

TESIS DE DOCTORADO

**Papel de p107 en la
regulación del metabolismo
energético**

Juan Cuñarro Gómez

ESCUELA DE DOCTORADO INTERNACIONAL DE LA USC
PROGRAMA DE DOCTORADO EN ENDOCRINOLOGÍA

SANTIAGO DE COMPOSTELA

AÑO 2021



DECLARACIÓN DEL AUTOR DE LA TESIS

Papel de p107 en la regulación del metabolismo energético

D. Juan Cuñarro Gómez

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, mayo de 2021



AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR / TUTOR DE LA TESIS

Papel de p107 en la regulación del metabolismo energético

D. Sulay Tovar Carro
D. Carlos Diéguez González

INFORMA/N:

*Que la presente tesis, corresponde con el trabajo realizado por D/Dña. **Juan Cuñarro Gómez**, 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, mayo de 2021

Sulay Tovar Carro

Carlos Diéguez González



DECLARACIÓN DE CONFLICTO DE INTERÉS

Juan Cuñarro Gómez declara no tener ningún conflicto de interés en relación con la tesis doctoral

En Santiago de Compostela, mayo de 2021





Papel de p107 en la regulación del metabolismo energético

RESUMEN

Desde hace años sabemos que un gran número de supresores tumorales están implicados en otras funciones biológicas como el control del metabolismo energético. p107, miembro de la familia RB, posee un importante papel en el ciclo celular y en la diferenciación celular de adipocitos. Sin embargo, sus acciones y los mecanismos por los cuales actuaría sobre la homeostasis energética son desconocidos. Por ello, nuestro objetivo fue dilucidar los efectos y posibles mecanismos de p107 en la regulación del balance energético y sus acciones en diferentes tejidos involucrados en ello.

Nuestros resultados mostraron que la deficiencia de p107 en ratón (p107KO) daba lugar a un fenotipo delgado y que presentaba una resistencia a la ganancia de peso cuando es expuesto a una dieta alta en grasa (HFD). Esto era consecuencia de un incremento en el gasto energético y averiguamos que estaba asociado a una mayor actividad termogénica del tejido adiposo marrón y a un amarronamiento del tejido adiposo blanco. Además, quisimos ahondar en sus acciones en hígado y descubrimos el importante papel de p107 en la regulación del metabolismo lipídico en hígado de ratón y en hepatocitos humanos. Averiguamos que bajo dietas altas en grasa su deficiencia producía un incremento en la oxidación mitocondrial de lípidos y una inhibición de la lipogénesis *de novo*. Dada la importancia de la enfermedad del hígado graso (MAFLD) y evolución a esteatohepatitis (MASH) realizamos un análisis de factores fibrogénicos en muestras de ratón, células estelares humanas y muestras de pacientes, indicándonos una correlación positiva con los niveles de p107.

En conclusión, en este trabajo describimos por primera vez la clara relación de p107 con la regulación del metabolismo hepático y con el desarrollo de fibrosis hepática. Además de establecer definitivamente a p107 como un importante regulador de la termogénesis del tejido adiposo marrón y del amarronamiento del tejido adiposo blanco. En consecuencia a dichos resultados, p107 podría ser considerado como una posible diana terapéutica para tratar la obesidad y MAFLD.



Rol of p107 in the regulation of energetic metabolism

ABSTRACT

For years we have known that a large number of tumor suppressors are involved in other biological functions such as the control of energy metabolism. p107, a member of the RB family, plays an important role in the cell cycle and in adipocyte cell differentiation. However, its actions and the mechanisms by which it would act on energy homeostasis are unknown. Therefore, our objective was to elucidate the effects and possible mechanisms of p107 in the regulation of energy balance and its actions in different tissues involved in it.

Our results showed that mouse p107 deficiency (p107KO) resulted in a lean phenotype and exhibited resistance to weight gain when exposed to a high-fat diet (HFD). This was the consequence of an increase in energy expenditure and we found that it was associated with a greater thermogenic activity of brown adipose tissue and with a browning of white adipose tissue. Furthermore, we wanted to delve into its actions in the liver and discovered the important role of p107 in the regulation of lipid metabolism in mouse liver and in human hepatocytes. We found that under high-fat diets its deficiency produced an increase in mitochondrial lipid oxidation and an inhibition of *de novo* lipogenesis. Given the importance of fatty liver disease (MAFLD) and evolution to steatohepatitis (MASH), we performed an analysis of fibrogenic factors in mouse samples, human stellar cells and patient samples, indicating a positive correlation with p107 levels.

In conclusion, in this work we describe for the first time the clear relationship of p107 with the regulation of liver metabolism and with the development of liver fibrosis. In addition to definitively establishing p107 as an important regulator of the thermogenesis of brown adipose tissue and browning of white adipose tissue. Consequently, p107 could be considered as a possible therapeutic target for the treatment of obesity or MAFLD.



Papel de p107 na regulación do metabolismo enerxético

RESUMO

Dende fai anos sabemos que un gran número de supresores tumorais están implicados noutras funcións biolóxicas como o control do metabolismo enerxético. p107, membro da familia RB, posúe un importante papel no ciclo celular e na diferenciación celular de adipocitos. Non obstante, as súas accións e os mecanismos mediante os cales actuaría sobre a homeostase enerxética son descoñecidos. Por elo, o noso obxectivo foi dilucidar os efectos e posibles mecanismos de p107 na regulación do balance enerxético e as súas accións en diferentes tecidos involucrados nese proceso.

Os nosos resultados amosaron que a deficiencia de p107 en rato (p107KO) daba lugar a un fenotipo delgado e que presentaba unha resistencia a ganancia de peso cando se expuxo a unha dieta alta en graxa (HFD). Isto era consecuencia dun incremento no gasto enerxético e descubrimos que estaba asociado a unha maior actividade termoxénica do tecido adiposo marrón e a un amarronamento do tecido adiposo branco. Ademais, quixemos afondar nas súas accións no fígado e descubrimos o importante papel de p107 na regulación do metabolismo lipídico en fígado de rato e en hepatocitos humanos. Descubrimos que baixo dietas altas en graxa a súa deficiencia producía un incremento na oxidación mitocondrial de lípidos e unha inhibición da lipoxénese de novo. Dada a importancia da enfermidade de fígado graxo (MAFLD) e a evolución a esteatohepatite (MASH) realizamos unha análise de factores fibroxénicos en mostras de rato, células estelares humanas e mostras de pacientes, indicándonos unha correlación positiva cos niveles de p107.

En conclusión, neste traballo describimos por vez primeira a clara relación de p107 coa regulación do metabolismo hepático e co desenvolvemento de fibrose hepática. Ademais de establecer definitivamente a p107 como un importante regulador da termoxénese do tecido adiposo marrón e do amarronamento do tecido adiposo branco. En consecuencia a ditos resultados, p107 podería ser considerada como unha posible diana terapéutica para o tratamento da obesidade ou de MAFLD.





ÍNDICE



ABREVIATURAS, ACRÓNIMOS Y ANGLICISMOS	21
INTRODUCCIÓN.....	29
1 <i>LA OBESIDAD.....</i>	31
1.1 Definición y prevalencia.....	31
1.2 La homeostasis energética.....	31
1.3 Regulación central de la homeostasis energética.....	32
1.4 Regulación periférica de la homeostasis energética.....	33
1.5 Regulación del gasto energético.....	35
2 <i>EL TEJIDO ADIPOSO BLANCO.....</i>	36
3 <i>EL TEJIDO ADIPOSO MARRÓN.....</i>	38
3.1 Características del tejido adiposo marrón.....	38
3.2 El tejido adiposo beige.....	39
3.3 Regulación de la termogénesis.....	40
4 <i>EL HÍGADO.....</i>	42
4.1 Metabolismo de lípidos en el hígado.....	42
4.2 Metabolismo lipídico extrahepático.....	43
4.3 Lipogénesis <i>de novo</i>	43
4.4 Oxidación de ácidos grasos.....	45
4.5 Metabolismo de la glucosa en el hígado.....	46
4.6 Metabolismo intermediario.....	47
5 <i>ENFERMEDADES HEPÁTICAS ASOCIADAS AL SÍNDROME METABÓLICO.....</i>	48
5.1 NAFLD.....	48
5.2 Patogénesis de NAFLD y NASH.....	49
5.3 Alteraciones metabólicas en la progresión de NAFLD.....	49
6 <i>p107 Y SU FUNCIÓN EN EL METABOLISMO.....</i>	60
6.1 La familia proteica de las <i>Pocket Protein</i>	60
6.2 Funciones de p107.....	62
HIPÓTESIS.....	69
OBJETIVOS.....	73
MATERIAL Y MÉTODOS	77
1 <i>ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.....</i>	79
1.1 Modelos animales.....	79
1.2 Genotipado de los ratones transgénicos.....	79
2 <i>PROCEDIMIENTOS EN ANIMALES.....</i>	81
2.1 Estabulación y seguimiento de peso e ingesta.....	81
2.2 Determinación de la composición corporal.....	82
2.3 Fenotipado metabólico.....	82
2.4 Medida de la temperatura corporal e interescapular.....	83
2.5 Test de tolerancia a la glucosa (GTT) y a la insulina (ITT).....	83
2.6 Índice de resistencia/sensibilidad a insulina (HOMA-IR).....	83
2.7 Inyección intraperitoneal (IP) y sustancias inyectadas.....	83
2.8 Inyección en la vena de la cola.....	84
2.9 Análisis de la incorporación de lípidos postprandiales.....	84
2.10 Eutanasia y recogida de tejidos.....	85

3	<i>CULTIVOS CELULARES</i>	85
3.1	Diferenciación de adipocitos.....	85
3.2	THLE2 (Transformed Human Liver Epithelial-2).....	85
3.3	Tratamientos celulares.....	85
3.4	Estudio del metabolismo lipídico en THLE2.....	87
3.5	Estudio de la respiración celular.....	88
3.6	LX2 (línea celular de células estelares humanas).....	88
4	<i>MUESTRAS HUMANAS</i>	89
5	<i>TÉCNICAS ANALÍTICAS</i>	89
5.1	Análisis histológicos de tejidos.....	89
5.2	Detección de metabolitos en tejido.....	90
5.3	Determinación de metabolitos en plasma.....	91
5.4	Análisis de proteínas por Western Blot.....	91
5.5	Inmunoprecipitación.....	97
5.6	Análisis de ARN mensajero por PCR en tiempo real.....	97
6	<i>ANÁLISIS ESTADÍSTICO</i>	101
6.1	Test paramétricos.....	101
6.2	Test no paramétricos.....	102
6.3	Correlaciones entre variables.....	102
6.4	Modelo de regresión lineal multivariante.....	102
7	<i>DISEÑOS EXPERIMENTALES EN RATONES</i>	103
7.1	Estudio fenotípico de los ratones p107KO.....	103
7.2	Estudio de la inhibición específica de hígado de p107 durante 11 semanas en ratones C57BL6 expuestos a dieta estándar o a HFD.....	103
7.3	Estudio de la inhibición específica de hígado de p107 durante 7 semanas en ratones C57BL6 expuestos a HFD.....	103
7.4	Recuperación de la expresión de p107 en hígado de ratones p107KO.....	104
	104
	RESULTADOS	107
1	<i>ESTUDIO FENOTÍPICO Y MOLECULAR DE RATONES KNOCK OUT (KO) PARA p107</i>	109
1.1	La deficiencia de p107 produce un fenotipo delgado tanto en condiciones de dieta estándar como con dieta alta en grasa.....	109
1.2	Los ratones con deficiencia de p107 mostraron un gasto energético incrementado.....	110
1.3	Los ratones p107KO manifestaron un incremento de la captación postprandial de lípidos en TABE y TAM.....	111
1.4	Los ratones con deficiencia de p107 mostraron una incrementada actividad termogénica y amarronamiento del TAB en condiciones de STD y HFD.....	112
1.5	Los ratones p107KO son capaces de mantener estable la temperatura corporal en condiciones de exposición a frío.....	116
1.6	Ratones deficientes en p107 mostraron una mejora en el metabolismo de la glucosa y en la sensibilidad a la insulina.....	117
1.7	La deficiencia de p107 previene la esteatosis hepática inducida por HFD.....	119
2	<i>ESTUDIO DEL PAPEL DE p107 EN LA REGULACIÓN DEL METABOLISMO HEPÁTICO EN RATONES</i>	121
2.1	Los ratones p107KO mostraron una inhibición de la lipógenes <i>de novo</i> así como un aumento en la oxidación mitocondrial de AGs en el hígado.....	121
2.2	Las hembras p107KO mostraron los mismos efectos fenotípicos y moleculares a nivel hepático que los ratones macho.....	122
2.3	La inhibición específica de p107 en el hígado protege frente al desarrollo de esteatosis inducida por HFD.....	123
2.4	La inhibición hepática de p107 actúa en primer lugar descendiendo la acumulación de grasa, disminuyendo la expresión de FAS e incrementando la de PGC1 β en el hígado.....	125

2.5	En condiciones de STD la inhibición hígado específica de p107 solamente produce un incremento de PGC1 β y CPT1 α	127
2.6	La recuperación de la expresión de p107 en el hígado de los ratones p107KO revierte los efectos en la acumulación de grasa hepática y la inhibición de FAS	128
3	<i>EFFECTOS DE LA MANIPULACIÓN GENÉTICA DE p107 EN HEPATOCITOS HUMANOS</i>	129
3.1	La inhibición de p107 disminuye la cantidad de lípidos debido a la inhibición de la lipogénesis <i>de novo</i> y al incremento en la oxidación de lípidos.	129
3.2	La inhibición de p107 produce resistencia a la acumulación de lípidos inducida por exposición a ácido oleico debido a un incremento en la oxidación lipídica	131
3.3	La sobreexpresión de p107 produce un incremento en la acumulación de lípidos derivado de un incremento de FAS y una menor actividad mitocondrial	132
3.4	El incremento en la acumulación de grasa en los hepatocitos con la inhibición de p107 es dependiente del incremento de FAS	133
4	<i>ESTUDIO DEL PAPEL DE p107 EN LA PROGRESIÓN DE NAFLD</i>	134
4.1	p107 se encuentra incrementado en modelos de roedores de NAFLD inducida por la dieta	134
4.2	La expresión de p107 se correlaciona positivamente con varios marcadores de fibrosis	135
4.3	Los ratones con el silenciamiento hepático de p107 mostraron una disminución en la expresión de TGF β	137
4.4	La activación con TGF β de una línea celular de células estelares humanas (LX2) provocó un incremento de p107	137
5	<i>ESTUDIO DE LOS NIVELES DE p107 EN MUESTRAS HUMANAS</i>	138
	DISCUSIÓN	141
	CONCLUSIONES	149
	BIBLIOGRAFÍA	153
	ANEXOS	185
	AGRADECIMIENTOS	199





ABREVIATURAS, ACRÓNIMOS Y ANGLICISMOS



ACC: acetil-CoA carboxilasa (*acetyl-CoA carboxilase*)
 ACLY: ATP-citrato liasa (*ATP citrate lyase*)
 ADN: ácido desoxirribonucleico
 ADNc: ácido desoxirribonucleico complementario
 AG: ácido graso
 AgRP: péptido relacionado con agutí (*agouti-related peptide*)
 ALT: alanina aminotransferasa
 AMPc: monofosfato de adenosina cíclico (*cyclic adenosin monophosphate*)
 AMPK: quinasa activada por adenosina monofosfato (*adenosine monophosphate-activated kinase*)
 ARC: núcleo arcuato (*arcuate nucleus*)
 ARNm: ácido ribonucleico mensajero
 ARNsh: ácido ribonucleico de horquilla corta (*short hairpin*)
 ARNsi: ácido ribonucleico pequeño interferente (*ARN small interfering*)
 AST: aspartato aminotransferasa
 ATF2: factor de transcripción activador 2 (*activating transcription factor 2*)
 ATF6: FT activante 6 (*activating transcription factor 6*)
 ATP: trifosfato de adenosina (*adenosine triphosphate*)
 BHE: barrera hematoencefálica
 BMP8b: proteína morfogénica ósea 8b (*bone morphogenetic protein 8b*)
 BPE: extracto pituitario bovino (*Bovine pituitary extract*)
 C/EBP: proteína de unión al potenciador CCAT (*CCAAT/enhancer-binding protein*)
 CART: péptido relacionado con cocaína y anfetamina (*cocaine- and amphetamine-regulated transcript*)
 CCL2: ligando quimioquina 2 (*chemokine ligand 2*)
 CD36: grupo de diferenciación 36 (*cluster of differentiation 36*)
 CDHFD dieta alta en grasa y deficiente en colina (*choline-deficient high fat diet*)
 CDK: quinasas dependientes de ciclinas (*cyclin-dependent kinase*)
 CHOP: proteína homóloga de C/EBP (*C/EBP homologous protein*)
 ChoRE: elemento de respuesta a carbohidratos (*carbohydrate response element*)
 ChREBP: proteína de unión en respuesta a carbohidratos (*carbohydrate-responsive element-binding protein*)
 CK: citoquina (*cytokine*)
 CPT1 α : carnitina palmitoiltransferasa 1 α
 CPT2: carnitina palmitoiltransferasa 2
 CRE: elementos de respuesta ATF/cAMP (*cAMP-response element*)
 CREB: elemento de unión en respuesta a cAMP (*cAMP response element-binding*)
 DAG: diacilglicerol
 DAMPs: patrones moleculares asociados a daño (*damage-associated molecular patterns*)
 DEPC: dietilpirocarbonato
 DM2: diabetes mellitus tipo 2
 DMH núcleo dorsomedial hipotalámico (*dorsomedial hypothalamic nucleus*)
 ECAR: tasa de acidificación del medio (*extracellular acidification rate*)
 EDTA: ácido etilendiaminotetraacético (*ethylene-diamine-tetraacetic acid*)

EGF: factor de crecimiento epidérmico (*epidermal growth factor*)
eIF2 α : subunidad α del factor de iniciación de la traslocación (*α -subunit of the translocation initiation factor*)
EMEM: medio de cultivo Eagle mínimo esencial (*Eagle's minimum essential medium*)
ERAD: componentes de degradación asociados al RE (*ER-associated degradatios*)
ERSE: elementos de respuesta a estrés del RE
FABP: proteínas de unión a AG (*Fatty acids binding proteins*)
FAS: ácido graso sintetasa (*fatty acid synthase*)
FATP: proteínas transportadoras de AG (*Fatty acids transport proteins*)
FBS: suero bovino fetal (*Fetal bovine serum*)
FGF21: factor de crecimiento de fibroblastos 21 (*fibroblast growth factor 21*)
FoxO1: *Forkhead box O1*
FT: factor de transcripción
G6P: glucosa-6-fosfato
Gab-1: proteína 1 de unión asociada a GRB2 (*GRB2-associated-binding protein 1*)
GCK: glucoquinasa
GHS-R1: receptor 1 del secretagogos de la hormona de crecimiento (*growth hormone secretagogue receptor type 1*)
GIP: polipéptido inhibitor gástrico (*gastric inhibitory polypeptide*)
GLP-1: péptido 1 similar al glucagón (*glucagón-like peptide 1*)
GLUT2: transportador de glucosa tipo 2 (*glucose transporter type 2*)
GPR78 o BiP: proteína regulada por glucosa 78 (*glucose-regulated protein 78*)
GRP: péptido liberador gástrico (*gastrin-releasing peptide*)
GTT: test de tolerancia a glucosa (*glucose tolerance test*)
HAT: histona acetiltransferasa
HCC: hepatocarcinoma (*hepatocellular carcinoma*)
HDL: lipoproteínas de alta densidad (*high density lipoprotein*)
hEGF: factor de crecimiento epitelial humano (*human epitelial growth factor*)
HFD: dieta alta en grasa (*high fat diet*)
HNF: factor nuclear hepáticos (*hepatic nuclear factor*)
HSC: células estelares hepáticas (*hepatic stellate cell*)
HSL: lipasa sensible a hormonas (*hormone-sensitive lipase*)
IBMX: isobutilmetilxantina
ICV: intracerebroventricular
IFN- γ : interferón γ
IGF1: factor de crecimiento insulínico tipo 1 (*insulin-like growth factor 1*)
IL: interleuquina
IMC: índice de masa corporal
IP: intraperitoneal
IRE1: enzima dependiente de inositol 1 (*inositol-requiring enzyme-1*)
IRS: sustrato del receptor de insulina (*insulin receptor substrate*)
ITT: test de tolerancia a insulina (*insulin tolerance test*)
JAK-STAT: *Janus kinase-signal transducers and activators of transcription*
JAK: quinasa janus (*janus kinase*)
JNK: quinasa C-Jun N-terminal (*C-Jun N-terminal kinase*)

KC: célula de Kupffer (*Kupffer cell*)
 KO: *knock out*
 LDH: lactato deshidrogenasa
 LDL: lipoproteínas de baja densidad (*low density lipoprotein*)
 LDN: lipogénesis *de novo*
 LHA: área hipotalámica lateral (*lateral hypothalamic area*)
 LPC: lisofosfatidilcolina (*lysophosphatidylcholine*)
 LPL: lipoproteína lipasa
 LPS: lipopolisacáridos
 LXR: receptor hepático X (*liver X receptor*)
 MAFLD: enfermedad de hígado graso asociada al metabolismo (*metabolic-associated fatty liver disease*)
 MAPK: quinasa activada por mitógenos (*mitogen-activated protein kinase*)
 MASH: esteatohepatitis asociada al metabolismo (*metabolic-associated steatohepatitis*)
 MCD: dieta deficiente en colina y metionina (*methionine choline-deficient diet*)
 ME1: enzima málico
 MEC: matriz extracelular
 MEF: fibroblastos embrionarios de ratón (*mouse embryonic fibroblast*)
 MTTP: proteína microsomal de transferencia de TG (*microsomal triglyceride transfer protein*)
 NADH: dinucleótido de nicotinamida y adenina (*Nicotinamide adenine dinucleotide*)
 FADH: dinucleótido de flavina y adenina (*flavin adenine dinucleotide*)
 NAFL: hígado graso no alcohólico (*non-alcoholic fatty liver*)
 NAFLD: enfermedad de hígado graso no alcohólico (*Non-alcoholic fatty liver disease*)
 NASH: esteatohepatitis no alcohólica (*non-alcoholic steatohepatitis*)
 NFκβ: factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células β activadas (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated β cells*)
 NLR: receptores tipo Nod (*Nod-like receptor*)
 NPY: neuropéptido Y
 O N-acetil-β-D-glucosamina-glicosilación (*O-linked β-N-acetylglucosaminylation, O-GlcNAcylation*)
 OCR: tasa de consumo de oxígeno (*oxygen consumption rate*)
 OMS: organización mundial de la salud
 OXPHOS: complejos de la cadena de transporte electrónico mitocondrial
 PBS: solución salina tamponada con fosfato (*phosphate buffered saline*)
 PCR: reacción en cadena de la polimerasa (*polymerase chain reaction*)
 PDGF: factor de crecimiento derivado de plaquetas (*platelet-derived growth factor*)
 PDH: piruvato deshidrogenasa (*piruvate deshidrogenase*)
 PDK: piruvato deshidrogenasa quinasa (*piruvate deshidrogenase kinase*)
 PEPCK: fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (*phosphoenolpyruvate carboxykinase*)
 PERK: quinasa del FT pancreático del retículo endoplasmático iniciador de la traducción eucariota (*RNA-dependent protein kinase-like ER eukaryotic initiation factor-2α kinase*)
 PGC1: coactivador de PPARγ 1 (*PPAR γ coactivator 1*)
 PI3K: fosfoinositol 3 quinasa (*phosphoinositide 3-kinase*)
 PK: piruvato quinasa (*pyruvate kinase*)

PKA: proteína quinasa A (*protein kinase A*)
PKB o AKT: proteína kinasa B (*protein kinase B*)
POMC: proopiomelanocortina
PP: *Pocket protein*
PP2A: proteína fosfatasa tipo 2 (*protein phosphatase 2A*)
PPAR: receptor activado del proliferador del peroxisoma (*peroxisome proliferator-activated receptor*)
Prdm16 : dominio Pr 16 (*Pr domain 16*)
PRR: receptores de reconocimiento de patrones (*pattern-recognition receptors*)
PVH: núcleo paraventricular hipotalámico
PYY: péptido YY
Rb: gen del retinoblastoma
RBL1: gen de p107 (*RB-like 1*)
RE: retículo endoplasmático
RI: resistencia a la insulina
ROS: especies reactivas de oxígeno (*reactive oxygen species*)
rpm: revoluciones por minuto
RQ: cociente respiratorio (*respiratory quotient*)
RT-PCR: PCR a tiempo real
RXR: receptor retinoide X (*retinoid X receptor*)
SCD1: estearoil-CoA desaturasa 1 (*stearoyl-CoA desaturase 1*)
SDS: dodecil-sulfato sódico (*Sodium DodecylSulfate*)
SEM: error estándar de la media (*standard error of the mean*)
SIRT1: sirtuina 1
SNC: sistema nervioso central
SNS: sistema nervioso simpático
SREBP1c: proteína de unión reguladora de esteroles tipo 1-c (*sterol regulatory element-binding protein 1c*)
STD: dieta estándar (*Standard Diet*)
TAB: tejido adiposo blanco
TABep: TAB epididimal
TABsc: TAB subcutáneo
TAE: Tris-acetato-EDTA
TAM: tejido adiposo marrón
TCA: ciclo del ácido tricarbóxico (*tricarboxylic acid cycle*)
TG: triglicéridos
TGF- β : factor de crecimiento transformante β (*transforming growth factor β*)
TLE3: transducina 3 (*Transducin-like enhancer 3*)
TLR: receptores tipo Toll (*Toll-like receptor*)
TNF- α : factor α de necrosis tumoral (*tumor necrosis factor α*)
TNFR1: receptor 1 del TNF (*TNF receptor 1*)
TRAIL: ligando inductor de apoptosis relacionados con el factor de necrosis tumoral (*TNF-related apoptosis-inducing ligand*)
TVI: vena lateral del ratón (*tail vein injection*)
UCP1: proteína desacopladora 1 (*uncoupling protein 1*)

ABREVIATURAS, ACRÓNIMOS Y ANGLICISMOS

UPR: respuesta a proteínas mal plegadas (*unfolded protein response*)

USF1: factor estimulante *upstream* 1 (*upstream stimulatory factor 1*)

VLDL: lipoproteínas de muy baja densidad (*very low density lipoprotein*)

VMH: núcleo ventromedial hipotalámico (*ventromedial hypothalamic nucleus*)

WT: controles de tipo salvaje (*wild type*)

XBP1: proteína 1 de unión a *X-box* (*X-box binding protein 1*)







INTRODUCCIÓN



1 LA OBESIDAD

1.1 DEFINICIÓN Y PREVALENCIA

La obesidad se ha convertido en una de las principales causas de mortalidad y discapacidad, de hecho, la Organización Mundial de la Salud (OMS) la ha identificado como el mayor problema de salud crónico en los adultos, aportando datos abrumadores, padeciendo sobrepeso en el año 2016 el 39% de las personas adultas (mayores de 18 años), y obesidad el 13%¹.

La OMS clasifica el sobrepeso y la obesidad en adultos en base al índice de masa corporal (IMC) que se define como el peso en kilogramos dividido por el cuadrado de la altura en metros (Kg/m^2). Se considera sobrepeso un IMC igual o superior a 25 y la obesidad como un IMC igual o superior a 30¹. Un método métrico sencillo para identificar gordura corporal.

La obesidad es una enfermedad multifactorial resultante de un balance energético positivo crónico. Este excedente energético es transformado en triglicéridos (TG) y es almacenado en los depósitos de tejido adiposo que expandirán su tamaño y en consecuencia se producirá la ganancia de peso corporal por exceso de masa adiposa.

Este incremento en la incidencia de la obesidad se atribuye principalmente a los cambios en el estilo de vida y a la globalización del sistema alimentario que han aparecido en las últimas décadas. El descenso en la actividad física y la ingesta crónica de un exceso de energía, derivan en una situación para la que el organismo no se encuentra preparado fisiológicamente. A lo largo de la evolución los mamíferos han desarrollado sistemas de ahorro y almacenamiento de energía para garantizar su supervivencia en periodos en el que el acceso a comida era intermitente, pero no han tenido tiempo para adaptarse a la nueva situación de constante abundancia.

Numerosos estudios demuestran que su prevalencia ha incrementado enormemente en las últimas décadas en población de todos los rangos de edad, sexos, etnias, regiones geográficas y estatus socioeconómico. En países con bajos ingresos, la obesidad es más prevalente entre adultos de mediana edad residentes en entornos urbanos y ricos (especialmente mujeres); mientras que, en países con elevados ingresos, afecta a ambos sexos y edades, pero su prevalencia es desproporcionalmente mayor entre grupos desfavorecidos de la población².

Sabemos que la obesidad trae consigo un enorme número de comorbilidades. Los pacientes con obesidad poseen mayor riesgo de padecer dislipemias, diabetes mellitus tipo 2 (DM2), hipertensión, esteatosis hepática, enfermedades cardiovasculares, problemas respiratorios, apnea del sueño, artritis e incluso varios tipos de cánceres^{3, 4}. Además, recientemente la obesidad ha sido considerada como un importante factor de riesgo de susceptibilidad y severidad de la pandemia emergente de la COVID-19^{5, 6}.

1.2 LA HOMEOSTASIS ENERGÉTICA

La primera ley de la termodinámica establece que la energía de cualquier sistema cerrado ni se crea ni se destruye, sino que se transforma. La variación de la energía interna de un

sistema adiabático (sin intercambio de calor con otros sistemas o el entorno) viene determinado por la suma del calor y del trabajo. Un organismo vivo puede considerarse un sistema adiabático, puesto que incorpora nutrientes y transforma la energía química (por oxidación de los combustibles) en otros elementos químicos mediante procesos anabólicos, o en energía mediante procesos catabólicos. Por ello la variación de las reservas energéticas en un organismo viene determinada por la diferencia entre la energía ingerida y el gasto energético:

Variación de las reservas energéticas = Energía ingerida – Gasto energético

Así pues, desde el punto de vista termodinámico, la obesidad y la delgadez son el resultado de una alteración en el balance entre la ingesta y el gasto energético. La obesidad se produce cuando existe un balance energético positivo como resultado de un desequilibrio crónico, siendo el número de calorías ingeridas superior al número de calorías consumidas. Por otro lado, la delgadez se daría en el caso opuesto. Pero esto no es ni mucho menos lo que ocurre normalmente, ya que como se verá posteriormente existen mecanismos de control exhaustivos, que mantienen la homeostasis energética entre unos umbrales idóneos⁷.

El gasto energético está constituido por el metabolismo basal, la actividad física y la termogénesis adaptativa, mientras que la energía absorbida se debe exclusivamente a la ingesta calórica (Imagen 1). A pesar de la aparente sencillez del sistema, el equilibrio energético se ve influenciado por múltiples factores, tanto endógenos (hormonales y genéticos) como exógenos (factores culturales, nutricionales, ambientales y psicológicos)⁸.



Imagen 1. Balance energético (Elaboración propia).

1.3 REGULACIÓN CENTRAL DE LA HOMEOSTASIS ENERGÉTICA

Desde los años 90 del siglo pasado sabemos que un aumento de la ingesta asociada a un aumento de peso corporal se asocia, a su vez, a un aumento en el gasto energético. Del mismo modo, la restricción alimentaria, con la consecuente pérdida de peso se ve compensada con una reducción en el gasto energético⁹. Estos datos evidencian la existencia de un sistema regulador de la homeostasis energética muy sensible, que mantiene el peso corporal entre unos umbrales específicos.

El principal centro regulador de la homeostasis energética es el cerebro y en él la región más importante para dicha regulación es el hipotálamo, que actúa como coordinador en la regulación del metabolismo energético, recibiendo señales centrales y periféricas, procesándolas y generando respuestas adecuadas dependiendo del estado energético del organismo.

Los núcleos hipotalámicos de mayor importancia en la regulación de la ingesta y el gasto energético son el núcleo arcuato (*arcuate nucleus*, ARC), el núcleo ventromedial (*ventromedial hypothalamic nucleus*, VMH), el núcleo dorsomedial (*dorsomedial*

hypothalamic nucleus, DMH), el núcleo paraventricular (*paraventricular nucleus*, PVH) y el área hipotalámica lateral (*lateral hypothalamic area*, LHA)¹⁰.

1.4 REGULACIÓN PERIFÉRICA DE LA HOMEOSTASIS ENERGÉTICA

Existe una gran cantidad de señales con la función de informar al sistema nervioso central (SNC) sobre el estado y las necesidades energéticas del organismo. El control de la ingesta se produce por dos tipos de señales diferentes. Las señales a corto plazo, que controlan la cantidad de alimento ingerido, el número y duración de las comidas y que se ven influidas por señales fisiológicas, patrones conductuales-culturales o por el estrés ambiental. Por otro lado, también existen las señales a largo plazo, que hacen posible la existencia de los depósitos de energía del organismo. En general, la acción de los mecanismos de control a largo plazo minimiza el efecto de los factores a corto plazo¹¹.

1.4.1 Señales a corto plazo

Estas señales están íntimamente ligadas a las tres fases en las que se suele diferenciar la ingesta de alimento: (1) fase preprandial (previa al acto de comer), (2) prandial (durante el acto de comer) y (3) postprandial (posterior a la comida). El objetivo de estas fases es la búsqueda de un estado de saciedad. El tracto gastrointestinal juega un papel crucial en la regulación de la ingesta de alimentos, informando al SNC sobre la cantidad de alimento ingerido y la composición nutricional del mismo. La información generada durante el curso de una comida converge fundamentalmente en el núcleo del tracto solitario. Así, la señal de saciedad es transmitida al tallo cerebral por medio del nervio vago o fibras aferentes, que pasan a la médula espinal a partir del tracto gastrointestinal superior.

En las últimas décadas el conocimiento sobre el eje intestino-cerebro ha aumentado considerablemente, identificándose numerosas hormonas peptídicas procedentes del tracto gastrointestinal y con un importante papel en el control de la ingesta. Entre ellas destacan grelina, péptido YY (PYY), polipéptido pancreático, péptido 1 similar al glucagón (*glucagón-like peptide 1*, GLP-1), uroguanilina, oxintomodulina, colecistoquinina, bombesina, amilina, polipéptido inhibidor gástrico (*gastric inhibitory polypeptide*, GIP), enterostatina, péptido liberador gástrico (*gastrin-releasing peptide*, GRP) o glucagón, entre otras¹²⁻¹⁵ (Imagen 2).

Grelina

Grelina es un péptido acilado de 28 aminoácidos, descubierto por Kojima y colaboradores a partir de extractos gástricos que fue identificado como ligando endógeno para el receptor de secretagogos de la hormona de crecimiento (*growth hormone secretagogue receptor type 1*, GHS-R1)¹⁶. Es un péptido producido y secretado fundamentalmente en el estómago y cuyos niveles aumentan antes de la ingesta, disminuyendo en la fase

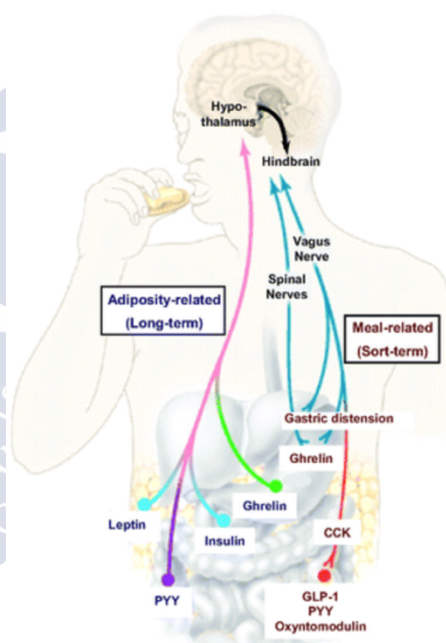


Imagen 2. Señales periféricas que actúan sobre el SNC. Tanto señales a corto plazo, relacionadas directamente con el propio acto de comer (*meal-related*), como señales a largo plazo, que informan sobre las reservas energéticas del tejido adiposo (*adiposity-related*), contribuyen al mantenimiento de la homeostasis energética (licencia número: 5042391320955)¹².

postprandial en proporción de las calorías ingeridas. Su expresión y secreción varía en función del estado nutricional, viéndose aumentada en condiciones de ayuno, pérdida de peso y en hipoglucemia producida por insulina^{16,17}. La administración central o periférica de grelina estimula la ingesta y la adiposidad¹⁸, por lo que es considerada moduladora de la homeostasis energética.

Una vez liberada, grelina es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica (BHE) y unirse a su receptor hipotalámico GHRS-1A. Este receptor es expresado de forma predominante en neuronas del péptido relacionado con agutí (*agouti-related peptide*, AgRP)/neuropéptido Y (NPY) del ARC y en neuronas del VMH, posteriormente activa una ruta en la que participan la sirtuina 1 (SIRT1), la quinasa activada por adenosina monofosfato (*adenosine monophosphate-activated kinase*, AMPK) y p53 y los ácidos grasos que induce la sobreexpresión de AgRP y NPY, los cuales median el efecto de grelina sobre el metabolismo lipídico^{19,20}. A nivel periférico el efecto adipogénico sobre el tejido adiposo blanco (TAB) es independiente de su efecto orexigénico, siendo transmitida esta señal a través del sistema nervioso simpático (SNS)²¹.

1.4.2 Señales a largo plazo

A mediados del siglo XX, Gordon Kennedy propuso la existencia de un modelo homeostático de regulación del balance energético a largo plazo. Planteó la existencia de señales circulantes que se relacionan directamente con las concentraciones de metabolitos en sangre y la reserva energética en el tejido adiposo²². Estas señales dan lugar a mensajes que informan al cerebro sobre la masa grasa corporal total, interactúan con los circuitos neuronales catabólicos y anabólicos, provocando un cambio en la sensibilidad del cerebro a las señales de saciedad. En este grupo se incluyen principalmente la insulina, producida en el páncreas; la leptina, adiponectina y resistina, entre otras, que son liberadas por el TAB¹².

Insulina

La insulina es una hormona polipeptídica de 51 aminoácidos descubierta por Banting y colaboradores en 1921²³, es secretada por las células β de los islotes de Langerhans pancreáticos en respuesta a elevadas concentraciones de glucosa en sangre.

La insulina es considerada una señal orexigénica, ya que la administración intracerebroventricular (ICV) de dicha hormona, causa una disminución de la ingesta y del peso corporal²⁴. Esta acción es mediada por receptores de insulina distribuidos en diferentes núcleos hipotalámicos involucrados en la regulación de la ingesta, siendo especialmente abundantes en neuronas de proopiomelanocortina (POMC)/péptido relacionado con cocaína y anfetamina (*cocaine- and amphetamine- regulated transcript*, CART) y NPY/AgRP del ARC²⁵.

Actúa mediante el receptor de insulina tirosin-quinasa, su activación provoca su autofosforilación incrementando la actividad quinasa y catalizando la fosforilación de tirosinas de proteínas adaptadoras, como el sustrato del receptor de insulina (*insulin receptor substrate*, IRS), isoformas de proteínas adaptadoras como Shc, JAK (*janus kinase*) y la proteína 1 de unión asociada a GRB2 (*GRB2-associated-binding protein 1*, Gab-1), y principalmente activando la vía fosfoinositol 3 quinasa (*phosphoinositide 3-kinase*, PI3K)/proteína quinasa B (*protein kinase B*, PKB o AKT) para generar respuestas que permiten reducir los niveles de glucosa circulantes.

La insulina es la hormona de mayor potencial anabólico, ya que favorece la síntesis y almacenamiento de carbohidratos, lípidos y proteínas. Además, inhibe la degradación y liberación de ácidos grasos (AG) y glucosa al torrente sanguíneo, favoreciendo, por lo

tanto, el almacenamiento energético en tejidos periféricos como músculo esquelético, grasa e hígado²⁶.

