et al. GPR55 regulates cannabinoid 2 receptor-mediated responses in human neutrophils. *Cell Research* 2011;21:1452-1469.
282. Lauckner JE, Jensen JB, Chen H-Y, Lu H-C, Hille B, Mackie K. GPR55 is a cannabinoid receptor that increases intracellular calcium and inhibits M current. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2008;105:2699-2704.

283. Henstridge CM, Balenga NA, Ford LA, Ross RA, Waldhoer M, Irving AJ. The GPR55 ligand L-alpha-lysophosphatidylinositol promotes RhoA-dependent Ca²⁺ signaling and NFAT activation. *Faseb j* 2009;23:183-193.
284. Henstridge CM, Balenga NA, Schröder R, Kargl JK, Platzer W, Martini L, Arthur S, et al. GPR55 ligands promote receptor coupling to multiple signalling pathways. *Br J Pharmacol* 2010;160:604-614.
285. Kapur A, Zhao P, Sharir H, Bai Y, Caron MG, Barak LS, Abood ME. Atypical responsiveness of the orphan receptor GPR55 to cannabinoid ligands. *J Biol Chem* 2009;284:29817-29827.
286. Ross RA. L- α -lysophosphatidylinositol meets GPR55: a deadly relationship. *Trends Pharmacol Sci* 2011;32:265-269.
287. Piñeiro R, Falasca M. Lysophosphatidylinositol signalling: new wine from an old bottle. *Biochim Biophys Acta* 2012;1821:694-705.
288. Oka S, Nakajima K, Yamashita A, Kishimoto S, Sugiura T. Identification of GPR55 as a lysophosphatidylinositol receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;362:928-934.
289. Oka S, Toshida T, Maruyama K, Nakajima K, Yamashita A, Sugiura T. 2-Arachidonoyl-sn-glycero-3-phosphoinositol: a possible natural ligand for GPR55. *J Biochem* 2009;145:13-20.
290. Pertwee RG. GPR55: a new member of the cannabinoid receptor clan? *Br J Pharmacol* 2007;152:984-986.
291. Johns DG, Behm DJ, Walker DJ, Ao Z, Shapland EM, Daniels DA, Riddick M, et al. The novel endocannabinoid receptor GPR55 is activated by atypical cannabinoids but does not mediate their vasodilator effects. *Br J Pharmacol* 2007;152:825-831.
292. Morales P, Whyte LS, Chicharro R, Gómez-Cañas M, Pazos MR, Goya P, Irving AJ, et al. Identification of Novel GPR55 Modulators Using Cell-Impedance-Based Label-Free Technology. *J Med Chem* 2016;59:1840-1853.
293. Waldeck-Weiermair M, Zoratti C, Osibow K, Balenga N, Goessnitzer E, Waldhoer M, Malli R, et al. Integrin clustering enables anandamide-induced Ca²⁺ signaling in endothelial cells via GPR55 by protection against CB1-receptor-triggered repression. *J Cell Sci* 2008;121:1704-1717.
294. Li K, Fichna J, Schicho R, Saur D, Bashashati M, Mackie K, Li Y, et al. A role for O-1602 and G protein-coupled receptor GPR55 in the control of colonic motility in mice. *Neuropharmacology* 2013;71:255-263.
295. Kargl J, Brown AJ, Andersen L, Dorn G, Schicho R, Waldhoer M, Heinemann A. A selective antagonist reveals a potential role of G protein-coupled receptor 55 in platelet and endothelial cell function. *J Pharmacol Exp Ther* 2013;346:54-66.
296. Yamashita A, Oka S, Tanikawa T, Hayashi Y, Nemoto-Sasaki Y, Sugiura T. The actions and metabolism of lysophosphatidylinositol, an endogenous agonist for GPR55. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2013;107:103-116.
297. Alhouayek M, Masquelier J, Muccioli GG. Lysophosphatidylinositols, from Cell Membrane Constituents to GPR55 Ligands. *Trends Pharmacol Sci* 2018;39:586-604.
298. Jalink K, van Corven EJ, Moolenaar WH. Lysophosphatidic acid, but not phosphatidic acid, is a potent Ca²⁺(+)-mobilizing stimulus for fibroblasts. Evidence for an extracellular site of action. *J Biol Chem* 1990;265:12232-12239.

299. Tokumura A, Fukuzawa K, Tsukatani H. Effects of synthetic and natural lysophosphatidic acids on the arterial blood pressure of different animal species. *Lipids* 1978;13:572-574.
300. Okamoto H, Takuwa N, Yokomizo T, Sugimoto N, Sakurada S, Shigematsu H, Takuwa Y. Inhibitory regulation of Rac activation, membrane ruffling, and cell migration by the G protein-coupled sphingosine-1-phosphate receptor EDG5 but not EDG1 or EDG3. *Mol Cell Biol* 2000;20:9247-9261.
301. Metz SA. Mobilization of cellular Ca²⁺ by lysophospholipids in rat islets of Langerhans. *Biochim Biophys Acta* 1988;968:239-252.
302. Falasca M, Iurisci C, Carvelli A, Sacchetti A, Corda D. Release of the mitogen lysophosphatidylinositol from H-Ras-transformed fibroblasts; a possible mechanism of autocrine control of cell proliferation. *Oncogene* 1998;16:2357-2365.
303. Blondeau N, Lauritzen I, Widmann C, Lazdunski M, Heurteaux C. A potent protective role of lysophospholipids against global cerebral ischemia and glutamate excitotoxicity in neuronal cultures. *J Cereb Blood Flow Metab* 2002;22:821-834.
304. Yamashita A, Kumazawa T, Koga H, Suzuki N, Oka S, Sugiura T. Generation of lysophosphatidylinositol by DDHD domain containing 1 (DDHD1): Possible involvement of phospholipase D/phosphatidic acid in the activation of DDHD1. *Biochim Biophys Acta* 2010;1801:711-720.
305. Leslie CC. Cytosolic phospholipase A₂: physiological function and role in disease. *J Lipid Res* 2015;56:1386-1402.
306. Lee HC, Inoue T, Sasaki J, Kubo T, Matsuda S, Nakasaki Y, Hattori M, et al. LPIAT1 regulates arachidonic acid content in phosphatidylinositol and is required for cortical lamination in mice. *Mol Biol Cell* 2012;23:4689-4700.
307. Helsley RN, Varadharajan V, Brown AL, Gromovsky AD, Schugar RC, Ramachandiran I, Fung K, et al. Obesity-linked suppression of membrane-bound O-acyltransferase 7 (MBOAT7) drives non-alcoholic fatty liver disease. *Elife* 2019;8.
308. Le Guédard M, Bessoule JJ, Boyer V, Ayciriex S, Velours G, Kulik W, Ejsing CS, et al. PSII is responsible for the stearic acid enrichment that is characteristic of phosphatidylinositol in yeast. *Febs j* 2009;276:6412-6424.
309. Piñeiro R, Maffucci T, Falasca M. The putative cannabinoid receptor GPR55 defines a novel autocrine loop in cancer cell proliferation. *Oncogene* 2011;30:142-152.
310. Soga T, Ohishi T, Matsui T, Saito T, Matsumoto M, Takasaki J, Matsumoto S, et al. Lysophosphatidylcholine enhances glucose-dependent insulin secretion via an orphan G-protein-coupled receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;326:744-751.
311. Arifin SA, Paternoster S, Carlessi R, Casari I, Ekberg JH, Maffucci T, Newsholme P, et al. Oleoyl-lysophosphatidylinositol enhances glucagon-like peptide-1 secretion from enteroendocrine L-cells through GPR119. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids* 2018;1863:1132-1141.
312. Monet M, Gkika D, Lehen'kyi V, Pournier A, Vanden Abeele F, Bidaux G, Juvin V, et al. Lysophospholipids stimulate prostate cancer cell migration via TRPV2 channel activation. *Biochim Biophys Acta* 2009;1793:528-539.

313. Ailte I, Lingelem ABD, Kavaliauskiene S, Bergan J, Kvalvaag AS, Myrann A-G, Skotland T, et al. Addition of lysophospholipids with large head groups to cells inhibits Shiga toxin binding. *Scientific Reports* 2016;6:30336.
314. Ailte I, Lingelem AB, Kvalvaag AS, Kavaliauskiene S, Brech A, Koster G, Dommersnes PG, et al. Exogenous lysophospholipids with large head groups perturb clathrin-mediated endocytosis. *Traffic* 2017;18:176-191.
315. Ma MT, Yeo JF, Farooqui AA, Zhang J, Chen P, Ong WY. Differential effects of lysophospholipids on exocytosis in rat PC12 cells. *J Neural Transm (Vienna)* 2010;117:301-308.
316. Wu CS, Chen H, Sun H, Zhu J, Jew CP, Wager-Miller J, Straiker A, et al. GPR55, a G-protein coupled receptor for lysophosphatidylinositol, plays a role in motor coordination. *PLoS One* 2013;8:e60314.
317. Bjursell M, Ryberg E, Wu T, Greasley PJ, Bohlooly YM, Hjorth S. Deletion of Gpr55 Results in Subtle Effects on Energy Metabolism, Motor Activity and Thermal Pain Sensation. *PLoS One* 2016;11:e0167965.
318. Deliu E, Sperow M, Console-Bram L, Carter RL, Tilley DG, Kalamarides DJ, Kirby LG, et al. The Lysophosphatidylinositol Receptor GPR55 Modulates Pain Perception in the Periaqueductal Gray. *Mol Pharmacol* 2015;88:265-272.
319. Shi QX, Yang LK, Shi WL, Wang L, Zhou SM, Guan SY, Zhao MG, et al. The novel cannabinoid receptor GPR55 mediates anxiolytic-like effects in the medial orbital cortex of mice with acute stress. *Mol Brain* 2017;10:38.
320. Rahimi A, Hajizadeh Moghaddam A, Roohbakhsh A. Central administration of GPR55 receptor agonist and antagonist modulates anxiety-related behaviors in rats. *Fundam Clin Pharmacol* 2015;29:185-190.
321. Whyte LS, Ryberg E, Sims NA, Ridge SA, Mackie K, Greasley PJ, Ross RA, et al. The putative cannabinoid receptor GPR55 affects osteoclast function in vitro and bone mass in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:16511-16516.
322. AlSuleimani YM, Hiley CR. The GPR55 agonist lysophosphatidylinositol relaxes rat mesenteric resistance artery and induces Ca(2+) release in rat mesenteric artery endothelial cells. *Br J Pharmacol* 2015;172:3043-3057.
323. Chiurchiù V, Lanuti M, De Bardi M, Battistini L, Maccarrone M. The differential characterization of GPR55 receptor in human peripheral blood reveals a distinctive expression in monocytes and NK cells and a proinflammatory role in these innate cells. *Int Immunol* 2015;27:153-160.
324. Sutphen R, Xu Y, Wilbanks GD, Fiorica J, Grendys EC, Jr., LaPolla JP, Arango H, et al. Lysophospholipids are potential biomarkers of ovarian cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004;13:1185-1191.
325. Andradas C, Blasco-Benito S, Castillo-Lluva S, Dillenburg-Pilla P, Diez-Alarcia R, Juanes-García A, García-Taboada E, et al. Activation of the orphan receptor GPR55 by lysophosphatidylinositol promotes metastasis in triple-negative breast cancer. *Oncotarget* 2016;7:47565-47575.
326. Ignatowska-Jankowska B, Jankowski MM, Swiergiel AH. Cannabidiol decreases body weight gain in rats: involvement of CB2 receptors. *Neurosci Lett* 2011;490:82-84.