Leptina

Los efectos de la leptina fueron observados por primera vez gracias al estudio de ratones mutantes para el gen de la leptina (*ob/ob*) que surgieron al azar dentro de una colonia de los laboratorios Jackson²⁷. Posteriormente estudios de parabiosis, en animales *ob/ob* y *db/db* (gen del receptor de leptina) realizados por Hervey²⁸ y principalmente por Coleman^{29, 30} pusieron de manifiesto la existencia de un factor circulante capaz de transmitir la información de las reservas energéticas de la periférica al cerebro. Sin embargo, no fue hasta 1994 cuando se clonó e identificó el producto del gen *ob* que se denominó leptina. Los ratones *ob/ob* y *db/db* tienen idénticos fenotipos, pesan tres veces más que los ratones normales, muestran hasta cinco veces más cantidad de grasa, son hiperfágicos, apenas tienen actividad locomotora y son sexualmente inactivos debido a su hipogonadismo³¹.

Gracias a todo esto hoy sabemos que la leptina es una hormona peptídica de 16 kDa que es secretada al torrente sanguíneo principalmente por el tejido adiposo en proporción a la cantidad de masa grasa. Su principal función es controlar la ingesta y el gasto energético, ejerciendo acciones tanto a nivel central como periférico. A nivel central la leptina debe atravesar la BHE mediante un mecanismo saturable y dependiente de receptor³². Una vez en el hipotálamo actúa de manera directa sobre la expresión de neuropéptidos anorexigénicos y orexigénicos¹³.

De especial interés, son estudios que han demostrado que la leptina actúa directamente sobre las neuronas POMC hipotalámicas regulando la homeostasis glucídica y la sensibilidad hepática a la insulina, independientemente de sus efectos sobre el peso corporal³³.

A nivel periférico la leptina promueve el gasto energético, aumenta la β -oxidación y reduce la esterificación de AGs en células pancreáticas, adipocitos y hepatocitos³⁴. Todas sus funciones son mediadas por su receptor y la principal vía de señalización acoplada a dicho receptor es la vía JAK-STAT (*Janus kinase-signal transducers and activators of transcription*)³⁵.

1.5 REGULACIÓN DEL GASTO ENERGÉTICO

Hasta ahora nos hemos centrado en uno de los componentes de la ecuación del balance energético. El otro factor que modula dicho balance es el gasto energético. Aunque en los apartados en los que se ha hablado sobre la regulación central y periférica de la ingesta ya se ha hecho una ligera mención a la modulación que sufre el gasto energético, ahora se hará un estudio más profundo de sus diferentes componentes: (1) Termogénesis adaptativa o metabolismo basal, (2) termogénesis asociada a la actividad física y (3) termogénesis facultativa.

1.5.1 Termogénesis obligatoria o metabolismo basal

Constituye entorno al 60-70% del gasto energético diario. Se trata de la energía consumida por un individuo en reposo, en ayunas y en condiciones de termoneutralidad; está asociada a reacciones metabólicas esenciales (metabolismo, respiración celular, mantenimiento de la temperatura corporal, bombeo de iones, etc.). El metabolismo basal se correlaciona con la cantidad de masa magra de un individuo, por ello es similar en sujetos delgados y obesos, aunque si el metabolismo basal es bajo podría influir en la tendencia a ganar peso^{36, 37}.

Dentro de la termogénesis obligatoria se incluye el efecto térmico de la comida (termogénesis acoplada a la digestión, absorción, distribución y almacenamiento de los nutrientes), este efecto térmico es mayor con la ingesta de hidratos de carbono y proteínas, y se encuentra disminuido en condiciones de resistencia a insulina y obesidad³⁸.

1.5.2 Termogénesis asociada a la actividad física

El gasto energético asociado a la actividad física es el derivado de la realización de cualquier actividad física que implique movimiento corporal. Este componente implica entre un 20 y un 40 % del gasto energético total³⁹. Constituye el factor con mayor variabilidad y además la actividad física aumenta el metabolismo basal y la oxidación de grasas. Este apartado del gasto energético se puede subdividir en gasto por ejercicio voluntario y gasto por actividad física involuntaria (contracción espontánea muscular, mantenimiento de la postura o movimientos involuntarios)⁴⁰.

1.5.3 Termogénesis facultativa

Se trata del calor producido cuando tiritamos y el que se produce en el tejido adiposo marrón (TAM) como respuesta a la exposición al frío o a una dieta hipercalórica y se encuentra regulado fundamentalmente por el SNS. En 1953, Barlow y Sellers observaron que los animales sometidos a frío inicialmente tiritaban con el fin de mantener la temperatura corporal, pero con el tiempo dejaban de tiritar a pesar de que su metabolismo seguía elevado⁴¹. A este metabolismo se le llamó termogénesis no temblorosa y tiene lugar principalmente en las mitocondrias de las células del TAM, donde se produce el desacoplamiento de la cadena transportadora de electrones, evitando así la síntesis de trifosfato de adenosina (*adenosine triphosphate*, ATP) y consecuentemente disipando la energía en forma de calor. Más adelante se profundizará en los aspectos más relevantes de este proceso, así como en los tejidos donde se lleva a cabo.

2 EL TEJIDO ADIPOSO BLANCO

Los mamíferos se alimentan de forma intermitente, pero consumen energía constantemente, por lo que es necesario algún tipo de reserva temporal de compuestos energéticos. Los lípidos son los más adecuados para esta misión, ya que, por su hidrofobicidad, presentan un peso húmedo y un volumen por caloría de energía almacenada menor, en comparación con los hidratos de carbono y las proteínas. Estos lípidos se encuentran almacenados en su mayoría en el tejido adiposo blanco en forma de TG.

No obstante, el almacenamiento energético no es la única función del tejido adiposo, como ya se ha mencionado posee un importante papel como órgano endócrino, estando implicado en el metabolismo de hormonas esteroideas y en la producción y secreción de diversas sustancias denominadas genéricamente adipocitoquinas, entre las que se incluyen varias citoquinas, hormonas y factores de crecimiento. De este modo, el tejido adiposo es capaz de responder a diferentes estímulos metabólicos encargándose de regular la homeostasis energética, la sensibilidad a insulina, el metabolismo de carbohidratos y lípidos, el crecimiento celular o la inflamación entre otros procesos^{42, 43}. Por lo tanto, determinadas alteraciones en la formación y función del TAB han sido

asociadas al desarrollo de patologías como la obesidad, diabetes, hipertensión y aterosclerosis⁴⁴.

El TAB se encuentra en depósitos en distintas regiones del cuerpo que presentan diferencias de organización y de actividad. En función de su localización, puede ser clasificado en visceral (retroperitoneal), subcutáneo, perirrenal y epididimal (perigonadal)⁴⁵. Asimismo, la distribución del TAB se encuentra influenciada por el sexo y todo parece indicar que son las hormonas sexuales esteroideas las implicadas en el dimorfismo sexual⁴⁶.

Las células del TAB, los adipocitos, poseen una enorme inclusión lipídica que desplaza el núcleo hacia la periferia celular, quedando el citoplasma muy reducido. En la obesidad se produce un gran aumento en los depósitos de este tejido debido a la hiperplasia e hipertrofia de los adipocitos.

Como ya se ha mencionado, el TAB es el principal reservorio energético del organismo, la energía se almacena en TG. Para los adipocitos, la principal fuente de TG son los quilomicrones y las lipoproteínas de muy baja densidad (*very low density lipoprotein*, VLDL) circulantes, que contienen TG que son hidrolizados a AG libres y glicerol por la enzima lipoproteína lipasa (LPL). Esta enzima se localiza en la pared de los capilares del tejido y su actividad está regulada por el estado nutricional y hormonal del organismo. Los AG libres resultantes de la acción de LPL son captados al interior de los adipocitos mediante transporte activo mediado por proteínas específicas, y a continuación, son reesterificados para volver a formar TG⁴⁷. Además, los AG, también pueden ser sintetizados *de novo* por los propios adipocitos a partir del exceso de glucosa en un proceso conocido como lipogénesis *de novo* (LDN). Por otro lado, en condiciones de déficit energético, los TG almacenados en el TAB son hidrolizados a AG y glicerol en un proceso conocido como lipólisis. La principal enzima implicada en este proceso es la lipasa sensible a hormonas (*hormone-sensitive lipase*, HSL), que cataliza la hidrólisis de TG a monoglicéridos⁴⁸.

La capacidad de almacenamiento del TAB puede saturarse, lo que provoca que el exceso de TG sea almacenado en otras partes del organismo como el hígado, corazón, riñón, páncreas, músculo esquelético e hipotálamo. Esto se produce en individuos con obesidad y está asociado al desarrollo de resistencia a la insulina y diabetes^{49, 50}.

Como se ha dicho anteriormente, el TAB también posee la capacidad de secretar hormonas implicadas en la regulación de la homeostasis energética conocidas como adipoquinas como la leptina, la adiponectina o la resistina, así como proteínas capaces de coordinar el sistema inmune denominadas citoquinas como TNF α o IL6. Estas hormonas tienen acciones endocrinas, paracrinas y autocrinas que se ejecutan en respuesta a diferentes estímulos que llegan al TAB, lo que convierte al TAB en un verdadero órgano endocrino clave en la regulación de diferentes procesos fisiológicos^{51, 52}.

3 EL TEJIDO ADIPOSEO MARRÓN

3.1 CARACTERÍSTICAS DEL TEJIDO ADIPOSEO MARRÓN

El TAM se encuentra presente en todos los mamíferos, pero predominantemente en las especies que presentan hibernación y en humanos neonatos, debido a su principal función, la realización del proceso de termogénesis. En pequeños mamíferos, como los roedores el TAM se localiza principalmente en la zona interescapular pero también se encuentra en la zona periaórtica, perirrenal e intercostal⁵³. Recientemente se ha demostrado la existencia de cantidades destacables de TAM metabólicamente activo en humanos adultos^{54, 55}. Mediante tomografía por emisión de positrones se ha demostrado la existencia de áreas definidas en regiones cervical, supraclavicular, perirrenal, intercostal y periaórtica⁵⁶⁻⁵⁸.

Las células que componen este tejido poseen múltiples inclusiones lipídicas y de mucho menor tamaño que en el TAB, además presenta una gran cantidad de mitocondrias, una elevada inervación por parte del SNS, que modula su funcionamiento por parte del SNC y una densa vascularización que facilita la disipación del calor producido⁵⁹.

Para la activación de la termogénesis, una señal es transmitida por el SNS hacia adipocitos maduros del TAM. Los nervios simpáticos que inervan el TAM liberan norepinefrina y este neurotransmisor activa los receptores β -adrenérgicos, principalmente el β_3 . Una vez el receptor se ha estimulado, una proteína G asociada a él provoca la activación de la adenilato ciclasa, incrementando los niveles de monofosfato de adenosina cíclico (*cyclic adenosin monophosphate*, AMPc), lo que provoca la activación de la proteína quinasa A (*protein kinase A*, PKA), induciendo la termogénesis. La PKA provoca un incremento en la lipólisis conduciendo a un aumento de AG libres en el citosol, esto ocurre principalmente gracias a la activación de la HSL. Estos AG a continuación son importados a la mitocondria a través de la carnitina palmitoiltransferasa 1 α (CPT1 α) y 2 (CPT2), donde son oxidados en la β -oxidación primero y posteriormente en el ciclo de Krebs como subproductos, conduciendo a la formación de dinucleótido de nicotinamida y adenina (*Nicotinamide adenine dinucleotide*, NADH) y de dinucleótido de flavina y adenina (*flavin adenine dinucleotide*, FADH), que luego serán oxidados en la cadena de transporte electrónico. Esto lleva a un bombeo de protones hacia fuera de la matriz mitocondrial y a la creación de un gradiente que conduce de nuevo a los protones hacia dentro de la matriz, pasando a través de la proteína desacopladora 1 (*uncouplign protein 1*, UCP1), desacoplando el transporte de electrones de la producción de ATP. Este proceso de pérdida de protones a favor de gradiente es un proceso exergónico, donde la energía es disipada en forma de calor⁵⁹ (Imagen 3).

La deficiencia de UCP1 en ratones provoca una elevada sensibilidad al frío, sin embargo, no produce una mayor susceptibilidad al desarrollo de obesidad ni tan siquiera en presencia de una dieta alta en grasa⁶⁰. Es necesario someter a los animales a termoneutralidad para que desarrollen un fenotipo obeso, efecto exacerbado cuando son expuestos a una dieta alta en grasa⁶¹. Esto se debe a que estos ratones por debajo de la temperatura de termoneutralidad tienen un estrés térmico que potencia su metabolismo basal⁶².

En los últimos años se la ha atribuido al TAM un importante rol como órgano secretor de batoquinas, pudiendo realizar funciones autocrinas, promoviendo la remodelación tisular en respuesta a un estímulo termogénico, para así poder responder a las necesidades del tejido, es el caso de la neuroregulina 4^{63, 64} o la proteína morfogénica ósea 8b (*bone morphogenetic protein 8b*, BMP8b)⁶⁵. Además, también existen batoquinas con importantes funciones endocrinas, como el factor de crecimiento insulínico tipo 1

(*insulin-like growth factor 1*, IGF1) o el factor de crecimiento de fibroblastos 21 (*fibroblast growth factor 21*, FGF21)^{66, 67}, aunque son principalmente secretado por el hígado el TAM también libera pequeñas cantidades que actúan sobre órganos distantes como el músculo esquelético o el corazón^{68, 69}.

Por ello, la termogénesis representa un mecanismo homeostático en la regulación de la temperatura corporal pero además se ha planteado que su actividad puede tener un importante impacto en el balance energético del organismo⁷⁰. Es también interesante el papel del TAM en el aclaramiento de TG y mejora de la homeostasis de la glucosa debido a su capacidad de captar y catabolizar lípidos y carbohidratos presentes en la sangre^{59, 71}.

Todas estas características han hecho que el TAM se proponga como una estrategia terapéutica prometedora para combatir la obesidad y sus patologías asociadas como la diabetes o la enfermedad de hígado graso no alcohólico (*Non-alcoholic fatty liver disease*, NAFLD)^{70, 72-74}. De todos modos, en este aspecto hay que ser cautos ya que existen ciertas evidencias que plantean que el aumento en la actividad del TAM podría asociarse a la aparición de efectos adversos como el crecimiento de placas ateromatosas⁷⁵ o neuropatía periférica^{76, 77}.

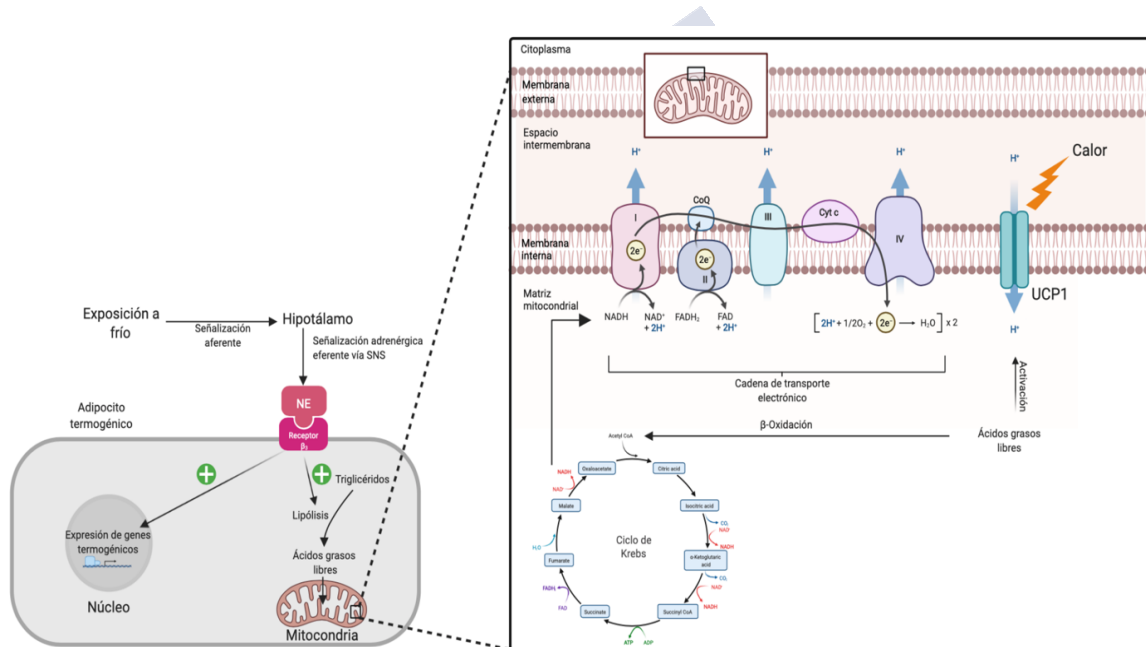


Imagen 3. Esquema de la activación de la termogénesis en el TAM por la exposición al frío (Elaboración propia).

3.2 EL TEJIDO ADIPOSO BEIGE

Recientes evidencias señalan un nuevo y diferenciado tipo de adipocitos marrones encontrados tanto en humanos como en roedores. Surge a raíz de un proceso de diferenciación conocido como amarronamiento (*browning* en inglés) que tiene lugar en depósitos de TAB. Se produce tras la exposición al frío, a una dieta hipercalórica o por activación por medio del SNS o por agonistas adrenérgicos^{78, 79}. Estos adipocitos beige (*brite*, *Brown in White* en inglés) expresan marcadores termogénicos y poseen características anatómicas y funcionales intermedias entre los adipocitos marrones y blancos⁷³, sin embargo, su origen embrionario es diferente del linaje miogénico (*Myf5*⁺) de los adipocitos marrones.

Los precursores de los adipocitos beige residen alrededor de regiones muy vascularizadas y proliferarán a adipocitos beige maduros en respuesta a uno de los estímulos mencionados. Estos precursores pueden ser *PDGFRα*⁺*Ebf2*⁺ y estar

restringidos a convertirse en un adipocito beige maduro, mientras que otro subconjunto de precursores PDGFR α ⁺ pueden dar lugar a adipocitos beige, adipocitos blancos o células fibrogénicas. Además, los propios adipocitos blancos pueden ser reprogramados y transdiferenciados en adipocitos beige^{73, 74, 80}.

3.3 REGULACIÓN DE LA TERMOGÉNESIS

3.3.1 Regulación neural de la termogénesis de la grasa marrón y beige

Como ya hemos mencionado, el principal centro regulador de la temperatura corporal y en consecuencia de la actividad termogénica es el SNC, principalmente en los diferentes núcleos hipotalámicos que son los encargados de recibir todas las señales periféricas y producir una respuesta acorde a los estímulos percibidos. Por ejemplo, las neuronas POMC del ARC estimulan la termogénesis del TAM y beige, mientras que las neuronas AgRP inhiben esta actividad⁷⁴.

La leptina estimula neuronas concretas del ARC y DMH promoviendo el gasto energético⁸¹. La insulina a nivel central estimula neuronas del ARC promoviendo la activación de adipocitos beige⁸². Además, otros factores hormonales como los estrógenos, las hormonas tiroideas o FGF21 también actúan sobre el hipotálamo provocando un incremento del gasto energético a través de la activación de la termogénesis. Además, diferentes nutrientes y señales aferentes influyen de forma determinante⁸³⁻⁸⁶.

3.3.2 Regulación humoral de la grasa marrón y beige

Numerosos factores endocrinos, paracrinos y autocrinos, algunos ya mencionados, también juegan un papel clave en la regulación del desarrollo, mantenimiento y función del TAM y beige. Estos factores son secretados por una gran variedad de tejidos y órganos como el páncreas, hígado, tracto gastrointestinal, corazón, TAB, músculo esquelético o incluso el sistema inmune. Estos reguladores humorales, junto con el SNS regulan el TAM y beige manteniendo la homeostasis de la temperatura corporal y del balance energético.

Es bien conocido también que la ingesta de comida incrementa la termogénesis no temblorosa⁸⁷, además una dieta con elevado aporte calórico como la HFD promueve todavía más la termogénesis del TAM y beige⁸⁸. Esta termogénesis inducida por la dieta probablemente se trate de una adaptación fisiológica para combatir la ganancia de peso y la obesidad, es por ello que la composición de la dieta posee una gran importancia sobre la actividad del TAM y beige.

3.3.3 Regulación genética de la termogénesis del TAM y beige

La activación del TAM y beige está también controlada por diferentes programas genéticos específicos para cada linaje de adipocitos. Son muchos los factores de transcripción (FT) que regulan el desarrollo y la activación de estos tejidos a nivel genético, incluso en estos últimos años ha adquirido una gran importancia la epigenética en la regulación de la biología de el TAM y beige. A continuación, hablaremos resumidamente de alguno de estos FT más relevantes para el desarrollo de esta tesis.

El receptor activado del proliferador del peroxisoma γ (*peroxisome proliferator-activated receptor γ* , PPAR γ) es un FT central requerido para la adipogénesis, se ha visto que agonistas de este FT incrementa enormemente la adipogénesis *de novo* beige y la transdiferenciación de adipocitos blancos a beige tanto en roedores como en humanos^{89, 90}. Esta habilidad de PPAR γ para estimular la diferenciación de preadipocitos en adipocitos blancos o marrones/beige viene determinada por los coactivadores con los que

se asocia. Cuando se asocia con la proteína Prdm16 (*Pr domain 16*), estimula la expresión de genes específicos de adipocitos marrón/beige y reprime la expresión de los genes típicos de adipocitos blancos⁹¹. Por otro lado, la unión del potenciador tipo transducina 3 (*Transducin-like enhancer 3*, TLE3) al mismo sitio al que se une Prdm16, por el que compiten, provoca el efecto opuesto, promoviendo la diferenciación a adipocito blanco⁹².

Otro miembro de esta familia, PPAR α es un FT bien conocido como activador de la β -oxidación y de la respiración mitocondrial⁹³. Pero su expresión también ha sido relacionada con la conversión de adipocitos blancos a beige y con la activación de la termogénesis del TAM y beige⁸⁹. Directamente PPAR α estimula la expresión del coactivador de PPAR γ 1 α (*PPAR γ coactivator 1 α* , PGC1 α) y Prdm16, dos coactivadores que promueven la termogénesis de los adipocitos marrones y beige⁹⁴.

Un FT ya mencionado con gran importancia en la regulación de la termogénesis es Prdm16, ha adquirido gran atención por su habilidad para promover la diferenciación a un linaje de adipocito marrón a las células progenitoras Myf5⁺⁷⁸ (Imagen 4a). Mecanicamente, Prdm16 actúa como cofactor de múltiples FT para estimular la expresión de UCP1 y en consecuencia la termogénesis en adipocitos marrones y beige. Además, es capaz de suprimir la expresión de reguladores negativos de la grasa marrón y beige⁹⁵. De hecho, como veremos más detenidamente en un próximo apartado, p107 se expresa en precursores adipocitarios y reprime la diferenciación a adipocitos marrones, promoviendo un linaje de adipocito blanco. Prdm16 se une al promotor de p107 y suprime su expresión en esos preadipocitos, promoviendo así su diferenciación a un linaje de tipo beige⁹⁶. En línea con estos resultados, la sobreexpresión de Prdm16 específicamente en los adipocitos induce la adipogénesis beige. Otros experimentos de delección de Prdm16 en progenitores de diferentes linajes y en adipocitos marrones adultos, concluyeron que Prdm16 es requerido para la adipogénesis de adipocitos beige, pero no para la de adipocitos marrones⁹⁷. Además, Prdm16 juega un papel importante preservando el fenotipo termogénico de adipocitos marrones y beige en ratones envejecidos⁹⁸.

Otro FT que ya ha sido mencionado y con gran relevancia como promotor de la termogénesis es PGC1 α . La exposición a frío incrementa la expresión de este FT en TAM de ratones y en TAB subcutáneo de humanos⁹⁵. PGC1 α estimula la expresión de UCP1 y la termogénesis en adipocitos marrones y beige actuando como coactivador de varios FT como los miembros de la familia de PPAR, la proteína de unión al potenciador CCAT (*CCAAT/enhancer-binding proteina*, C/EBP) o con Prdm16⁹⁴. Son muchos los factores celulares que modulan la termogénesis a través de la activación directa de PGC1 α como el elemento de unión en respuesta a cAMP (*cAMP response element-binding*, CREB) o el factor de transcripción activador 2 (*activating transcription factor 2*, ATF2)⁹⁹. Pero también son numerosos las proteínas que se unen a su promotor y suprimen su expresión, este es el caso de pRb o p107¹⁰⁰ (Imagen 4b).

Su actividad también es regulada a través de modificaciones postraduccionales. Por ejemplo, la Sirt2 activa mediante la desacetilación de PGC1 α promoviendo la biogénesis mitocondrial y la β -oxidación¹⁰¹. Por otro lado, p38 quinasa activada por mitógenos (*mitogen-activated protein kinase*, MAPK) fosforila a PGC1 α , incrementando su estabilidad y en consecuencia su habilidad para estimular la expresión de UCP1¹⁰².

Dada la gran importancia de PGC1 α en la expresión de UCP1 y la respiración mitocondrial, es curioso que la delección específica de adipocitos de PGC1 α solo produzca un ligero fallo en la función del TAM, se especula que algún otro miembro de su familia como PGC1 β pueda compensar la pérdida de PGC1 α ¹⁰³. Alternativamente, podría deberse a la recientemente conocida termogénesis independiente de UCP1, también con una relevante contribución a la homeostasis energética¹⁰⁴

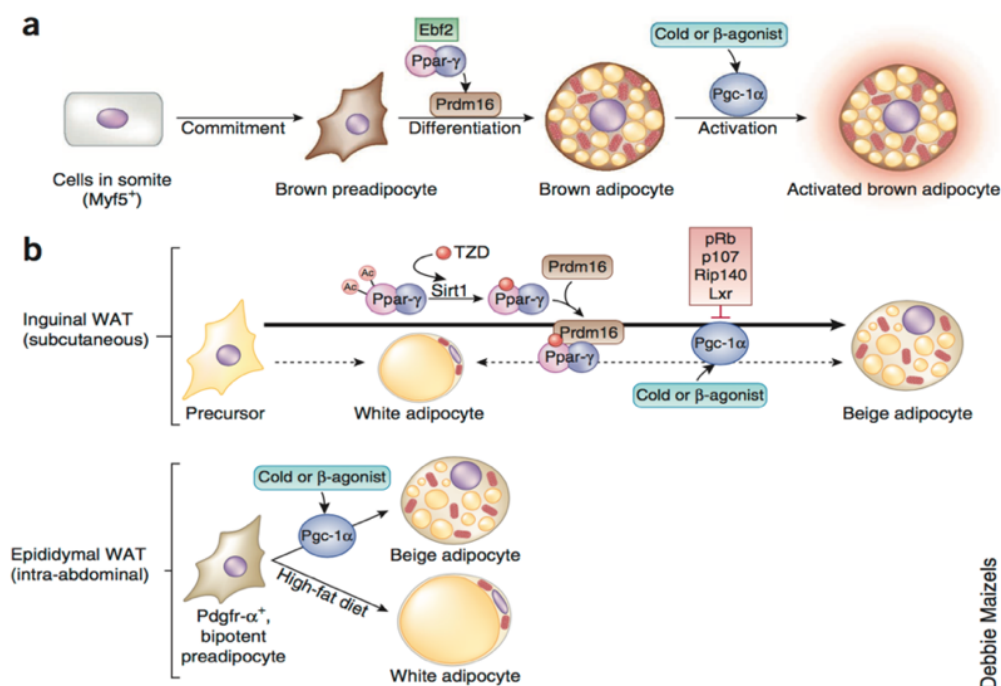


Imagen 4. Regulación transcripcional del desarrollo de adipocitos marrones y beige. a) PPAR γ promueve la expresión de PRDM16 lo que determina un linaje de tipo marrón. b) En algunas condiciones el adipocito blanco maduro puede transdiferenciarse a célula beige, proceso en el que son claves PPAR γ , PRDM16 y PGC1 α entre otros. Este proceso puede ser inhibido por pRb y p107 (superior). En el TAB epididimal un exceso calórico provocará la diferenciación a adipocito blanco, pero la estimulación β -adrenérgica provoca el desarrollo de un adipocito beige. (Licencia número: 5042401086246)⁹⁵.

4 EL HÍGADO

El hígado es uno de los órganos metabólicamente más activos y versátiles. Posee un doble suministro de sangre: aproximadamente el 25% viene de la arteria hepática y sobre un 75% llega a través de la vena porta, por lo que se ocupa de drenar la sangre que viene del intestino, siendo el primer órgano que entra en contacto con los nutrientes absorbidos intestinalmente. En consecuencia, es el encargado de procesar y almacenar los nutrientes contenidos en la sangre intestinal y garantizar un suministro adecuado para otros órganos, además de ejercer también un papel clave en el mantenimiento de la homeostasis de la glucosa¹⁰⁵.

4.1 METABOLISMO DE LÍPIDOS EN EL HÍGADO

Los AG son sustratos de gran importancia para la oxidación y producción de energía celular, así como precursores moleculares para toda clase de lípidos, imprescindibles para la formación de membranas celulares y también actuando como moléculas señalizadoras necesarias para la regulación metabólica.

Los AG en el hígado pueden proceder mayoritariamente de tres orígenes diferentes (Imagen 5): (1) AG incorporados en lipoproteínas y remanentes de quilomicrones, (2) Complejos albúmina-AG liberados de tejidos extrahepáticos y (3) lipogénesis *de novo*

(LDN) en el hígado. A partir de estos AG el hígado posee la capacidad de formar diferentes tipos mediante su elongación y desaturación.

Dependiendo del estado nutricional, los AG son procesados a TG y almacenados o rápidamente metabolizados.

4.2 METABOLISMO LIPÍDICO EXTRAHEPÁTICO

El metabolismo de lípidos comienza con la absorción de grasas de la dieta, estas pasan por los enterocitos intestinales hacia el torrente sanguíneo. Para su absorción es crucial el papel del hepatocito, debido a la producción de ácidos biliares que provocan la emulsión de los lípidos por sus propiedades anfipáticas, permitiendo así su hidrolización mediante lipasas y pudiendo así ser absorbidos por los enterocitos. Allí los lípidos son resintetizados y empaquetados en partículas lipoproteicas (quilomicrones nacientes), estas son secretadas al sistema linfático y entran en el torrente sanguíneo, donde pierden dos de sus apolipoproteínas, ApoA-I y ApoA-IV, que son sustituidas por ApoE y ApoC-II, claves para su procesado.

ApoC-II activa a LPL, esta enzima realiza la digestión de los TG de los quilomicrones dando lugar a AG libres y glicerol que son capturados parcialmente y almacenados en los adipocitos, mientras que los remanentes de quilomicrones vuelven a la circulación para dirigirse al hígado.

El receptor de lipoproteínas de baja densidad (*low density lipoprotein*, LDL) reconoce a ApoE en el hepatocito facilitando su captación. Finalmente, los remanentes de quilomicrones son procesados por lisosomas intracelulares liberando AG, glicerol, colesterol, aminoácidos y residuos de fosfato que son metabolizados y reciclados en VLDL¹⁰⁵.

Como se ha mencionado, el hígado también puede captar AG circulantes de tejidos extrahepáticos. La incorporación de AG en los hepatocitos se produce principalmente mediante difusión pasiva o facilitada por diferentes transportadores, como la proteína grupo de diferenciación 36 (*cluster of differentiation 36*, CD36), proteínas transportadoras de AG (*Fatty acids transport proteins*, FATP) o proteínas de unión a AG (*Fatty acids binding proteins*, FABP)¹⁰⁶.

4.3 LIPOGÉNESIS DE NOVO

La LDN hepática es el proceso bioquímico mediante el cual los hepatocitos sintetizan AG a partir de subunidades de acetil-CoA provenientes de diferentes rutas celulares, comúnmente del catabolismo de carbohidratos. El flujo de carbonos desde la glucosa hasta los AG, que es modulado por esta ruta lipogénica, incluye una serie de reacciones enzimáticas coordinadas.

4.3.1 Proceso enzimático

El acetil-CoA es transportado al citosol como citrato donde la ATP-citrato liasa (*ATP citrate lyase*, ACLY) se encarga de su conversión de nuevo a acetil-CoA y oxalacetato. Este último es reducido a malato por la malato deshidrogenasa y posteriormente oxidado a piruvato por el enzima málico en una reacción asociada a la producción de NADPH.

El componente catalítico de esta ruta se concentra en dos enzimas, por un lado, el acetil-CoA es carboxilado a malonil-CoA por la acetil-CoA carboxilasa (*acetyl-CoA carboxylase*, ACC) y finalmente la ácido graso sintetasa (*fatty acid synthase*, FAS) es el complejo enzimático clave que provoca la conversión del malonil-CoA en palmitato, en una serie de reacciones dependientes de NADPH. Posteriormente, otros AG más complejos pueden ser generados gracias a la acción de enzimas desaturasas como la estearoil-CoA desaturasa 1 (*stearoyl-CoA desaturase 1*, SCD1) o enzimas elongasas¹⁰⁷.

De entre todas las posibles fuentes de depósito de lípidos ectópicos, la LDN es con mucho la que consume más calorías. Según la estequiometría, la síntesis de una molécula de palmitato a partir de acetil-CoA cuesta 7 moléculas de ATP y requiere la conversión de 14 moléculas de NADPH de alta energía en NADP⁺. Además, el malonil-CoA, un sustrato esencial para la LDN, también actúa como un potente inhibidor de la oxidación de AG mitocondrial a través de la inhibición de CPT-1, por lo que niveles elevados de dicho sustrato podrían promover la acumulación lipídica en los hepatocitos¹⁰⁸.

Estudios que muestran que los ratones KO globales de las enzimas ACLY, ACC y FAS son inviábiles desde etapas embrionarias demuestran que la LDN juega un papel imprescindible en el desarrollo embrionario¹⁰⁹⁻¹¹¹. La inhibición específica en hígado de ratones demostró que estas enzimas también juegan un papel esencial en la coordinación de la oxidación de AG dependiente de malonil-CoA. Además, la actividad de ACC en hepatocitos es necesaria para la acetilación de cientos de proteínas¹¹².

Aunque en condiciones específicas, la supresión de ACC y ACLY puede proteger de la acumulación de lípidos en los hepatocitos, estos efectos parecen verse solamente en modelos en los que la LDN es la principal fuente de lípidos hepáticos y no se pueden compensar fácilmente mediante otros mecanismos como en ratones deficientes en el receptor de la leptina (db/db) o en ratones alimentados con una dieta libre de grasa. Sin embargo, en ratones alimentados con dieta estándar o dieta alta en grasa la supresión de estas proteínas promueve la acumulación de lípidos en el hepatocito, indicando un papel protector de estas enzimas para el hígado graso. Una explicación para esto puede ser el elevado coste de la LDN y la posibilidad de formar un ciclo fútil entre la LDN y la oxidación de AG, algo que se ha demostrado que se produce en el tejido adiposo y en el músculo esquelético^{113, 114}.

4.3.2 Regulación de la lipogénesis *de novo*

La LDN responde en gran medida a los cambios en la dieta. Sabemos que una dieta rica en carbohidratos activa una respuesta lipogénica en el hígado, provocando un aumento en la síntesis y secreción de VLDL, así como un aumento de la hipertrigliceridemia^{115, 116}. Además, existen evidencias que sugieren que el tipo concreto de carbohidrato influye en la actividad de la LDN. Concretamente la fructosa se ha identificado como un potente activador de la lipogénesis¹¹⁷ y se ha visto que los azúcares simples son más efectivos que los carbohidratos complejos para la estimulación de la LDN¹¹⁸.

Así, los niveles de glucosa e insulina son claves en la regulación de esta ruta metabólica. Por un lado, la glucosa sirve de fuente de carbonos para la síntesis de AGs y por otro lado la insulina y la glucosa activan la expresión de FT claves en la regulación de la LDN como son la proteína de unión reguladora de esteroles tipo 1-c (*sterol regulatory element-binding protein 1c*, SREBP1c), la proteína de unión en respuesta a carbohidratos (*carbohydrate-responsive element-binding protein*, ChREBP), el factor estimulante *upstream* 1 (*upstream stimulating factor 1*, USF1) y el receptor hepático X (*liver X receptor*, LXR).

Cuando la vía de la insulina se activa se promueve la liberación proteolítica de la forma madura de SREBP1c que se encuentra en forma de precursor anclada en la membrana del aparato de Golgi. Una vez liberada es capaz de dirigirse al núcleo y promover la transcripción de sus genes diana lipogénicos entre los que se incluyen FAS y ACC¹¹⁹.

Por el contrario, ChREBP es un FT activado especialmente por los altos niveles postprandiales de carbohidratos que llegan a los hepatocitos. Parece que son muchos los

metabolitos que son partícipes en la activación de ChREBP, como la glucosa 6-fosfato o la fructosa-2,6-bifosfato^{120, 121}.

Sin embargo, la principal activación de ChREBP se produce mediante su desfosforilación por la proteína fosfatasa tipo 2A (*protein phosphatase 2A*, PP2A) en sitios previamente fosforilados por PKA o AMPK, lo que provoca su disociación de la proteína 14-3-3 en el citosol, su traslocación al núcleo y la activación de los genes que contienen en su promotor secuencias del elemento de respuesta a carbohidratos (*carbohydrate response element*, ChoRE)¹²².

Sin embargo, recientemente se ha descubierto que los cambios en el estado de fosforilación no es el único mecanismo de regulación enzimática de este FT. Su acetilación y su unión a O N-acetil- β -D-glucosamina-glicosilación (*O-linked β -N-acetylglucosaminylation*, O-GlcNAcylation) incrementan la actividad de ChREBP¹²³.

En cualquier caso, el resultado final de su activación es promover la expresión de los genes diana que contienen secuencias ChoRE, principalmente FAS, ACC y también la piruvato quinasa (*pyruvate kinase*, PK), la cual proporciona piruvato que es convertido a Acetil-CoA mediante la piruvato deshidrogenasa (*pyruvate deshydrogenase*, PDH).

LXR es un miembro de la superfamilia de receptores nucleares que heterodimerizan con el receptor retinoide X (*retinoid X receptor*, RXR). Tiene un importante papel en la regulación del metabolismo del colesterol, pero también juega un rol esencial en el control de la LDN, de forma directa activando transcripcionalmente a FAS e indirectamente a través de la activación de SREBP1c^{124, 125}.

Otro FT implicado en la regulación de la LDN es USF1. Su unión al promotor del gen de FAS es clave en la activación de la LDN mediada por insulina¹²⁶.

Además, recientes estudios han demostrado que PGC-1 β es importante en la mediación del efecto metabólico de la grasa de la dieta, así como en dietas altas en fructosa. Demostrando que su sobreexpresión induce la expresión hepática de genes lipogénicos mientras que su inhibición reduce la expresión de los genes de la LDN^{127, 128}.

Además, la LDN también presenta un importante punto de regulación en ACC. Esta enzima se presenta mayoritariamente en dos isoformas en mamíferos: ACC1 y ACC2, pero la que juega un papel relevante en hígado es ACC1. Uno de sus principales mecanismos de regulación es mediante su fosforilación y desfosforilación. Su fosforilación ocurre rápidamente en células tratadas con adrenalina o glucagón, conduciendo a la inactivación de la enzima. Esta fosforilación se produce mayoritariamente a través de AMPK.

ACC también puede ser regulada de forma alostérica, sus activadores alostéricos reconocidos son el glutamato y el citrato y entre sus inhibidores se encuentra el malonil-CoA¹²⁹.

4.4 OXIDACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS

Los AG derivados de la hidrólisis de los depósitos de TG hepáticos, de la LDN o los lípidos circulantes, pueden oxidarse por múltiples vías. La β -oxidación mitocondrial es la ruta principal para la oxidación de la mayoría de los AG que se encuentran en los hepatocitos. La β -oxidación de AG de cadena muy larga (C20-C26) y ramificada comienza en los peroxisomas. Además, existen vías adicionales para la oxidación de AG como la α -oxidación y la ω -oxidación dentro del RE, mediadas por miembros de la familia del citocromo P450 4A¹³⁰.