327. Díaz-Arteaga A, Vázquez MJ, Vazquez-Martínez R, Pulido MR, Suarez J, Velásquez DA, López M, et al. The atypical cannabinoid O-1602 stimulates food intake and adiposity in rats. *Diabetes Obes Metab* 2012;14:234-243.
328. Meadows A, Lee JH, Wu CS, Wei Q, Pradhan G, Yafi M, Lu HC, et al. Deletion of G-protein-coupled receptor 55 promotes obesity by reducing physical activity. *Int J Obes (Lond)* 2016;40:417-424.
329. Ishiguro H, Onaivi ES, Horiuchi Y, Imai K, Komaki G, Ishikawa T, Suzuki M, et al. Functional polymorphism in the GPR55 gene is associated with anorexia nervosa. *Synapse* 2011;65:103-108.
330. Ross GR, Lichtman A, Dewey WL, Akbarali HI. Evidence for the putative cannabinoid receptor (GPR55)-mediated inhibitory effects on intestinal contractility in mice. *Pharmacology* 2012;90:55-65.
331. Stančić A, Jandl K, Hasenöhr C, Reichmann F, Marsche G, Schuligoi R, Heinemann A, et al. The GPR55 antagonist CID16020046 protects against intestinal inflammation. *Neurogastroenterol Motil* 2015;27:1432-1445.
332. Schicho R, Bashashati M, Bawa M, McHugh D, Saur D, Hu HM, Zimmer A, et al. The atypical cannabinoid O-1602 protects against experimental colitis and inhibits neutrophil recruitment. *Inflamm Bowel Dis* 2011;17:1651-1664.
333. Song S, Baker D, Huang GC, Amiel SA, King AJ, Bowe JE, Jones PM, Persaud SJ. Islet GPR55 is coupled to increased insulin secretion and decreased apoptosis. *Diabetología* 2012;55:S1-S538 (Abstract 378).
334. Lipina C, Walsh SK, Mitchell SE, Speakman JR, Wainwright CL, Hundal HS. GPR55 deficiency is associated with increased adiposity and impaired insulin signaling in peripheral metabolic tissues. *Faseb j* 2019;33:1299-1312.
335. McKillop AM, Moran BM, Abdel-Wahab YHA, Gormley NM, Flatt PR. Metabolic effects of orally administered small-molecule agonists of GPR55 and GPR119 in multiple low-dose streptozotocin-induced diabetic and incretin-receptor-knockout mice. *Diabetologia* 2016;59:2674-2685.
336. Tudurí E, López M, Diéguez C, Nadal A, Nogueiras R. GPR55 and the regulation of glucose homeostasis. *Int J Biochem Cell Biol* 2017;88:204-207.
337. Imbernon M, Whyte L, Diaz-Arteaga A, Russell WR, Moreno NR, Vazquez MJ, Gonzalez CR, et al. Regulation of GPR55 in rat white adipose tissue and serum LPI by nutritional status, gestation, gender and pituitary factors. *Mol Cell Endocrinol* 2014;383:159-169.
338. Tudurí E, Imbernon M, Hernández-Bautista RJ, Tojo M, Fernø J, Diéguez C, Nogueiras R. GPR55: a new promising target for metabolism? *J Mol Endocrinol* 2017;58:R191-r202.
339. Buch S, Stickel F, Trépo E, Way M, Herrmann A, Nischalke HD, Brosch M, et al. A genome-wide association study confirms PNPLA3 and identifies TM6SF2 and MBOAT7 as risk loci for alcohol-related cirrhosis. *Nat Genet* 2015;47:1443-1448.
340. Mancina RM, Dongiovanni P, Petta S, Pingitore P, Meroni M, Rametta R, Borén J, et al. The MBOAT7-TMC4 Variant rs641738 Increases Risk of Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Individuals of European Descent. *Gastroenterology* 2016;150:1219-1230.e1216.

341. Luukkonen PK, Zhou Y, Hyötyläinen T, Leivonen M, Arola J, Orho-Melander M, Orešič M, et al. The MBOAT7 variant rs641738 alters hepatic phosphatidylinositols and increases severity of non-alcoholic fatty liver disease in humans. *J Hepatol* 2016;65:1263-1265.
342. Thabet K, Asimakopoulos A, Shojaei M, Romero-Gomez M, Mangia A, Irving WL, Berg T, et al. MBOAT7 rs641738 increases risk of liver inflammation and transition to fibrosis in chronic hepatitis C. *Nat Commun* 2016;7:12757.
343. Viitasalo A, Eloranta AM, Atalay M, Romeo S, Pihlajamäki J, Lakka TA. Association of MBOAT7 gene variant with plasma ALT levels in children: the PANIC study. *Pediatr Res* 2016;80:651-655.
344. Krawczyk M, Rau M, Schattenberg JM, Bantel H, Pathil A, Demir M, Kluwe J, et al. Combined effects of the PNPLA3 rs738409, TM6SF2 rs58542926, and MBOAT7 rs641738 variants on NAFLD severity: a multicenter biopsy-based study. *J Lipid Res* 2017;58:247-255.
345. Thabet K, Chan HLY, Petta S, Mangia A, Berg T, Boonstra A, Brouwer WP, et al. The membrane-bound O-acyltransferase domain-containing 7 variant rs641738 increases inflammation and fibrosis in chronic hepatitis B. *Hepatology* 2017;65:1840-1850.
346. Liu B, Song S, Jones PM, Persaud SJ. GPR55: from orphan to metabolic regulator? *Pharmacol Ther* 2015;145:35-42.
347. Simcocks AC, O'Keefe L, Jenkin KA, Mathai ML, Hryciw DH, McAinch AJ. A potential role for GPR55 in the regulation of energy homeostasis. *Drug Discov Today* 2014;19:1145-1151.
348. Porteiro B, Fondevila MF, Delgado TC, Iglesias C, Imbernon M, Iruzubieta P, Crespo J, et al. Hepatic p63 regulates steatosis via IKK β /ER stress. *Nature Communications* 2017;8:15111.
349. Barr J, Caballería J, Martínez-Arranz I, Domínguez-Díez A, Alonso C, Muntané J, Pérez-Cormenzana M, et al. Obesity-dependent metabolic signatures associated with nonalcoholic fatty liver disease progression. *J Proteome Res* 2012;11:2521-2532.
350. Martínez-Arranz I, Mayo R, Pérez-Cormenzana M, Mincholé I, Salazar L, Alonso C, Mato JM. Enhancing metabolomics research through data mining. *J Proteomics* 2015;127:275-288.
351. Gingold JA, Fidalgo M, Guallar D, Lau Z, Sun Z, Zhou H, Faiola F, et al. A genome-wide RNAi screen identifies opposing functions of Snai1 and Snai2 on the Nanog dependency in reprogramming. *Mol Cell* 2014;56:140-152.
352. Condiotti R, Curran MA, Nolan GP, Giladi H, Ketzinel-Gilad M, Gross E, Galun E. Prolonged liver-specific transgene expression by a non-primate lentiviral vector. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;320:998-1006.
353. Goedeke L, Bates J, Vatner DF, Perry RJ, Wang T, Ramirez R, Li L, et al. Acetyl-CoA Carboxylase Inhibition Reverses NAFLD and Hepatic Insulin Resistance but Promotes Hypertriglyceridemia in Rodents. *Hepatology* 2018;68:2197-2211.
354. Pfeifer AM, Cole KE, Smoot DT, Weston A, Groopman JD, Shields PG, Vignaud JM, et al. Simian virus 40 large tumor antigen-immortalized normal human liver epithelial cells express hepatocyte characteristics and metabolize chemical carcinogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1993;90:5123-5127.
355. Friedman SL, Rockey DC, McGuire RF, Maher JJ, Boyles JK, Yamasaki G. Isolated hepatic lipocytes and Kupffer cells from normal human liver: morphological and functional characteristics in primary culture. *Hepatology* 1992;15:234-243.