La β -oxidación progresivamente acorta la cadena de los AG liberando Acetil-CoA, el cual puede entrar en el ciclo del ácido tricarbóxico (*tricarboxylic acid cycle*, TCA) para continuar oxidándose a agua y dióxido de carbono, o podría condensarse en cuerpos cetónicos que sirven como sustratos energéticos oxidables para tejidos extrahepáticos.

La entrada en la mitocondria es un factor clave en la regulación de la β -oxidación, este proceso engloba tres pasos: 1. Transferencia del grupo acil del CoA a la carnitina, catalizada por CPT1, 2. transporte intermembrana catalizado por la acilcarnitina traslocasa y 3. reconversión a acil-CoA en la cara interna de la membrana mitocondrial interna por CPT2. Por ello, la regulación de la expresión de CPT1 es el principal mecanismo encargado de controlar el flujo de la β -oxidación hepática¹³¹. Como se ha mencionado anteriormente el malonil-CoA actúa como inhibidor alostérico de CPT1. Por otro lado, PPAR α induce la expresión de genes implicados en la oxidación de AGs tanto mitocondriales como extramitocondriales¹³² (Imagen 5).

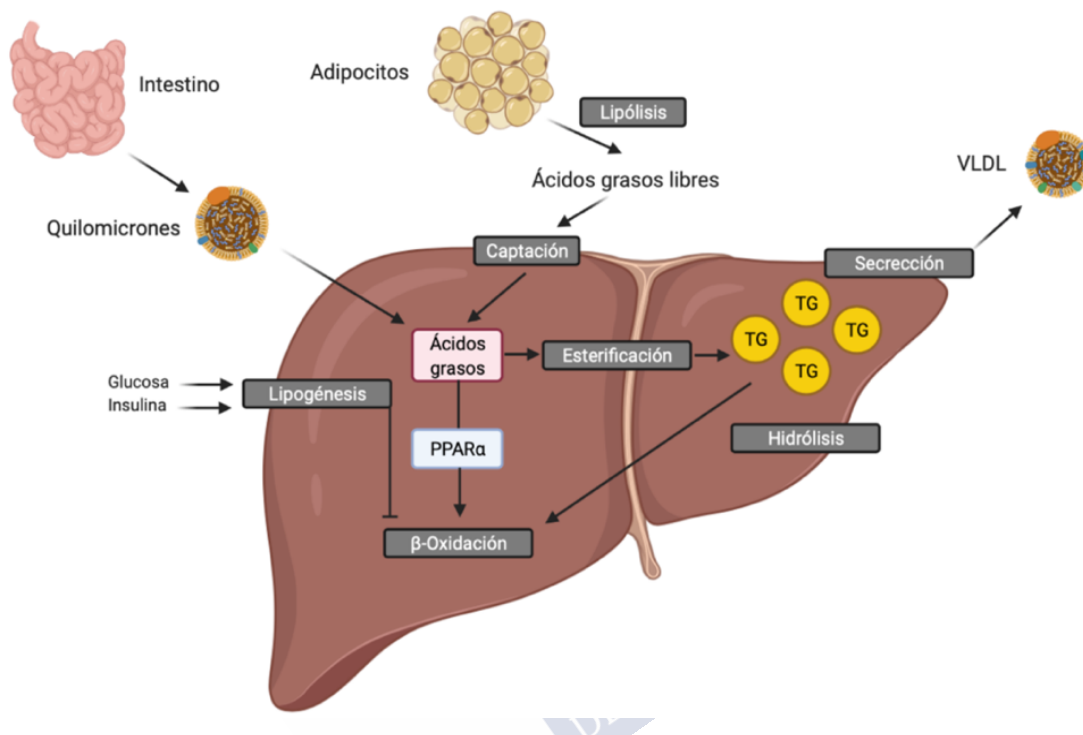


Imagen 5. Metabolismo lipídico en el hígado (Elaboración propia).

4.5 METABOLISMO DE LA GLUCOSA EN EL HÍGADO

El hígado juega un importante papel en el metabolismo de la glucosa ya que es el principal encargado de controlar su concentración en la sangre.

En un estado postprandial, el azúcar presente en la sangre es captado por el hepatocito a través del transportador de glucosa tipo 2 (*glucose transporter type 2*, GLUT2), un transportador de membrana con alta capacidad y baja afinidad por la glucosa. A diferencia de otros transportadores de glucosa, la expresión y actividad de GLUT2 es independiente de insulina.

Una vez dentro del hepatocito, la glucosa es fosforilada a glucosa-6-fosfato (G6P) por la glucoquinasa hepática (GCK). Al contrario que otras hexoquinasas, GCK (hexoquinasa IV) no es inhibida por su producto, lo que permite el almacenamiento de glucógeno en los hepatocitos durante el estado postprandial.

Se trata de un enzima altamente regulado a nivel transcripcional por SREBP1c, USF1, FoxO1 (*Forkhead box O1*), y por los factores nuclear hepáticos 4 α y 6 (*hepatic nuclear factor*, HNF4 α y HNF6)¹⁰⁵.

Una vez dentro del hepatocito, la G6P es incapaz de abandonar la célula por lo que será procesada en la glucólisis o utilizada en la síntesis de glucógeno en función del estado metabólico sistémico.

La glucólisis es un proceso que engloba diez pasos en el que se metaboliza la glucosa a piruvato con una ganancia neta de dos moléculas de ATP y dos moléculas de NADH por molécula de glucosa.

La glucólisis se encuentra regulada principalmente por cuatro enzimas: la GK, la fosfofructoquinasa, la PK y las piruvato deshidrogenasa quinasa (*piruvate deshidrogenase kinase*, PDK).

La fuente principal de piruvato es la glucólisis, aunque también puede provenir del lactato gracias a la lactato deshidrogenasa (LDH) o de la alanina por medio de la acción de la alanina aminotransferasa (ALT). Además de su interconversión con estas otras moléculas de tres carbonos, ya dentro de la mitocondria, el piruvato puede ser carboxilado a oxalacetato por la reacción anaplerótica catalizada por la piruvato carboxilasa promoviendo la gluconeogénesis o podría ser descarboxilado a acetil-coA por el complejo enzimático de la PDH, produciendo ATP a través del TCA y las reacciones de la fosforilación oxidativa¹³³.

4.6 METABOLISMO INTERMEDIARIO

El metabolismo intermediario es clave en la interconexión de las principales rutas metabólicas mencionadas hasta ahora.

La oxidación del acetil-CoA en el TCA es el proceso central del metabolismo energético. Sin embargo, el TCA es un ciclo anfibólico, por lo que tiene funciones de biosíntesis mediante la generación de metabolitos intermediarios que darán lugar a glucosa, AG o aminoácidos. Para que el ciclo funcione correctamente es necesario que los componentes del ciclo se vayan reemplazando para mantener el equilibrio. La principal enzima anaplerótica es la PC, que genera oxalacetato. Por otro lado, la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (*phosphoenolpyruvate carboxykinase*, PEPCK) es la principal enzima cataplerótica. La anaplerosis es necesaria durante la gluconeogénesis y la lipogénesis, cuando el malato o el citrato abandonan la mitocondria para dar lugar a glucosa o AG respectivamente. Paralelamente a este proceso ocurre otro ciclo anaplerótico, la síntesis de piruvato a partir de malato, reacción catabolizada por la enzima málico (ME1) con la consecuente producción de poder reductor NADPH que posteriormente será utilizado por FAS en la síntesis de AG¹³⁴.

Una familia de coactivadores que ha sido fuertemente ligada con la regulación transcripcional del metabolismo intermediario es la de los PGC-1. Sus principales miembros, PGC1 α y PGC1 β juegan un importante papel en la regulación de la biogénesis mitocondrial y del metabolismo oxidativo, sobre todo a través de la coactivación junto con PPAR α de sus genes diana, implicados en la oxidación de AG y en la fosforilación oxidativa¹³⁵.

PGC1 α y PGC1 β también poseen funciones diferentes cada una. PGC1 α por ejemplo estimula la expresión de genes gluconeogénicos mientras que PGC1 β en hepatocitos estimula la síntesis y liberación de TG al activar la expresión de genes lipogénicos a través de la coactivación directa de SREBP1, LXR y ChREBP1^{127, 136}.

Incluso recientes estudios han demostrado como la sobreexpresión de PGC1 β protege frente al desarrollo de esteatosis y fibrosis hepática en modelos de ratones con modelos nutricionales de NASH y NAFLD, ya que son capaces de mantener la expresión de genes de varias rutas metabólicas que se encuentran comprometidas durante la esteatohepatitis. Concretamente los autores proponen que esta protección se produce a

través de un incremento en la biogénesis/función mitocondrial, de las defensas antioxidantes, de la oxidación de AG y de la secreción de TG¹³⁷.

5 ENFERMEDADES HEPÁTICAS ASOCIADAS AL SÍNDROME METABÓLICO

Hay varios tipos de enfermedades hepáticas, algunas de ellas relacionadas con virus como la hepatitis B o C y otras con el consumo de drogas, venenos o excesivo consumo de alcohol. Sin embargo, en las últimas décadas ha incrementado enormemente la prevalencia de las enfermedades hepáticas asociadas con desórdenes metabólicos como la obesidad, la resistencia a la insulina (RI) y la DM2.

5.1 NAFLD

La enfermedad del hígado graso no alcohólico (*Non-alcoholic fatty liver disease*, NAFLD) es una de las causas más comunes de enfermedad hepática crónica y se ha convertido en la causa más frecuente de disfunción hepática en muchos países, manteniendo un crecimiento ascendente en línea con la prevalencia de la obesidad, la RI y la DM2. De hecho, la prevalencia de NAFLD en pacientes obesos adultos es de entre un 80-90% y más del 90% presentan hiperlipidemia¹³⁸. Pero esta patología también puede ser desarrollada en pacientes no obesos, concretamente se ha estimado que afecta a un 25% de la población mundial¹³⁹. Además, se prevé que en la próxima década sea la principal causa para el trasplante hepático¹⁴⁰.

Tradicionalmente esta patología ha sido conocida como NAFLD, pero recientemente ha sido renombrada como enfermedad de hígado graso asociada al metabolismo (*metabolic-associated fatty liver disease*, MAFLD) con el objetivo de promover un mayor entendimiento del origen de la patología¹⁴¹.

La NAFLD se presenta como una enfermedad inflamatoria hepática crónica que se inicia con la acumulación excesiva de triglicéridos en los hepatocitos y que engloba un espectro de condiciones que van desde el hígado graso no alcohólico (*non-alcoholic fatty liver*, NAFL), caracterizado por una esteatosis simple sin inflamación, a la esteatohepatitis no alcohólica (*non-alcoholic steatohepatitis*, NASH), recientemente renombrada como esteatohepatitis asociada al metabolismo (*metabolic-associated steatohepatitis*, MASH), la cual puede progresar a cirrosis hepática y a hepatocarcinoma (*hepatocellular carcinoma*, HCC) (Imagen 6). Cuando la NAFLD progresa a estos

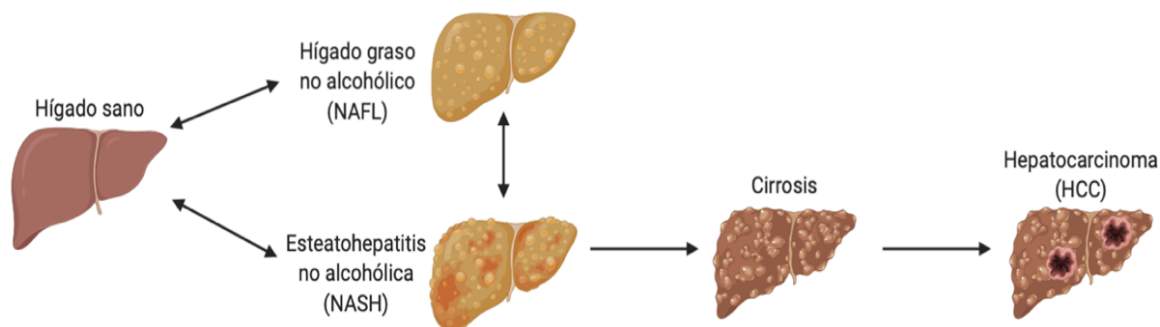


Imagen 6. Progresión de la enfermedad de hígado graso no alcohólico (Elaboración propia).

estadios tardíos, el trasplante hepático es la única opción para el tratamiento ya que hasta ahora no existe ningún tratamiento efectivo^{142, 143}.

5.2 PATOGÉNESIS DE NAFLD Y NASH

Los mecanismos implicados en la progresión de la enfermedad hepática son complejos y no están del todo claros. Un punto de vista tradicional es la hipótesis de los “dos impactos”, donde el “primer impacto”, determinado por factores metabólicos (obesidad, DM2, dislipemia) consiste en la acumulación de TG y AG libres como consecuencia del aumento de lípidos procedentes de la dieta, de la lipólisis periférica y de la LDN hepática. En este caso, la acumulación simplemente de TG se considera inerte y en algunos casos podría tener un papel hepatoprotector, sin embargo, es la acumulación de intermediarios lipotóxicos como el diacilglicerol (DAG) la que provoca la RI hepática^{144, 145}.

En consecuencia, a la esteatosis hepática generada por el “primer impacto”, se sensibilizará el hígado para los “segundos impactos”; generando estrés oxidativo, estrés del retículo endoplasmático (RE), inflamación, apoptosis y alteración en los niveles de adipoquinas, lo que causa enfermedad hepatocelular e inflamación hepática, promoviendo la progresión a NASH.

Sin embargo, recientemente, han surgido evidencias que sugieren que la esteatosis simple y la NASH podrían ser dos enfermedades independientes. En esta teoría de “múltiples impactos”¹⁴⁶, la acumulación de especies lipídicas “lipotóxicas/proinflamatorias” interactúa con factores proinflamatorios para producir NASH desde un principio, mientras que en los otros casos el hígado desarrolla esteatosis y permanece libre de cambios inflamatorios y fibróticos¹⁴⁷. Por lo tanto, todavía hay contradicciones en la patogénesis de la NASH.

Lo que sí está claro es que la NASH se caracteriza por la inflamación y fibrosis, principalmente inducidas por toxicidad y la liberación de citoquinas (*cytokine*, CK), como el factor α de necrosis tumoral (*tumor necrosis factor α* , TNF- α), interleuquina (IL)-1 y el factor de crecimiento transformante β (*transforming growth factor β* , TGF- β). Estas CK se encuentran involucradas en el reclutamiento de macrófagos circulantes en el hígado y la activación de las células de Kupffer (*Kupffer cell*, KC) y de las células estelares hepáticas (*hepatic stellate cell*, HSC) todo lo que contribuye al desarrollo de NASH¹⁴⁸.

5.3 ALTERACIONES METABÓLICAS EN LA PROGRESIÓN DE NAFLD

5.3.1 Resistencia a insulina

Como ya hemos visto, la insulina es una hormona con un papel lipogénico y antigluconeogénico en los hepatocitos. La RI se define como un desajuste de la insulina en su capacidad para regular el metabolismo de la glucosa y de lípidos. Es por ello que la RI es considerada como el factor fisiopatológico más relevante en el desarrollo de NAFLD. La aparición de esta patología se asocia mayoritariamente a defectos en la vía de señalización, aunque también se han propuesto diversas rutas metabólicas y mecanismos moleculares que juegan un importante papel en el desarrollo de la RI como la inflamación, la activación del estrés del RE o la acumulación de lípidos extrahepáticos^{149, 150}.

Sus efectos sobre el hígado se dan tanto a nivel propiamente hepático como en consecuencia a alteraciones en otros órganos como el músculo y el tejido adiposo.

En adipocitos y miocitos, la RI provoca una disminución de la captación de glucosa estimulada por la insulina, lo que lleva en la mayor parte de los casos a un incremento en la captación por parte de los hepatocitos y la consecuente activación de la LDN¹⁴⁹.

Específicamente en el tejido adiposo posee funciones de gran relevancia en la respuesta postprandial. Es la encargada de inducir la entrada de la glucosa y la consecuente glucólisis, generando intermediarios metabólicos para la síntesis *de novo* de TG; frena la lipólisis mediante la inhibición de HSL y, además, activa la LPL del endotelio vascular que rompe los quilomicrones y las VLDL liberando AG que entrarán por difusión en el adipocito. La mala regulación de estos mecanismos lleva a una elevada concentración de AG circulantes, lo que contribuye a la acumulación hepática de los mismos¹⁵¹.

Por lo tanto, la resistencia periférica a la insulina es muy probable que provoque una elevada concentración de AG libres en los hepatocitos debido al gran incremento en los niveles de AG libres circulantes y a la activación de la LDN.

Por otro lado, parece que hay mecanismos propiamente hepáticos que podrían inducir la RI hepática. Existen numerosas evidencias de que los lípidos inertes como los TG contenidos en las gotas lipídicas no son tóxicos en sí mismos. Sin embargo, otros lípidos como los DGA, las ceramidas, los AG o sus metabolitos son potencialmente bioactivos y podrían interferir con las funciones de los hepatocitos y particularmente con la capacidad de los hepatocitos para responder a cambios en los niveles de insulina¹⁵². Específicamente, la acumulación hepática de DGA se asocia con un incremento en la translocación de una nueva isoforma de las quinasas tipo C, la PKC ϵ , a la membrana plasmática donde se une e inhibe el dominio quinasa intracelular del receptor de la insulina. Esto provoca una disminución de la fosforilación asociada a insulina de los sustratos de los receptores de insulina 1 y 2, de la actividad de PI3K y de la fosforilación de AKT2. En consecuencia, la insulina no ejercerá su papel en la activación de la síntesis de glucógeno ni en la inhibición de la gluconeogénesis¹⁵³. Esta hipótesis sobre la RI hepática ha sido validada recientemente en pacientes con NAFLD¹⁵⁴.

Mientras estos aspectos de la acción de la insulina en la vía de la gluconeogénesis están alterados, la función de la insulina como activador de SREBP1c y de la LDN se encuentra intacta o incluso hiperestimulada, provocando todavía una mayor acumulación de lípidos, es lo que se conoce como RI selectiva^{155, 156}. Sin embargo, no se ha encontrado un lípido específico que sea necesario y suficiente para provocar RI hepática, los datos muestran que esta patología puede surgir como resultado de condiciones distintas a la acumulación de lípidos en el hígado. Por ejemplo, un modelo murino con delección específica en hepatocitos del receptor de insulina presentó una marcada RI pero sin presencia de esteatosis hepática¹⁵⁷. Además, pacientes con mutaciones en el receptor de insulina son resistentes a la insulina, pero también carecen de esteatosis hepática¹⁵⁸.

Por tanto, la esteatosis no es un requisito estricto para desarrollar RI hepática. Una explicación alternativa para la fuerte correlación de la acumulación hepática de lípidos y RI es que estos lípidos no son causantes de RI hepática, pero podrían ser los que provoquen una alteración subyacente y causal. Se hipotetiza que el estrés del RE y la inflamación podrían ser factores conductores hacia la RI^{159, 160}. Sin embargo, en muchos casos, estas condiciones también están asociadas con la acumulación de lípidos.

Por otro lado, como ya se ha mencionado, la RI suele provocar acumulación de lípidos en los hepatocitos por diferentes mecanismos. Aunque la inactivación del receptor de insulina en el hígado no causa esteatosis, la supresión mediada por ácido ribonucleico pequeño interferente (ARN *small interfering*, ARNsi) de la proteína sustrato del receptor de insulina (*insulin receptor substrate*, IRS) en el hígado da como resultado RI hepática, hiperinsulinemia y esteatosis¹⁶¹.

Por lo tanto, en este caso, los defectos específicos de la señalización de la insulina en el hígado son suficientes para provocar esteatosis. Además, está ampliamente aceptado que la RI sistémica produce hiperinsulinemia y esteatosis hepática¹⁴³. En conclusión, la

esteatosis hepática en determinadas circunstancias puede ser tanto el resultado como la causa de la RI hepática.

5.3.2 Papel de la lipogénesis *de novo*

El almacenamiento de lípidos en tejidos no adiposos (deposición ectópica de lípidos) es considerada la mayor fuente de estrés metabólico y el mayor factor patogénico en las enfermedades asociadas a la obesidad y más concretamente en la NAFLD¹⁶².

Concretamente, la contribución de la LDN a la acumulación de AG almacenados en el hígado de pacientes con NAFLD es del 26%, de AG libres procedentes del tejido adiposo y de la dieta contribuyen en un 59% y los TG de la dieta asociados con quilomicrones constituyen un 15% de la grasa hepática. Por lo que la LDN es la responsable de un cuarto de la acumulación de grasa en el hígado en pacientes con NAFLD.

En un estudio reciente se mostró como la LDN es la única fuente de lípidos que mostró un aumento significativo en sujetos con un alto contenido de lípidos en el hígado, comparado con los que tenían niveles bajos, pero con adiposidad similar¹⁶³. Por lo que se puede concluir que la LDN es específicamente utilizada durante el desarrollo de hígado graso. Dándole así a esta ruta un rol causístico en el desarrollo de la patología hepática y poniéndola en el foco de posibles tratamientos, como la restricción de carbohidratos; siendo este tratamiento más efectivo que la restricción de lípidos¹⁶⁴. Sin embargo, no se observan diferencias entre ambos tratamientos a partir de haber perdido un 7% del peso corporal inicial. Además, se sabe que la restricción de carbohidratos provoca un aumento en la síntesis de glucosa por parte del hígado, conduciendo a una situación de balance energético negativo en el hígado.

Estos estudios demuestran que la LDN es una fuente de lípidos intrahepáticos importante en la patogénesis de NAFLD, y muchos ya la han propuesto como la ruta más importante en el desarrollo de esta enfermedad.

Por otro lado, investigaciones recientes también proponen que el reclutamiento específico de la LDN en personas que acumulan lípidos en el hígado puede ofrecer cierta protección contra la progresión de NAFLD (y la deposición de lípidos ectópicos), al minimizar la eficiencia de conversión de calorías adicionales del balance energético positivo a lípidos.

Estudios que han analizado simultáneamente la LDN en hígado y en tejido adiposo en hombres obesos y delgados mostraron que la resistencia a insulina y la esteatosis están correlacionadas positivamente con la LDN hepática y negativamente correlacionadas con la LDN en tejido adiposo^{163, 165}.

En resumen, parece que la LDN tiene una gran importancia en el desarrollo de NAFLD, pero, por otro lado, esta ruta adquiere cierto carácter protector durante el desarrollo de la enfermedad debido a que la LDN produce menos lípidos por caloría de lo que produciría la deposición ectópica directa de lípidos derivados de la dieta o del tejido adiposo^{166, 167}.

5.3.3 Alteración en la formación y secreción de VLDL

Como ya se ha mencionado, la exportación por medio de VLDL representa una importante forma de eliminación de TG hepáticos¹⁴⁹. Aunque en pacientes con NAFLD la secreción de VLDL se encuentra incrementada, cuando la acumulación de TG supera el 10% esta diferencia se estabiliza¹⁶⁸, llegando al punto de que en pacientes con NASH parece que sucede lo opuesto.

El ensamblaje de las VLDL tiene lugar en la ruta secretora del hepatocito. La apoB100 es la proteína estructural obligada y su síntesis es constitutiva; de modo que a

medida que el polipéptido es sintetizado se trasloca al lumen de RE, secretándose solo la apoB100 que se lipida en grado suficiente. La proteína microsomal de transferencia de TG (*microsomal triglyceride transfer protein*, MTTP), es esencial para la formación de la lipoproteína al ser responsable de la adición progresiva de TG, fosfolípidos y ésteres de colesterol a la partícula naciente¹⁵¹.

Estudios sobre el papel de estas proteínas en la progresión a NASH han demostrado que la tasa de producción de apoB100 se encuentra disminuida en pacientes con NASH comparados con pacientes obesos y personas delgadas y la cantidad de MTTP fue menor al analizar a humanos con más de un 30% de contenido de TGS en el hígado comparados con personas sanas¹⁶⁹. Además, pacientes con NASH poseen niveles disminuidos de ARN mensajero (ARNm) de apoB100 y MTTP y reducidos valores séricos de VLDL en comparación con personas sin NASH¹⁷⁰. Todo esto sugiere que la progresión de NAFLD también puede estar influenciada por fallos en la producción y secreción de VLDL, lo que podría deberse, al menos en parte, a la activación del estrés del RE que también se correlaciona con la progresión de la enfermedad.

5.3.4 Lipotoxicidad

La acumulación de AG en el hígado predispone a la lipotoxicidad que promueve el desarrollo de NASH. La lipotoxicidad es definida como una desregulación del ambiente lipídico y/o composición lipídica intracelular que conduce a la acumulación de lípidos dañinos que pueden ser asociados con disfunción de diferentes orgánulos, daño celular y apoptosis. La lipotoxicidad está íntimamente ligada con la inflamación crónica y asociada a condiciones de predisposición a la progresión de NAFLD a NASH, como la obesidad, la diabetes y la RI.

Los lípidos tóxicos pueden causar daño celular a través de tres mecanismos: (1) por modificación de la biología y función de orgánulos intracelulares como el RE y la mitocondria, (2) por modificación directa de rutas de señalización intracelulares o (3) a interaccionar con quinasas proinflamatorias celulares¹⁷¹. Existen varios tipos de lípidos que producen lipotoxicidad, pero dos de los más estudiados y con una gran relevancia en la progresión de NAFLD son las ceramidas y los DAG.

La ceramida es un esfingolípido que consiste en un AG saturado o monoinsaturado de longitud variable unido a un grupo amino y una base esfingosina. Existen evidencias clínicas que indican que la acumulación intracelular de ceramidas promueve la patogénesis de NASH a través de una gran variedad de mecanismos entre los que se incluyen, la disfunción de la homeostasis del calcio, lo que conduce a estrés del RE y, en última instancia, a la activación de la apoptosis mediada por dicho estrés. Además, la acumulación de ceramidas puede provocar RI mediante la inhibición de AKT y también participa en la activación del inflamósoma y empeora la autofagia¹⁷².

Como ya se ha mencionado en el apartado de RI la acumulación de especies lipotóxicas y en especial de DAG provoca RI, además la acumulación de estas especies dañinas puede desencadenar inflamación a través del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células β activadas (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated β cells*, NF κ B) y fibrosis hepática mediada por las células estelares¹⁷².

5.3.5 Disfunción mitocondrial y estrés oxidativo en el desarrollo de NASH

Otro factor clave en el desarrollo de NASH es la disfunción mitocondrial ya que en un contexto de gran abundancia de AG se altera la homeostasis de lípidos en el hígado e induce la sobreproducción de especies reactivas de oxígeno (*reactive oxygen species*, ROS).

En pacientes con NASH, la β -oxidación incrementa notablemente para deshacerse del excedente de AG y así intentar compensar el incremento en la captación y la síntesis. Aunque en modelos de roedores de esteatosis, este incremento en la β -oxidación podría ser explicado por un incremento de CPT1, hay pocas evidencias que soporten esta hipótesis en pacientes con NASH, en donde el significativo aumento de expresión de genes lipogénicos está asociado con una reducción de la actividad de CPT1¹⁷³. Además se ha visto que la activación de CPT1 protege en el desarrollo de NAFLD al disminuir marcadores séricos de daño hepático en pacientes tratados¹⁷⁴.

Microscopía electrónica de muestras de pacientes con NASH mostró que sus mitocondrias presentaban anormalidades morfológicas, sin embargo, estas anomalías estructurales no se encuentran en pacientes con esteatosis simple¹⁷⁵. Además, pacientes con NASH presentan disminuida la actividad de los complejos de la cadena respiratoria, fosforilación oxidativa deficiente, una menor capacidad para sintetizar ATP, un descenso en la concentración de ATP intracelular, y daño en el ácido desoxirribonucleico (ADN) mitocondrial, lo que compromete la respuesta de la célula ante cualquier daño celular¹⁵¹.

En un hepatocito esteatótico con mitocondrias disfuncionales, una parte sustancial de los AG se procesarán por los sistemas oxidativos peroxisomal y microsomal. Los peroxisomas realizan varios ciclos de la β -oxidación para acortar la longitud de AGs de cadena larga y muy larga, ácidos dicarboxílicos de cadena larga, eicosanoides y ésteres de CoA de intermediarios de los ácidos biliares, produciendo acetyl-CoA y H_2O_2 ¹⁷⁶. La oxidación microsomal está controlada por el sistema de citocromos P450, más concretamente por CYP2E1 y miembros de la familia de los CYP4A. En la acción de estos citocromos también se reduce el oxígeno molecular produciendo ROS¹⁷⁷. CYP2E1 parece ser la principal fuente microsomal de H_2O_2 y de peroxidación lipídica y, además, presenta mayor expresión y/o actividad en individuos obesos, con DMT2 o hiperlipidémicos, en situaciones de resistencia a la insulina y también en pacientes y modelos animales de NASH; todas ellas situaciones en las que coexiste estrés oxidativo y daño mitocondrial¹⁵¹.

Inherente a la activación de los sistemas celulares para la oxidación de AG es, por tanto, la producción de ROS. También la oxidación masiva de glucosa que se produce en la DMT2 es una fuente importante de ROS. Se trata de sustancias de vida media corta, que ejercen un efecto local, pero que pueden provocar una situación de estrés oxidativo en la célula si los sistemas defensivos celulares no los contrarrestan adecuadamente. Se ha descrito daño oxidativo causado por ROS en pacientes con esteatosis, NASH y en modelos animales de NASH¹⁷⁸.

Los ROS pueden provocar una multitud de efectos, como son el aumento de la síntesis de TNF- α , que, a su vez, puede causar resistencia a la insulina, necrosis y apoptosis; el agotamiento de sustancias antioxidantes naturales y de ATP y NAD^+ , daño al ADN, alteración de la estabilidad de proteínas, distorsión de membranas y secreción de citoquinas proinflamatorias. Un efecto de ROS importante es la peroxidación de lípidos, lo que genera como productos finales aldehídos reactivos, compuestos de vida media superior a la de ROS que tienen facilidad para difundir a través de las membranas celulares, pudiendo alcanzar dianas extracelulares y extender al tejido los efectos del daño oxidativo¹⁷³.

La peroxidación lipídica parece desempeñar un papel crucial en el daño hepatocelular que ocurre en NASH. Existe una fuerte asociación entre la severidad de la esteatosis y el riesgo de desarrollo de NASH correlacionada con el grado de peroxidación lipídica¹⁷⁹. El hecho no es sorprendente, ya que la gran cantidad de lípidos almacenados en un hepatocito esteatótico, además de ser una fuente de ROS a través de los sistemas oxidativos, son un sustrato idóneo para la generación de aldehídos reactivos. Estos

productos tienen capacidad para bloquear la síntesis de nucleótidos y proteínas y aumentar el TGF- β , que promueve la formación de cuerpos de Mallory, acumulaciones eosinófilas halladas en los hepatocitos de personas que sufren enfermedades hepáticas¹⁷⁸. Además, resultan ser potentes quimioatrayentes de células inflamatorias y activadores de HSC¹⁷⁸. Todos estos fenómenos pueden producir muerte celular por apoptosis y necrosis, inflamación y fibrosis, todas ellas huellas histológicas de NASH.

5.3.6 Muerte celular y necrosis

La muerte de los hepatocitos ocurre en forma de muerte celular programada (apoptosis) o de forma accidental (necrosis) y juega un importante papel en la lesión hepática y el desarrollo de NASH¹⁸⁰.

La necrosis es considerada un proceso accidental caracterizado por la hinchazón de las células y la pérdida prematura de la integridad de la membrana plasmática. Es también interesante, la necroptosis, una forma inmunogénica de muerte celular programada, morfológicamente similar a la necrosis y también ha sido implicada en la patogénesis de la inflamación que produce daño hepático¹⁸⁰.

Por otro lado, la apoptosis se caracteriza morfológicamente por un redondeo celular, la concentración citoplasmática, la condensación de la cromatina y la fragmentación nuclear. Para que esto tenga lugar se requiere de la acción de las caspasas, proteasas que rompen a otras proteínas en residuos aspartato. Tanto la apoptosis como la necrosis pueden ocurrir como consecuencia del mismo evento desencadenante.

La apoptosis se encuentra altamente regulada y puede ser ejecutada mediante dos vías diferentes: la vía intrínseca activada por mecanismos de estrés celular como el estrés del RE o el estrés mitocondrial y la vía extrínseca mediada por receptores de muerte celular situados en las membranas celulares¹⁸¹. Los receptores de muerte celular que pueden activar la vía extrínseca incluyen los receptores del ligando inductor de apoptosis relacionados con el factor de necrosis tumoral (*TNF-related apoptosis-inducing ligand*, TRAIL), el receptor 1 del TNF (*TNF receptor 1*, TNFR1) y a Fas. Los AG citotóxicos estimulan a los receptores tipo Fas y TRAIL y se ha visto que la expresión de estos receptores se encuentra más elevada en pacientes con NASH que en pacientes con esteatosis simple¹⁸². Las vías de TNF α y de la quinasa C-Jun N-terminal (*C-Jun N-terminal kinase*, JNK) son claves en procesos apoptóticos, cuando se activan a través del receptor TNFR1, se forma un complejo que induce la activación de la caspasa 8 y la muerte celular. En pacientes con NASH se ha visto un incremento en la expresión de TNF α y de su receptor¹⁸³.

La vía de apoptosis intrínseca se caracteriza por la liberación de factores activadores de caspasas como el citocromo C desde el espacio intermembrana mitocondrial al citoplasma. En el citoplasma forman un complejo denominado apoptosoma que activa a la caspasa 9. Como ya hemos visto el exceso de ROS provocado por el estrés oxidativo puede provocar daños en el ADN mitocondrial, proteínas y fosfolípidos e inducir la apoptosis de los hepatocitos. Además, como veremos con mayor detalle más adelante, alteraciones en la homeostasis del calcio, sobrecarga de síntesis de proteínas o su mal plegamiento inducirá estrés del RE que puede desencadenar en apoptosis¹⁸⁴.

5.3.7 Inflamación hepática y fibrosis

Existe numerosas evidencias de la estrecha relación entre la obesidad y la inflamación. La obesidad se asocia con un grado de inflamación crónico en el TAB a través del sistema inmune innato. Además, esta inflamación va unida a la RI en tejidos periféricos¹⁸⁵.

Hoy también sabemos que la inflamación hepática tiene un papel muy importante en el desarrollo de NAFLD. Generalmente, los AG saturados libres como el ácido palmítico y el ácido esteárico son directamente citotóxicos, pero además el ácido palmítico es capaz de inducir la formación de ceramidas y lisofosfatidilcolina (*lysophosphatidylcholine*, LPC), especies con un gran poder hepatotóxico que ya han sido asociadas con RI y esteatohepatitis. LPC puede activar rutas proapoptóticas y provocar la liberación de vesículas extracelulares. Estas vesículas pueden transmitir señales desde los hepatocitos dañados y podrían estar involucradas en la patogénesis de NASH mediante la activación de los macrófagos¹⁸⁶.

Las células inmunes son activadas por señales de alarma endógenas conocidas como alarminas o por patrones moleculares asociados a daño (*damage-associated molecular patterns*, DAMPs)¹⁸⁷, los cuales son liberados por células muertas o dañadas. El ATP también funciona como alarmina, es liberado por células necróticas alertando a los neutrófilos circulantes para que se adhieran en los sinusoides hepáticos¹⁸⁸.

El hígado además, presenta una gran exposición a los productos microbiales derivados del intestino, que tendrán una gran importancia en la respuesta inflamatoria hepática, ya que la disbiosis intestinal ha sido relacionada con la obesidad¹⁸⁹, la diabetes¹⁹⁰ y NAFLD. Incluso se ha visto que el paso a un estado fibrótico está relacionado también con un cambio microbiótico¹⁹¹. Como hemos podido ver, tanto ligandos endógenos liberados por células dañadas como ligandos exógenos procedentes de la microbiota intestinal son capaces de activar diferentes rutas inflamatorias que serán explicadas con detalle a continuación.

De gran importancia en la respuesta inflamatoria hepática son las células de Kupffer. Son macrófagos residentes localizadas en el lumen de los sinusoides hepáticos, englobando un 30% de las células sinusoidales¹⁸⁰. Debido a su origen, los marcadores de macrófagos F4/80, CD11b y CD68 son también marcadores representativos de células de Kupffer. Cuando estas células son activadas presentan marcadores de macrófagos de tipo 1 (proinflamatorios) o de tipo 2 (antiinflamatorios) en función del tipo de estímulo que reciben. El balance entre las KC de ambos tipos es un factor clave en el desarrollo de inflamación en el hígado¹⁹².

Las KC están expuestas a través de la circulación portal a numerosas sustancias como nutrientes o productos de bacterias derivadas del intestino, por ello juegan un papel tan importante en detectar y eliminar patógenos y partículas dañinas por medio de los receptores de reconocimiento de patrones (*pattern-recognition receptors*, PRRs). Estos receptores comprenden al menos dos familias de proteínas sensoras: los receptores tipo Toll (*Toll-like receptor*, TLR) y los receptores tipo Nod (*Nod-like receptor*, NLR), que detectan señales dañinas como las alarminas o DAMPs¹⁹³.

Los TLRs, representan uno de los factores principales en el inicio de la inflamación hepática en NAFLD, se ha demostrado que esto se debe a que en NAFLD aumenta la permeabilidad intestinal, lo que permite que moléculas señalizadoras puedan llegar con mayor facilidad al hígado y activar dichos receptores. Consecuentemente se activarán las KC que liberan una gran variedad de citoquinas y quimioquinas proinflamatorias¹⁷¹. Además, una de las características histológicas de NAFLD es la infiltración difusa de linfocitos y macrófagos. Todo esto se ha demostrado que tiene un gran poder inductor de RI e hígado graso¹⁸⁰.

Existe una gran cantidad de TLR, en particular la activación de TLR2, TLR4 y TLR9 induce varias citoquinas como TGF- β , IL-1 β y TNF α , lo que conduce a la acumulación de lípidos, la activación de HSC y la apoptosis hepática. Esta apoptosis conduce a una mayor activación de los TLR y a una mayor liberación de citoquinas, incluida la IL-6. Se ha demostrado que los TLR 4 y 9 inducen inflamación y fibrosis hepática a través de la

activación del inflamosoma. Además, los efectos de TLR4 son impulsados principalmente por las cascadas de NF- κ B y MAPK que regulan la inflamación, la resistencia a la insulina y la homeostasis metabólica¹⁷¹.

Existen un gran número de vías de señalización que desencadenan una respuesta inflamatoria pero las más relevantes son:

Factor nuclear κ B-I κ B quinasa. TNF α es capaz de estimular esta ruta para provocar la liberación de señales proinflamatorias. NF- κ B, se encuentra secuestrado por el inhibidor I κ B en el citoplasma. La activación de la ruta conduce a la fosforilación de I κ B y la consecuente liberación de NF- κ B que será traslocado al núcleo y podrá actuar sobre sus genes diana. Los AGs pueden activar esta ruta de señalización directamente o a través del estrés del RE y la desregulación mitocondrial, induciendo la sobreexpresión de citoquinas proinflamatorias como IL6 o TNF α . Los niveles séricos y en el hígado de IL6 se encuentran incrementados en pacientes con NASH, sin embargo, de TNF α solamente los niveles séricos se han visto incrementados en estos pacientes^{194, 195}.

Quinasa c-Jun N-terminal (JNK). JNK es una MAPK cuya fosforilación y consecuente activación conlleva la fosforilación el extremo N-terminal en los homodímeros c-Jun para formar heterodímeros c-Jun-c-Fos que se unirán a promotores de genes proinflamatorios. Como veremos más adelante, la señalización de JNK también puede ser activada por el estrés del RE e inhibe directamente la señalización de la insulina a través de la fosforilación de su receptor, evitando así, la fosforilación de IRS¹⁹⁶.

El inflamosoma. Es un gran complejo multiproteico que detecta señales de daño intracelular por medio de los NLR. El inflamosoma mediante la asociación con la procaspasa 1 media la escisión y activación de pro-IL1 β y pro-IL8. Los hepatocitos dañados pueden transferir señales de daño al regular la activación del inflamosoma en las células inmunes. De hecho, moléculas como el ATP y el ácido úrico, que se liberan de los hepatocitos dañados, activan inflamosomas en las KC del hígado en modelos murinos de NASH¹⁹⁷.