356. Xu L, Hui AY, Albanis E, Arthur MJ, O'Byrne SM, Blaner WS, Mukherjee P, et al. Human hepatic stellate cell lines, LX-1 and LX-2: new tools for analysis of hepatic fibrosis. *Gut* 2005;54:142-151.
357. Müller FA, Sturla SJ. Human in vitro models of nonalcoholic fatty liver disease. *Current Opinion in Toxicology* 2019;16:9-16.
358. Aspichueta P, Pérez S, Ochoa B, Fresnedo O. Endotoxin promotes preferential periportal upregulation of VLDL secretion in the rat liver. *J Lipid Res* 2005;46:1017-1026.
359. Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 1959;37:911-917.
360. Ruiz JI, Ochoa B. Quantification in the subnanomolar range of phospholipids and neutral lipids by monodimensional thin-layer chromatography and image analysis. *J Lipid Res* 1997;38:1482-1489.
361. Hirschey MD, Shimazu T, Goetzman E, Jing E, Schwer B, Lombard DB, Grueter CA, et al. SIRT3 regulates mitochondrial fatty-acid oxidation by reversible enzyme deacetylation. *Nature* 2010;464:121-125.
362. Vilà-Brau A, De Sousa-Coelho AL, Mayordomo C, Haro D, Marrero PF. Human HMGCS2 regulates mitochondrial fatty acid oxidation and FGF21 expression in HepG2 cell line. *J Biol Chem* 2011;286:20423-20430.
363. O'Connor RS, Guo L, Ghassemi S, Snyder NW, Worth AJ, Weng L, Kam Y, et al. The CPT1a inhibitor, etomoxir induces severe oxidative stress at commonly used concentrations. *Scientific Reports* 2018;8:6289.
364. Dos Anjos Cassado A. F4/80 as a Major Macrophage Marker: The Case of the Peritoneum and Spleen. *Results Probl Cell Differ* 2017;62:161-179.
365. Porteiro B, Fondevila MF, Buque X, Gonzalez-Rellan MJ, Fernandez U, Mora A, Beiroa D, et al. Pharmacological stimulation of p53 with low-dose doxorubicin ameliorates diet-induced nonalcoholic steatosis and steatohepatitis. *Mol Metab* 2018;8:132-143.
366. Imbernon M, Beiroa D, Vázquez MJ, Morgan DA, Veyrat-Durebex C, Porteiro B, Díaz-Arteaga A, et al. Central melanin-concentrating hormone influences liver and adipose metabolism via specific hypothalamic nuclei and efferent autonomic/JNK1 pathways. *Gastroenterology* 2013;144:636-649.e636.
367. Imbernon M, Sanchez-Rebordelo E, Romero-Picó A, Kalló I, Chee MJ, Porteiro B, Al-Massadi O, et al. Hypothalamic kappa opioid receptor mediates both diet-induced and melanin concentrating hormone-induced liver damage through inflammation and endoplasmic reticulum stress. *Hepatology* 2016;64:1086-1104.
368. Naughton SS, Mathai ML, Hryciw DH, McAinch AJ. Fatty Acid modulation of the endocannabinoid system and the effect on food intake and metabolism. *Int J Endocrinol* 2013;2013:361895.
369. Musso G, Cassader M, Paschetta E, Gambino R. Bioactive Lipid Species and Metabolic Pathways in Progression and Resolution of Nonalcoholic Steatohepatitis. *Gastroenterology* 2018;155:282-302.e288.

370. Lehmann R, Franken H, Dammeier S, Rosenbaum L, Kantartzis K, Peter A, Zell A, et al. Circulating lysophosphatidylcholines are markers of a metabolically benign nonalcoholic fatty liver. *Diabetes Care* 2013;36:2331-2338.
371. Labonté ED, Pfluger PT, Cash JG, Kuhel DG, Roja JC, Magness DP, Jandacek RJ, et al. Postprandial lysophospholipid suppresses hepatic fatty acid oxidation: the molecular link between group 1B phospholipase A2 and diet-induced obesity. *Faseb j* 2010;24:2516-2524.
372. Chiappini F, Coilly A, Kadar H, Gual P, Tran A, Desterke C, Samuel D, et al. Metabolism dysregulation induces a specific lipid signature of nonalcoholic steatohepatitis in patients. *Sci Rep* 2017;7:46658.
373. Lawitz EJ, Coste A, Poordad F, Alkhoury N, Loo N, McColgan BJ, Tarrant JM, et al. Acetyl-CoA Carboxylase Inhibitor GS-0976 for 12 Weeks Reduces Hepatic De Novo Lipogenesis and Steatosis in Patients With Nonalcoholic Steatohepatitis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2018;16:1983-1991.e1983.
374. Esquejo RM, Salatto CT, Delmore J, Albuquerque B, Reyes A, Shi Y, Moccia R, et al. Activation of Liver AMPK with PF-06409577 Corrects NAFLD and Lowers Cholesterol in Rodent and Primate Preclinical Models. *EBioMedicine* 2018;31:122-132.
375. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03763877>.
376. Zhang C-S, Hawley SA, Zong Y, Li M, Wang Z, Gray A, Ma T, et al. Fructose-1,6-bisphosphate and aldolase mediate glucose sensing by AMPK. *Nature* 2017;548:112-116.
377. Shaw RJ, Lamia KA, Vasquez D, Koo SH, Bardeesy N, Depinho RA, Montminy M, et al. The kinase LKB1 mediates glucose homeostasis in liver and therapeutic effects of metformin. *Science* 2005;310:1642-1646.
378. Foretz M, Hébrard S, Leclerc J, Zarrinpashneh E, Soty M, Mithieux G, Sakamoto K, et al. Metformin inhibits hepatic gluconeogenesis in mice independently of the LKB1/AMPK pathway via a decrease in hepatic energy state. *J Clin Invest* 2010;120:2355-2369.
379. Martínez-López N, Varela-Rey M, Fernández-Ramos D, Woodhoo A, Vázquez-Chantada M, Embade N, Espinosa-Hevia L, et al. Activation of LKB1-Akt pathway independent of phosphoinositide 3-kinase plays a critical role in the proliferation of hepatocellular carcinoma from nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2010;52:1621-1631.
380. York B, Li F, Lin F, Marcelo KL, Mao J, Dean A, Gonzales N, et al. Pharmacological inhibition of CaMKK2 with the selective antagonist STO-609 regresses NAFLD. *Scientific Reports* 2017;7:11793.
381. Anderson KA, Lin F, Ribar TJ, Stevens RD, Muehlbauer MJ, Newgard CB, Means AR. Deletion of CaMKK2 from the liver lowers blood glucose and improves whole-body glucose tolerance in the mouse. *Mol Endocrinol* 2012;26:281-291.
382. Marcelo KL, Means AR, York B. The Ca(2+)/Calmodulin/CaMKK2 Axis: Nature's Metabolic CaMshaft. *Trends Endocrinol Metab* 2016;27:706-718.
383. Wang P, Jiang Y, Wang Y, Shyy JY, DeFea KA. Beta-arrestin inhibits CAMKKbeta-dependent AMPK activation downstream of protease-activated-receptor-2. *BMC Biochem* 2010;11:36.
384. Neumann D. Is TAK1 a Direct Upstream Kinase of AMPK? *Int J Mol Sci* 2018;19.

385. Inokuchi S, Aoyama T, Miura K, Osterreicher CH, Kodama Y, Miyai K, Akira S, et al. Disruption of TAK1 in hepatocytes causes hepatic injury, inflammation, fibrosis, and carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:844-849.
386. Seki E. TAK1-dependent autophagy: A suppressor of fatty liver disease and hepatic oncogenesis. *Mol Cell Oncol* 2014;1.
387. Inokuchi-Shimizu S, Park EJ, Roh YS, Yang L, Zhang B, Song J, Liang S, et al. TAK1-mediated autophagy and fatty acid oxidation prevent hepatosteatosis and tumorigenesis. *J Clin Invest* 2014;124:3566-3578.
388. Morioka S, Sai K, Omori E, Ikeda Y, Matsumoto K, Ninomiya-Tsuji J. TAK1 regulates hepatic lipid homeostasis through SREBP. *Oncogene* 2016;35:3829-3838.
389. Bates J, Vijayakumar A, Ghoshal S, Marchand B, Yi S, Korniyev D, Zagorska A, et al. Acetyl-CoA carboxylase inhibition disrupts metabolic reprogramming during hepatic stellate cell activation. *Journal of Hepatology* 2020;73:896-905.





ANEXOS





ANEXO 1



Login

Detalle de la Colección C.0002959

Fecha de comunicación 13/11/2013

Responsable de la colección MARCOS MARTÍN, MIGUEL

Dirección profesional COMPLEJO ASISTENCIAL UNIVERSITARIO DE SALAMANCA. PASEO DE SAN VICENTE 58-186
37007 SALAMANCA
SalamancaProyecto de investigación inicial PAPEL DE LA OBESIDAD EN EL DESARROLLO DEL CÁNCER HEPÁTICO. REFERENCIA: SAF2010-19347.
INVESTIGADORA PRINCIPAL: GUADALUPE SABIO BUZO (CENTRO NACIONAL DE INVESTIGACIONES
CARDIOVASCULARES, MADRID). INVESTIGADOR COLABORADOR E INVESTIGADOR RESPONSABLE DEL
COMPLEJO ASISTENCIAL UNIVERSITARIO DE SALAMANCA: MIGUEL MARCOS MARTÍN

Línea de investigación OBESIDAD, INFLAMACIÓN Y COMPLICACIONES ORGÁNICAS ASOCIADAS

Tipo y Origen de las muestras conservadas

Tipo	Origen
SANGRE	SANGRE PERIFÉRICA
HÍGADO	BIOPSIA HEPÁTICA
GRASA	BIOPSIA TEJIDO GRASO

Otros Registros

[Volver](#)

ANEXO 2



Comunicado de inscripción en el Registro Nacional de Biobancos (Sección de Colecciones)

Referencia : C.0002717			
Responsable de la colección			
DNI/NIE o NIF: 42799881D	Apellidos y Nombre: García Monzon Carmelo		Sexo: Hombre
Dirección: Maestro Vives		Número: 2	Municipio: Madrid
C.P.: 28009	Provincia: Madrid	E-mail: cgmonzon@salud.madrid.org	
Finalidades de la colección (Por ejemplo, investigación en cáncer)			
Investigación en enfermedades del hígado			
Tipo y origen de las muestras conservadas			
Tipo (por ejemplo sangre, grasa) biopsias hepáticas suero/plasma/sangre total		Origen anatómico / patología hígado/enfermedad hepática grasa sangre venosa/enfermedad hepática grasa	

Lo que el RESPONSABLE de la COLECCIÓN DE MUESTRAS comunica a efectos de su inscripción en el REGISTRO NACIONAL DE BIOBANCOS, SECCION DE COLECCIONES.

En Madrid a 23 de Junio de 2017

Firma:

ANEXO 3



**ACTA DE RESOLUCIÓN
COMITÉ ÉTICO CIENTÍFICO CIENCIAS DE LA SALUD UC
Re-acreditado por SEREMI de Salud
Resolución Exenta N°012321 del 07 de junio de 2017**

RENOVACIÓN ANUAL

Fecha y N° de Sesión: 03 de septiembre 2020, Sesión N°14

Investigador(a) Responsable: Francisco Barrera M.

ID Protocolo: 14-019

Título del Proyecto: Generación de banco de muestras biológicas para el estudio de las enfermedades hepáticas agudas, crónicas, cirrosis y cáncer hepático

Facultad/Unidad Académica: Facultad de Medicina, Pontificia Universidad Católica de Chile

Académico Responsable: Francisco Barrera M.