Macrófagos. El reclutamiento de macrófagos derivados de la médula ósea es un componente clave de la inflamación aguda y crónica y está relacionado con la regresión de la enfermedad hepática. Los macrófagos tradicionalmente son divididos según su fenotipo en proinflamatorios (M1), cicatrizadores de la herida (M2) e inmunosupresivos (macrófagos reguladores). Los macrófagos M1, son inducidos por interferón γ (IFN- γ), lipopolisacáridos (LPS) y TNF α y expresan citoquinas proinflamatorias como TNF α , IL6 e IL1; por lo que están implicados en la patogénesis de la inflamación hepática crónica. Los macrófagos M2 que son inducidos por IL4, IL10 y IL13; producen IL10, TGF- β , el factor de crecimiento derivado de plaquetas (*platelet-derived growth factor*, PDGF) y el factor de crecimiento epidérmico (*epidermal growth factor*, EGF); poseen efectos antiinflamatorios y promueven la cicatrización del daño hepático¹⁹⁸. La activación de macrófagos en el tejido adiposo precede a la activación de las células de Kupffer. El desequilibrio M1/M2 a favor de M1 y la consiguiente liberación de citoquinas proinflamatorias por las KC es un paso crítico para el desarrollo de NASH¹⁹⁹.

Antagonistas de quimioquinas. Son pequeñas proteínas secretadas que regulan la inflamación, la migración de leucocitos, la fibrosis y remodelado tisular y la angiogénesis. Incluyen a 45 ligandos y 22 receptores que se expresan en diferentes tipos celulares. Las KC son la mayor fuente de quimioquinas mediadoras en el daño hepático y NASH. Un buen marcador de la transición de esteatosis a NASH podría ser el ligando quimioquina 2 (*chemokine ligand 2*, CCL2) ya que sus niveles se encuentran incrementados en pacientes con NASH²⁰⁰.

El daño en el hepatocito seguido de la inflamación y la activación del sistema inmune innato conduce a la fibrosis hepática mediada por la activación de las HSC y la secreción

y deposición de matriz extracelular (MEC). Las HSC en estado quiescente se encuentran localizadas en el espacio de Disse, un espacio perisinusoidal entre los hepatocitos y las células endoteliales hepáticas. Estas células almacenan una gran cantidad de vitamina A, representando el mayor almacén de todo el organismo²⁰¹, además expresan FT adipogénicos como PPAR γ , receptor de adiponectina 1, perilipina 2, C/EBP δ , C/EBP α , C/EBP β y SREBP1c. La diferenciación de HSC en miofibroblastos se caracteriza por un descenso de la vitamina A y por la pérdida del fenotipo adipogénico. Las HSC activadas son la principal fuente de producción de MEC en la fibrosis hepática que se produce durante NASH y también contribuye a la inflamación hepática por medio de la liberación de citoquinas²⁰².

La activación de las HSC es el resultado de la actividad inflamatoria de las células inmunes del hígado, principalmente de los macrófagos. El TGF- β 1 derivado de macrófagos es capaz de activar a las HSC siendo el agonista fibrogénico más potente que se conoce¹⁸⁰. Los macrófagos hepáticos, tanto las KC como los reclutados de la médula ósea también potencian la fibrosis al promover la supervivencia de las HSC activadas mediante la vía de NF- κ β . En consecuencia, se ha visto que la inhibición de NF- κ β estimula la apoptosis de las HSC activadas de rata y humanas, inhibiendo la fibrosis hepática²⁰³. En la obesidad, la leptina también juega un importante papel en este proceso, estimula la expresión de TGF- β 1 en las KC promoviendo la activación de las HSC²⁰⁴.

5.3.8 Estrés del retículo endoplasmático

El RE es el lugar donde se sintetizan lípidos y esteroides, funciona como reservorio de calcio regulando las concentraciones celulares del mismo y, además, es el principal encargado de dar a una gran cantidad de proteínas una estructura activa, ya que es donde se llevan a cabo procesos como el plegamiento, ensamblaje, glicosilación y formación de enlaces disulfuro. El RE también juega un importante papel en la detoxificación ya que las enzimas del complejo citocromo P450 están asociadas a su membrana²⁰⁵. Cuando la célula está expuesta a compuestos tóxicos, el RE liso de los hepatocitos puede aumentar su superficie para la eliminación de dichos compuestos. Si por algún motivo, la cantidad de proteínas inmaduras que llegan al RE sobrepasa su capacidad o se agotan las reservas de calcio, las funciones del RE se verán alteradas. Esta condición es conocida como estrés del RE, cuando esto ocurre, la célula dispone de un sistema de transducción de señales conocido como respuesta a proteínas mal plegadas (unfolded protein response, UPR) (Imagen 7).

El sistema UPR consta de 3 rutas de señalización intracelulares que pueden ser activadas por proteínas localizadas en la membrana del RE, como la quinasa del FT pancreático del retículo endoplasmático iniciador de la traducción eucariota (*RNA-dependent protein kinase-like ER eukaryotic initiation factor-2 α kinase*, PERK), el FT activante 6 (*activating transcription factor 6*, ATF6) y la enzima dependiente de inositol (*inositol-requiring enzyme-1*, IRE1)²⁰⁵.

El objetivo de la activación de la UPR es restablecer el buen funcionamiento del RE, lo que conlleva varias acciones como la degradación de las proteínas mal plegadas o aumentar la expresión de las enzimas plegadoras o chaperonas, todo esto con el fin de mantener la supervivencia celular. Sin embargo, cuando la perpetuación del estrés del ER no se puede bloquear/restaurar, la UPR conduce a una serie de eventos patológicos como la activación de la respuesta inflamatoria y de la muerte celular¹⁷¹.

En una célula normal, los tres sensores se mantienen inactivos a través de su asociación con la proteína regulada por glucosa 78 (*glucose-regulated protein 78*, GRP78, también conocida como BiP), la principal chaperona del RE crítica en el control de la calidad de las proteínas y en el control de la activación de la respuesta UPR.

Cuando se produce una alteración en la homeostasis celular como la privación de nutrientes, la acumulación excesiva de lípidos o una gran acumulación de proteínas mal plegadas, GPR78 se libera y secuestra a las proteínas mal plegadas, lo que permite la activación de la UPR. Esto hará que se inicie una cascada de respuestas que llevan a la atenuación de la traducción de proteínas, la regulación positiva de proteínas de empaquetamiento y la degradación de proteínas mal plegadas a través de los componentes de degradación asociados al RE (*ER-associated degradation*, ERAD) tratando así de reestablecer la homeostasis del RE²⁰⁶.

IRE1 α cuando se disocia de GPR78, dimeriza y se autofosforila, promoviendo su actividad endorribonucleasa, lo que provoca la escisión del ARNm de la proteína 1 de unión a *X-box* (*X-box binding protein 1*, XBP1), generando la forma escindida y activa XBP1s. Además, la expresión de XBP1 aumenta a través de ATF6, proporcionando un sustrato adicional para IRE1.

ATF6, tras la disociación de GPR78, se traslada al aparato de Golgi donde unas proteasas cortarán su extremo C-terminal. El fragmento generado, pasará al núcleo para activar la transcripción uniéndose a elementos de respuesta ATF/cAMP (*cAMP-response element*, CRE) y a elementos de respuesta a estrés del RE (ERSE). Además, ATF6 también puede activar elementos ERAD a través de su dimerización con XBP1s²⁰⁷.

PERK, es una de las cuatro quinasas que pueden fosforilar a eIF2 α (*α -subunit of the translocation initiation factor*). Este proceso es fundamental para la supervivencia celular ya que limita la cantidad de proteínas mal plegadas y el consiguiente incremento del estrés oxidativo. Uno de los genes clave que se activa es el FT 4 (ATF4), el cual induce la expresión de genes responsables de la respuesta antioxidante, del metabolismo de los aminoácidos y de la apoptosis, como la proteína homóloga de C/EBP (*C/EBP homologous protein*, CHOP)²⁰⁷.

5.3.8.1 UPR EN EL DESARROLLO Y PROGRESIÓN DE NAFLD

El papel de RE en los hepatocitos es de gran relevancia debido a su especial importancia en la síntesis y secreción de proteínas plasmáticas (albúmina, globulinas, fibrinógeno, etc.), ensamblaje y secreción de VLDL, síntesis de colesterol y en el metabolismo de xenobióticos; lo que hace tenga una gran extensión de este orgánulo celular¹⁷¹.

Como no podía ser de otra manera, los sensores del estrés del RE desempeñan un importante papel en el metabolismo lipídico hepático, así como en el desarrollo de esteatosis y de RI hepática. Esto se debe a que en enfermedades como la obesidad y NAFLD, la capacidad de respuesta al estrés del RE se encuentra comprometida. Esto se ha demostrado en diferentes modelos de ratón con obesidad y esteatosis inducida por la dieta y en modelos genéticos. Posteriormente también ha sido confirmado en pacientes con NAFLD y NASH^{208, 209}.

Además, muchas de las rutas de señalización que son activadas como respuesta al estrés del RE promueven la acumulación lipídica en el hígado. En ratones *ob/ob*, la esteatosis provoca estrés del RE, lo que conduce a la escisión de los FT SREBP1 y SREBP2, encargados de activar la LDN y el metabolismo del colesterol respectivamente. La sobreexpresión de GPR78 en los hígados de estos ratones, redujo la activación de los FT mencionados, así como los niveles de TG hepáticos y de colesterol, además mejoró notablemente la sensibilidad a insulina en dichos ratones²¹⁰.

Más concretamente varias de las rutas de la UPR poseen importantes roles en la estimulación de la lipogénesis y un gran poder promoviendo la esteatosis hepática. Los ratones KO para ATF4 están protegidos contra la obesidad inducida por la dieta, la esteatosis y la hipertrigliceridemia al tener reducida la expresión de PPAR γ , SREBP1c,

ACC y FAS. El mantenimiento prolongado del estrés del RE da lugar a una elevada expresión de CHOP, lo que provoca la inhibición C/EBP α , activador de importantes reguladores del metabolismo lipídico y participando, por lo tanto, en la generación de la esteatosis. Además, la disminución en la fosforilación de eIF2 α se correlaciona con una reducción de la expresión del FT PPAR γ y de sus reguladores *upstream* C/EBP α y C/EBP β ²¹¹.

Por otro lado, la vía IRE1 α -XBP1 es necesaria para el mantenimiento de la homeostasis lipídica en el hígado en condiciones de estrés del RE. Ratones con una delección de IRE1 α en los hepatocitos específicamente desarrollan esteatosis severa después de un tratamiento inductor de estrés del RE, esto se debe a la disminución en la expresión de los FT, C/EBP α , C/EBP β y PPAR γ . Esta vía también desempeña un papel importante en el ensamblaje y secreción de VLDL hepáticas.

En los hepatocitos, XBP1 regula la LDN mediante la unión directa a los promotores de genes lipogénicos como ACC2, SCD1 y DGAT2 promoviendo su activación. Por lo que la delección en hígado de ratón de esta proteína provoca la reducción de la LDN y de la cantidad de TGs, AG libres y colesterol en suero²¹².

Por último, la vía de ATF6 también desempeña un importante papel en la regulación de la acumulación de lípidos inducida por estrés del RE. Un estudio en hepatocitos ha demostrado que ATF6 es capaz de inhibir la acción lipogénica de SREBP2¹⁰⁶ y, además, ratones deficientes en ATF6 desarrollan esteatosis cuando se mantienen en condiciones prolongadas de estrés²¹³.

Además de todos estos efectos en relación a la regulación lipogénica del hígado, las diferentes vías UPR poseen la capacidad de controlar otras respuestas y acontecimientos celulares de gran relevancia para el desarrollo de NASH como son la inflamación, la apoptosis y la disfunción mitocondrial.

5.3.8.2 Inflamación

El vínculo entre el estrés del RE y la inflamación ha quedado reflejado en numerosos estudios y se produce a través de la activación de JNK y NF κ B y por la producción de

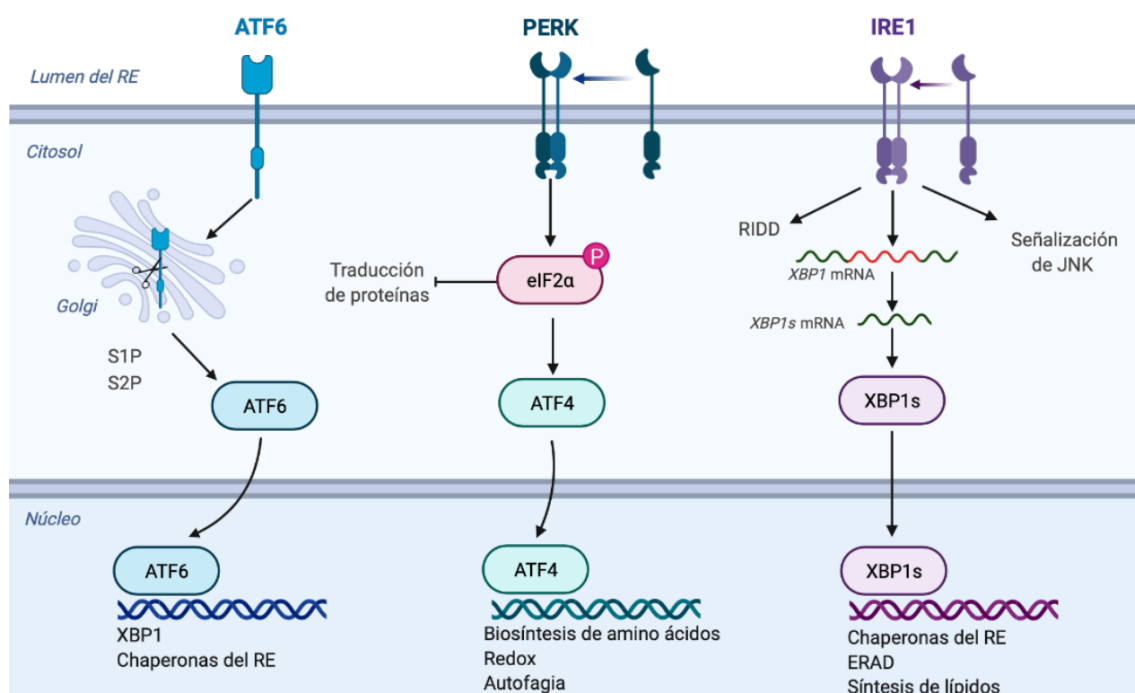


Imagen 7. Principales rutas de la UPR (Elaboración propia).

ROS y ácido nítrico^{214, 215}. La vía de IRE1 α además de regular la adaptación al estrés del RE a través de la escisión de XBP1 también es capaz de activar rutas de señalización relacionadas con la inflamación y apoptosis. Cuando es activada, es capaz de activar quinasas de estrés como JNK promoviendo la vía de NF κ B²¹⁵.

5.3.8.2 Apoptosis

El estrés del RE crónico puede desencadenar en la apoptosis de los hepatocitos a través de tres mecanismos: (1) activación de CHOP, (2) activación de la señalización de las quinasas JNK y (3) alteraciones en la homeostasis del calcio. Las vías de PERK y ATF6 inducen la activación de CHOP, considerada una de las proteínas proapoptóticas mejor reguladas en UPR²¹⁶. Además, como se ha mencionado anteriormente la activación de IRE1 α puede desencadenar en la apoptosis por medio de la activación de JNK y NF κ B²¹⁷.

5.3.8.3 Disfunción mitocondrial

La sobrecarga de lípidos influye en la composición de la membrana celular. Se ha visto en ratones obesos incrementada la ratio fosfatidilcolina/fosfatidiletanolamina, lo que provoca una alteración en la fluidez de la membrana y en consecuencia de la homeostasis del calcio²¹⁸ y como hemos visto esto puede activar las vías apoptóticas. CHOP de forma indirecta provoca la desforilación de eIF2 α lo que conduce a que las proteínas puedan continuar sintetizándose y entrando prematuramente en el RE para plegarse. La entrada de proteínas en el RE durante condiciones de estrés, puede producir ROS, es lo que se conoce como plegamiento oxidativo de las proteínas. Por otro lado, la vía de PERK puede activar un programa antioxidante para limitar la producción de ROS a través de la fosforilación de Nrf2, que se traslocará al núcleo donde activará la expresión de enzimas antioxidantes²⁰⁷.

Como hemos visto el papel que juega el estrés del RE en el desarrollo y la progresión de NAFLD es muy complejo, siendo al mismo tiempo una posible causa y una consecuencia de la excesiva acumulación de lípidos en los hepatocitos. Lo que sí está claro es que el RE constituye un orgánulo clave en el control de la inflamación, la muerte celular y el metabolismo lipídico y que el estrés del RE crónico produce consecuencias agravantes claves en la progresión de la patología, como la alteración de la síntesis de lípidos y colesterol agravando la disfunción mitocondrial y la homeostasis del RE o la liberación de citoquinas proinflamatorias e inductores apoptóticos.

Todos estos procesos contribuyen al daño y la muerte hepatocelular, promoviendo la fibrogénesis y la proliferación de progenitores de hepatocitos para compensar la pérdida de los mismos, lo que se considera un proceso clave en la progresión de NAFLD a NASH e incluso en el desarrollo de cirrosis y HCC²¹⁹.

6 p107 Y SU FUNCIÓN EN EL METABOLISMO

6.1 LA FAMILIA PROTEICA DE LAS *POCKET PROTEIN*

El gen del retinoblastoma (*Rb*) fue identificado como el gen cuya pérdida producía retinoblastoma hereditario en niños y fue el primer gen supresor de tumores reconocido y clonado^{220, 221}. El gen codifica la proteína del retinoblastoma (pRB, RB o RB1), un

regulador central del ciclo celular y el miembro fundador de la familia proteica *Pocket protein* (PP) de la que también forman parte p107, codificado por el gen *RBL1*²²² y p130 (*RBL2*)²²³. p107 y p130 comparten un 54% de identidad en la secuencia entre sí y un 30% con RB, además estas proteínas comparten una región estructural característica, esta es el dominio *Pocket*, se trata de una estructura que se encuentra dividida en dos regiones en RB y en tres en p107 y p130²²⁴ (Imagen 8).

Los principales FT con los que fueron relacionadas estas proteínas han sido los E2F. Estos FT regulan el ciclo celular de los mamíferos controlando la expresión de genes necesarios para la síntesis de ADN y la división celular. La actividad de los E2F es regulada por los miembros de la familia PP, los cuales cuando se encuentran en un estado hipofosforilado y por tanto sus dominio *Pocket* desplegados, son capaces de unirse a los E2F y así impedir la interacción de los mismos con sus genes diana. La disociación del complejo PP-E2F se induce mediante la fosforilación en varios residuos Ser/Thr del dominio C-terminal de las PP por quinasas dependientes de ciclinas (*cyclin-dependent kinase*, CDK)²²⁵ o por la unión de proteínas virales como el antígeno T SV40²²⁶ o la proteína E7 del virus del papiloma humano²²⁷. En este sentido, la actividad de las PP está modulada por su estatus de fosforilación, un estado hiperfosforilado debido a la acción de determinadas CDK inactiva la acción de las PP, sin embargo Ser/Thr fosfatasas (PP1 Y PP2A) son las responsables de la desfosforilación y la consecuente activación de las pp²²⁸.

La familia de los E2F contiene ocho miembros, cinco de los cuales forman complejos con PP. E2F1-3 se asocian con RB y son potentes activadores de la transcripción durante las fases G₁ y S del ciclo celular²²⁹. E2F4 se encuentra formando complejos con todas las PP y típicamente potencia la expresión de genes represores, aunque algunos estudios sugieren que podría promover la proliferación en ciertos contextos durante el desarrollo, actuando a través de la asociación con otros FT²³⁰.

Observaciones genéticas sugieren funciones distintas para las PP. Por ejemplo, solo la delección de RB es letal desde etapas embrionarias en ratón²³¹, RB es un supresor tumoral mucho más potente en modelos de cáncer de ratón²³², y sus mutaciones son frecuentemente observadas en diferentes tipos de cáncer humano²³³. Sin embargo, ratones KO para p107 o p130 resultan en un fenotipo viable y no desarrollan tumores espontáneos²³². Hasta ahora, la única delección observada de p107 ha sido encontrada en desórdenes mieloproliferativos, donde una larga región del cromosoma 20q que contiene hasta 115 genes se encuentra delecionada²³⁴. Una posible explicación para eso es que, en condiciones normales RB es la única que forma complejos con los E2F activadores (E2F1-3)²³⁵.

La unión a diferentes E2F hace que controlen el ciclo celular en diferentes fases y de formas muy diferentes, por ejemplo, RB tiene la habilidad de estabilizar el inhibidor de CDK p27, promoviendo la apoptosis y manteniendo la estabilidad genómica²³⁵. Por otro lado, p107 y p130 actúan por sí mismos como inhibidores de CDK y promueven la quiescencia a través de su incorporación en el complejo DREAM, un complejo proteico que reprime la expresión de genes del ciclo celular cuando la célula se encuentra en un estado quiescente a través de la unión de proteínas estructurales MuvB con E2F4/5 y p107 o p130²³⁶.

Además, las PP pueden mediar la represión de la transcripción a través del reclutamiento de modificadores de histonas como histonas desacetilasas²³⁷ e histonas metilasas²³⁸.

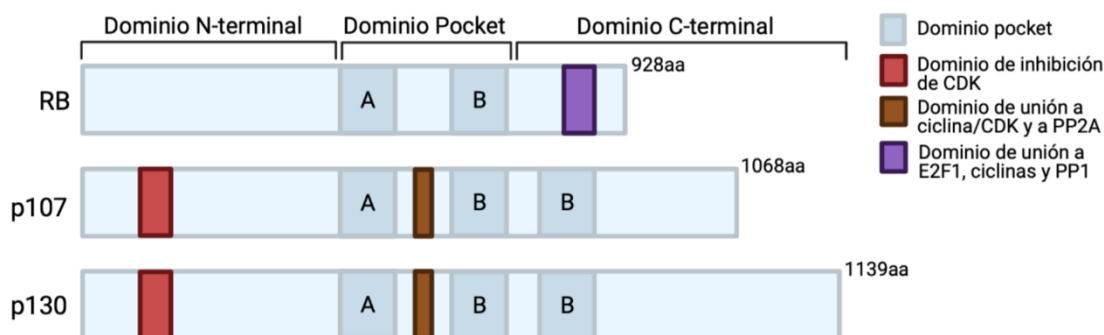


Imagen 8. Estructura y dominios de las *pocket protein* (Elaboración propia).

6.2 FUNCIONES DE P107

6.2.1 p107 y la regulación del ciclo celular

p107, fue identificada a través de su interacción con el antígeno T SV40 grande y con el adenovirus E1A²³⁹. Estructuralmente, p107 posee una mayor homología en su secuencia con p130. Ambos contienen las regiones A y B del dominio *pocket* separadas por una región espaciadora y la región B dividida en dos regiones. También, tienen distintos dominios de unión a ciclinas diferentes a los de RB y contienen un dominio inhibidor de CDK en la región N-terminal del que también carece RB (Imagen 8).

A diferencia de RB y p130, los niveles de p107 son generalmente, pero no siempre, bajos en quiescencia y células diferenciadas y elevados en células proliferativas^{240, 241}.

Podemos encontrar moléculas de p107 tanto en el citoplasma como en el núcleo en varios tipos celulares, predominando en los más proliferativos²⁴². Mientras que los complejos p130/E2F4 los encontramos principalmente en las fases G₀ y G₁, los p107/E2F4 incrementan después de G₁ y a lo largo de la fase S²⁴³. Estos datos sugieren que p107 puede reclutar FT desde el citoplasma y el núcleo para regular la transcripción a nivel de promotor de diferentes genes.

De las tres PP, p107 es la más fuertemente regulada a nivel transcripcional²⁴⁴. p107 es una diana de E2F, conteniendo dos sitios para la unión de estos FT en su promotor²⁴⁵. Por ello, tras la delección de RB y el consecuente incremento en la actividad de E2F provoca un incremento de expresión de p107, siendo capaz de compensar la pérdida de RB en ciertos contextos²⁴⁶.

p107, como p130 y RB, son un sustrato para la actividad kinasa de CDK/ciclina durante la progresión del ciclo celular, lo que provoca la liberación de los FT E2F de p107 y en consecuencia la represión de los promotores de los genes diana^{247, 248}.

En células quiescentes, p107 se expresa normalmente a bajos niveles y se encuentra hipofosforilada al igual que RB, p107 se fosforila a medida que la célula progresa hacia la fase S^{249, 250}. Así, los niveles más altos de p107 en dicha fase se encuentran cuando la proteína está funcionalmente desactivada debido a su fosforilación. Después de la fase S, p107 permanece fosforilada a lo largo del ciclo celular hasta la llegada a la siguiente fase G₁, donde es desfosforilada por PP2A, y puede unirse de nuevo a E2F²⁵¹⁻²⁵³.

Como ya se ha dicho p107 se une preferentemente a E2F4 y E2F5, pero en caso de producirse la ausencia de RB, p107 podría realizar una función compensatoria y unirse y formar complejos con E2F1-3²⁵⁴.

p107 y p130 pueden unirse e inhibir a los complejos kinasa ciclinaE/CDK2 y ciclina A/CDK2 a través de la región espaciadora entre los dominios *pocket* A y B que no está presente en RB^{248, 255, 256}. Además de esta región, poseen un dominio en la parte amino-terminal que también puede inhibir la actividad kinasa de ciclinas/CDK de forma similar a los inhibidores de kinasas dependientes de ciclinas p21 y p27^{257, 258}. Por lo tanto, los complejos p107/Ciclina/CDK pueden ser encontrados en la célula unidos a complejos E2F4/DP o por sí solos²⁵⁸.

A través de su región N-terminal, p107 también puede unir otros FT como Sp1 reprimiendo su activación transcripcional²⁵⁹ o a Smad3 en respuesta a la señalización de TGFβ. En este contexto p107 sirve como un adaptador necesario para la entrada en el núcleo de complejos E2F4-5/D y Smad3, una vez en el núcleo todo el complejo se une al promotor de *c-Myc* y reprime su transcripción²⁶⁰. Además, se ha visto en ensayos de transfección transitoria que p107 también es capaz de unirse directamente a *c-Myc* a través del dominio *pocket* evitando su transactivación^{261, 262}.

6.2.2 Papel de p107 en el desarrollo

Al igual que RB, p107 también ha sido implicado en la regulación del desarrollo de numerosos tipos celulares. Para entender estas funciones ha sido clave la utilización de modelos de ratones mutantes para p107.

El ratón deficiente en p107 con fondo mixto (129/Sv:C57/BL6) es viable y fértil, y los fibroblastos embrionarios de ratón (*mouse embryonic fibroblast*, MEF) derivados de este animal no muestran ningún defecto significativo en el ciclo celular²⁶³. Sin embargo, el ratón deficiente en p107 con un fondo Balb/c presenta una severa deficiencia en el crecimiento postnatal, así como una hiperplasia mieloide en el bazo y el hígado. Los MEF y mioblastos derivados de estos ratones muestran un incremento en la proliferación asociado con una expresión constitutiva de la Ciclina E²⁶⁴. Además, muestran una reducción en la diferenciación del TAB debido a que RB no es capaz de incrementar su expresión, algo necesario para iniciar la diferenciación in vivo a través de la interacción con PGC1α¹⁰⁰.

Embriones doble KO para p107 y p130 mueren al nacer con múltiples defectos en el desarrollo de tejidos. Esos defectos pueden ser debidos a una disminución en los niveles de moléculas imprescindibles como la proteína BMP y p63 en la epidermis, lo que sugiere un papel en el desarrollo epitelial para p107 y p130²⁶⁵.

p107 también ha sido implicada en el control del desarrollo del hueso y del cartílago, los embriones de ratón doble KO p107^{-/-}; p130^{-/-}, al igual que el p107^{-/-}; p21^{-/-} presentan defectos en osificación de huesos largos y en la proliferación de condrocitos^{266, 267}. En el cerebro del ratón adulto la expresión de p107 solo se produce en células progenitoras en ciclo en la zona ventricular y su expresión disminuye cuando estas células se van diferenciando en neuronas corticales²⁶⁸.

Estudios recientes también han descubierto funciones de p107 solapadas con RB durante el desarrollo. La pérdida adicional de p107 en ratones KO para RB acorta la esperanza de vida de los embriones a un estadio E14.5, debido a un incremento anormal en los niveles de proliferación y apoptosis en el SNC, además provoca defectos en el desarrollo del corazón, fenómenos que no se observan en embriones deficientes en RB o p107 por sí solos²⁶⁹. Por lo tanto, p107 puede compensar parcial o completamente la pérdida de RB en varios tejidos durante el desarrollo.

Un ejemplo de la compensación de la pérdida de RB por p107 es mostrado en un estudio en el que, un solo alelo de p107 es suficiente para funcionar como supresor tumoral en ratones con mutación de RB en la epidermis, previniendo así el desarrollo de tumores a pesar de presentar hiperplasia epidérmica e hiperqueratosis²⁷⁰. Otro claro ejemplo de la compensación, al menos parcial, por parte de p107 tras la pérdida de RB se puede ver en el control del desarrollo de células α y β pancreáticas. Se sabe que RB no es imprescindible en células β maduras, posiblemente debido a la compensación por p130^{271, 272}. Sin embargo, la delección de RB en progenitores pancreáticos mejora la tolerancia a la glucosa debido a un incremento en la proliferación y diferenciación de células β , pero interrumpe la proliferación y supervivencia de células α ²⁷³. Por otro lado, mientras que p107 por si solo no tiene un papel esencial en la homeostasis de los islotes, cuando se combinan las delecciones de RB y p107 en islotes proliferativos tampoco se produce ningún efecto a mayores de lo explicado anteriormente, sin embargo, se acentúa la apoptosis de células α y β asociada al envejecimiento, provocando una mayor intolerancia a la glucosa y la disminución de la densidad de islotes²⁷⁴.

Sin embargo, p107 no es capaz de compensar la pérdida de RB en todos los contextos ni tejidos, lo que sí está claro es que en cierto modo las PP poseen algunas de sus funciones solapadas o al menos respaldadas entre ellas, lo que les confiere cierta flexibilidad en caso de verse expuestas a mutaciones.

Como ya hemos visto en varios ejemplos expuestos con anterioridad las PP realizan importantes funciones en la diferenciación y el desarrollo de diferentes tipos celulares y tejidos. Es de especial importancia desde el punto de vista de la homeostasis energética su papel en la diferenciación de preadipocitos.

Ya desde finales del pasado siglo sabemos que todas las PP se encuentran implicadas en la regulación de este mecanismo. RB fue el primer ejemplo de proteína con funciones opuestas en la adipogénesis blanca y marrón, siendo su expresión indispensable para la diferenciación en un adipocito blanco²⁷⁵⁻²⁷⁷. RB se encuentra en el núcleo de precursores adipocitarios blancos, pero no en marrones. Además, se fosforila rápidamente y en consecuencia se inactiva en TAM de ratones expuestos a frío ya que este proceso promueve una significativa neodiferenciación del TAM. También se reduce la expresión de RB tras la transdiferenciación de adipocitos blancos retroperitoneales a adipocitos con características de tipo marrón inducida por la estimulación mediante agonistas β_3 ²⁷⁸.

Posee efectos tanto inhibitorios como estimulantes en la adipogénesis del adipocito blanco. Por un lado, hay evidencias de que la forma activa de RB actúa como correpressor transcripcional de PPAR γ , un receptor nuclear de gran importancia en la adipogénesis²⁷⁹ y por otro lado, se ha demostrado que las células precursoras de adipocitos blancos que carecen de RB muestran una diferenciación defectiva en respuesta a estímulos hormonales^{100, 280}, algo que puede ser evitado por la activación inducida por ligando (rosiglitazona) de PPAR γ ²⁷⁹.

La actividad de RB podría facilitar la adipogénesis al desencadenar la salida permanente del ciclo celular requerida para la diferenciación terminal²⁸¹, al potenciar, a través de su interacción directa, la activación transcripcional de C/EBP²⁸², y a través de efectos en la ruta de kinasas activadas por mitógenos²⁸³.

Además, RB parece tener un efecto inhibitorio específico en la adipogénesis marrón y ha sido propuesto como interruptor molecular entre la diferenciación a adipocito blanco o marrón²⁷⁸. RB interactúa con E2F para unirse al promotor de PGC1 α y reprimir su transcripción, inhibiendo así la expresión de UCP-1 y haciendo que el preadipocito se diferencie a un adipocito blanco¹⁰⁰.

Unos años más tarde también se demostró como p107 y p130 ejercen un importante papel en la diferenciación adipocitaria. Su expresión se encuentra regulada

diferencialmente durante el desarrollo de la línea de preadipocitos 3T3-L1 encontrando altos niveles de p130 y bajos de p107 en el día 0 de preadipocito quiescente y lo opuesto en el día 1 (24 horas tras la inducción hormonal de la diferenciación) con un incremento importante en la expresión de p107 y la reducción de p130. Durante los días 2 y 4 este cambio en la expresión comienza a revertirse y ya en el día 4 donde el adipocito se encuentra en un estado quiescente estas proteínas vuelven a los niveles encontrados en el día 1²⁸⁴.

En un principio se pensó que el incremento en la expresión de p107 en el día 1 era indispensable para llevarse a cabo la fase de expansión clonal mitótica, proceso que ocurre en las primeras 24 horas después de haberse inducido la diferenciación²⁸⁵, sin embargo estudios adicionales en los cuales la expresión de estas proteínas fue analizada después de desacoplar la expansión clonal de la diferenciación, revelaron que p107 está asociado con la diferenciación terminal del adipocito y no con la fase de expansión clonal, mientras que p130 está más asociado con la expansión clonal y no con la diferenciación terminal²⁸⁶. Esto fue confirmado también en células madre derivadas de tejido adiposo humano donde vieron que los niveles de p107 mostraron el mismo incremento transitorio que el visto en las células 3T3-L1, sugiriendo que p107 también posee una función en la diferenciación de adipocitos humanos²⁸⁷.

Diversos estudios ponen de manifiesto también a p107 como un importante regulador del linaje final de preadipocitos y en los últimos años ha sido postulada como correpresor del programa termogénico derivado de Prdm16. Las células madre deficientes en p107 dan lugar a adipocitos de tipo marrón, además la programación a fenotipo marrón inducida por Prdm16 en MSC mostró niveles muy bajos de p107. De hecho, Prdm16 suprimió la expresión de p107 al unirse directamente a su promotor. Además, la expresión sostenida de p107 bloqueó la capacidad de Prdm16 para inducir la expresión de los genes del adipocito marrón⁹⁶. Demostrando que la expresión de p107 en células madre compromete a las células a desarrollar un linaje de adipocito blanco.

6.2.3 p107 y regulación metabólica

Además de todas las funciones mencionadas anteriormente, durante los últimos años se ha visto cierta implicación por parte de estas proteínas en la regulación del metabolismo, siendo en consecuencia de gran importancia en el control del balance energético.

Ya son numerosas las evidencias de la implicación de la PP RB en este aspecto. En humanos, el tejido adiposo de sujetos obesos independientemente de que tuviesen diabetes tipo 2 o no mostró bajos niveles de expresión de RB. La expresión de RB se encuentra positivamente asociada con la expresión de marcadores adipogénicos (Pparc, IRS1) y lipogénicos (FAS, ACC) en TAB, pero está asociada negativamente con el IMC, la glucosa en suero o los niveles de insulina²⁸⁸. Algo similar se encontró en un modelo de ratón con obesidad inducida por la dieta, donde la inactivación o delección de RB en tejido adiposo conduce a un fenotipo antiobesogénico²⁸⁹⁻²⁹¹.

Los ratones Rb+/- expuestos a HFD presentan un fenotipo más delgado que los controles WT, ya que la haploinsuficiencia de Rb mejora la sensibilidad a la insulina, la tolerancia a la glucosa y aumenta el gasto energético y el programa termogénico en TAB epididimal (TABep)^{289, 290}. Sin embargo, el efecto antiobesogénico y la reducción del TAB inducida por la haploinsuficiencia de Rb aparece solo en ratones maduros no en jóvenes²⁹⁰.

La inhibición específica de Rb en adipocitos produce un fuerte efecto protector frente a la obesidad, mostrando estos ratones tras ser expuestos a HFD menor peso corporal, menos TAB y menores niveles de leptina en suero que sus correspondientes controles.

Este efecto protector frente a obesidad inducida por la dieta fue consecuencia de un aumento en el gasto energético debido a un incremento de la biogénesis mitocondrial y de la actividad de genes termogénicos como *Ucp1*, *Pgc1 α* y *Ppar γ* en TAB y TAM²⁹¹.

Como hemos mencionado anteriormente, la expresión y la actividad de Rb en el tejido adiposo se encuentra incrementada en obesidad, y su inactivación protege contra el desarrollo de la enfermedad. Sin embargo, la expresión de Rb en el hipotálamo se encuentra inhibida en un modelo de obesidad inducida por la dieta, por lo que Rb podría actuar en el hipotálamo como un supresor de la obesidad²⁹².

Además, en células musculares, el silenciamiento de Rb mediante ARNsi potencia el metabolismo oxidativo mitocondrial, así como la eliminación de AG y glucosa y disminuye la acumulación de lípidos intracelulares. En este modelo han visto que el silenciamiento de Rb provocó un incremento de un 200% en la expresión de p107, por lo que se concluyó que algunos de estos efectos se encuentran mediados por el consecuente aumento en la expresión de p107. Por ello, estudiaron la inhibición de p107 en una línea celular de miotubos y demostraron que, tanto por sí sola como junto con el cosilenciamiento de Rb, se provocó una disminución significativa de Cd36 y Pdk4²⁹³.

Por ahora no conocemos demasiado el papel de p107 en la regulación metabólica, uno de los primeros campos en donde se le atribuyó un rol en el control del metabolismo es en la diferenciación adipocitaria. Se demostró que p107 juega un papel importante en el control bioenergético y en el estado metabólico de los progenitores adipocitarios. En estas células, el silenciamiento de p107 conduce a la glucosa a la formación de lactato a través de un mecanismo que implica un incremento en la expresión de LDHa y PDK2, una disminución de la capacidad de partición de NADH de la glucólisis a las mitocondrias y un aumento de la capacidad oxidativa mitocondrial de sustratos distintos de la glucosa mientras la proliferación celular se encuentra detenida²⁹⁴. El lactato, puede actuar como inductor del linaje marrón en progenitores adipocitarios²⁹⁵, por lo que esta es otra vía por la que la ausencia de p107 podría promover la formación de adipocitos marrones o beige en lugar de adipocitos blancos. Además, p107 podría también regular estos procesos de forma epigenética. Se sabe que la utilización de diferentes nutrientes dentro de las vías metabólicas puede controlar en cierto modo los programas epigenéticos, por ejemplo, el Acetil-CoA que proviene del piruvato como producto final de la glucólisis o por medio de la β -oxidación de AG, es un componente esencial para la enzima modificadora de histonas, histona acetiltransferasa (HAT)²⁹⁶. De hecho, p107 se asocia con Suv39h1, una metiltransferasa que metila la histona 3 (H3K9) y provoca la represión de diversos genes²⁹⁷. Curiosamente, recientemente se ha demostrado que la desmetilación de la lisina 27 de la histona 3 es necesaria para el desarrollo del TAM²⁹⁸. Aunque esto último debería ser más profundamente estudiado.

La relevancia de p107 en modelos in vivo en relación a su función en la homeostasis metabólica todavía no está clara. Los datos obtenidos hasta ahora, se limitan a un único estudio en un modelo de ratón KO global para p107 con fondo genético *Balb/c*. En este modelo se vio como la disminución global de p107 conduce a una disminución en el tamaño de los diferentes depósitos de TAB. Estos ratones también tienen un fenotipo más delgado, incluso cuando fueron expuestos a HFD durante 8 semanas, pero sus hígados no mostraron ninguna alteración. Estos cambios se cree que fueron debidos a un aumento de la oxidación de lípidos en el músculo esquelético. En este estudio de nuevo se ve como p107 actúa como correpresor de PGC1 α uniéndose a su promotor, pero en este caso en células musculares. Es por ello, que el silenciamiento de p107 promueve la formación de fibras musculares de tipo prooxidativo a través de un incremento en la expresión de PGC1 α ²⁹⁹.