Sitio de realización: Hospital Clínico Red Salud UC-Christus

Miembros del Comité que participaron en la aprobación del estudio:

Dra. Claudia Uribe Torres, Presidente
 Dra. Colomba Cofré Dougnac, Vice-Presidente
 Mg. Andrea Villagrán Torres, Secretaria Ejecutiva
 Sr. Jorge Muñoz Castillo, Abogado miembro externo
 Dr. Gustavo Kaltwasser González, Miembro externo
 Srta. Alyssa Garay Navea, Representante de la comunidad
 Dr. Antonio López Fuenzalida, Carrera de Kinesiología
 Prof. Ivonne Vargas Celis, Centro de Bioética
 Dra. Marisa Torres Hidalgo, Departamento de Salud Pública
 EU Mónica Cifuentes Soro, Miembro externo
 EU Víctor Contreras Ibacache, Departamento de Anestesiología

Documentos recibidos por el Comité:

- Carta Presentación Investigador(a) Responsable solicitando la revisión y aprobación de la renovación anual del estudio

Documentos revisados y aprobados por el Comité:

- Formulario Solicitud de Renovación Anual



Considerando que:

1. El presente protocolo de investigación ha contado con la opinión favorable de un comité ético científico (CEC) antes de iniciar su ejecución, de fecha 01 de abril de 2014;
2. El estudio no ha sufrido modificaciones respecto de la última versión aprobada; y
3. El Investigador Responsable ha presentado un informe general del estado de avance del estudio, declarando en éste, que durante el período y de acuerdo al tipo de investigación, no se han presentado desvíos al protocolo ni al proceso de consentimiento informado

Resolución CEC-Salud UC:

Se renueva la opinión favorable del estudio con fecha **03 de septiembre de 2020** en la **sesión ordinaria N°14** del Comité, la que tiene vigencia de un año.

El Investigador Responsable deberá solicitar una nueva renovación de la presente opinión favorable con al menos 45 días de anticipación si desea continuar con el estudio. Si no ha recibido la respuesta oficial a su solicitud, deberá detener las actividades de ejecución de la investigación y no podrá proceder o continuar con el análisis de los datos.

El CECSaludUC solicita al Investigador Responsable presentar una nueva versión del documento de consentimiento informado con información de contacto actualizada del Comité.

(ID: 14-019)

SRA. ANDREA VILLAGRÁN TORRES
Secretaria Ejecutiva CEC-Salud UC



DRA. CLAUDIA URIBE TORRES
Presidente CEC-Salud UC

EN CASO DE CUALQUIER DUDA SE LE SOLICITA CONTACTARSE CON EL CEC-Salud UC

Se certifica que la información contenida en el presente documento es correcta y que refleja el Acta del Comité Ético Científico de Ciencias de la Salud UC (CEC-Salud UC). Este Comité adhiere a los principios éticos de la Pontificia Universidad Católica de Chile, que considera como eje fundamental el respeto a la dignidad de la persona humana en cualquier condición. Este Comité cumple además con las Guías de buena práctica clínica definidas por la Conferencia Internacional de Armonización (GCP-ICH); y con las leyes chilenas 19.628; 20.120; 20.584 y 20.850 que modifica el Código Sanitario



PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
COMITÉ ÉTICO CIENTÍFICO - CEC MED UC



**ACTA DE APROBACIÓN ÉTICA PARA PROYECTOS FONDECYT/CONICYT
A SER REALIZADOS EN PERSONAS**

Nº del Proyecto: 14-244

Fecha de aprobación: 04 de Junio 2015

Investigador Responsable: Dr. Marco Arrese

Título del Proyecto: Liver injury in non-alcoholic fatty liver disease: exploring new modulators and biomarkers

Sitio de realización: Pontificia Universidad Católica

Institución Patrocinador: Pontificia Universidad Católica

Financiamiento: FONDECYT Regular 2014

Documentación recibida:

- Proyecto Fondecyt en referencia.
- Documento de consentimiento informado
- Carta de respaldo del Jefe de Departamento
- Carta de compromiso Investigador Responsable

Propósitos del Estudio:

Explorar nuevas vías de modulación de la injuria hepática e identificar nuevos marcadores de daño hepatocelular en la esteatohepatitis no alcohólica.

Objetivos generales:

1. Evaluar los efectos de la alta y baja ingesta de sodio en la injuria hepática en modelos experimentales de esteatohepatitis no alcohólica.
2. Evaluar el rol de la activación del inflammasoma en la agravación de la esteatohepatitis no alcohólica en síndrome de apnea-hipopnea del sueño.
3. Evaluar los efectos hepatoprotectores de marcadores bioactivos seleccionados presentes en el café, en modelos in vitro de esteatohepatitis no alcohólica.
4. Evaluar la utilidad de los biomarcadores: microRNA 122 y 192 hepato-enriquecidos, solos o en combinación con citoqueratina 18.



PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
COMITÉ ÉTICO CIENTÍFICO - CEC MED LIC

4. Evaluar la utilidad de los biomarcadores: microRNA 122 y 192 hepato-enriquecidos, solos o en combinación con citoqueratina 18.

Procedimientos del Estudio:

Los objetivos 1 y 2 se llevarán a cabo en modelos de ratón. El objetivo 3 en modelo in vitro de células hepáticas. El objetivo 4 se contempla en una cohorte de 70 pacientes que forman parte de un banco de muestras biológicas. Se identifican a través de la muestra confirmatoria de esteatohepatitis no alcohólica. La investigación exige del participante una muestra de sangre, una muestra de orina de 24 horas y la autorización para la revisión de la ficha clínica.

Fundamentos de la Aprobación :

Para otorgar esta aprobación, el Comité en pleno, en su sesión del 04 de Junio 2015, consideró los siguientes aspectos: (Seleccionar lo que corresponda)

- El equipo investigador cuenta con la capacidad técnica y competencia profesional acorde a los requerimientos del estudio.
- Los aspectos científicos de la propuesta son considerados adecuados.
- La propuesta es original y puede aportar al conocimiento.
- Este proyecto no tiene fines terapéuticos y no existe ningún beneficio directo para los participantes a corto plazo.
- La población a estudiar no es considerada como vulnerable.
- El protocolo contempla todos los resguardos necesario para la seguridad y bienestar de los participantes.
- Balance beneficio/riesgo es considerado favorable. El estudio contempla algunos riesgos predecibles que son mencionados en el CI y el protocolo cuenta con los resguardos y compensaciones necesarios para resolverlos.(cuando corresponda)
- No contempla entregar resultados clínicos relevantes, no se realizarán estudios genéticos. Se solicitará autorización adicional para estudios futuros.
- El Documento de Consentimiento Informado señala claramente que existe libertad para consentir y para retirarse; se asegura confidencialidad, que no hay costos asociados, que no hay beneficios directos para los participantes. Se indican los teléfonos de las personas responsables del estudio y de los derechos de los participantes.

En virtud de los antecedentes recibidos, el proyecto en referencia, cumple con la normativa de regulación de los aspectos éticos tanto nacionales como internacionales y con los principios y valores de la Pontificia Universidad Católica de Chile.