Recientemente, un estudio en humanos evaluó la asociación de RB y p107, con la adaptación mitocondrial inducida por el ejercicio de resistencia en el músculo esquelético humano. Se demostró que los niveles de p107, pero no de RB, disminuyen a las 3 semanas de entrenamiento en intervalos de alta intensidad. Además, encontraron una correlación inversa entre la expresión de p107 y la fosforilación oxidativa mitocondrial, así como con los complejos de la cadena de transporte electrónico mitocondrial después de 9 sesiones de entrenamiento. Esto le da a p107 una importante función en el proceso de adaptación al ejercicio en el músculo esquelético humano³⁰⁰.







HIPÓTESIS



Nosotros hipotetizamos que p107 podría estar implicado en la regulación del metabolismo energético global y que su inhibición podría prevenir del desarrollo de obesidad y MAFLD.







OBJETIVOS



Los objetivos propuestos en la presente tesis doctoral son los siguientes:

1. AVERIGUAR LA IMPLICACIÓN DE P107 EN EL METABOLISMO ENERGÉTICO Y SU RELACIÓN CON LA TERMOGÉNESIS
2. ESTUDIAR LAS ACCIONES DE P107 EN EL METABOLISMO LIPÍDICO EN EL HÍGADO DE RATONES ALIMENTADOS CON DIETA NORMAL
3. ESTUDIAR LAS ACCIONES DE P107 Y LOS POSIBLES MECANISMOS SOBRE EL METABOLISMO LIPÍDICO EN EL HÍGADO DE RATONES EN UN MODELO DE OBESIDAD INDUCIDA POR DIETA Y EN HEPATOCITOS DE RATÓN
4. ANALIZAR LAS VARIACIONES DE P107 EN MODELOS DE NASH Y FIBROSIS
5. ESTUDIAR LAS IMPLICACIONES DE P107 EN METABOLISMO LIPÍDICO EN CÉLULAS HUMANAS
6. ESTUDIAR LA IMPLICACIÓN DE P107 EN HÍGADO DE HUMANOS CON NAFLD Y NASH





MATERIAL Y MÉTODOS



1 ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Todos los experimentos con animales han sido revisados y aprobados por el comité ético de la universidad de Santiago de Compostela (procedimiento de la Dra. Sulay Tovar Carro; 15010/17/002) de acuerdo con la normativa europea y española para el uso de animales de experimentación animal; realizado, por tanto, en cumplimiento de la 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 de España 1201/2005, del 10 de octubre, sobre la protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos.

En vista de las condiciones éticas asociadas con el uso de animales, los diseños experimentales se realizaron teniendo en cuenta el principio de las tres R (reemplazo, reducción y refinamiento). En base a estos principios, a lo largo de la realización de esta tesis doctoral, se aseguró que los procedimientos realizados fueran aquellos que: implicaran el uso mínimo de animales, afectara lo mínimo a la capacidad de sentir dolor, sufrimiento, angustia o daño duradero y, por tanto, tuvieran mayores probabilidades de producir resultados satisfactorios.

Debido a la naturaleza y perspectiva fisiológica del estudio se limitó seriamente la posibilidad del reemplazo del uso de animales. La homeostasis energética implica la comunicación de los tejidos periféricos con el SNC a través de señales que transcurren por el torrente sanguíneo; por ello, la sustitución de los modelos animales no se consideró factible. Sin embargo, si se redujo al mínimo el número de roedores utilizados en cada experimento.

1.1 MODELOS ANIMALES

Para el desarrollo de este trabajo se han utilizado los siguientes animales de experimentación:

1) Ratón macho adulto de entre 5 y 6 semanas de edad y un peso aproximado de 25g de la cepa C57BL6 procedentes del animalario central de la Universidad de Santiago de Compostela.

2) Ratones hembras y macho KO para el gen *Rb11* (Suministrados por el Doctor Anxo Vidal, del CIMUS-Universidad de Santiago de Compostela) y sus controles de tipo salvaje (*wild type*, WT) de la cepa C57BL6/129 (fondo mixto) hermanos de camada de 4 semanas de edad al inicio del experimento.

1.2 GENOTIPADO DE LOS RATONES TRANSGÉNICOS

1.2.1 Extracción de ADN a partir de un fragmento de cola

Para el genotipado de los ratones se cortó una pequeña muestra de la punta de la cola (<5mm) antes de los 21 días de edad. Posteriormente, se procedió a la extracción del ADN lo que añadimos 500 μ L de tampón de cola (Tabla 1) y 10 μ L de proteinasa K (20mg/mL)

(*Invitrogen*). Para una digestión eficiente dejamos las colas toda la noche en un termobloque a 55°C.

Tabla 1. Composición del tampón de cola para extracción de ADN.

Composición del tampón de cola	
Tris	100mM pH 8
EDTA	0,5mM pH 8
SDS	0,2%
NaCl	200mM
Completar con agua destilada un volumen de 500mL	

Una vez digerida la cola, seguimos el siguiente protocolo:

- Centrifugar las muestras a 13200 revoluciones por minuto (rpm) 10 minutos y transferir el sobrenadante a un nuevo tubo.
- Añadir 500µL de isopropanol puro y mezclar mediante inversión.
- Centrifugar a 13200 rpm durante 10 minutos. Al finalizar deberíamos observar un precipitado en el fondo del tubo. Descartar el sobrenadante con cuidado para no perder el precipitado.
- Añadir 500µL de etanol al 70% e invertir varias veces para lavar el precipitado.
- Centrifugar a 13200 rpm durante 10 minutos.
- Eliminar el sobrenadante y dejar secar el precipitado a temperatura ambiente durante unos 20 minutos dejando los tubos abiertos.
- Añadir 50µL de agua Milli-Q y guardar a 4°C hasta el momento de realizar la reacción en cadena de la polimerasa (*polymerase chain reaction*, PCR).

1.2.2 Amplificación mediante PCR convencional

Una vez realizada la extracción del ADN genómico procederemos a su amplificación mediante PCR convencional utilizando los cebadores específicos. La síntesis de los cebadores la realizó *EUROFINDNA (ThermoFisher)* con una purificación tipo HPSF y una concentración de 0,01µmol.

Tabla 2. Oligonucleótidos para el genotipado de los ratones p107 KO.

Denominación	Secuencia 5' → 3'	T _m (°C)
p107WT	TGTGCTGAGCATGAACAGAC	60
p107KO	ACGAGACTAGTGAGACGTGC	62
p107 Común	TCGCTGGCAGTCTGAGTCAG	64

En las siguientes tablas se detallan las condiciones para el genotipado de los ratones p107 KO global:

Tabla 3. Condiciones de la PCR para el genotipado de los ratones p107 KO.

Paso	T (°C)	Tiempo (minutos)	Número de ciclos
Desnaturalización inicial	94	3	1
Desnaturalización	94	1	34
Alineamiento	55	1	
Extensión	72	1	
Elongación final	72	4	1

Tabla 4. Cantidades de los reactivos necesarios para la mezcla de PCR de los ratones p107 KO.

Reactivo	Casa comercial	Concentración	Volumen (μL)
H2O miliQ	-	-	19,85
Tampón Taq Polimerasa 10x	Thermo Fisher Scientific (EP0712)	-	2,5
dNTPs	Thermo Fisher Scientific, 100mM dNTP set (10297018)	4 mM	0,2
Oligo p107 WT	Thermo Fisher Scientific (Eurofinsdna)	5 μM	0,2
Oligo p107 KO	Thermo Fisher Scientific (Eurofinsdna)	5 μM	0,2
Oligo p107 Común	Thermo Fisher Scientific (Eurofinsdna)	5 μM	0,2
DMSO	Sigma-Aldrich (D9170)	-	0,5
Taq polimerasa	Dream Taq Green DNA Polymerase, Thermo Fisher Scientific (EP0712)	-	0,2
Añadir 24 μL de mezcla de PCR y 2 μL de ADN genómico			

La incubación de la PCR se ha realizado en el termociclador T100TM *Thermal Cycler* de *BIO-RAD*.

1.2.3 Electroforesis de agarosa

La separación de los fragmentos de ADN correspondientes con cada uno de los alelos se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa. El gel se preparó a una concentración del 2% en tampón de electroforesis TAE (TRIS 40mM pH 7,6; ácido acético 20mM y EDTA 1mM). Una vez cargado el marcador de peso molecular de 100 pares de bases (*Invitrogen*) y las muestras, se aplicó un voltaje de 90V durante una hora sumergido en el tampón de electroforesis. Finalmente, el ADN se visualizó mediante la incorporación de Red Safe (*iNtRON biotechnology*) al gel, usando un transiluminador de luz ultravioleta Gel Doc 1000 de *BIO-RAD*.

2 PROCEDIMIENTOS EN ANIMALES

2.1 ESTABULACIÓN Y SEGUIMIENTO DE PESO E INGESTA

Todos los animales fueron estabulados tras su destete a las 4 semanas de edad o en el momento de su llegada cuando provenían del animalario central y tuvieron un período de aclimatación de 7 días antes de comenzar los experimentos. Se mantuvieron en condiciones controladas de humedad, temperatura ($21\pm 2^\circ\text{C}$) y ciclos alternos de luz (12 horas luz/12 horas oscuridad). Durante este tiempo tuvieron libre acceso a agua y comida estándar, con excepción de aquellos procedimientos experimentales en los que se especifique. Se llevó a cabo el seguimiento controlado de todos los animales mediante la monitorización periódica de masa corporal e ingesta, además de valorar su correcto

aspecto físico y la adaptación al manejo por el personal del laboratorio, tratando así de minimizar el posible estrés generado durante el desarrollo de los procedimientos experimentales. La asignación de los animales en los diferentes grupos experimentales se realizó de forma aleatoria.

La determinación de la masa corporal y de la ingesta se realizó mediante una balanza de precisión; los animales fueron pesados semanalmente y para controlar el consumo de comida se hicieron mediciones cada 24 horas durante 48 horas, siempre a la misma hora del día en cada experimento.

Para el mantenimiento general y cría, los ratones se alimentaron con un pienso sólido comercial que constituía la dieta estándar (*Standard Diet*, STD) (*Teklad Global 18% Protein Rodent Diet*, Envigo). En ciertos experimentos en los que será indicado, se utilizaron dietas diferentes para inducir obesidad y/o esteatosis hepática: dieta alta en grasa (*High Fat Diet*, HFD) con un 60% de contenido de grasa (*Research Diets*, D12492), MCD (A02082002BR, =% colina, suplementada o no con 0,1% en metionina, *Research Diets*) o CD-HFD (D05010402, *Research Diets*). La de las diferentes dietas utilizadas en los diferentes modelos experimentales se detalla en la tabla 5.

Tabla 5. Composición de las dietas SD, HFD, MCD y CD-HFD en %kcal.

Composición	STD	HFD (60%)	MCD	CD-HFD
Proteína (% kcal)	19	20	16	20
Glúcidos (% kcal)	44	20	62	35
Lípidos (% kcal)	6	60	21	45
Total (kcal/g)	3,1	5,21	4,17	4,74
Metionina (% Masa)	S	S	D (0 o 0,1%)	S
Colina (% Masa)	S	S	D (0)	D (0)

2.2 DETERMINACIÓN DE LA COMPOSICIÓN CORPORAL

El análisis de la composición corporal se ha hecho a través de una técnica de resonancia magnética de imagen (*Whole Body Composition Analyzer EchoMRI 500*, EchoMRI); con ella se obtuvieron datos de la composición de masa grasa y masa magra de cada animal.

2.3 FENOTIPADO METABÓLICO

Para el fenotipado metabólico se determinó el gasto energético, ingesta, actividad locomotora y el cociente respiratorio (*respiratory quotient*, RQ) utilizando un sistema de calorimetría indirecta (*PhenoMaster*, TSE System) de 12 cajas que realiza mediciones simultáneas cada 20 minutos, durante 48 horas (con una adaptación previa de 48 horas en las cajas metabólicas) de ingesta, consumo de O₂ (vO₂), producción de CO₂ (vCO₂) y actividad locomotora (cortes en los haces) entre otros. Con los valores obtenidos, se calculó el RQ de cada individuo dividiendo el vCO₂ entre el vO₂ (vCO₂/ vO₂). El valor de gasto energético (EE) resultante (kcal/48h) fue normalizado por la masa magra de cada individuo. La actividad locomotora se detectó utilizando sensores de luz infrarroja que registran el movimiento en sentido horizontal y vertical.

Tasa de respiración metabólica: Nos permite detectar cuál es el principal combustible oxidado en el organismo. La RQ es la relación entre el volumen de CO₂ producido como residuo oxidativo entre el O₂ consumido para la respiración (vCO₂/ vO₂). Los valores de la ratio determinan cuál es el macronutriente preferente para realizar la oxidación (Tabla 6)³⁰¹.

Tabla 6. Valores RQ para cada macronutriente.

Macronutriente	Energía liberada (kcal)
CARBOHIDRATO	5,047
PROTEÍNA	4,735
ÁCIDO GRASO	4,735

Determinación del gasto energético: Se establece por kilocalorías consumidas en las 24 horas de medición utilizando la RQ. En los estudios metabólicos es importante relativizar los parámetros de la variación del gasto energético, con la variación del peso, pero sobre todo con la composición corporal, ya que los diferentes tejidos tienen tasas metabólicas distintas. Por ello los valores de gasto energético fueron relativizados en función de la cantidad de masa magra de cada ratón.

2.4 MEDIDA DE LA TEMPERATURA CORPORAL E INTERESCAPULAR

La temperatura corporal ha sido medida por vía rectal con un termómetro rectal (*BAT-12 Microprobe-Thermometer*, Physitemp).

La temperatura interescapular fue medida mediante el análisis de fotos térmicas realizadas con una cámara termográfica (*E60bx: Compact-Infrared-Thermal-Imaging-Camera; FLIR*) y analizadas mediante el *software* específico (*FLIR-Tools-Software; FLIR*). Previamente a la realización de las fotografías se ha retirado el pelo de la zona interescapular y luego se tomaron tres imágenes por animal, tomando la media para la asignación de un valor de temperatura interescapular.

2.5 TEST DE TOLERANCIA A LA GLUCOSA (GTT) Y A LA INSULINA (ITT)

Los test de tolerancia a glucosa (*glucose tolerance test*, GTT) e insulina (*insulin tolerance test*, ITT) permiten conocer la capacidad que tiene el metabolismo de un individuo para tolerar la glucosa y el grado de resistencia a insulina. Para esto 12 horas antes del test se ponen a los animales en ayuno, luego se toma medida de los valores de glucosa basales, tomando una muestra de sangre a través de la cola y la depositamos en una tira reactiva conectada a un glucómetro. A continuación, pesamos los animales e inyectamos glucosa o insulina IP en función de su peso y del test a realizar (2 g/kg de D-glucosa y 0,75 U/kg de insulina respectivamente). Se toman medidas de glucosa sanguínea a través de la cola a los 15, 30, 60 y 120 minutos después de la inyección.

2.6 ÍNDICE DE RESISTENCIA/SENSIBILIDAD A INSULINA (HOMA-IR)

El índice HOMA-IR es un método utilizado para cuantificar la resistencia y sensibilidad a la insulina y el porcentaje de células β funcionales. Fue descrito por primera vez por el Dr. Matthews y colaboradores en el año 1985³⁰² y se obtuvo aplicando la siguiente ecuación:

$$HOMA - IR = \frac{\text{Insulina en ayuno } \left(\frac{\mu U}{L}\right) \times \text{glucosa en ayuno } \left(\frac{mmol}{L}\right)}{22,5}$$

2.7 INYECCIÓN INTRAPERITONEAL (IP) Y SUSTANCIAS INYECTADAS

Para la administración de sustancias por esta vía no se precisa anestesia; se realiza en la parte ventro-caudal del animal por debajo del peritoneo. Se inmoviliza el animal por la espalda intentando oprimirle las extremidades anteriores. Se inclina la cabeza del animal ligeramente hacia abajo para minimizar el riesgo de desgarro en vísceras y se inserta la

aguja (*BD Microlance, 25G 5/8" 0,5x16mm, BD Medical Surgicals Systems*) acoplada a una jeringa (1 ml *BD slip-tip syringe, bulk, non-sterile, BD Medical Surgicals Systems*) prácticamente de manera perpendicular a éste. Esta vía fue utilizada para la administración de glucosa e insulina detallada anteriormente.

2.8 INYECCIÓN EN LA VENA DE LA COLA

La inyección en la vena lateral del ratón (*tail vein injection, TVI*) es el método más común para la administración de vectores virales en el hígado. Esta vía de administración tampoco requiere anestesia, pero sí la utilización de un cepo para inmovilizar de forma correcta al ratón (*BIOSEB, modelo: TV-150-STD*). Antes de administrar las sustancias se dilata la vena del ratón con exposiciones cortas a una lámpara de infrarrojo para facilitar su inyección. Inyectamos con agujas de 27G x 3/8" (0.40mm x 10mm) (*BD Plastipak syringe*) un volumen de 100µL. Las sustancias se inyectan en las venas laterales que se localizan a ambos lados de la línea central de la cola. Estas venas son muy superficiales de manera que la inyección ha de hacerse paralela a la superficie. Para comprobar si estamos accediendo a la vena de forma correcta basta con comprobar si aparece sangre al aspirar, o bien, no apreciar ninguna resistencia al presionar el émbolo de la aguja al inyectar. Una vez inoculada la sustancia, se retira la aguja despacio y se presiona la zona hasta detener la hemorragia.

Mediante este método se han inyectado los siguientes virus:

Tabla 7. Lista de virus inyectados por la vena de la cola del ratón.

Virus	Casa Comercial y número de referencia	Dosis (TU/mL)	Vehículo
EGFP control lentivirus	VectorBuilder (VB160109-10005)	10 ⁹	Suero salino
pLV-EGFP T2A:Puro-CMV>mRbl1	VectorBuilder (VB190619-1030dhg)	10 ⁹	Suero salino
ARNsh control (directed against Luciferase RNA)	Diana Guallar (vector #pF1200)	10 ⁹	Suero salino
pLKO.pig-GFP:Puro>ARNsh#1 de Rbl1	Diana Guallar (vector #pF1198)	10 ⁹	Suero salino
pLKO.pig-GFP:Puro>ARNsh#2 de Rbl1	Diana Guallar (vector #pF1199)	10 ⁹	Suero salino

2.9 ANÁLISIS DE LA INCORPORACIÓN DE LÍPIDOS POSTPRANDIALES

La incorporación de lípidos postprandial fue estudiada siguiendo el método ya establecido³⁰³⁻³⁰⁵.

Los ratones fueron expuestos a un ayuno de 12 horas y seguidamente, recibieron un bolo de 200µL de aceite de oliva que contenía 10µCi de [9,10-³H]-triolein (*PerkinElmer*) mediante gavage gástrico. A continuación, se midieron los niveles séricos de TG y de AG a diferentes tiempos (0, 60, 120 y 240 min) usando un kit comercial (*A. Menarini Diagnostics* y *Wako Chemicals GmbH*, respectivamente)- A los 240 minutos, se recogieron los hígados, TABep y el TAM. Después del lavado de los tejidos con PBS frío, la radioactividad fue determinada en 100µL de tejido homogeneado (1:10, peso:volumen en PBS frío) en un contador de centelleo 1214 *Wallac Rackbeta* (*PerkinElmer*).

2.10 EUTANASIA Y RECOGIDA DE TEJIDOS

Al final de los procedimientos, los animales fueron sacrificados por decapitación. Las muestras de tejidos obtenidas, se expusieron a rápida congelación en anhídrido carbónico sólido y posteriormente almacenadas a -80°C ; para análisis histológicos, se introdujeron en paraformaldehído 10% para su posterior inclusión en parafina.

3 CULTIVOS CELULARES

3.1 DIFERENCIACIÓN DE ADIPOCITOS

Para obtener preadipocitos blancos, la grasa inguinal WT se desagregó mecánica y enzimáticamente con colagenasa tipo A (2 mg/mL de colagenasa tipo A, Roche) a 37°C . La suspensión celular pasó a través de un colador de células de $70\mu\text{m}$ (Falcon) para eliminar el estroma y los residuos y se centrifugó a $400 \times g$ durante 8 minutos a temperatura ambiente. Se recogió el sedimento y se contaron las células en un contador de células CasyTon. Los pre-adipocitos se diferenciaron en adipocitos durante 9 días en un medio FCS al 8% suplementado con 5 mg/mL de insulina, 25 mg/mL de isobutilmetilxantina (IBMX), 1 mg/mL de dexametasona y 1 mM de troglitazona.

3.2 THLE2 (TRANSFORMED HUMAN LIVER EPITHELIAL-2)

Es una línea celular con morfología epitelial cuya procedencia es un cultivo primario de hepatocitos procedente del lóbulo izquierdo de un adulto en el que no se encontraron evidencias de tumor. Esta línea celular se inmortalizó mediante la infección de un virus que contiene fragmentos del antígeno SV40 T. El medio de cultivo empleado fue BEGM de la casa comercial Lonza; además es necesario suplementar este medio basal con unos aditivos: extracto pituitario bovino (*Bovine pituitary extract*, BPE), insulina, hidrocortisona, ácido retinoico, transferrina, triyodotironina, epinefrina y el factor de crecimiento epitelial humano (*Human epitelial growth factor*, hEGF), 70ng/mL de fosfoetanolamina (Sigma-Aldrich P0503), un 10% de suero bovino fetal (*Fetal bovine serum*, FBS; Sigma-Aldrich) y un 1% de GPS (200Mm L-Glutamina, 200 U/mL de penicilina y 10mg/mL de estreptomycin; *Sigma-Aldrich*) Estas células fueron mantenidas en condiciones de 5% de CO_2 a 37°C . Se pasaban cuando alcanzaban la subconfluencia (70-80%) y se diluían 1:4, lo que equivale a 5×10^4 células/cm² usando tripsina/EDTA al 0,25%. Para sembrar estas células fue necesario hacer un tratamiento previo en las placas para conseguir una mejor adherencia. Se trata de aplicar una mezcla de 0,01 mg/mL de fibronectina (*Gibco*), 0,03 mg/mL de colágeno tipo I (*Santa Cruz Biotechnology*) y 0,01 mg/mL FBS disuelto en medio basal.

El mantenimiento, congelación/descongelación y el conteo fueron realizados según procedimientos estándar de cultivo celular.

3.3 TRATAMIENTOS CELULARES

3.3.1 Transfecciones transitorias

En esta tesis se han utilizado dos mecanismos para la manipulación genética de la línea celular THLE2: sobreexpresión con plásmidos e inhibición con ARNsi.

Tabla 8. Lista de plásmidos y siRNAs utilizados en las transfecciones transitorias.

Plásmido/siRNA	Casa comercial y número de referencia	µg/pocillo
pControl (pcDNA 3.1 (+/-))	Donado por el Prof. Juan Zalvide (USC)	2,5
Plásmido p107 (pCMV-p107HA)	Donado por el Prof. Anxo Vidal (USC)	2,5
siControl, ON-TARGET plus Non-targeting Pool	<i>Dharmacon</i> , D-001810-10-05	5µM
siRBL1, ON-TARGET plus-SMART pool	<i>Dharmacon</i> , M-003298-02-0005	5µM
siFASN, ON-TARGET plus-SMART pool	<i>Dharmacon</i> , M-003954-00-0005	5µM

Para la sobreexpresión de p107 se ha utilizado Lipofectamina 2000 (*LifeTechnologies*) siguiendo las instrucciones de la casa comercial. Se sembraron $1,5 \times 10^5$ células en placas de 6 pocillos y $0,9 \times 10^5$ en placas de 24 pocillos. A las 24 horas se lipofectaron con los plásmidos correspondientes. Después de 24 horas se recogieron los extractos de células para los estudios de pertinentes.

En el caso de la inhibición, se utilizaron ARNsi de la casa comercial *Dharmacon* cuyas referencias se indican en la tabla 8. En el caso del silenciamiento de RBL1 consistía en una mezcla de 4 secuencias “sense” diferentes: CAAGAGAAGUUGUGGCAUA; CAGCAGCACUCCAUUUAUA; GGACAUAAGUUACAAUUC y GCGAUUAUGUGCCCAAUA. En el caso del silenciamiento de FASN las secuencias fueron: UGACAUCGUCCAUCGUUU; GAAGCACAUUGGCAAAGUC; GGUAUGCGACGGGAAAGUA y CUUCCGAGAUUCCAUCCUA. Para la transfección utilizamos DharmaFECT (*Dharmacon*) siguiendo las instrucciones de la casa comercial. Se sembraron 1.5×10^5 células en placas de 6 pocillos y tras 24 horas en cultivo se transfectaron con los correspondientes ARNsi. Tras 8 horas, cambiamos el medio de cultivo y a las 48 horas desde el inicio de la transfección recogemos los extractos celulares.

Amplificación y purificación de plásmidos:

- Cultivo bacteriano: Para la amplificación de estos plásmidos se transformaron bacterias de la cepa *Escherichia coli* (*Subcloning efficiency* DH5α: F- φ80lacZΔ15 Δ(*lacZYA-argF*)U169 *recA1 endA1 hsdR17(rk-, mk+)* *phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 λ-*, *Invitrogen*). Para el crecimiento de las bacterias se utilizó el medio LB (*Luria-Broth*) (triptona 1%, extracto de levadura 0,5%, cloruro sódico 1% en gua destilada). Para la selección de bacterias transformantes, el medio se suplementó con antibiótico según la resistencia conferida por el plásmido (Ampicilina 100 µg/mL, *Sigma-Aldrich*). Las condiciones de crecimiento fueron 18h a 37°C y 250 rpm.

Para la preparación de placas con medio sólido se utilizó el medio LB suplementado con agar bacteriológico a una concentración de 1,5%. En estas placas, que se utilizaron para la selección de transformantes, también se añadió el antibiótico correspondiente, después de esterilizar el medio y previamente a su solidificación. Tanto el medio líquido como las placas se prepararon en condiciones de esterilidad.

- Obtención del ADN plasmídico: para la purificación de los plásmidos a partir del cultivo bacteriano en primer lugar se picaron las colonias aisladas de las placas de LB, que se crecieron en un mini cultivo y posteriormente se purificaron mediante la técnica miniprep para comprobar su correcta secuencia. Para esta técnica se utilizó el kit GeneJET Plasmid Miniprep Kit (*Fermentas*) siguiendo las instrucciones del fabricante. A partir del

mini cultivo se obtuvo un cultivo a mayor escala o midi cultivo que después se purificó mediante la técnica midiprep. El midi cultivo se realiza en 150mL de LB suplementado con el antibiótico correspondiente durante 18 h a 37°C y 225 rpm. Para la recuperación del ADN plasmídico se utilizó el kit *NucleoBand Xtra Midi EF* (Macherey-Nagel) siguiendo las instrucciones del fabricante.

- Cuantificación del ADN plasmídico: Para esto se utilizó un espectrofotómetro *NanoDrop 2000* (Thermo Scientific), midiendo la absorbancia a 260 nm/D.O. 280nm permite estimar el grado de pureza de las muestras, siendo 1,8 el valor óptimo. También se comprobó la integridad del ADN plasmídico mediante un gel de agarosa.

3.3.2 Tratamiento con ácido oleico

Con el objetivo de inducir la acumulación de triglicéridos hemos tratado las células con ácido oleico (*Sigma-Aldrich*) 1mM unido a BSA libre de AG (*Capricorn*) en una proporción molar 2:1

Las células fueron mantenidas en el incubador diferentes tiempos con el tratamiento y para comprobar que la acumulación de lípidos se había producido realizamos tinciones de Oil red O, la cual será detallada más adelante.

3.4 ESTUDIO DEL METABOLISMO LIPÍDICO EN THLE2

3.4.1 Análisis de la lipogénesis de novo

Tras sembrar las células, se incubaron toda la noche en medio de cultivo Eagle mínimo esencial (*Eagle's minimum essential medium*, EMEM) suplementado con glutamina 1% (v/v), una mezcla de penicilina-estreptomicina 1% (v/v), BSA libre de AG 0,5% (w/v) y glucosa a una concentración final de 22mM (4g/L). A continuación, las células se incubaron durante 4 horas con medio fresco suplementado con insulina 100nM y acetato 20μM con una cantidad de 10μCi/mL de acetato [H^3] (*Perkin Elmer*)³⁰⁶. Tras la incubación, se recogió el medio y se realizaron cuatro lavados con solución salina tamponada con fosfato (*phosphate buffered saline*, PBS) frío (pH 7,4) y se recogieron las células. Se separan los lípidos tanto de las células como del medio y se separan mediante cromografía de capa fina³⁰³. Los diferentes tipos de lípidos se visualizaron mediante exposición al vapor de yodo, se seleccionaron las bandas correspondientes y se contabilizó la cantidad de marcaje radiactivo incorporado en los lípidos con un contador de centelleo. Los resultados se expresan en relación a la cantidad de proteína celular.

3.4.2 Análisis de la oxidación de ácidos grasos

La tasa de oxidación se determinó mediante la medición de la cantidad de [^{14}C]-CO₂ (oxidación completa) y la cantidad de metabolitos ácido-solubles marcados con [^{14}C] (oxidación incompleta) liberados al medio, como se describió previamente^{307, 308}. Brevemente, las células fueron incubadas durante 6 horas en medio pretratado (EMEM suplementado con 1% glutamina (v/v), 1% de una mezcla de penicilina-streptomicina (v/v), BSA libre AG 0,5% (w/v) y glucosa a una concentración final de 5,5mM (1g/L)). Luego, las células fueron incubadas durante 4 horas con medio fresco suplementado con BSA libre de AGs 0,5% (w/v) mezclado con palmitato 0,2mM conteniendo 0,5 μCi/ml [^{14}C]-palmitate (*Perkin Elmer Inc* (*Waltham*)). El medio fue recogido en un tubo con papel de filtro Whatman empapado con NaOH 0,1M en la tapa. Luego se añaden 500μl de ácido perclórico 3M para liberar el CO₂ capturado en el papel de filtro. El medio acidificado se centrifugó a 21000g durante 10 minutos para eliminar posibles partículas. La radiactividad del CO₂ capturado por los filtros de papel y la radiactividad de los

metabolitos ácido-solubles del medio, se midió mediante un contador de centelleo y expresada en relación a la proteína celular.

3.5 ESTUDIO DE LA RESPIRACIÓN CELULAR

La respiración de las células THLE2 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 (*oxygen consumption rate, OCR*) y de acidificación del medio (*extracellular acidification rate, ECAR*), indicadores clave de la respiración mitocondrial y la glucólisis, respectivamente. Para las mediciones de OCR, expresadas como tasa de cambio de O₂ disuelto en el medio de cultivo, las células transfectadas con el plásmido de p107 o un plásmido vacío fueron sembradas en una placa de cultivo multipocillo (*XFp cell culture microplate, Seahorse Bioscience, Agilent Technologies*), utilizando 2x10⁴ 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 (*Dulbecco's modified Eagle's medium, Sigma-Aldrich*) pH 7,4 sin bicarbonato y baja capacidad de tamponamiento de pH (*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 CO₂. Tras el equilibrado los cultivos celulares en medio de ensayo durante 1 hora, se realizaron cinco medidas basales de OCR. A continuación, secuencialmente se inyectaron los moduladores de la respiración oligomicina (oligo, 1,5µM), carbonil cianido-4 (trifluorometoxi), fenilhidrazona (FCCP, 1µM) 7 rotenona/antimicina (Rot/AA, 0,5µM) (*Cell Mito Stress Test Kit, Seahorse Bioscience, Agilent Technologies*). La cantidad de células en cada pocillo fue cuantificada al finalizar el experimento con cristal violeta para normalizar los datos de OCR. Los parámetros de función mitocondrial fueron calculados como indica la guía de usuario (*Seahorse Bioscience, Agilent Technologies*).

3.6 LX2 (LÍNEA CELULAR DE CÉLULAS ESTELARES HUMANAS)

Las LX2 fueron generadas por inmortalización de un cultivo primario de HSC mediante la infección de un virus que contiene fragmentos del antígeno SV40 T. El medio de cultivo utilizado fue DMEM; además es con un 10% de FBS y un 1% de GPS (200Mm L-Glutamina, 200 U/mL de penicilina y 10mg/mL de estreptomina; *Sigma-Aldrich*). Estas células fueron mantenidas en condiciones de 5% de CO₂ a 37°C. Se pasaban cuando alcanzaban la subconfluencia (70-80%) y se diluían 1:4, lo que equivale a 5×10⁴ células/cm² usando tripsina/EDTA al 0,25%.

El mantenimiento, congelación/descongelación y el conteo fueron realizados según procedimientos estándar de cultivo celular.

Tratamiento con TGFβ

TGFβ₁ es un potente activador de HSC y un inductor de fibrosis³⁰⁹. Las HSC humanas LX-2 fueron incubadas con medio suplementado con TGFβ₁ recombinante de humanos (*PreproTech*) a una concentración 8 ng/ml o vehículo (PBS) durante 24 horas, como previamente indicado³¹⁰. Después de eso, las células LX-2 fueron recogidas para extracción de ARNm.

4 MUESTRAS HUMANAS

La población de estudios incluye a un grupo de pacientes adultos y obesos ($n=75$), $IMC \geq 35 \text{Kg/m}^2$. Los pacientes fueron sometidos a cirugía bariátrica en el Hospital Universitario de Salamanca. Como controles, incluimos a individuos ($n=13$) con un $IMC < 35 \text{Kg/m}^2$ que se sometieron a colecistectomía laparoscópica para el tratamiento de cálculos biliares. Se excluyeron del estudio los pacientes que presentaban un historial con consumo excesivo de alcohol ($>30 \text{g}$ por día en hombres y $>20 \text{g}$ por día en mujeres), hepatitis C o B crónicas o si en el laboratorio los datos histopatológicos revelan otras causas de enfermedad hepática distinta a MAFLD.

El estudio fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital Universitario de Salamanca y todos los sujetos presentaron un informe de consentimiento escrito para someterse a una biopsia hepática bajo supervisión durante la cirugía (autorizaciones en la sección “anexos”).

Los datos recopilados incluyen 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, aspartato aminotransferasa (AST), alanina aminotransferasa (ALT), colesterol total, lipoproteínas de alta densidad (*high density lipoprotein*, HDL), LDL, TG, creatinina, glucosa y albúmina.

5 TÉCNICAS ANALÍTICAS

5.1 ANÁLISIS HISTOLÓGICOS DE TEJIDOS

Para la elaboración de esta tesis doctoral se han realizado diferentes tinciones histológicas que nos han permitido visualizar la morfología celular, la acumulación de lípidos en las células y ver la expresión y localización de determinadas proteínas en diferentes tejidos. Una vez obtenidas las tinciones, se observaron y fotografiaron los cortes con un microscopio (*Zeiss*) utilizando los objetivos de 20 y 40 aumentos.

5.1.1 Hematoxilina y eosina

Para esta tinción el tejido fijado con formalina tamponada al 10% se incluyó en parafina para ser seccionado en un micrótopo. Los cortes de parafina se trataron con xilol para eliminar los excesos de la misma. A continuación, se pasaron los cortes por un proceso de rehidratación a través de alcoholes de concentración decreciente (100, 95 y 70°C). Después de un lavado con H_2O destilada, fueron sumergidos en hematoxilina (*Bio Optica*) 10 minutos, se lavaron e inmediatamente se pasaron por un alcohol ácido. Tras el lavado, fueron sumergidas durante 30 segundos en eosina (*Bio Optica*). Para deshidratar la muestra, se pasaron los cortes por los mismos alcoholes en graduación creciente y se dejaron sumergidos durante 10 minutos en xilol antes de montarlos. Los portaobjetos se montaron en medio de montaje acuoso.

Esta técnica tiñe las estructuras celulares mostrando, de forma general, la estructura del tejido. La hematoxilina es de naturaleza catiónica (básica), por lo que tiñe de azul estructuras basófilas (ácidas) como los núcleos celulares. Por otro lado, la eosina es de

estructura ácida, por lo que tiñe de rosa estructuras de naturaleza básica, como el citoplasma.

5.1.2 Oil Red O

La tinción de Oil-Red O se realizó en fragmentos de hígados congelados justo después de la extracción del tejido del ratón. Se realizaron cortes en un criostato de un grosor de 10 μ m. Posteriormente, se fijaron las muestras durante toda la noche en formalina neutra tamponada al 10%. Luego fueron teñidas con Solución Oil Red durante 20 minutos (*Oil Red color solution, Merck*) y posteriormente fueron lavadas con agua destilada. A continuación, se sometieron a otro colorante y se contratiñen con Hematoxilina de Harris (Bio Óptica) durante 10 minutos. Se vuelven a lavar y se montan en un medio de montaje acuoso.

Una vez hemos tomado las fotos con el microscopio previamente mencionado, fueron cuantificadas mediante el programa *Image J (ImageJ-1.33, Wayne Rasband)*.

5.1.3 Inmunohistoquímica

Las secciones de tejido adiposo extraído en el momento del sacrificio se fijaron en formaldehído tamponado al 10% y posteriormente se deshidrataron (en concentraciones crecientes de alcohol) para su estudio histológico, montaje en xileno e inmersión en parafina.

Para la inmunohistoquímica de UCP1, los bloques de parafina se cortaron en secciones de 3 μ m que se procesaron, desparafinando en xileno, rehidratando y enjugando en agua destilada. A continuación, las secciones se incubaron durante toda la noche con el anticuerpo primario (UP1, dilución 1:500, *Abcam*) y luego lavaron e incubaron con el anticuerpo secundario ENVISION (una mezcla de anti-ratón y anti-conejo de *Dako*). Las imágenes se obtuvieron con el microscopio previamente mencionado y posteriormente se cuantificó la tinción con el software ImageJ.

5.2 DETECCIÓN DE METABOLITOS EN TEJIDO

5.2.1 Extracción de grasa hepática

Para la extracción de grasa hepática se pesaron 0,5g de hígado y se llevaron a un tubo de polipropileno de 2ml con una bola de acero y 500 μ L de una mezcla cloroformo/metanol (2:1 v/v). El tejido se homogenizó por acción mecánica en el *Tissue Lyser (Quiagen)* durante 3 minutos a 25 rpm. Tras homogenizar se mantuvieron en rotación orbital durante tres horas para facilitar la disolución de la grasa en el disolvente orgánico. Al finalizar la rotación, se añadieron 300 μ L de agua destilada y se centrifugaron durante 30 minutos a temperatura ambiente. Una vez separadas las fases, descartamos la fase inorgánica superior y se pasó la fase orgánica a un nuevo tubo de polipropileno de 1,5mL para dejar que se evapore durante toda la noche en una campana de extracción de gases. El precipitado que se obtuvo tras la evaporación corresponde a la grasa extraída del tejido.

5.2.2 Determinación de triglicéridos en muestras de grasa hepática

La cuantificación de TG se realizó con un kit comercial (*Spinreact*). Se determina la concentración tras la evaporación de una parte de la fase orgánica, añadiendo el reactivo al precipitado e incubando 5 minutos a 37°C; durante ese tiempo se produce una reacción enzimática que produce una coloración roja. La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de TG en la muestra. La lectura de las muestras y de la

recta patrón se realiza con un espectrofotómetro a 505nm y se calcula la concentración de TG teniendo en cuenta el peso del tejido.

5.3 DETERMINACIÓN DE METABOLITOS EN PLASMA

Para la detección plasmática de diferentes metabolitos circulantes se usaron kits ELISA comerciales específicos siguiendo las instrucciones determinadas por la casa comercial: T₄ (*DRG*), IGF1 (*R&D Systems*), FGF21 (*Biovendor*), insulina (*Millipore*). Para TG y colesterol ensayos enzimáticos colorimétrico homogéneos de la casa comercial *Spinreact*.

5.4 ANÁLISIS DE PROTEÍNAS POR WESTERN BLOT

5.4.1 Extracción de proteínas

De las muestras de tejido conservadas a -80°C se separó una porción del tejido para ser procesado. Durante todo el proceso de extracción las muestras estuvieron en hielo para evitar la degradación de las proteínas. El tejido se introduce en un tubo de polipropileno de 2mL con cierre de seguridad (*Safe-Lock Tubes 2.0 ml, Eppendorf*) y se le añade una bola de acero y un volumen determinado de tampón de lisis (Tabla 9) con un cóctel de inhibidores de proteínas y un cóctel de fosfatasas, ambos a una dilución 1/100 (*Sigma-Aldrich*). Las muestras se homogeneizaron por un proceso de disgregación y rotura celular mecánica mediante un homogeneizador (*TissueLyser II, Qiagen*) a 25rpm durante 4 minutos. Posteriormente se centrifugaron durante 30 minutos a 13.200 rpm y a 4°C. Se retiró el sobrenadante (extracto proteico) en varias alícuotas descartando el precipitado (núcleos y artefactos de tejido) y la posible capa superior de lípidos. En el caso de las muestras de tejido adiposo e hígado graso fue necesario realizar varias centrifugaciones para descartar la grasa.

Para la extracción de proteína a partir de un cultivo celular se realizó el siguiente protocolo:

1. Retirar el medio de cultivo de las células y lavar con PBS frío (4°C).
2. Situar las placas de cultivo en hielo y añadir tampón de lisis. Despegar las células mediante el uso de un rascador (*BD Falcon*) y recoger en un tubo de polipropileno de 1,5mL.
3. Mantener en hielo 10 minutos, agitando cada 5 minutos.
4. Centrifugar durante 10 minutos a 13000rpm a 4°C y llevar el sobrenadante a un nuevo tubo. Almacenar extractos a -80°C o cuantificar.

Tabla 9. Composición del tampón de lisis.

Tampón de lisis	
Tris-HCl pH 7,5	50 mM
EGTA	1 mM
EDTA	1 mM
Tritón X-100	1% vol/vol
Ortovanadato sódico	1 mM
Fluoruro Sódico	50 mM
Pirofosfato Sódico	5 mM
Sacarosa	0,27 M
Fluoruro de fenilmetilsulfonilo	1 mM
Cóctel Inhibidores proteasas (<i>ROCHE</i>)	1 pastilla/50mL

5.4.2 Cuantificación de proteínas

Para cuantificar la cantidad de proteína contenida en el extracto, se realizó un método colorimétrico con la solución Bradford (*Bio-Rad Protein Assay Kit*). Este método se basa en el cambio de color del colorante *Coomassie brilliant blue* en respuesta a diferentes concentraciones de proteínas. Este compuesto interacciona con aminoácidos básicos y aromáticos por lo que la unión de este colorante con las proteínas provoca un cambio en el máximo de absorción del colorante a 465 a 595nm. La forma roja de este compuesto se convierte en azul cuando se une con la proteína. Experimentalmente, realizamos una recta patrón de sero-albúmina bovina (BSA) con diluciones seriadas a partir de la máxima concentración de 1mg/mL. En el caso de las muestras, realizamos una dilución para poder realizar la cuantificación, 1:50 en el caso del hígado, 1:25 para la grasa y 1:5 para la proteína extraída de las THLE2. Todas las muestras fueron medidas por duplicado junto con la recta patrón en un espectrofotómetro a 550nm. Previamente la mezcla de las muestras con el Bradford se incubó a 37°C durante 5 minutos.

5.4.3 Preparación de la muestra

La cantidad total de proteína de la muestra usada varió entre 12 y 40µg dependiendo del tipo de anticuerpo utilizado y el tejido analizado. Tras la cuantificación preparamos las muestras junto con el tampón de carga o tampón de Laemmli (Tabla 10). A cada muestra se le añadió la misma proporción de solución de carga. Este tampón permite dotar a todas las proteínas de carga negativa en proporción a su tamaño gracias al dodecilsulfato sódico (*Sodium DodecylSulfate*, SDS; *Sigma-Aldrich*), permite la desnaturalización de las proteínas con el β-mercaptoetanol (*Sigma-Aldrich*) eliminando los puentes disulfuro. Todo esto facilita su carga en el gel y además se añade un colorante para identificar el frente de migración (*azul de bromofenol*, *Merck*). Todas las muestras deben tener la misma concentración final para que en el volumen de carga en la electroforesis (16µl) haya 20µg de proteína de TAM e hígado y 5µg de proteína en los extractos proteicos obtenidos a partir de cultivo celular. Tras añadir el tampón de carga y previamente a realizar la electroforesis las muestras deben calentarse a 95°C durante 5 minutos para su completa desnaturalización. Una vez utilizadas se almacenan a -20°C. En los casos en los que quisimos detectar la expresión de los complejos de la cadena de transporte electrónico mitocondrial (OXPHOS) las muestras se incubaron a 60°C durante 5 minutos para evitar su degradación.

Tabla 10. Componentes del tampón de Laemmli disuelto en agua destilada.

Tampón Laemmli	
Tris-HCl pH 6.7	250 mM
Glicerol	50% vol/vol
SDS	10% peso/vol
B-Mercaptoetanol	5% vol/vol
Azul de bromofenol	0,0005 % peso/vol

5.4.4 Electroforesis SDS-PAGE

La electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico SDS-PAGE consiste en la separación de las proteínas por su peso molecular. Se realizó en un gel que consiste en una estructura tridimensional, en forma de red, formada por la polimerización de poliacrilamida (N, N-metilenobisacrilamida). El proceso de polimerización se cataliza con persulfato amónico (*Ammonium persulfate*, APS; *Sigma-Aldrich*) y TEMED (*N,N,N,N-tetramethyletilenediamina*, *Sigma-Aldrich*). La concentración de acrilamida y

bis-acrilamida (30% *Acrylamide/Bis Solution 29:1, Bio-Rad*) en el gel determina el tamaño de los poros de la red tridimensional y el grado de migración de las proteínas según su tamaño. Al aplicarle una corriente eléctrica, las proteínas migran a través del gel hacia el polo positivo de la corriente, separándose por su peso molecular en gradiente de mayor a menor. El gel está formado por dos fracciones: una fracción concentradora y una fracción separadora. En la fracción concentradora el porcentaje de acrilamida es siempre 5% de acrilamida/bis-acrilamida y se localiza en la parte superior sobre el que se incluye un peine para formar los pocillos y poder introducir la muestra (Tabla 11). Se prepararon a partir de soluciones stock de acrilamida/bisacrilamida 29:1 30% (0,83 ml); tris 1.5M pH 6,8 (0,63 ml); SDS 10% (50µl); APS 10% (50µl); y TEMED (5µl). En la fracción separadora los porcentajes de acrilamida variaron entre 8%, 10% y 12% en función del tamaño de la proteína de interés (Tabla 12).

Tabla 11. Composición del gel concentrador.

Gel separador 5%	
H ₂ O destilada	4,1 mL
Acrilamida/Bis (30%)	1 mL
Tris-HCl 1,5M pH 6,8	0,75 mL
10% SDS	0,06 mL
10% APS	0,06 mL
TEMED	0,006 mL

Tabla 12. Composición del gel separador a porcentajes 8, 10 y 12.

Gel separador	8%	10%	12%
H ₂ O destilada	11,5 mL	9,9 mL	8,2 mL
Acrilamida/Bis (30%)	6,7 mL	8,3 mL	10 mL
Tris-HCl 1,5M pH 8,8	6,3 mL	6,3 mL	6,3 mL
10% SDS	0,25 mL	0,25 mL	0,25 mL
10% APS	0,25 mL	0,25 mL	0,25 mL
TEMED	0,015 mL	0,01 mL	0,01 mL

Los geles se montaron en la cubeta de electroforesis (*Mini-PROTEAN Tetra Cell, Bio-Rad, Hercules, CA, EEUU*) y se sumergieron en tampón de electroforesis (Tabla 13) que permite la transmisión del voltaje.

Tabla 13. Composición del tampón de electroforesis disuelto en agua destilada.

Tampón de electroforesis	
Tris-HCl	200 mM
Glicina	20 mM
SDS	1% peso/vol

En cada pocillo del gel se cargaron 16 µl de muestra. Se utilizó una calle para cargar un marcador de pesos moleculares (*Precision Plus Protein Standards-Dual Color, Bio-Rad*). En cada gel se cargaron siempre muestras de todos los grupos experimentales.

Una vez cargadas las muestras en el gel se sometieron a un campo eléctrico (voltaje constante de 80V-100V y amperaje de 180 mA) conectando la cubeta de electroforesis a una fuente de alimentación (*PowerPac HC High Current Power Supply, Bio-Rad*), en el que se indujo la migración de las proteínas hacia el cátodo. Se detuvo la electroforesis cuando el frente de migración llegó a una distancia aproximada de unos 0,5cm del final del gel.

5.4.5 Transferencia semi-seca

Una vez finalizada la electroforesis las proteínas deben ser transferidas a una membrana para poder realizar el análisis de expresión de cada proteína; para ello se someten a un campo eléctrico capaz de movilizar las proteínas hasta la membrana donde se realizarán las incubaciones con los diferentes anticuerpos. Se realizó una transferencia de tipo semi-seca, donde la membrana y el gel se sitúan una debajo del otro y separadas por papeles absorbentes y las placas que crearán el voltaje (*Trans-Blot Semy-Dry Transfer Cell, Bio-Rad*). Se utilizaron membranas de nitrocelulosa de 0,45 μ m (*Nitrocellulose Membrane 0.45 μ m, Bio-Rad*) o de PVDF (*Polivinylidene Fluoride Immobilion-P membrane, Millipore*) cortadas con unas dimensiones de 8,6 x 7,1 cm. En el caso de las membranas de PVDF fueron activadas previamente durante 5 min en metanol, 5 min en H₂O destilada y 5 min en tampón de transferencia (Tabla 14) El papel de transferencia (*Extra Thick Blot Paper, Bio-Rad*) se empapó en tampón de transferencia para que a través de él pudiera crearse el campo eléctrico necesario para la transferencia; el gel y la membrana se colocaron entre dos piezas de papel de transferencia de manera que así se creó el campo eléctrico necesario para la correcta transferencia; con ayuda de un rodillo se eliminaron las posibles burbujas que podían quedar entre ésta, el papel y el gel. El proceso se realiza a amperaje constante 0,8mA por cm² durante una 1h y 40 min conectado a una fuente de energía (*PowerPac HC High Current Power Supply, Bio-Rad*).

Tabla 14. Composición del tampón de transferencia diluido en agua destilada.

Tampón de transferencia	
Tris-HCl	40 mM
Glicina	40 mM
SDS	0,36% peso/vol
Metanol	20% vol/vol

5.4.6 Tinción con rojo Ponceau

La eficacia de la transferencia se comprobó mediante la tinción Ponceau (rojo Ponceau S 0.1%(p/v), ácido acético 1%) (*Ponceau S Red, Sigma-Aldrich*). Se lavó el exceso con solución de lavado de Ponceau (ácido acético 1%) y a continuación se lavaron las membranas con solución de lavado para acabar de eliminar la tinción. En los casos en los que estudiamos la expresión de OXPHOS en ratones se utilizó como control de carga ya que los controles típicamente usados se podrían ver enmascarados por las proteínas a estudio.

5.4.7 Inmunodetección

- Bloqueo de la membrana: tras la transferencia la membrana se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora en agitación con una solución de BSA (sero-albúmina bovina) al 5% disuelto en tampón de lavado (TBS-T, Tabla 15). El BSA en disolución se une a todos aquellos lugares de la membrana que no estén ocupados por las transferidas desde el gel. De esta forma, los anticuerpos sólo podrán unirse a su antígeno específico, reduciendo así las uniones inespecíficas. Dependiendo de las especificaciones del anticuerpo usado para la inmunodetección, se utilizó como solución de bloqueo leche en polvo desnatada comercial (Dietisol, leche desnatada polvo 350 gramos; Dietisa; Nutrition & Santé) también al 5% disuelta en tampón de lavado.

Tabla 15. Composición del tampón de lavado diluido en agua destilada.

Tampón de lavado (TBS-T)	
Tris-HCl	20 mM
NaCl	146 mM
Tween-20	0,1% vol/vol

- Anticuerpo primario: tras el bloqueo, la membrana se incubó con el anticuerpo específico contra la proteína a detectar diluido en solución de bloqueo durante toda la noche en agitación a 4°C (Tabla 16).

Tras la incubación se retira el anticuerpo y se realizan tres lavados de 10 minutos cada uno con la solución de lavado (TBS-T).

- Anticuerpo secundario: se incuba la membrana durante una hora con un anticuerpo secundario (*Dako*) asociado a peroxidasa (*Horse Radish Peroxidase*) que reconoce la parte constante del anticuerpo primario para detectar la presencia de la proteína y amplificar la señal del anticuerpo primario. Se diluye en solución de incubación a una concentración de 1:5000. El tipo de secundario utilizado vendrá determinado por el tipo de huésped en el que se generó el anticuerpo primario. Tras la hora de incubación se retira el anticuerpo y se realizan tres lavados de 10 minutos con la solución de lavado (TBS-T).

- Revelado y fijación de la señal: para detectar el anticuerpo secundario, se incuba la membrana con el sustrato de la peroxidasa y un potenciador de quimioluminiscencia (*Pierce ECL Western Blotting Substrate*, Thermo Scientific) a volúmenes iguales (1:1) incubándose durante 3 minutos en oscuridad con este sustrato. Inmediatamente después, para detectar la luz emitida resultante de la reacción del sustrato con la peroxidasa, se coloca la membrana en un casete de autorradiografía (*HyperCassette*, Amersham Biosciences). El revelado tiene lugar en una sala oscura en donde para la visualización se utilizaron placas radiográficas Fujifilm (*FujiMedical X-Ray Film Super RX*, Fujifilm Corporation). Estas hojas de revelado se introducen en el casete de autorradiografía sobre las membranas y se deja exponer la señal quimioluminiscente durante unos minutos, en función de la proteína que estemos revelando. Posteriormente se retira la película y se sumerge en una solución reveladora (dilución 1:10) (*Developer/Replenisher*, Agfa-Gevaert Group) hasta que se visualiza la señal buscada y en ese momento se sumerge la película en líquido fijador (dilución 1:5) (*Manual Fixing Bath*, Agfa-Gevaert Group) durante un par de minutos con el fin de fijar la señal. Por último, se lava la película con agua corriente y se deja secar.

- Análisis de los resultados: una vez reveladas las placas se digitalizan las imágenes mediante un escáner de alta resolución (*CanonScan 9900F*, Canon). Para determinar la cantidad relativa de proteína en cada muestra, se utiliza el programa ImageJ (*ImageJ 1.40g*, Wayne Rasband) que detecta la cantidad de píxeles de la imagen de la proteína en todas las muestras de una misma placa radiográfica. El área de medición debe ser igual para todas las muestras. El valor final es normalizado y porcentuado respecto al grupo control de cada experimento.

Tabla 16. Lista de anticuerpos utilizados para la inmunodetección por *western blot*.

ANTICUERPO	DILUCIÓN	CASA COMERCIAL	REFERENCIA
ACC	1:1000	Abcam	ab54174
fosfo-ACC (Ser 79)	1:1000	Cell Signaling	3661
AMPK α 1	1:1000	Millipore	07-350-25UG
fosfo-AMPK α (Thr 172)	1:1000	Cell Signaling	2535
ChREBP1 α	1:1000	NOVUSBIO	NB400-135
CIDE-A (N-19)-R	1:1000	Santa Cruz Biotechnology	sc-8730-R
Citocromo C oxidasa	1:1000	Abcam	ab13575
Complejos mitocondriales (Humano)	1:1000	Abcam	ab110411
Complejos mitocondriales (Ratón)	1:1000	Abcam	ab110413
CPT1A	1:1000	Abcam	ab128568
CPT2	1:1000	Santa Cruz Biotechnology	sc-377294
eIF2 α	1:1000	Santa Cruz Biotechnology	sc-11386
fosfo-eIF2 α (Ser 52)	1:1000	Santa Cruz Biotechnology	sc-101670
FAS	1:1000	Abcam	ab128870
FGF21	1:1000	Abcam	ab171941
GPR78 (BiP)	1:1000	Cell Signaling	3183
GAPDH	1:5000	Merck	T5168
PRDM16	1:1000	Abcam	ab106410
HSL	1:1000	Abcam	ab45422
fosfo-HSL (ser 680)	1:1000	Cell Signaling	4126
IRE	1:1000	Abcam	ab37073
fosfo-IRE1 (Ser 724)	1:1000	Novus Biologicals	NB100-2323
JNK 1/3	1:1000	Santa Cruz Biotechnology	sc-514539
fosfo-SAPK/JNK (Thr 183/Tyr 185)	1:1000	Cell Signaling	4668
p107	1:500	Abcam	ab2451
PGC-1 α	1:1000	Santa Cruz Biotechnology	sc-13067
PGC1 β	1:1000	Santa Cruz Biotechnology	sc-373771
PPAR α	1:1000	Santa Cruz Biotechnology	sc-398394
PPAR γ	1:1000	Santa Cruz Biotechnology	sc-7273
PRDM16	1:1000	Abcam	ab106410
Receptor adrenérgico β_3	1:1000	Abcam	ab694506
α -tubulina	1:5000	Sigma	T 9026
SCD1	1:1000	Cell Signaling	2794
SREBP-1c	1:1000	Abcam	ab3259
UCP-1	1:5000	Abcam	ab10983
UCP-2	1:1000	Abcam	ab67241

Tabla 16. (Continuación).

ANTICUERPO	DILUCIÓN	CASA COMERCIAL	REFERENCIA
Vinculina	1:5000	Sigma-Aldrich	V9131
Anti-Ratón Inmunoglobulina/HRP (anticuerpo secundario)	1:5000	DAKO	P0260
Anti-conejo Inmunoglobulina/HRP (anticuerpo secundario)	1:5000	DAKO	P0448

5.5 INMUNOPRECIPITACIÓN

La cantidad de proteína utilizada fue de 500µg de extracto total. Los extractos se recogieron en tampón de lisis (Tabla 9). Se siguió el protocolo:

- Llevar la cantidad de extracto proteico a inmoprecipitar a un volumen final de 500µL de tampón de lisis.
- Preaclara los extractos con un anticuerpo similar al de la proteína que se desea inmunoprecipitar pero que se sepa que no lo reconoce. Añadir 30µL de una matriz de G-Agarosa (*Roche diagnostics*)/tampón de lisis (1:1) y mantener en agitación rotacional a 4°C durante 1 hora. A continuación, centrifugar los extractos a 13200rpm durante 1 minuto y recoger el sobrenadante. De esta forma se elimina gran parte de las posibles uniones inespecíficas tanto a anticuerpo como a proteína G obteniendo mejores resultados.
- Añadir al sobrenadante anteriormente obtenido el anticuerpo contra la proteína a inmoprecipitar. De esta forma general la relación proteína/anticuerpo fue 1mg/1µg. En el caso de encontrarse el anticuerpo utilizado en un sobrenadante de hibridoma obtenido según el protocolo descrito por Harlow y Lane en 1989³¹¹ se estima que son necesarios 100µL de sobrenadante para tener 1µg de anticuerpo. Mantener en rotación a 4°C durante 1 hora.
- Añadir 30µL de una suspensión 1:1 de matriz de proteína G-Agarosa/tampón de lisis y mantener en agitación rotacional a 4°C durante 2 horas. Es importante el equilibrado de la proteína G con el propio tampón de lisis, lo que se realiza lavando tres veces el polímero en dicho tampón. También es de especial importancia que el tampón contenga inhibidores de fosfatasas y proteasas.
- Centrifugar a 13200rpm durante 1 minuto a 4°C.
- Descartar el sobrenadante y lavar el precipitado con tampón de lisis con inhibidores. Centrifugar con las mismas condiciones que en el paso previo. Repetir este proceso 3 veces.
- Descartar el sobrenadante y aspirar bien toda la fase líquida con la ayuda de una jeringa muy fina.
- Añadir tampón de carga *Laemmli 2X*.
- Hervir las muestras inmunoprecipitadas a 95°C durante 10 minutos.

Las muestras desnaturalizadas se cargan en un gel de electroforesis SDS-PAGE y se procede como se ha explicado en el apartado anterior a la realización del *western blot*.

5.6 ANÁLISIS DE ARN MENSAJERO POR PCR EN TIEMPO REAL

5.6.1 Extracción de ARN

De las muestras de tejido conservadas a -80°C se separó una porción de tejido. Durante todo el proceso de extracción las muestras estuvieron en hielo. El tejido se introduce en un tubo de 2 ml con cierre de seguridad (*Safe-Lock Tubes 2,0 ml, Eppendorf*)

y se le añade una bola de acero y 800µl del reactivo Trizol (*TRIZOL Reagent; Invitrogen*). Este compuesto contiene tiocinato de guanidinio para la degradación proteica y fenol-cloroformo para el aislamiento de ácidos nucleicos. Las muestras se homogeneizaron por un proceso de disgregación y rotura celular mecánica mediante un homogeneizador (*TissueLyser II, Qiagen*) durante 4 minutos a 25rpm. Tras la homogenización, la muestra se centrifugó a 12000 rpm durante 10 minutos a 4°C y se recogió el sobrenadante.

Se añadieron 160µl de cloroformo, se agitó el tubo de polipropileno por inversión y se incubó aproximadamente durante 3 minutos hasta verse bien diferenciadas las dos capas. Posteriormente se centrifugó a 12000 rpm durante 15 minutos a 4°C, se recogió el sobrenadante con cuidado de no tocar la interfase blanquecina. Se añadieron 400µl de isopropanol, se agitó por inversión y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se centrifugaron a 12000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Se eliminó el sobrenadante por decantación. A partir de esta centrifugación la muestra debe permanecer siempre en hielo. Posteriormente se añadieron 800µl de etanol 75% diluido en H₂O bidestilada con dietilpirocarbonato (DEPC) 0,1%. Se centrifugó a 7500 rpm durante 5 minutos a 4°C y se eliminó el sobrenadante decantando cuidadosamente. Una vez seco, se resuspendió el precipitado en 25µl de H₂O DEPC.

5.6.2 Cuantificación del ARN

Para determinar la concentración y la pureza del ARN se utilizó un *NanoDrop 2000c Spectrophotometer (Thermo Scientific)* ajustado a 2 longitudes de onda: 260 y 280nm. La absorbancia a 260nm proporcionó la cantidad de ácidos nucleicos y a 280nm la cantidad de proteína. El grado de pureza de la muestra se determinó estudiando la ratio 260/280, considerándose aceptable la oscilación entre 1,8 y 2. Una vez determinada la pureza, se toma el valor de absorbancia de 260nm para determinar la cantidad de ARN extraído. Una vez determinada la concentración, se normalizan todas las muestras a una misma concentración: 0,01µg/µL en el caso del hígado y 0,05µg/µL en el caso de la grasa.

5.6.3 Retrotranscripción

La retrotranscripción consiste en una amplificación del ARN extraído en forma de ADN complementario (ADNc). De esta forma se amplifica la cantidad de ARN contenido en la muestra y al convertir la secuencia de ARN a ADN se asegura la estabilidad de la molécula durante la PCR en tiempo real. La reacción se realiza en un volumen final de 30µg con las siguientes proporciones:

Tabla 17. Cantidades de los reactivos para la reacción de retrotranscripción.

Reactivo	Casa comercial	Volumen (µL)
H ₂ O DEPC	-	3,58
Tampón de reversotranscripción (5X first strand buffer)	Invitrogen	6
Mezcla de dNTPs 100mM (dTTP, dCTP, dGTP, dATP)	Invitrogen	6
MgCl ₂ 50mM	Invitrogen	1,5
Cebadores aleatorios (Random primers 3µg/µL)	Invitrogen	0,17
Inhibidor de RNAsas (RNAsa OUT™ 40U/µL)	Invitrogen	0,25
Reverse transcriptasa (M-MLV 200U/µL)	Invitrogen	1
Muestra de ARN 10µL		

La mezcla se incubó en el termociclador con las siguientes condiciones: 25°C (10 minutos), 37°C (50 minutos) y 70°C (15 minutos).

5.6.4 PCR en tiempo real

Una vez obtenido el ADNc, se determinaron los niveles de ARNm de los genes de interés mediante PCR a tiempo real (RT-PCR) (también conocida como PCR cuantitativa, qPCR) con el equipo 7300 *Real Time PCR System* (*Applied Biosystems*). Los resultados fueron expresados en términos relativos comparando nuestro gen de interés con un gen control.

Esta técnica se basa en la capacidad de detectar el producto de PCR (amplicón) en cada ciclo, utilizando fluorescencia. En esta tesis se utilizaron dos formas diferentes para detectar los productos de PCR:

- Sondas Taqman: Esta técnica se basa en el empleo de sondas específicas unidas a dos fluorocromos: uno, denominado *reporter*, se encuentra unido de forma covalente en el extremo 5' de un oligonucleótido y el otro, un desactivador de fluorescencia (*quencher*) se encuentra en el extremo 3'. El quencher inhibe la fluorescencia del reporter cuando es excitado por la fuente de luz del termociclador. Cada sonda específica hibrida en la zona intermedia entre el cebador directo y el inverso. A medida que la Taq polimerasa sintetiza en sentido 5'-3', la actividad exonucleasa 5'-3' de esta misma enzima degrada la sonda quedando separado el fluoróforo del *quencher* y permitiendo así la emisión de la fluorescencia. La fluorescencia detectada es directamente proporcional a la cantidad de fluoróforo liberado y, por lo tanto, a la cantidad de ADNc de interés presente en el producto de PCR. La mezcla de PCR para este método se muestra en la tabla 18 y se calcula para un volumen final de 12µL por cada pocillo.

Tabla 18. Cantidad de los reactivos para la RT-PCR utilizando sondas Taqman.

Reactivo	Casa comercial	Volumen (µL)
H ₂ O	-	2,82
Master mix	Applied Biosystems	6
Sonda Taqman®	EurofinsDNA	0,36
Cebador directo 10µM	EurofinsDNA	0,36
Cebador inverso 10µM	EurofinsDNA	0,36
Muestra ADNc 0,01/0,05µg/µL	-	2

El protocolo utilizado para la amplificación consistió en 40 ciclos de 2 minutos a 50°C, 10 minutos a 95°C, 15 segundos a 95°C y 1 minuto a 60°C en un sistema de PCR a tiempo real (*7300 Real Time PCR System, Applied Biosystems*).

-SYBR Green: Esta técnica se basa en el empleo de un fluorocromo inespecífico capaz de unirse a la molécula de ADN de cadena doble. El complejo fluorocromo-ADN se excita con luz azul y emite luz verde. En cada ciclo de la PCR se generan moléculas de ADN de doble cadena, generando más fluorescencia por lo que ésta aumenta de forma proporcional al producto de PCR. La mezcla de PCR para SYBR Green se muestra en la tabla 19 y se calcula para un volumen final de 12µL por pocillo.

Tabla 19. Cantidad de los reactivos para la RT-PCR utilizando el método SYBR Green.

Reactivo	Casa comercial	Volumen (μL)
H ₂ O	-	3,1
Master mix	Agilent	6
Dye (1:500)	Agilent	0,18
Cebador directo 10μM	EurofinsDNA	0,36
Cebador inverso 10μM	EurofinsDNA	0,36
Muestra ADNc 0,01/0,05μg/μL	-	2

El protocolo utilizado para la amplificación consistió en un paso inicial de 3 minutos a 95°C y 32 segundos a 60°C, a continuación, se produce la fase de disociación que consiste en 15 segundos a 95°C y 15 segundos a 95°C. Este proceso se realizó con el mismo sistema de PCR a tiempo real mencionado anteriormente.

Todas las muestras fueron analizadas por duplicado incluyendo un control negativo (sin muestra). En la tabla 20 se muestran las secuencias de las sondas y cebadores utilizados en esta tesis.

Para determinar la concentración de ADNc en cada muestra se analiza el valor CT (número de ciclos requeridos para que la señal fluorescente supere el umbral definido por los niveles de fondo o *background*). El valor CT es inversamente proporcional a la cantidad de ADNc.

Tabla 20. Lista de cebadores y sondas utilizados para el análisis de expresión mediante PCR a tiempo real.

Nombre del gen (proteína)	Especie	Método	Secuencia/Referencia
hprt	<i>Mus musculus</i>	SYBR Green	Directo AAGCTTGCTGGTGAAAAGGA Reverso TTGCGCTCATCTTAGGCTTT
HPRT	<i>Homo sapiens</i>	SYBR Green	Directo ACCCCACGAAGTGTTGGATA Reverso AAGCAGATGGCCACAGAACT
Col1a1	<i>Mus musculus</i>	SYBR Green	Directo CCTAATGCTGCCTTTTCTGC Reverso ATGTCCCAGCAGGATTTGAG
Col1a1	<i>Homo sapiens</i>	SYBR Green	Directo GCTCGTGGAAATGATGGTGC Reverso ACCCTGGGGACCTTCAGAG
Col1a2	<i>Mus musculus</i>	SYBR Green	Directo CCGTGCTTCTCAGAACATCA Reverso CTTGCCCCATTTCATTTGTCT
Col1a2	<i>Homo sapiens</i>	SYBR Green	Directo GCAGGAGGTTTCGGCTAAGT Reverso CAGACTCCTTGTCGCGAGA
Col3a1	<i>Mus musculus</i>	SYBR Green	Directo GCACAGCAGTCCAACGTAGA Reverso TCTCCAAATGGGATCTCTGG
Col3a1	<i>Homo sapiens</i>	SYBR Green	Directo TCAAAGGTGAACGTGGCAGT Reverso GTCCTGGGTTACCATTAC
Col4a1	<i>Mus musculus</i>	SYBR Green	Directo AAAGGGAGAAAGAGGCTTGC Reverso CACCTTTGTCTCCAGGTAAG
Col4a1	<i>Homo sapiens</i>	SYBR Green	Directo AAGGATCTGTTGGTGAATG Reverso CACCTTTGTCTCCAGGTAAG
tgfb	<i>Mus musculus</i>	SYBR Green	Directo AAGCTTGCTGGTGAAAAGGA Reverso TTGCGCTCATCTTAGGCTTT
tgfb	<i>Homo sapiens</i>	SYBR Green	Directo GGACCAGTGGGGAACACTAC Reverso AGAGTCCCCTGCATCTCAGAGT

Tabla 20. (Continuación).

Nombre del gen (proteína)	Especie	Método	Secuencia/Referencia
hprt	<i>Mus musculus</i>	Taqman	Comercial (<i>Applied biosystems</i> . Ref. Mm03024075_m1)
HPRT	<i>Homo sapiens</i>	Taqman	Comercial (<i>Applied biosystems</i> . Ref. Hs02800695_m1)
Fasn (FAS)	<i>Mus musculus</i>	Taqman	Comercial (<i>Applied biosystems</i> . Ref. Mm00662319_m1)
Fasn (FAS)	<i>Homo sapiens</i>	Taqman	Comercial (<i>Applied biosystems</i> . Ref. Hs01005622_m1)
ACACA (ACC)	<i>Homo sapiens</i>	Taqman	Comercial (<i>Applied biosystems</i> . Ref. Hs01046047_m1)
Mlxipl (ChREBP)	<i>Mus musculus</i>	Taqman	Comercial (<i>Applied biosystems</i> . Ref. Mm2342723_m1)
chrebp	<i>Homo sapiens</i>	Taqman	Comercial (<i>Applied biosystems</i> . Ref. Hs00975714_m1)
Srebp1	<i>Mus musculus</i>	Taqman	Comercial (<i>Applied biosystems</i> . Ref. Hs01088679_g1)
Nr1h2 (LxR)	<i>Mus musculus</i>	Taqman	Comercial (<i>Applied biosystems</i> . Ref. Mm00437265_g1)
Fgf21 (Fgf21)	<i>Mus musculus</i>	Taqman	Comercial (<i>Applied biosystems</i> . Ref. Mm00840165_g1)
Rbl1 (p107)	<i>Mus musculus</i>	Taqman	Comercial (<i>Applied biosystems</i> . Ref. Mm01250721_m1)
RBL1 (p107)	<i>Homo sapiens</i>	Taqman	Comercial (<i>Applied biosystems</i> . Ref. Hs00765700_m1)

6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos obtenidos tras los procedimientos experimentales in vivo e in vitro, se presentan como la media de los grupos \pm el error estándar de la media (*standard error of the mean*, SEM). El tamaño muestral de las poblaciones de cada experimento se detalla en los pies de figura de los resultados y se representa con la letra “n”.

Los datos obtenidos en todos los experimentos se analizaron mediante el software estadístico GraphPad Instad (*GraphPad Instad Software, v5*).

Para el análisis, se excluyeron las muestras y/o animales cuyo valor se desviaba ± 2 veces la desviación estándar³¹², o cuando se observara un comportamiento inadecuado durante el procedimiento experimental.

Antes de realizar el análisis estadístico, se realiza un test de normalidad. Se utilizó el test Shapiro-Wilk para un conjunto de muestras de $n \leq 0$ y ≥ 7 , y el test Kolmogorov-Smirnov cuando el $n \leq 6$ ³¹³. Cuando las poblaciones analizadas muestran una distribución normal, se realizan test estadísticos paramétricos y cuando no pasan el test de normalidad, se realizan test estadísticos no paramétricos^{314, 315}.

Los resultados del análisis estadístico tras la aplicación del test correspondiente se consideran significativos con una probabilidad de error menor o igual de 0.05, 0.01 o 0.001.

6.1 TEST PARAMÉTRICOS

Se realizan sobre aquellos experimentos cuyos grupos experimentales sigan una distribución Gaussiana (normal).

6.1.1 ANOVA de una vía

El análisis de la varianza (*ANOVA*) determina si hay diferencia entre las medias de tres o más poblaciones que siguen una distribución normal y son independientes entre sí. Una vez realizado el test, en caso de aceptar la hipótesis alternativa que indica que sí hay diferencias entre las medias, es necesario realizar un test a posteriori para comprobar qué medias son las que causan significación. Para ello se utilizó el Tukey test con corrección de Kramer que permite que los diferentes grupos tengan diferente tamaño muestral³¹⁶. A diferencia del test a posteriori Bonferroni, con el test Tukey-Kramer, se comparan dos a dos los grupos experimentales de forma simultánea³¹⁷.

6.1.2 T-Test

Compara las medias de dos poblaciones desapareadas asumiendo que siguen una distribución normal. Es un test robusto, puesto que es capaz de comparar poblaciones con un $n \leq 5$ ^{318, 319}. En un contraste de hipótesis bilateral (2 colas), se estudia la desigualdad entre las medias, siendo la región crítica del estadístico ambas regiones correspondientes a la cola inferior y superior de la distribución. En un contraste unilateral (una cola) la desigualdad en la hipótesis señala en una sola dirección. En el desarrollo de esta tesis, se utilizó t-test de dos colas.³²⁰

6.2 TEST NO PARAMÉTRICOS

Se realizan sobre aquellos experimentos cuyos grupos experimentales no siguen una distribución Gaussiana (normal).

6.2.1 Test Kruskal-Wallis

Al igual que con el *ANOVA*, para hacer comparaciones entre múltiples poblaciones que no siguen una distribución normal, se realiza el análisis de la varianza mediante el test de *Kruskal-Wallis* seguido de un *post hoc test de Dunn* para determinar entre qué poblaciones existe la significancia^{321, 322}.

6.2.2 Test Mann-Whitney

Para comparar dos poblaciones con una distribución no paramétrica se utiliza el test de Mann-Whitney³²³.

6.3 CORRELACIONES ENTRE VARIABLES

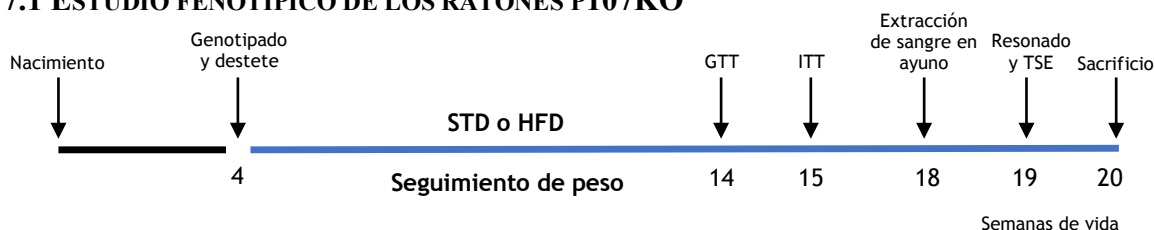
Durante esta tesis se realizaron correlaciones entre los niveles de p107 y diferentes variables mediante el coeficiente de correlación de Pearson (si los datos siguen una distribución normal) o el coeficiente de correlación de Spearman (si los datos no siguen una distribución normal) (r)³²⁴.

6.4 MODELO DE REGRESIÓN LINEAL MULTIVARIANTE

Además, se estudió la relación entre la expresión de p107 y diferentes factores fibrogénicos mediante el modelo de regresión lineal multivariante³²⁵. El criterio usado para seleccionar el mejor modelo se basó en el Akaike Information Criterion (AIC) asumiendo que la multicolinealidad fue rechazada. El modelo óptimo se obtuvo automáticamente mediante selección jerárquica de manera bidireccional, de manera que las variables independientes entran o salen dependiendo de su significación.

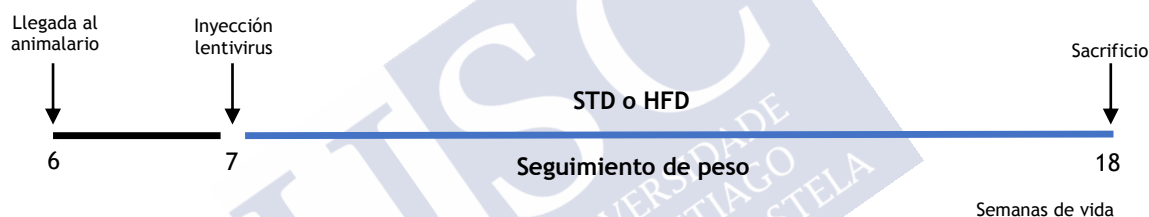
7 DISEÑOS EXPERIMENTALES EN RATONES

7.1 ESTUDIO FENOTÍPICO DE LOS RATONES P107KO



Para este experimento se utilizaron ratones macho o hembras KO o haploinsuficientes para el gen *Rb11* (Suministrados por el Doctor Anxo Vidal, del CIMUS-Universidad de Santiago de Compostela) y sus controles de tipo salvaje (*wild type*, WT) hermanos de camada de 4 semanas de edad al inicio del experimento. Fueron expuestos a una dieta estándar (STD) o con un 60% de grasa (HFD) después de ser destetados. Hasta su sacrificio a las 20 semanas de edad se hizo un seguimiento del peso corporal y se realizó un fenotipado metabólico de dichos ratones.

7.2 ESTUDIO DE LA INHIBICIÓN ESPECÍFICA DE HÍGADO DE P107 DURANTE 11 SEMANAS EN RATONES C57BL6 EXPUESTOS A DIETA ESTÁNDAR O A HFD



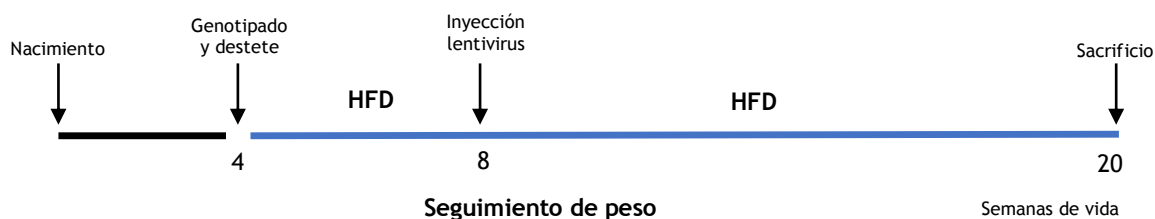
Para este experimento se usaron ratones macho adulto de entre 5 y 6 semanas de edad y un peso aproximado de 25g de la cepa C57BL6 procedentes del animalario central de la Universidad de Santiago de Compostela. Después de una semana de adaptación estabulados en cajas con 5 ratones cada una, se realizó la inyección de los lentivirus (shLuciferasa para el grupo control y shp107 para el grupo a estudio) a través de la vena de la cola para producir una disminución de la expresión de p107 mayoritariamente en el hígado. Inmediatamente los ratones fueron devueltos a la misma caja añadiendo una dieta con un 60% de las calorías procedentes de la grasa (HFD). Se realizó un seguimiento del peso corporal durante 11 semanas y luego fueron sacrificados recogiendo muestras de plasma y tejidos de interés.