Adjunto a ésta Acta de Aprobación Ética, se encuentra el listado de los miembros asistentes a la reunión del Comité en la cual fue aprobado.



PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CHILE
 FACULTAD DE MEDICINA
 COMITÉ ÉTICO CIENTÍFICO - CEC MED UC

Para proceder con la recolección de la información, se le solicita hacer llegar el formato oficial del Acta de Consentimiento Informado, asentimiento y/o instrumentos de recolección de datos para ser firmados y timbrados por el Comité. De esta forma, como investigador responsable, velará por la realización del procedimiento de consentimiento con las copias de la versión original (timbrada y firmada por el CEC MedUC).

Al término del estudio, se le solicita enviar un informe al CEC Med UC con los resultados del estudio.

En toda futura correspondencia, hacer referencia al N° de proyecto asignado por este Comité (14-244).

SRA. CLAUDIA URIBE TORRES
 Presidente (S) CECMedUC
 Pontificia Universidad Católica de Chile

EN CASO DE CUALQUIER DUDA SE LE SOLICITA CONTACTARSE CON EL CEC-MedUC

Se certifica que la información contenida en el presente documento es correcta y que refleja el acta del Comité Ético Científico de la Facultad de Medicina (CECMedUC). Este Comité adhiere a los principios éticos de Facultad de Medicina de la Pontificia Universidad Católica, que considera como norma fundamental el respeto a la dignidad de la persona humana en cualquier condición, desde el momento de la concepción hasta la muerte natural. Este comité cumple además con las guías de buena práctica clínica definidas por la conferencia internacional de armonización (GCP-ICH); y con las leyes chilenas 20.120 y 19.628 sobre protección de la vida privada o protección de datos de carácter personal.

ANEXO 4



Departamento Territorial
Edificio Administrativo de Servizos Múltiples
Vicente Ferrer, 2
15071 – A Coruña



José Manuel Cifuentes
Departamento de Anatomía
Facultade de Veterinaria
Campus Universitario
27002 Lugo

RESOLUCIÓN DE AUTORIZACIÓN DE PROXECTOS DE EXPERIMENTACIÓN ANIMAL

Expediente núm.: 15010/17/007

Data de inicio: 10.05.2018

Persoa interesada: Rubén Nogueiras Pozo

Forma de inicio: solicitude do interesado

Procedemento: resolución de autorización

ANTECEDENTES

A persoa interesada, como representante do centro CIMUS (Universidade de Santiago de Compostela), presentou primeiramente o 28.12.2017 e despois completou o 17.04.2018, unha solicitude para a realización do proxecto de experimentación animal, cuxos datos se detallan a continuación:

Denominación do proxecto: Mecanismos centrais e periféricos no control da homeostase enerxética

Nome do centro usuario: CIMUS

Persoa responsable do proxecto: Rubén Nogueiras Pozo

Establecemento onde se realizarán os procedementos do proxecto (ou lugar xeográfico no caso de traballos de campo): Animalario da Facultade de Medicina do CIMUS

Clasificación do proxecto : Tipo I Tipo II Tipo III

CONSIDERACIÓNS LEGAIS E TÉCNICAS

1. O Real decreto 53/2013, de 1 de febreiro (BOE 34, do 8 de febreiro), polo que se establecen as normas básicas aplicables para a protección dos animais utilizados en experimentación e outros fins científicos, incluíndo a docencia, establece no seu artigo 33 as condicións de autorizacións dos proxectos con animais de experimentación.
2. O artigo 88 da Lei 39/2015, de 1 de outubro, do procedemento administrativo común das administracións públicas (BOE 236, do 2 de outubro de 2015) establece que a resolución que pofa fin o procedemento decidirá todas as cuestións expostas polos interesados e aquelas outras derivadas deste.



3. O Servizo de Gandaría da Coruña revisou a documentación achegada na solicitude e o resultado favorable da avaliación do proxecto, realizada polo órgano habilitado da Sección de Experimentación Animal do Comité de Bioética da Universidade de Santiago de Compostela.

Esta xefatura territorial é competente para ditar unha resolución, de conformidade co artigo 11 do Decreto 245/2009 de 30 de abril, polo que se regulan as delegacións territoriais da Xunta de Galicia (DOG 84, do 1 de maio de 2009) e o Decreto 166/2015, de 13 de novembro, polo que se aproba a estrutura orgánica da Consellería do Medio Rural (DOG 220, do 18 de novembro de 2015).

De acordo con todo o indicado, RESOLVO:

- 1 Autorizar o proxecto solicitado.
- 2 O mencionado proxecto precisa someterse a unha avaliación retrospectiva aos tres anos.
- 3 A autorización deste proxecto terá unha duración de cinco anos, transcorrido este tempo, deberá ser renovada esta autorización.

A citada autorización é unicamente válida nas condicións que figuran no expediente. Ante calquera cambio significativo no proxecto que poida ter efectos negativos sobre o benestar dos animais, deberá solicitar a confirmación da autorización ao Servizo Provincial de Gandaría.

Esta autorización poderá ser suspendida, no caso de que o proxecto non se leve a cabo de acordo coas condicións de autorización e retirada, previo expediente tramitado ao que se lle dará audiencia.

Contra a presente resolución, que non lle pon fin á vía administrativa, poderá interpoñer un recurso de alzada ante a conselleira de Medio Rural. O prazo comezará a contar dende o día seguinte ao da recepción desta resolución. Todo isto, segundo o disposto nos artigos 121 e 122 da citada Lei 39/2015.

Mediante este escrito notifícaselle ao CIMUS da USC esta resolución segundo o esixido no artigo 40.1 da antedita Lei 39/2015.

A Coruña, 10 de maio de 2018
O xefe territorial

ANEXO 5



Ref.: CAP-T-0718-15

D./D.ª MARCOS FERNÁNDEZ FONDEVILA
EDIF. CIMUS - AVDA. DE BARCELONA, S/N,
PISO 0, LAB.4
15706 SANTIAGO DE
COMPOSTELA (CORUÑA)

Notifico a Vd. que el Sr. Director General de Agricultura y Ganadería, ha dictado la siguiente Resolución:

“Vista la solicitud formulada por D./D.ª MARCOS FERNÁNDEZ FONDEVILA, con N.I.F. 45870533T, para obtener el reconocimiento de la capacitación para realizar las funciones de EUTANASIA DE LOS ANIMALES, REALIZACIÓN DE LOS PROCEDIMIENTOS, de animales utilizados, criados o suministrados con fines de experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia.