7.3 ESTUDIO DE LA INHIBICIÓN ESPECÍFICA DE HÍGADO DE P107 DURANTE 7 SEMANAS EN RATONES C57BL6 EXPUESTOS A HFD



El experimento fue exactamente idéntico al explicado en el punto anterior (7.2) pero en este caso los ratones fueron sacrificados a las 7 semanas tras la inyección lentiviral.

7.4 RECUPERACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE p107 EN HÍGADO DE RATONES p107KO



Para este experimento se utilizaron ratones macho KO para el gen *Rbl1*. Una vez destetados a las 4 semanas de edad fueron expuestos a una dieta con un 60% de grasa (HFD) y comenzamos un seguimiento de peso. 4 semanas después se realizó la inyección del vector lentiviral a través de la vena de la cola para producir la sobreexpresión de p107 mayoritariamente en el hígado (y lentivirus con expresión de GFP para los controles). Se continuó con la dieta HFD y el seguimiento de peso hasta las 20 semanas de edad, cuando se procedió al sacrificio y toma de muestras.









RESULTADOS



1 ESTUDIO FENOTÍPICO Y MOLECULAR DE RATONES KNOCK OUT (KO) PARA p107

1.1 LA DEFICIENCIA DE p107 PRODUCE UN FENOTIPO DELGADO TANTO EN CONDICIONES DE DIETA ESTÁNDAR COMO CON DIETA ALTA EN GRASA

A partir de las 3 semanas de edad (destete), monitorizamos el peso corporal de los ratones p107KO y de sus controles WT compañeros de camada alimentados con una dieta estándar (STD) o con una exposición prolongada a una dieta alta en grasa (HFD) (15 semanas). Este análisis nos reveló un peso corporal ligeramente inferior en los ratones p107KO en comparación con los controles después de la exposición a STD (Fig. 1a). Esta diferencia fue más evidente en los ratones alimentados con HFD; mostrando hasta un 30% menos de aumento de peso en comparación con los controles (peso corporal [g] WT: 45.83 ± 1.3 vs p107 KO 33.5 ± 0.17) (Fig. 1b). Esta diferencia también se encontró en ratones heterocigotos para p107 que mostraron una disminución intermedia del peso corporal. El estudio de la composición corporal indicó que los ratones p107KO tenían una menor cantidad de masa grasa al exponerse a una dieta STD o una HFD (Fig. 1c y 1d). Es importante tener en cuenta que esta diferencia no es una consecuencia de las alteraciones en la ingesta de alimentos ni en los grupos de STD (Fig. 1e) ni de HFD (Fig. 1f), ya que no hubo cambios significativos en la ingesta de alimentos entre los ratones p107KO en comparación con los controles. Además, tampoco es una consecuencia de las diferencias de tamaño porque los ratones p107KO no eran más pequeños que sus controles compañeros de camada y no se encontraron diferencias en los niveles de IGF-1 (Fig. 1g y 1h).

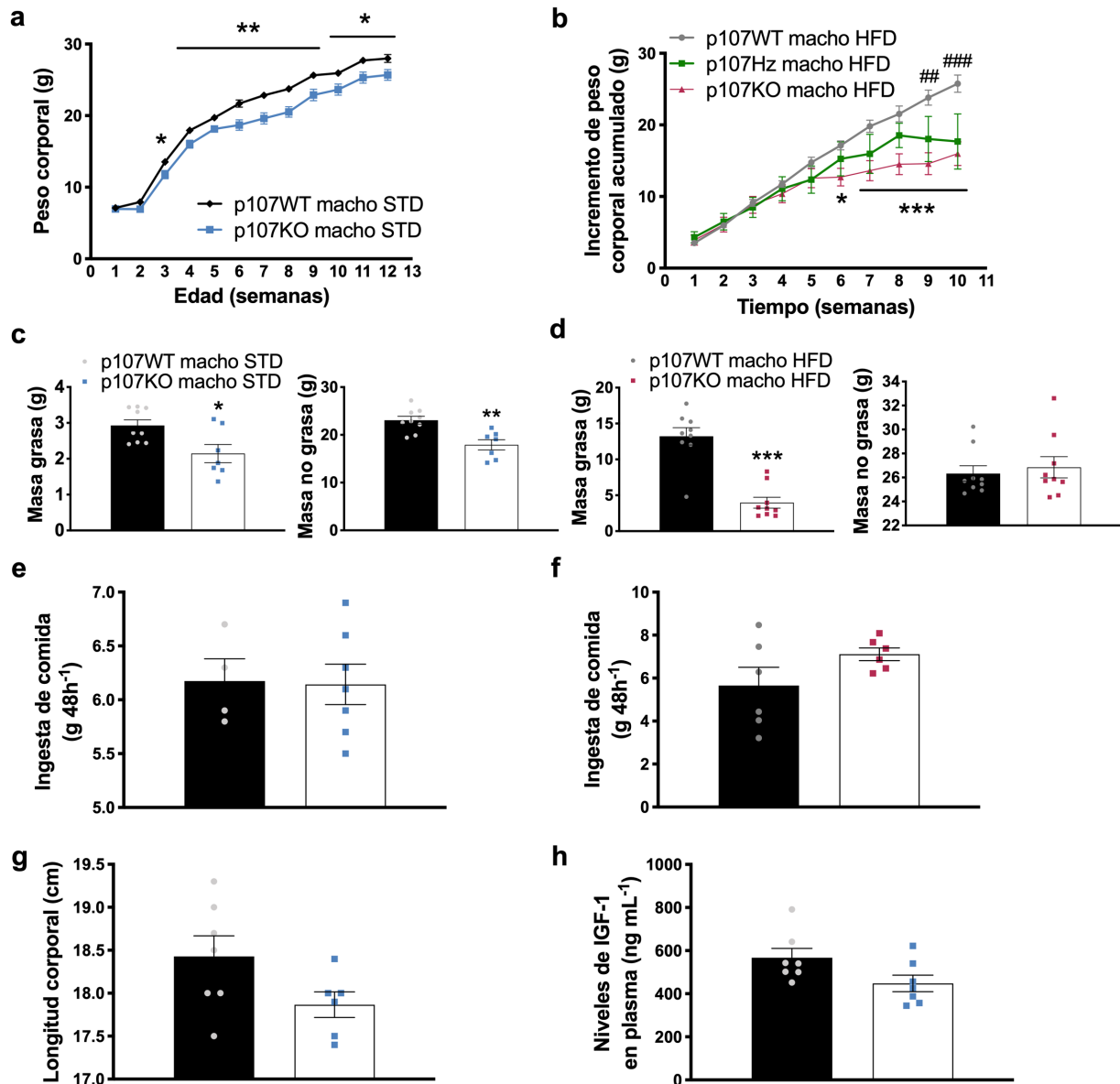


Figura 1. Los ratones p107KO son más delgados y resistentes a los efectos de la HFD. (a) Promedio del peso corporal de los ratones control (n = 15) y p107KO (n = 10) con una dieta estándar (STD). (b) Incremento de peso corporal acumulado durante 11 semanas con una HFD en ratones control (n = 15) y ratones homocigotos p107KO (n = 9) y ratones heterocigotos p107KO (n = 12). (c) Composición corporal (masa grasa y masa no grasa) en ratones control y ratones p107KO alimentados con STD o (d) con HFD. (e) Ingesta diaria promedio de ratones control y p107KO con STD y (f) con HFD. Longitud corporal en centímetros (g) y niveles plasmáticos de IGF-1 (h) en ratones p107KO de 21 semanas de edad con STD. Los datos se expresan como media \pm SEM. Después de aplicar el T-test (menos en la gráfica 1a que se realizó un ANOVA de una vía para la comparación de los 3 grupos): * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$ entre los ratones control y p107KO. ## $p \leq 0.01$ y ### $p \leq 0.001$ comparación de heterocigotos p107 con control.

1.2 LOS RATONES CON DEFICIENCIA DE P107 MOSTRARON UN GASTO ENERGÉTICO INCREMENTADO

Para determinar el mecanismo subyacente a la resistencia a la obesidad inducida por la dieta en ratones p107KO, evaluamos el gasto energético mediante calorimetría indirecta en ratones control y p107KO en condiciones de STD y HFD. Este análisis reveló que el gasto de energía era significativamente mayor en los ratones p107KO en comparación

con los controles, tanto en condiciones de STD (Fig. 2a) como en HFD (Fig. 2b), y además este aumento no fue asociado con cambios en la actividad locomotora (Fig. 2c y 2d).

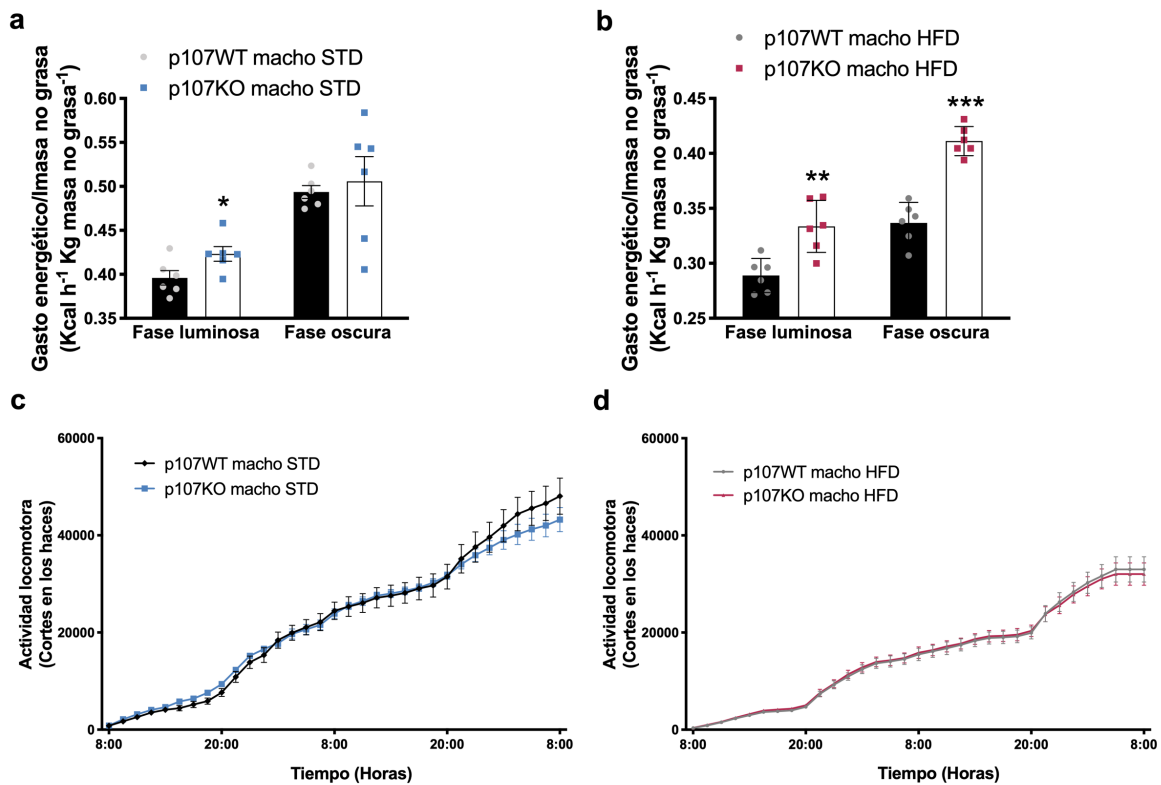


Figura 2. Los ratones p107KO mostraron un incremento en el gasto energético. Gasto energético corregido por la masa magra en ratones p107KO de 18 semanas de edad en STD (a) y HFD (b). Actividad locomotora en ratones control y ratones p107KO alimentados con STD (c) y con HFD (d). Los datos se expresan como media \pm SEM. Después de aplicar el T-test: * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$ entre los ratones control y p107KO.

1.3 LOS RATONES p107KO MANIFESTARON UN INCREMENTO DE LA CAPTACIÓN POSTPANDRIAL DE LÍPIDOS EN TABE Y TAM

Para descartar que el fenotipo de los ratones p107 KO se debiera a la disminución de la absorción de grasa, evaluamos la captación de grasa procedente de la dieta en el hígado, TABe y TAM in vivo. Específicamente, la administración de un bolo de aceite de oliva no mostró diferencias significativas entre los dos grupos de ratones en cuanto a los niveles de TG y AGs circulantes (Fig. 3 a, b). Por el contrario, la biodistribución tisular mostró algunos cambios interesantes, principalmente un aumento significativo en los recuentos de radioactividad en TABe y una tendencia similar en TAM, lo que indicaba una mayor captación, mientras que el hígado no se vio afectado (Fig. 3c).

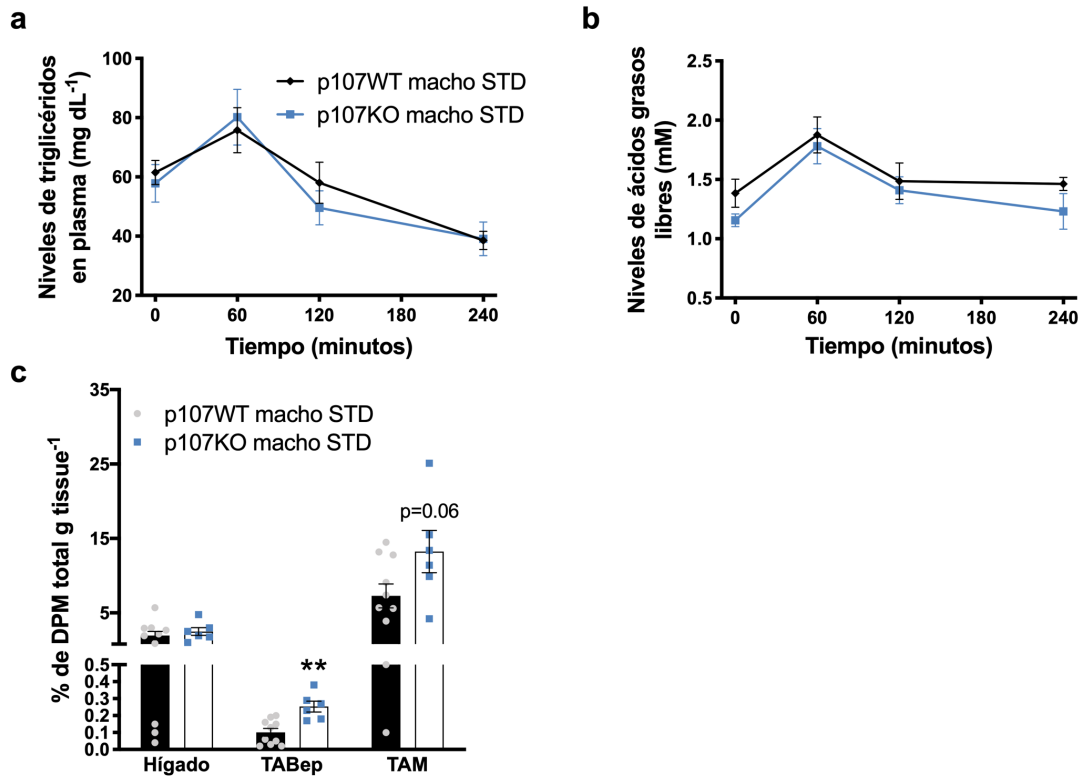


Figura 3. Los ratones p107KO presentan una mayor captación de grasa postprandial en TABep (tejido adiposo blanco epididimal) y TAM (tejido adiposo marrón). (a) Niveles de TG en suero después de un bolo de 200 μ l de aceite de oliva (control, n = 10 y p107KO, n = 7). (b) Niveles de ácidos grasos (AG) libres en suero después de un bolo de 200 μ l de aceite de oliva (ratones control, n = 10 y p107KO, n = 7). (c) Captación de lípidos de la dieta por el hígado, TABep y TAM después de un bolo de 200 μ l de aceite de oliva que contiene 10 μ Ci [9,10-3H] -trioleína. Los datos se expresan como media \pm SEM. Después de aplicar el T-test: * p \leq 0.05, ** p \leq 0.01, *** p \leq 0.001 entre los ratones control y p107KO.

1.4 LOS RATONES CON DEFICIENCIA DE P107 MOSTRARON UNA INCREMENTADA ACTIVIDAD TERMOGÉNICA Y AMARRONAMIENTO DEL TAB EN CONDICIONES DE STD Y HFD

El TAM es el principal tejido donde se lleva a cabo el proceso de la termogénesis ya que tiene una capacidad única para disipar el exceso de energía en forma de calor. La regulación de la termogénesis del TAM en respuesta a las señales metabólicas puede contribuir al balance energético, a la regulación de las reservas corporales de tejido adiposo y al control de los niveles de glucosa.

Debido a que el aumento del gasto energético en los ratones p107KO es independiente de la ingesta de alimentos y de la actividad locomotora, quisimos investigar los mecanismos subyacentes detrás del aumento del gasto de energía. Por lo tanto, medimos la temperatura del TAM y encontramos que estaba significativamente aumentada con respecto a los ratones controles en condiciones de STD (Fig. 4a, b), sin cambios en la temperatura corporal (Fig. 4c). El análisis histomorfológico reveló gotas de lípidos más pequeñas en el TAM de los ratones p107KO (Fig. 4d). Este resultado estaba en consonancia con el estudio de la expresión de proteínas, donde encontramos elevados niveles de expresión de varios biomarcadores termogénicos como UCP1, PPAR γ y PRMD16, indicativos de una mayor actividad termogénica (Fig. 4f). También hubo una tendencia al aumento en la ratio pHSL/HSL, lo que podría indicar un aumento

de la lipólisis (Fig. 4f). Además, observamos la esperada disminución de la expresión de p107 en el TAM de ratones p107KO en comparación con los controles (Fig 4e).

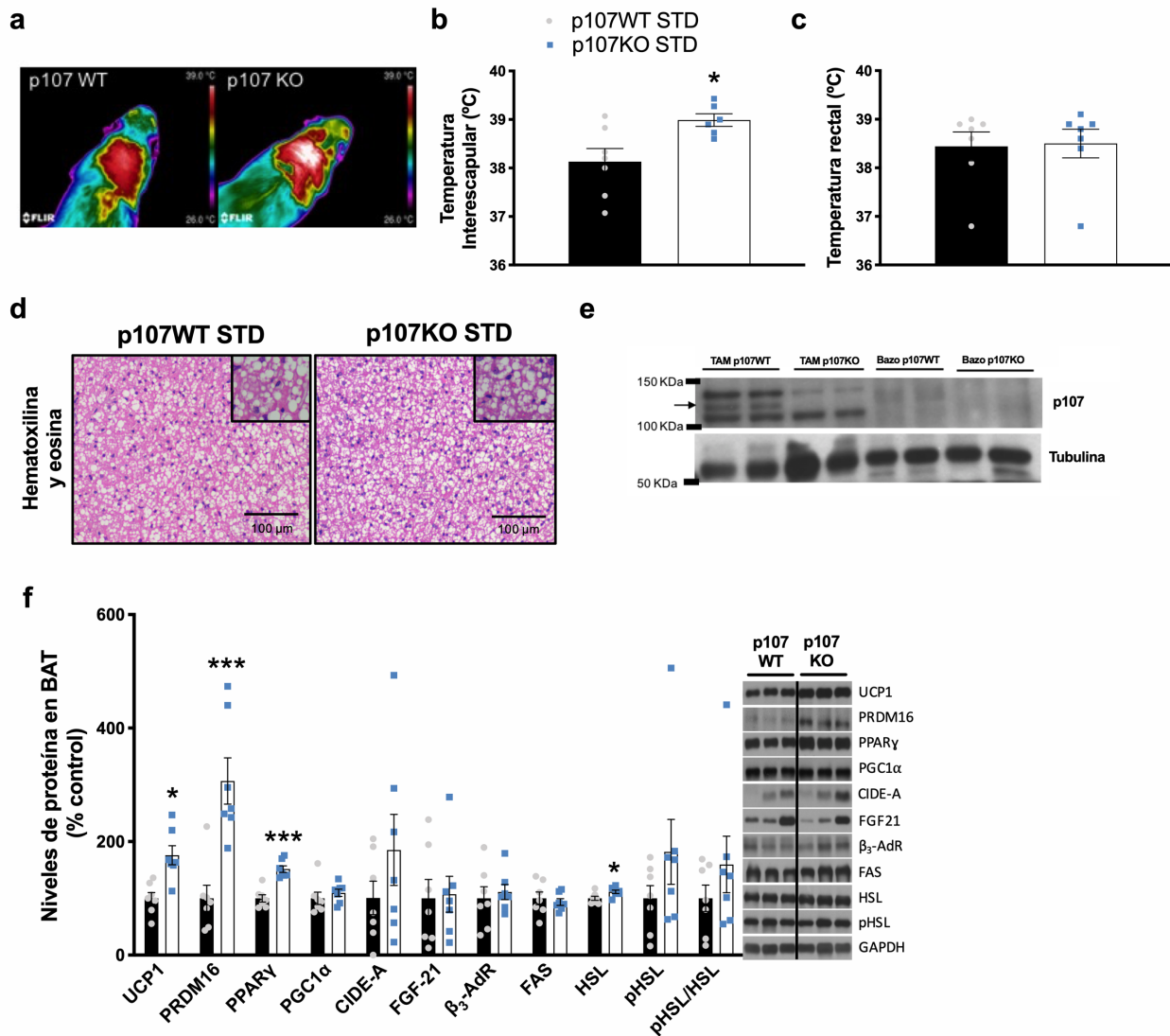


Figura 4. Los ratones p107KO presentan un programa termogénico más activo. (a) Imágenes representativas de la temperatura interescapular del TAM y (b) la cuantificación de la temperatura interescapular del TAM y (c) la temperatura corporal en los ratones control y p107KO a temperatura ambiente y bajo STD. (d) Tinción representativa de hematoxilina y eosina de TAM a las 21 semanas de edad. Los detalles se muestran a mayor aumento. (e) Imagen de western blot de la expresión de p107 en TAM y bazo (usado como control de expresión) de ratones p107WT y p107KO. (f) Cuantificación de las imágenes obtenidas mediante western blot de proteínas relacionadas con la termogénesis y la lipólisis como UCP1, Prmd16, PPAR γ , CIDE-A, FGF-21, receptor adrenérgico β_3 , FAS, HSL y pHSL en TAM de ratones control (n = 7) y ratones p107KO (n = 7) y las imágenes representativas. Los datos se expresan como media \pm SEM. Después de aplicar el T-test: * p \leq 0.05, *** p \leq 0.001 entre los ratones control y p107KO.

De acuerdo con la conocida función de p107 como regulador de la proliferación celular y la diferenciación de adipocitos^{248, 294}, evaluamos el nivel de expresión de p107 entre la fracción de adipocitos blancos maduros y la fracción vascular estromal, la cual contiene preadipocitos. Nuevamente, como se esperaba, encontramos que p107 está disminuida en TAB subcutáneo (TABsc) así como en la fracción estromal (tiempo 0) y muestra un aumento de la expresión durante la diferenciación de los adipocitos (Fig. 5a).

Con respecto al TAB, su análisis morfológico reveló una hipoplasia significativa de adipocitos en los ratones p107KO en comparación con los controles (Fig. 5b, panel superior). La tinción de UCP-1 en TAB mostró más células positivas para UCP en ratones p107KO (Fig. 5b panel inferior) y esta diferencia fue estadísticamente significativa (Fig. 5c).

Es ampliamente reconocido el papel que juegan las hormonas tiroideas en la regulación central de la termogénesis y el amarronamiento del TAB^{326, 327}, por ello medimos la cantidad de T₄ en plasma de los ratones p107KO sin encontrar diferencias estadísticamente significativas (Fig. 5d).

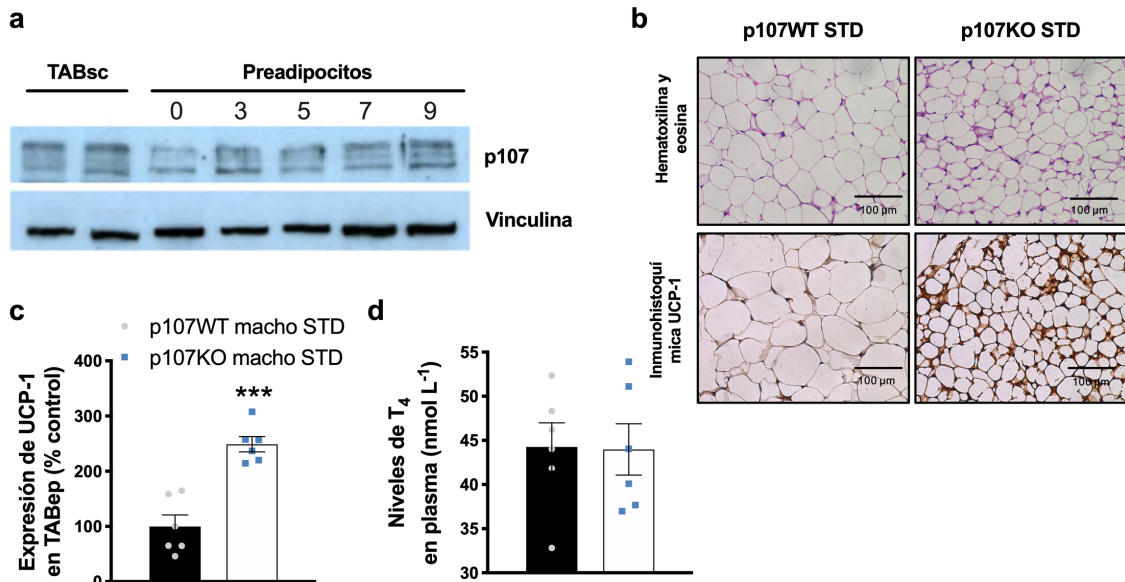


Figura 5. (a) Análisis por western blot de la proteína p107 en la fracción adipocítica blanca madura y fracción vascular estromal que contiene preadipocitos en el día 0,3,5,7 y 9 de diferenciación. (b) Tinción representativa de hematoxilina y eosina (panel superior) e inmunohistoquímica de UCP-1 (panel inferior) de TABep en ratones control (n = 7) y p107KO (n = 7). (c) Semicuantificación de la inmunohistoquímica de UCP-1 en TABep de ratones control y p107KO. (d) Concentración de T₄ en ratones control (n = 7) y p107KO (n = 7) de 21 semanas de edad con una STD determinada por un ELISA. Los datos se expresan como media ±SEM. Después de aplicar el T-test: *** p ≤ 0.001 entre los ratones control y p107 KO.

A la luz de los hallazgos descritos anteriormente sobre el aumento de la actividad de BAT y el amarronamiento del TAB, quisimos ver lo que ocurría con los grupos expuestos a HFD. En consecuencia, cuando se expusieron a HFD, los ratones p107KO mostraron una temperatura interescapular más elevada (Fig. 6a, b) sin variación en la temperatura corporal total (Fig. 6c). El análisis histomorfológico reveló gotas de lípidos más pequeñas en TAM de ratones KO (Fig. 6d, panel superior) con respecto a los controles, y la inmunohistoquímica para UCP-1 (Fig. 6d, panel inferior) produjo una señal significativamente mayor en el TAM de los ratones p107KO, indicándonos un aumento de la actividad termogénica (fig. 6e). Además, los niveles de expresión de varios marcadores termogénicos como UCP-1, PRMD16, PPARγ y CIDE-A fueron mayores en los ratones KO (Fig. 6f).

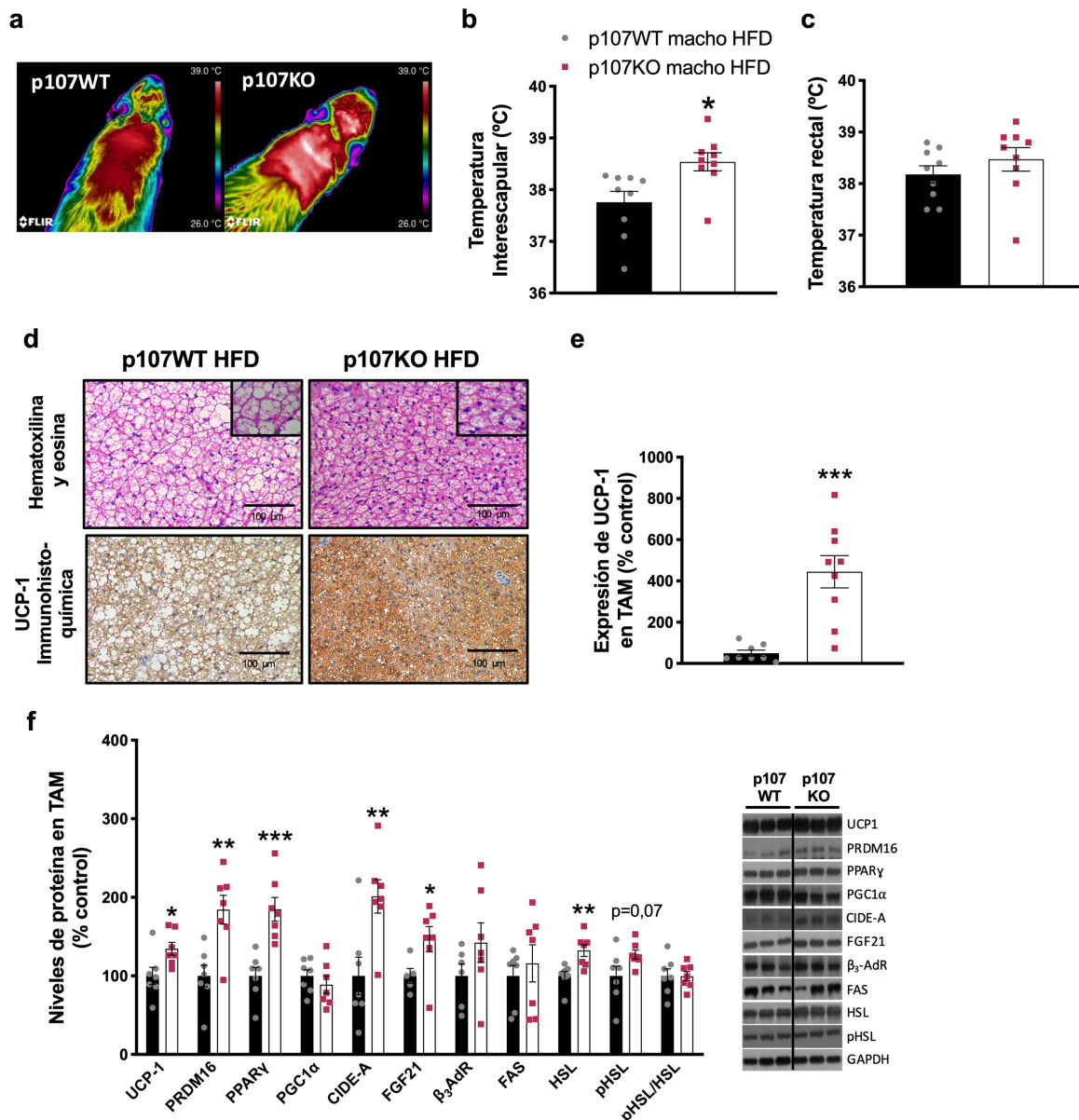


Figura 6. Los ratones p107KO tienen un programa termogénico más activo cuando se alimentaron con una HFD (a) Imágenes representativas de la temperatura interscapular del TAM y (b) la cuantificación de la temperatura interscapular del TAM y (c) la temperatura corporal en ratones control y p107KO a temperatura ambiente y con HFD. (d) Tinción representativa de hematoxilina y eosina (panel superior) y análisis inmunohistoquímico de UCP-1 (panel inferior) del TAM a las 21 semanas de edad con HFD. Los detalles se muestran a mayor aumento. (e) Semicuantificación de datos inmunohistoquímicos de UCP-1 en TAM de ratones control y p107KO con HFD. (f) Cuantificación de imágenes obtenidas por western blot de proteínas relacionadas con la termogénesis y la lipólisis, tales como UCP1, PRMD16, PPAR γ , PGC1 α , CIDE-A, FGF-21, receptor adrenérgico β 3, FAS, HSL y pHSL en TAM de ratones control (n = 7) y p107KO (n = 7) en HFD y las imágenes representativas. Los datos se expresan como media \pm SEM. Después de aplicar el T-test: * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$ entre los ratones control y p107KO.

Se sabe que FGF21 promueve la activación de la actividad termogénica del TAM y el amarronamiento del TAB en asociación con una mayor captación y oxidación de glucosa^{328, 329}. Por lo tanto, medimos la expresión del ARNm de FGF21 por qPCR en la grasa subcutánea y detectamos un aumento claro en los ratones p107KO en comparación con sus controles (Fig. 7f). Al igual que con STD, en el caso de los ratones p107KO

expuestos a HFD tampoco encontramos diferencias en los niveles plasmáticos de la hormona T₄ (Fig. 7g).

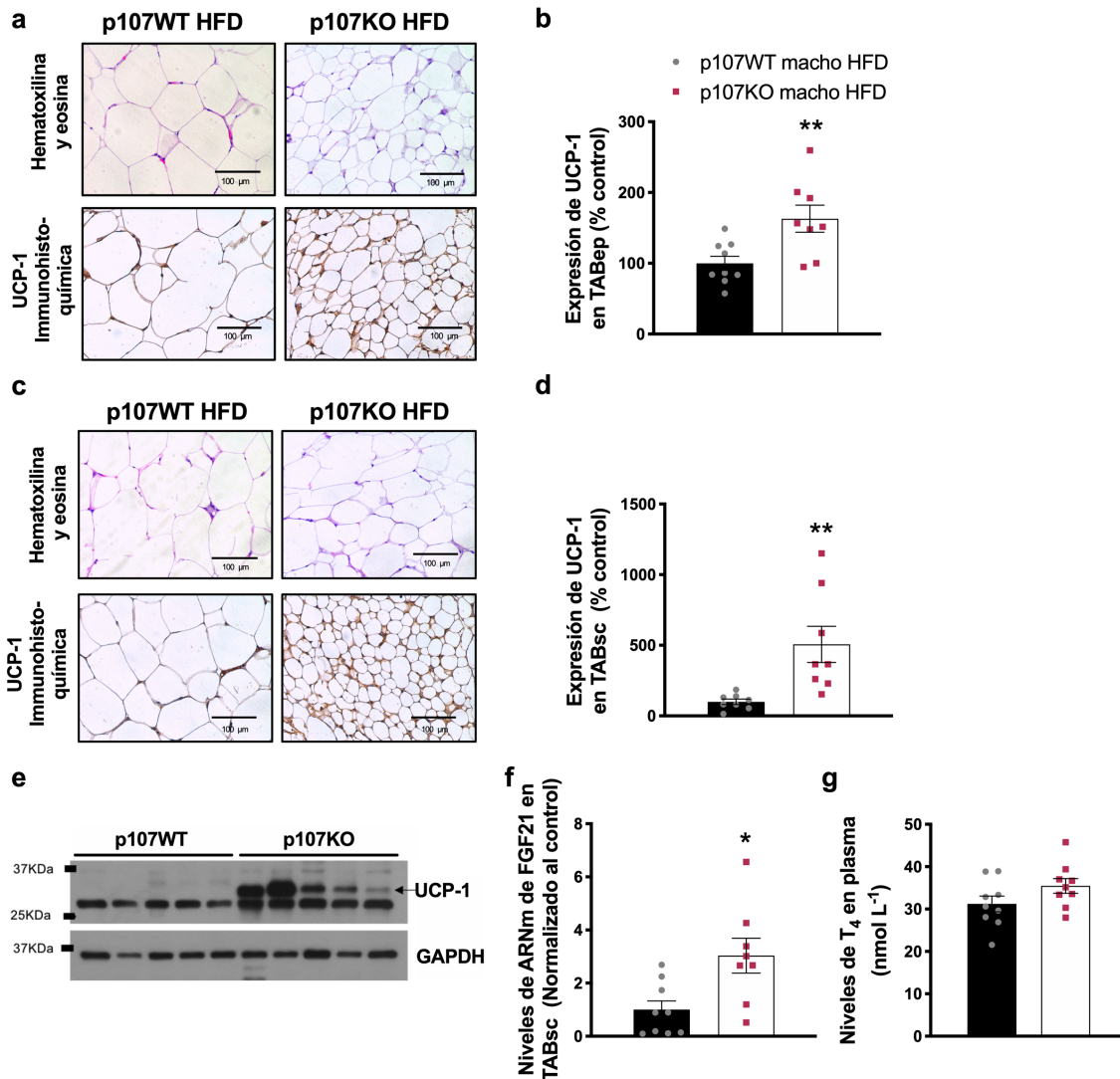


Figura 7. Los ratones p107KO presentan un mayor amarramiento del TABep (epididimal) y TABsc (subcutáneo) tras la exposición a HFD. (a) Tinción representativa de hematoxilina y eosina (panel superior) y análisis inmunohistoquímico de UCP-1 (panel inferior) de TABep en ratones control (n = 9) y p107KO (n = 9) con HFD. (b) Semicantificación de datos inmunohistoquímicos de UCP-1 en TABep de ratones control y p107KO. (c) Tinción representativa de hematoxilina y eosina (panel superior) y análisis inmunohistoquímico de UCP-1 (panel inferior) en TABsc de ratones control (n = 9) y p107KO (n = 9) en HFD. (d) Semicantificación de datos inmunohistoquímicos de UCP-1 en TABsc de ratones control y p107KO. (e) Análisis mediante western blot de UCP1 en TABsc en ratones control (n = 7) y p107KO (n = 7) con HFD. (f) Expresión de ARNm de FGF21 en TABsc de ratones control (n = 9) y p107KO (n = 9) con HFD. (g) Concentración de T₄ en ratones control (n = 7) y p107KO (n = 7) de 21 semanas de edad con una STD determinada por un ELISA. Los datos se expresan como media ±SEM. Después de aplicar el T-test: ** p ≤ 0.01 entre los ratones control y p107 KO.

1.5 LOS RATONES p107KO SON CAPACES DE MANTENER ESTABLE LA TEMPERATURA CORPORAL EN CONDICIONES DE EXPOSICIÓN A FRÍO

Para obtener más información sobre la relevancia fisiológica de p107 en la termogénesis, realizamos una prueba de tolerancia al frío. El resultado de este experimento fue difícil de predecir porque el hecho de que experimenten un mayor gasto de energía podría indicar que son hipermetabólicos y por tanto que no pueden aumentar aún más la producción de calor para evitar la pérdida de calor. Por el contrario, encontramos que los ratones deficientes en p107 pudieron aumentar aún más sus tasas metabólicas cuando se

enfrentan al estrés por frío. De hecho, después de 2 horas de exposición, parecían poder mantener su temperatura corporal mejor que los ratones WT (Fig. 8). Tomados en conjunto, nuestros hallazgos indicaron que la disminución de expresión de p107 tiene un papel beneficioso en términos de prevenir el aumento de peso inducido por HFD y además son capaces de ayudar a mantener la temperatura corporal bajo el estrés por frío agudo.