Visto el informe favorable del Área de Protección Animal.

Considerando que el solicitante cumple con los requisitos para estimar su solicitud, de acuerdo a lo dispuesto en la Orden ECC/566/2015, de 20 de marzo, por la que se establecen los requisitos de capacitación que debe cumplir el personal que maneje animales utilizados, criados o suministrados con fines de experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia.

Esta Dirección General ha resuelto: reconocer la capacitación a D./D.ª MARCOS FERNÁNDEZ FONDEVILA, con N.I.F. 45870533T, para realizar, sin limitación de especie, las funciones de EUTANASIA DE LOS ANIMALES, REALIZACIÓN DE LOS PROCEDIMIENTOS, de animales utilizados, criados o suministrados con fines de experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia, e incluirle en el correspondiente registro.

El mantenimiento de esta capacitación se debe demostrar al menos cada ocho años, en los términos que establece el artículo 20 de la Orden ECC/566/2015, de 20 de marzo, a partir de la fecha de esta Resolución.

La presente Resolución no pone fin a la vía administrativa y contra la misma podrá interponer recurso de Alzada en el plazo de un mes a partir del día siguiente al de la recepción de esta notificación, ante el Viceconsejero de Medio Ambiente, Administración Local y Ordenación del Territorio, o ante el Director General de Agricultura y Ganadería o en cualquiera de las formas previstas en el artículo 38.4 de la Ley 30/1992, de Régimen Jurídico de las Administraciones Públicas y del Procedimiento Administrativo Común de conformidad con lo previsto en los artículos 107, 114 y 115 de dicha Ley.”

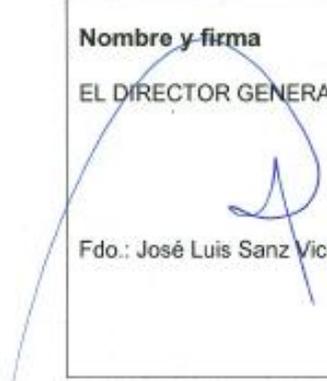
Se adjunta Certificado de Capacitación.

Madrid, 13 de octubre de 2015
ÁREA DE PROTECCIÓN ANIMAL
LA JEFA DE SECCIÓN TÉCNICA I

Fdo.: Sonia García Gómez



Certificado de reconocimiento de la capacitación para manejar animales utilizados, criados o suministrados con fines de experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia. Orden ECC 566/2015, de 20 de marzo

<p>D./D.ª MARCOS FERNÁNDEZ FONDEVILA, con N.I.F. 45870533T, ha obtenido el reconocimiento de la capacitación para realizar, sin limitación de especie, las funciones de:</p> <p>EUTANASIA DE LOS ANIMALES REALIZACIÓN DE LOS PROCEDIMIENTOS</p>	
<p>Nº de certificado: CAP-T-0718-15</p>	
<p>ORGANISMO QUE EXPIDE EL CERTIFICADO Dirección General de Agricultura y Ganadería Consejería de Medio Ambiente, Administración Local y Ordenación del Territorio</p>	
<p>El reconocimiento de la capacitación para la realización de las funciones relacionadas en este certificado surtirá efecto en todo el territorio nacional.</p>	
<p>Fecha</p> <p>13 de octubre de 2015</p>	<p>Sello</p> 
<p>Nombre y firma</p> <p>EL DIRECTOR GENERAL DE AGRICULTURA Y GANADERÍA</p> <p>Fdo.: José Luis Sanz Vicente</p> 	



CONSEJERÍA DE MEDIO AMBIENTE,
ADMINISTRACIÓN LOCAL
Y ORDENACIÓN DEL TERRITORIO

Comunidad de Madrid

RESOLUCIÓN DE RECONOCIMIENTO DE LA CAPACITACIÓN E INCLUSIÓN EN EL REGISTRO DE PERSONAL QUE MANEJA ANIMALES UTILIZADOS, CRIADOS O SUMINISTRADOS CON FINES DE EXPERIMENTACIÓN Y OTROS FINES CIENTÍFICOS, INCLUYENDO LA DOCENCIA (Orden ECC/566/2015, de 20 de marzo)

Vista la solicitud formulada por D./D.ª MARCOS FERNÁNDEZ FONDEVILA, con N.I.F. 45870533T, para obtener el reconocimiento de la capacitación para realizar las funciones de EUTANASIA DE LOS ANIMALES, REALIZACIÓN DE LOS PROCEDIMIENTOS, de animales utilizados, criados o suministrados con fines de experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia.

Visto el informe favorable del Área de Protección Animal.

Considerando que el solicitante cumple con los requisitos para estimar su solicitud, de acuerdo a lo dispuesto en la Orden ECC/566/2015, de 20 de marzo, por la que se establecen los requisitos de capacitación que debe cumplir el personal que maneje animales utilizados, criados o suministrados con fines de experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia.

Esta Dirección General ha resuelto: reconocer la capacitación a D./D.ª MARCOS FERNÁNDEZ FONDEVILA, con N.I.F. 45870533T, para realizar, sin limitación de especie, las funciones de EUTANASIA DE LOS ANIMALES, REALIZACIÓN DE LOS PROCEDIMIENTOS, de animales utilizados, criados o suministrados con fines de experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia, e incluirle en el correspondiente registro.

El mantenimiento de la capacitación se debe demostrar al menos cada ocho años, en los términos que establece el artículo 20 de la Orden ECC/566/2015, de 20 de marzo, a partir de la fecha de esta Resolución.

La presente Resolución no pone fin a la vía administrativa y contra la misma podrá interponer recurso de Alzada en el plazo de un mes a partir del día siguiente al de la recepción de esta notificación, ante el Viceconsejero de Medio Ambiente, Administración Local y Ordenación del Territorio, o ante el Director General de Agricultura y Ganadería, o en cualquiera de las formas previstas en el artículo 38.4 de la Ley 30/1992, de Régimen Jurídico de las Administraciones Públicas y del Procedimiento Administrativo Común de conformidad con lo previsto en los artículos 107, 114 y 115 de dicha Ley.

Madrid, 13 de octubre de 2015

EL DIRECTOR GENERAL DE AGRICULTURA Y GANADERÍA



Fdo.: José Luis Sarz Vicente