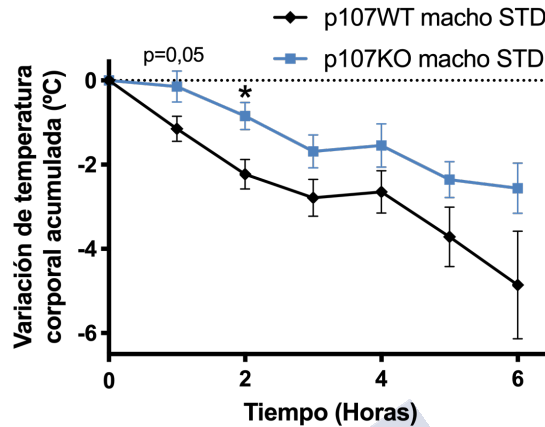


Figura 8. Temperatura rectal de los ratones control (n = 6) y p107KO (n = 6) de 15 semanas de edad tras exposición a frío (+ 4 °C) durante 6 horas. Los datos se expresan como media \pm SEM. Después de aplicar el T-test: * $p \leq 0.05$ entre los ratones control y p107 KO.

1.6 RATONES DEFICIENTES EN P107 MOSTRARON UNA MEJORA EN EL METABOLISMO DE LA GLUCOSA Y EN LA SENSIBILIDAD A LA INSULINA

Una vez que establecimos que los ratones deficientes en p107 son resistentes a HFD, decidimos estudiar en detalle su impacto en la homeostasis de la glucosa. En primer lugar, medimos los niveles de glucosa en sangre en ratones alimentados *ad libitum* (Fig. 9a y 9b) y sometidos a un ayuno de 18 horas (Fig. 9c y 9d). No encontramos diferencias significativas en los niveles de glucosa entre los ratones alimentados *ad libitum*. Por el contrario, cuando se exponen a HFD y en estado de ayuno, los ratones KO mostraron unos niveles de glucosa más bajos comparados con los ratones WT. Además, aunque los ratones deficientes en p107 expuestos a STD tenían ligeras diferencias con respecto a los controles (mejoría en la tolerancia a la glucosa; Fig. 9e) después de la exposición a HFD, esas diferencias se incrementaron de manera más acusada (Fig. 9f).

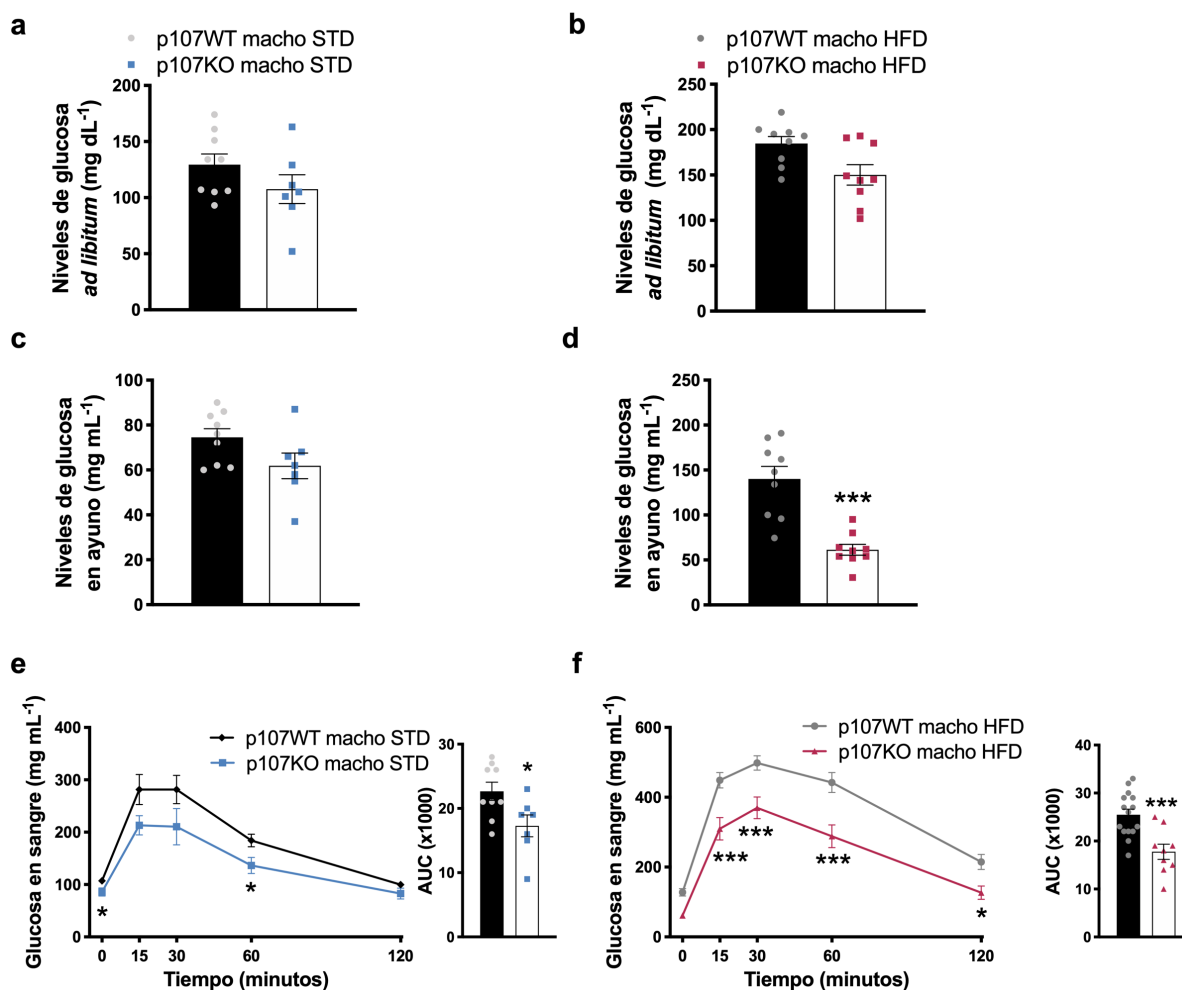


Figura 9. Los ratones p107KO muestran una mejor tolerancia a la glucosa. (a) Concentración de glucosa en sangre de ratones control y p107KO de 21 semanas de edad en STD (control, n = 7 y p107KO, n = 7) y (b) en HFD (control, n = 8; p107KO, n = 15). (c) Concentración de glucosa en sangre después de un ayuno de 18 h en ratones control y p107KO de 8 semanas de edad en STD (control, n = 7 y p107KO, n = 20) y (d) en HFD (control, n = 9; p107KO, n = 9). (e) Prueba de tolerancia a la glucosa y su área bajo la curva de ratones control (n = 7) y p107KO (n = 7) en STD y (f) en HFD (control n = 9 y p107KO n = 9) a las 9 semanas de edad. Los datos se expresan como media \pm SEM. Después de aplicar el T-test: * $p \leq 0.05$, *** $p \leq 0.001$ entre los ratones control y p107 KO.

En línea con los datos de glucosa (Fig. 9), los resultados de la evaluación de los niveles de insulina (Fig. 10a, b) y el índice HOMA (Fig. 10c, d) sugirieron que la mejor tolerancia a la glucosa en ratones deficientes en p107 era probablemente debida a la mejor sensibilidad a la insulina. Esta hipótesis fue confirmada a continuación por el test de tolerancia a insulina (Fig. 10e, g, f, h).

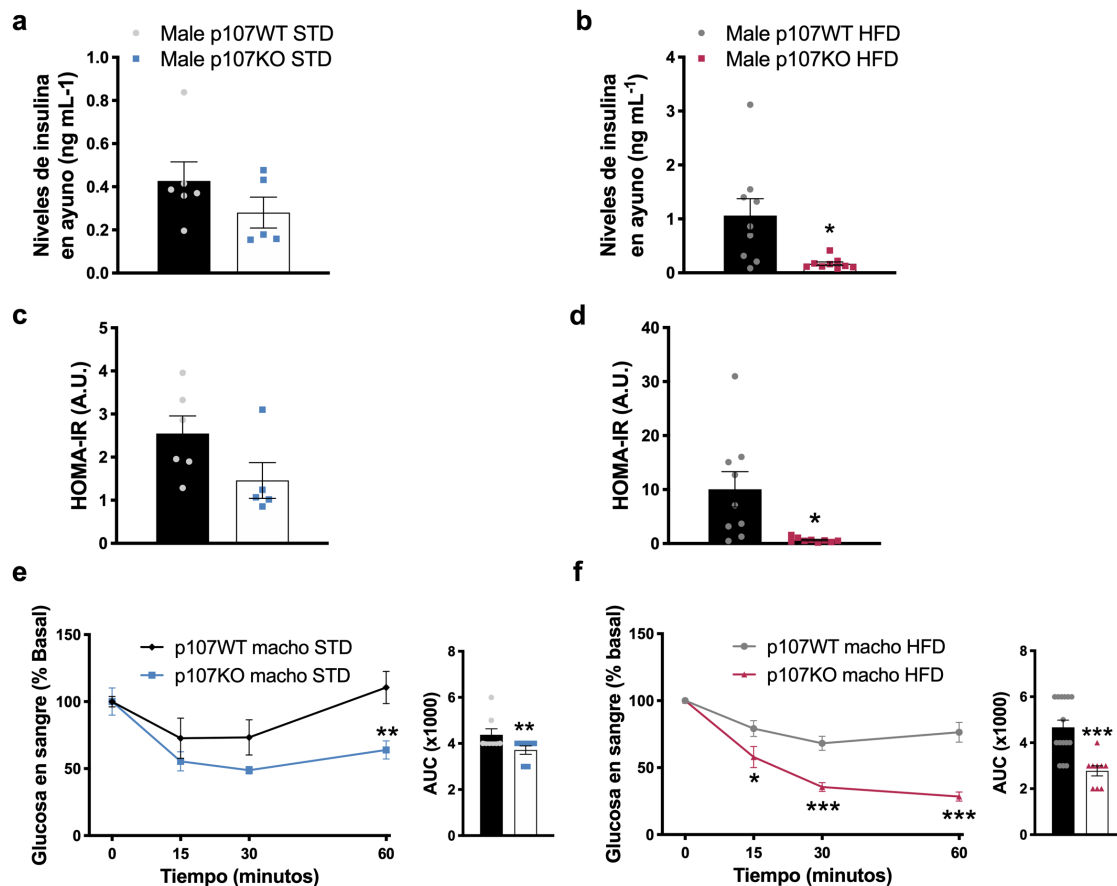


Figura 10. Los ratones p107KO presentan una resistencia a la insulina mejorada. (a) Concentraciones séricas de insulina en ratones control y p107KO de 21 semanas de edad en STD (control, n = 7 y p107KO, n = 7) y (b) en HFD (control, n = 9; p107KO, n = 9). (c) Índice HOMA en ratones control y p107KO de 21 semanas de edad con STD (control, n = 7 p107KO, n = 7) y (d) en HFD (control, n = 9; p107KO, n = 9). (e) Prueba de tolerancia a la insulina y su área bajo la curva en ratones control (n = 7) y p107KO (n = 7) en STD y (f) en HFD (control n = 9 p107 ratones KO n = 9) a las 10 semanas de edad. Los datos se expresan como media \pm SEM. Después de aplicar el T-test: * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$ entre los ratones control y p107 KO.

1.7 LA DEFICIENCIA DE p107 PREVIENE LA ESTEATOSIS HEPÁTICA INDUCIDA POR HFD

Dado el claro efecto de p107 en la disminución de la adiposidad que se manifestaba en los ratones deficientes en p107, decidimos analizar la influencia de p107 en la esteatosis hepática.

Comparamos ambos genotipos (ratones control y ratones p107KO) en relación a los niveles circulantes de TG, cantidad de TG hepáticos y deposición de lípidos en el hígado medido mediante la tinción Oil Red O en STD (Fig. 11a, 11d y 11g) sin encontrar diferencias muy significativas. Sin embargo, al someterlos a HFD, los ratones p107KO manifestaron una marcada disminución tanto de los triglicéridos circulantes como hepáticos, además de niveles más bajos de colesterol en plasma (Fig. 11b, 11c y 11e). De forma interesante, observamos una clara prevención frente a la esteatosis hepática en los ratones p107KO según lo evaluado por la tinción con Oil Red O (Fig. 11h). Además, al medir FGF21 circulante, indicador de obesidad y esteatosis hepática, observamos un claro descenso en los niveles del mismo en los ratones p107KO comparados con los WT (Fig. 11f).

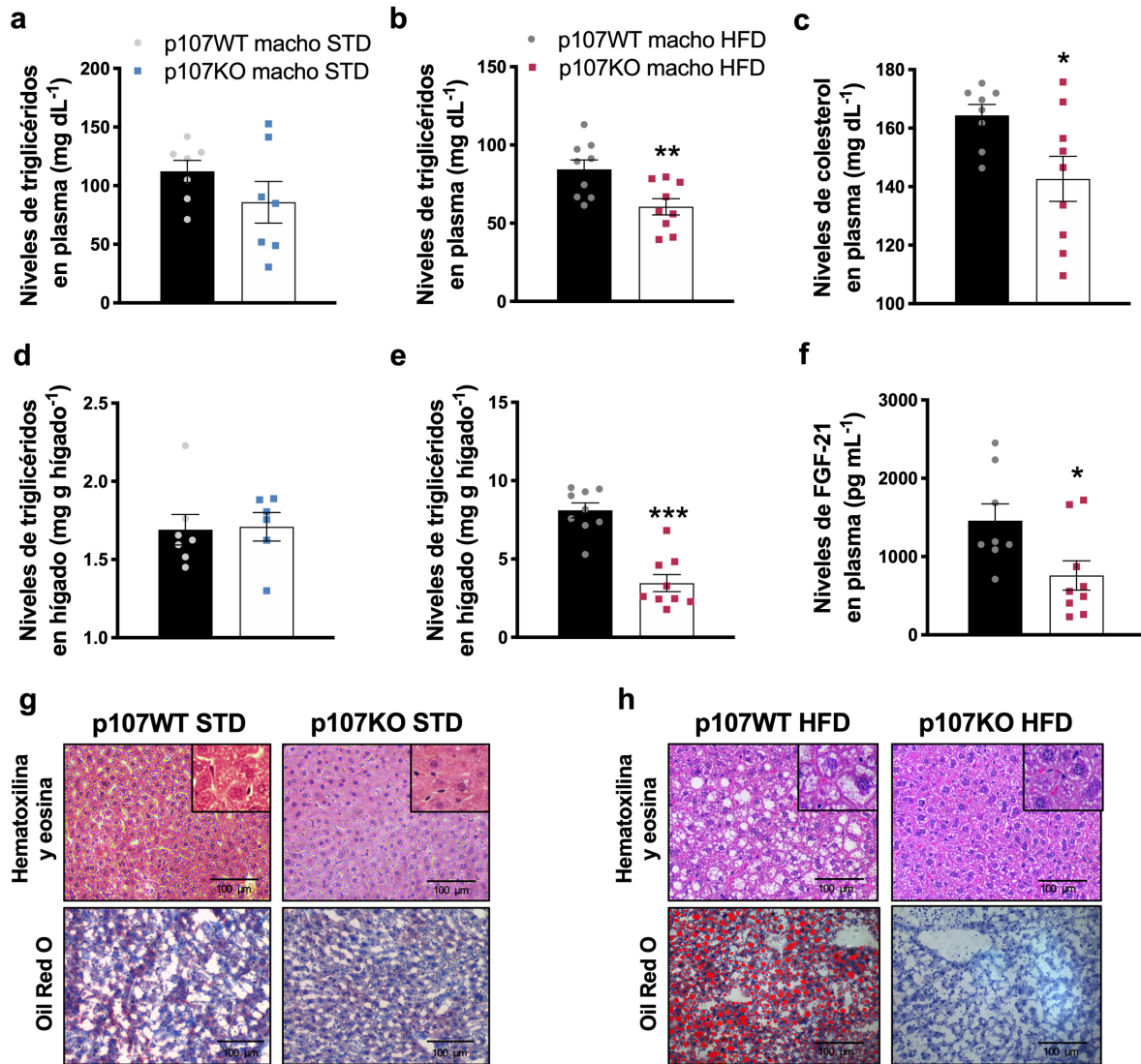


Figura 11. Los ratones p107KO son resistentes a la esteatosis inducida por HFD. (a) Niveles de TG en plasma de ratones machos de control y p107KO de 21 semanas de edad en STD (control, n = 7 y p107 ratones KO, n = 7) o (b) en HFD (control, n = 9; p107 ratones KO, n = 9). (c) Niveles de colesterol en plasma de ratones control y p107KO en HFD. (d) Contenido total de TG en el hígado de ratones control y p107KO de 21 semanas de edad en STD (control, n = 7 y p107KO, n = 7) y (e) en HFD (control, n = 9; p107 ratones KO, n = 9). (f) Concentración de FGF-21 en plasma en ratones control (n = 9) y p107KO (n = 9) de 21 semanas de edad con una HFD. (g) Tinción representativa de hematoxilina y eosina (panel superior) y tinción de Oil Red O (panel inferior) de secciones de hígado de ratones control (n = 7) y ratones p107KO (n = 7) en STD y (h) en HFD (control, n = 9; p107KO, n = 9). Los detalles se muestran a mayor aumento. Los datos se expresan como media \pm SEM. Después de aplicar el T-test: * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$ entre los ratones control y p107 KO.

2 ESTUDIO DEL PAPEL DE p107 EN LA REGULACIÓN DEL METABOLISMO HEPÁTICO EN RATONES

2.1 LOS RATONES p107KO MOSTRAN UNA INHIBICIÓN DE LA LIPÓGENESIS *DE NOVO* ASÍ COMO UN AUMENTO EN LA OXIDACIÓN MITOCONDRIAL DE AGS EN EL HÍGADO

La clara resistencia al desarrollo de esteatosis hepática en los ratones p107KO que hemos visto en la parte final del anterior punto, nos ha llevado a pensar que quizás p107 tenga alguna acción directa en el metabolismo hepático que fuese clave para el desarrollo de este fenotipo. Por ello, se ha analizado la expresión de diferentes proteínas implicadas en la LDN, encontrando un claro descenso en la expresión de FAS y ACC (Fig. 12a). El descenso de FAS fue confirmado mediante el estudio de sus niveles de ARNm (Fig. 12c).

Además, el análisis de la expresión de proteínas implicadas en la β -oxidación mitocondrial como son los transportadores de AGs CPT1 α y CPT2 mostraron un incremento, al igual que el FT implicado en la activación de este proceso PPAR α , así como diferentes proteínas utilizadas frecuentemente como marcadores de actividad mitocondrial como son el complejo IV de la mitocondria (citocromo c oxidasa) y UCP2 (Fig. 12c).

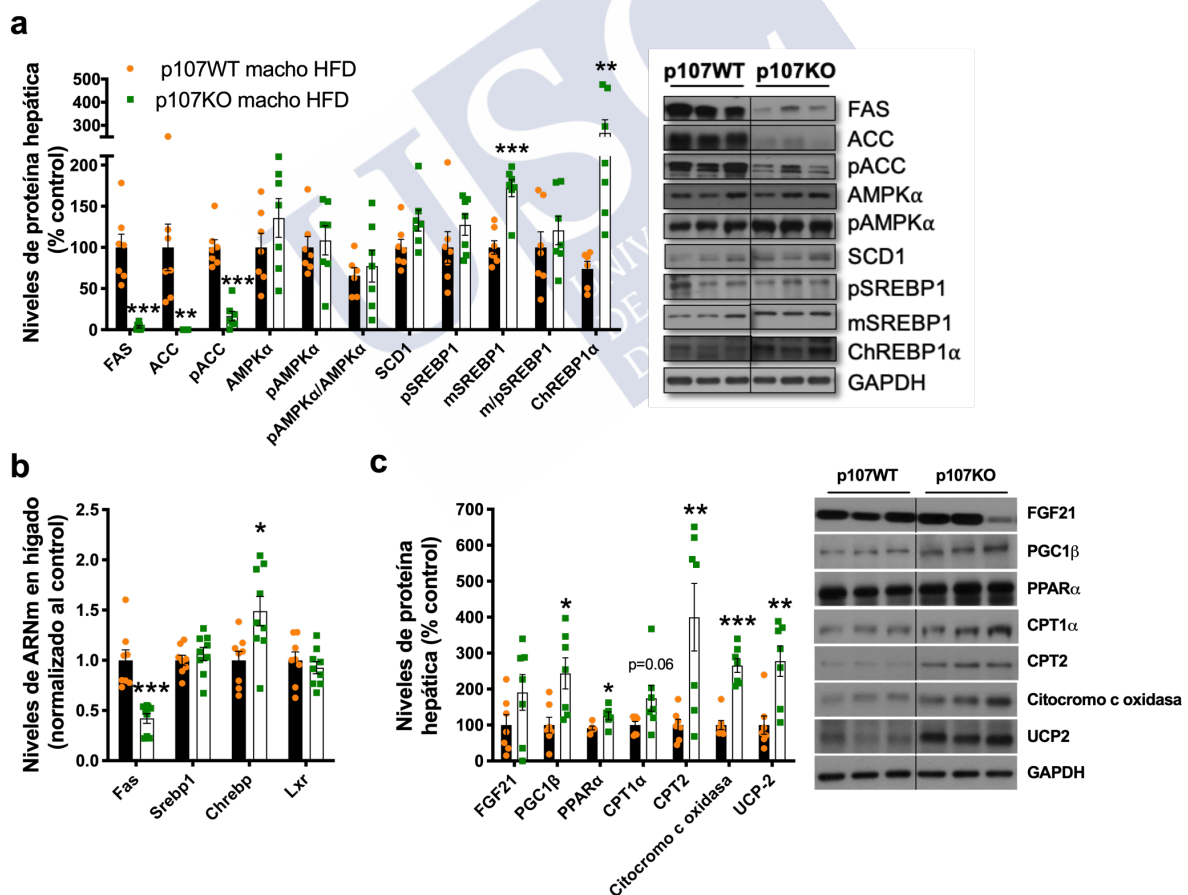


Figura 12. Los ratones p107KO alimentados con HFD presentan alteraciones en el metabolismo lipídico hepático. (a) Cuantificación de imágenes obtenidas por western blot de proteínas relacionadas con la lipogénesis *de novo*, tales como FAS, ACC, pACC, AMPK α , pAMPK α , SCD1, SREBP1p (precursor), SREBP1m (forma madura) y ChREBP1 α en hígado de ratones control (n = 7) y p107KO (n = 7) en HFD y las imágenes representativas. (b) Análisis de los niveles de ARNm de proteínas y factores de transcripción relacionados con la lipogénesis como FAS, SREBP1, ChREBP y LxR en hígado de ratones control (n = 7) y p107KO (n = 7) en HFD. (c) Cuantificación de imágenes obtenidas por western

blot de proteínas relacionadas con la lipólisis y actividad mitocondrial, tales como FGF21, PPAR α , CPT1 α , CPT2, complejo mitocondrial IV (citocromo c oxidasa) y UCP-2 en hígado de ratones control (n = 7) y p107KO (n = 7) en HFD y las imágenes representativas. Los datos se expresan como media \pm SEM. Después de aplicar el T-test: * p \leq 0.05, ** p \leq 0.01, *** p \leq 0.001 entre los ratones control y p107KO.

2.2 LAS HEMBRAS p107KO MOSTRAN LOS MISMOS EFECTOS FENOTÍPICOS Y MOLECULARES A NIVEL HEPÁTICO QUE LOS RATONES MACHO

Como sabemos existe un marcado dimorfismo sexual en patologías como la obesidad y en concreto en la acumulación de grasa, debido principalmente a factores hormonales³³⁰. Es por ello, que en investigaciones metabólicas se suelen utilizar ratones del mismo sexo, principalmente machos para así obtener unos datos más homogéneos. Sin embargo, obviamente es realmente importante contrastar que los resultados que se obtienen son aplicables en ambos sexos. Por ello, hemos expuesto a un grupo de hembras de ratón p107KO y sus controles WT a una dieta HFD para observar si se producían las mismas alteraciones moleculares y el mismo fenotipo a nivel hepático.

Satisfactoriamente, vimos que las hembras p107KO también mostraron una resistencia a la ganancia de peso bajo una HFD siendo esta diferencia significativa desde la semana 11 de dieta (Fig. 13a). A nivel hepático observamos, de nuevo, una resistencia a la acumulación de grasa en los hepatocitos como vemos en las histologías (Fig. 13b) y en la cuantificación del Oil Red O (Fig. 13c). Además, a nivel molecular también presentaron una inhibición de las enzimas de la LDN (Fig. 13d) y un incremento en los FT lipolíticos PGC1 β y PPAR α (Fig. 13e).

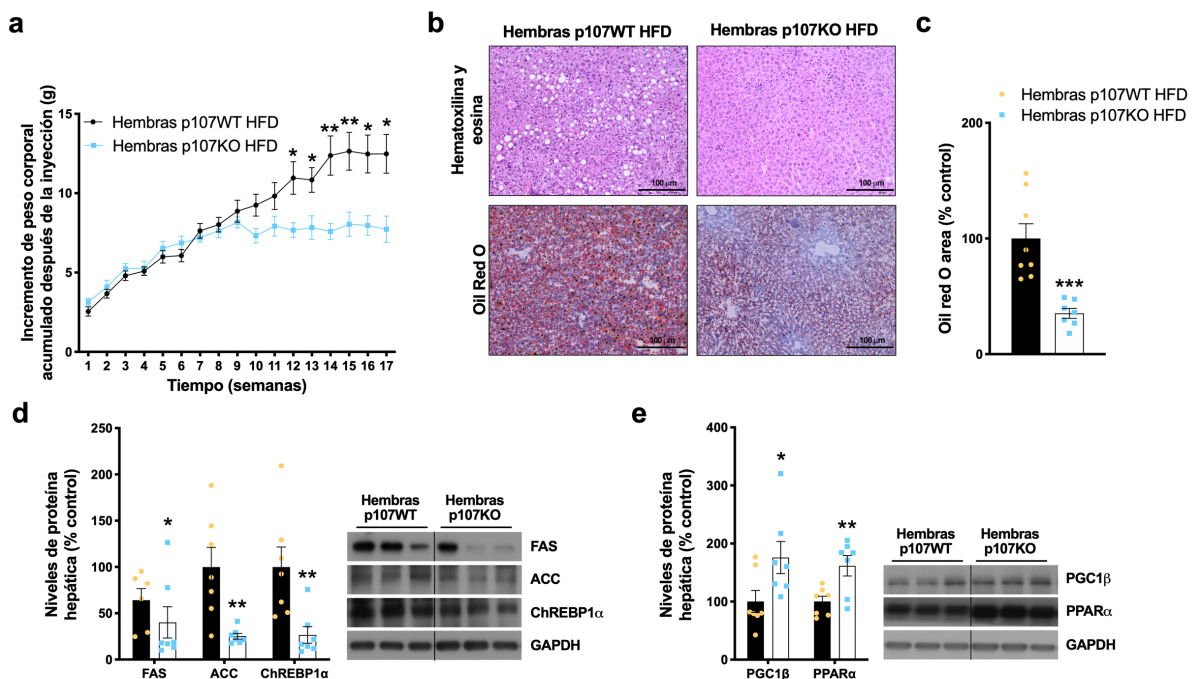


Figura 13. Las hembras p107KO alimentadas con HFD presentan mayoritariamente las mismas alteraciones fenotípicas y moleculares que los machos. (a) Incremento de peso corporal acumulado durante 17 semanas con una HFD en ratones hembra control (n = 8) y ratones hembra p107KO (n = 7). (b) Tinción representativa de hematoxilina y eosina (panel superior) y tinción de Oil Red O (panel inferior) de secciones de hígado de ratones hembra. (c) Cuantificación de la tinción Oil Red O. (d) Cuantificación de imágenes obtenidas por western blot de proteínas relacionadas con la lipogénesis *de novo*, tales como FAS, ACC y ChREBP1 α y de la (e) lipólisis como PGC1 β y PPAR α en hígado de ratones hembra p107WT (n = 7) y p107KO (n = 7) en HFD y las imágenes representativas. Los datos se expresan como media \pm SEM. Después de aplicar el T-test: ** p \leq 0.01, *** p \leq 0.001 entre los ratones hembra p107WT y p107KO.

2.3 LA INHIBICIÓN ESPECÍFICA DE p107 EN EL HÍGADO PROTEGE FRENTE AL DESARROLLO DE ESTEATOSIS INDUCIDA POR HFD

Debido a la menor acumulación de grasa y a las alteraciones en el metabolismo lipídico encontradas en el hígado de los ratones p107KO, quisimos averiguar si era un efecto directo de p107 sobre el hígado o era una consecuencia del efecto que tenía sobre el tejido adiposo y la termogénesis. Por ello, nos propusimos hacer un modelo de ratón mutante específico en hígado (mediante técnicas virogenéticas) para evitar los posibles efectos producidos por otros órganos.

La inyección a través de la vena de la cola de un vector lentoviral que contiene un ARNsh para el gen de p107 se redujo significativamente la expresión de p107 en el hígado (Fig. 14a). Una vez inyectados los ratones fueron alimentados con HFD durante 11 semanas. Controlando su peso corporal semanalmente pudimos ver que los ratones con la inhibición de p107 hepática presentaron una ligera resistencia a la ganancia de peso, llegando a ser estadísticamente significativa en las semanas 9 y 10 (Fig. 14b).

Los análisis histológicos nos permitieron determinar que los ratones con la disminución de p107 mostraron una resistencia al desarrollo de esteatosis inducida por la dieta, como se ve de manera destacada en el Oil Red O (Fig. 14c y 14d).

Estos resultados indicaban que la inhibición específica de p107 en el hígado de ratones producía una disminución de la acumulación de grasa hepática de manera similar al encontrado en el hígado de los ratones p107KO globales, estableciendo así un modelo de estudio clave para determinar la función hepática de p107.

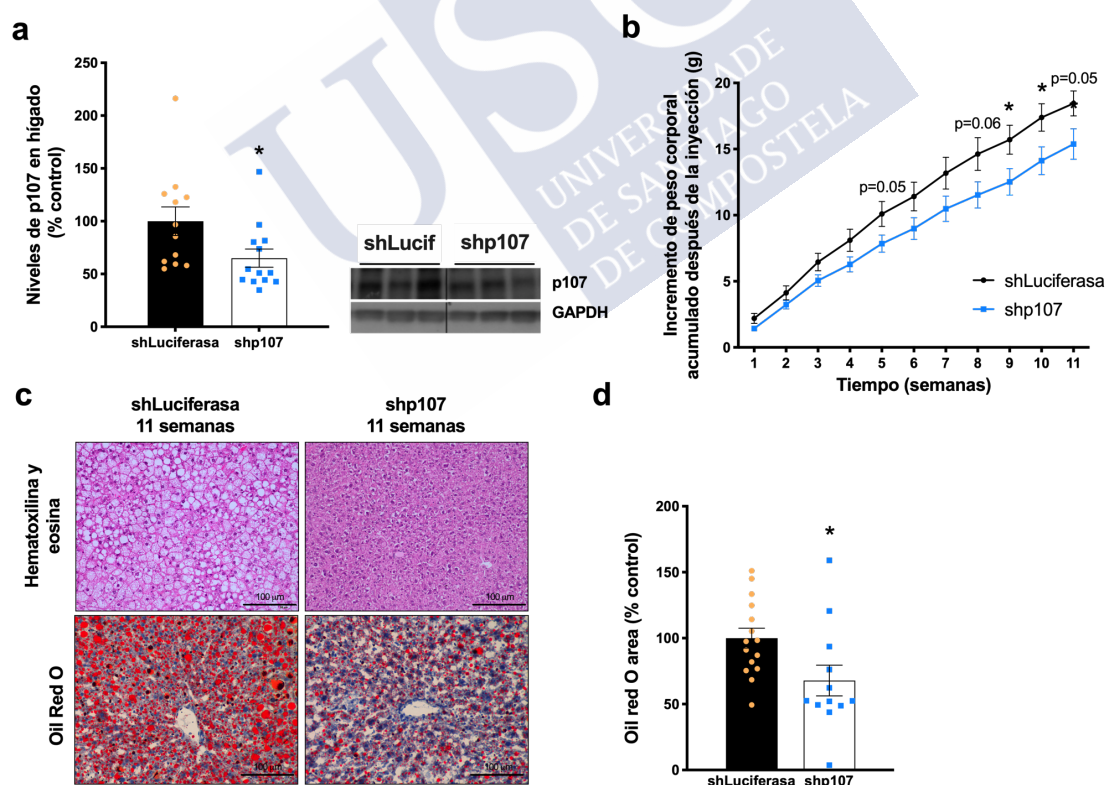


Figura 14. La inhibición específica de hígado de p107 protege contra la esteatosis inducida por la dieta. (a) Cuantificación de la imagen obtenida por western blot de la expresión de p107 en hígados de ratones shLuciferasa (n = 12) y shp107 (n = 13) 11 semanas después de la inyección de los lentivirus y la exposición a HFD. (b) Incremento de peso corporal acumulado durante 7 semanas con una HFD en ratones shLuciferasa (n = 15) y shp107 (n = 13). (c) Tinción representativa de hematoxilina y eosina (panel superior) y tinción de Oil Red O (panel inferior) de secciones de hígado de ratones shLuciferasa (n = 15) y shp107 (n = 13). (d) Cuantificación de la tinción Oil Red O. Los datos se

expresan como media \pm SEM. Después de aplicar el T-test: * $p \leq 0.05$ entre los ratones shLuciferasa y shp107.

A la vista de esos resultados, quisimos ahondar en más detalle en las rutas moleculares que podrían estar implicadas en ese proceso y si eran coincidentes con los encontrados en el modelo KO global.

Para ello, en primer lugar, estudiamos los niveles proteicos de diferentes enzimas clave en la LDN, así como los FT que intervienen en su regulación. De manera destacada, y como ya habíamos visto en el ratón KO total, la inhibición de p107 en el hígado produjo una disminución de las principales enzimas de la LDN como son FAS y ACC y además en este caso SCD1 también se encontraba disminuida (Fig. 15a). A pesar de esto, el FT SREBP1 no presentó cambios y ChREBP1 sí que mostró un elevado incremento (Fig. 15a). Además, la disminución de FAS fue confirmada mediante el análisis de los niveles de ARNm (Fig. 15b).

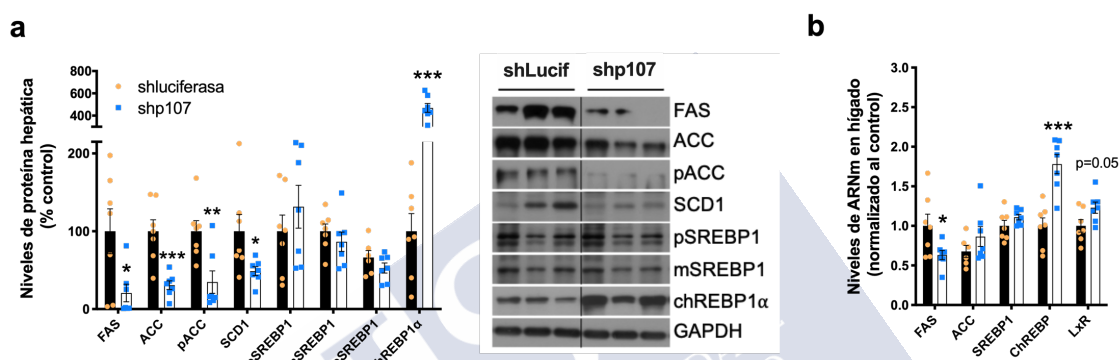


Figura 15. (a) Cuantificación de imágenes obtenidas por western blot de proteínas relacionadas con la lipogénesis de novo, tales como FAS, ACC, pACC, SCD1, SREBP1p (precursor), SREBP1m (forma madura) y ChREBP1 α en hígado de ratones shLuciferasa (n = 7) y shp107 (n = 7) y las imágenes representativas. (b) Expresión de ARNm de diferentes marcadores lipogénicos en hígado de ratones shLuciferasa (n = 7) y shp107 (n = 7). Los datos se expresan como media \pm SEM. Después de aplicar el T-test: * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$ entre los ratones shLuciferasa y shp107.

Centrándonos en la oxidación de AGs se midieron los niveles de expresión de proteínas implicadas en estos mecanismos y en este caso, no se vio el incremento de los transportadores mitocondriales de AGs, CPT1 α y CPT2 (Fig. 16a). Al analizar los marcadores de actividad mitocondrial como son los cinco complejos mitocondriales solamente se ha encontrado un incremento en los ratones con la inhibición de p107 en hígado, aunque sin llegar a valores estadísticamente significativos (Fig. 16b). Sin embargo, si se han encontrado incrementados FT implicados en la activación de la oxidación lipídica como son FGF21, PGC1 β y PPAR α en los ratones con la inhibición de p107 (Fig. 16a).

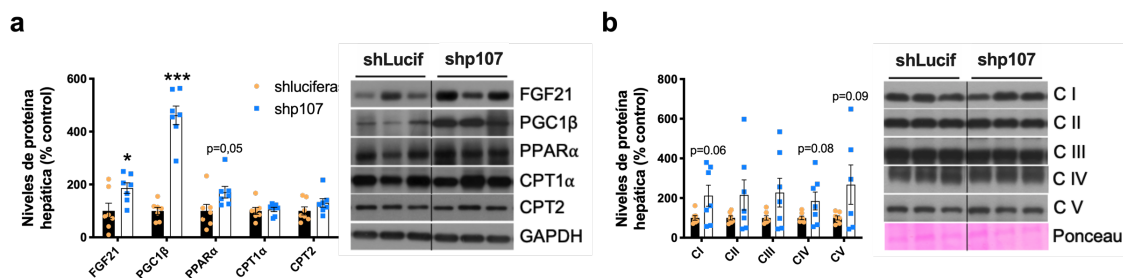


Figura 16. Cuantificación de imágenes obtenidas por western blot de proteínas relacionadas con la (a) lipólisis, como FGF21, PGC1β, PPARα, CPT1α y CPT2; y (b) marcadores de actividad mitocondrial como son los 5 complejos mitocondriales en hígado de ratones shLuciferasa (n = 7) y shp107 (n = 7) y las imágenes representativas. Los datos se expresan como media ±SEM. Después de aplicar el T-test: * p ≤ 0.05, *** p ≤ 0.001 entre los ratones shLuciferasa y shp107.

Como ya ha sido descrito, el hígado de ratones alimentados con HFD está sometido a diferentes daños por la acumulación de grasa, esto produce que se activen las respuestas celulares de la UPR para aliviar el estrés del RE. Por ello, medimos diferentes marcadores de estrés del RE en el hígado del modelo de ratón con inhibición específica hepática de p107. Es importante destacar que, estos ratones mostraron una menor activación de algunos marcadores de estrés del RE como se refleja en las ratios pIRE/IRE, pJNK/JNK y pEIF2α/EIF2α. Además, encontramos unos niveles de GPR78 más elevados, algo que se correlaciona con los resultados previos ya que como hemos mencionado en la introducción se trata de una chaperona del RE que facilita el correcto plegamiento de las proteínas y reduce el estrés del RE (Fig. 17).

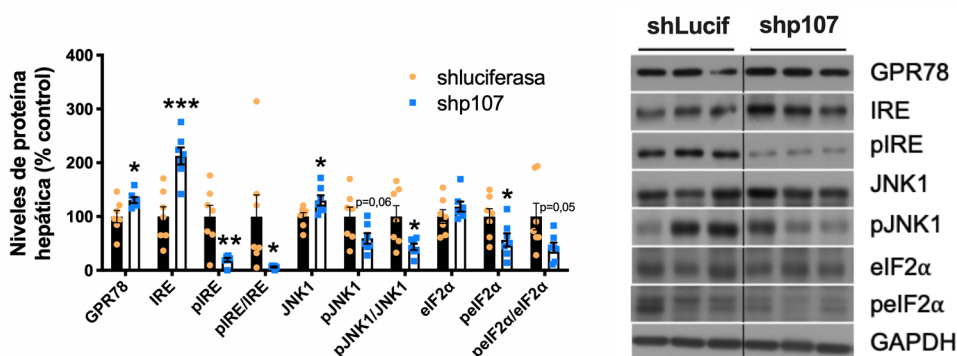


Figura 17. Cuantificación de imágenes obtenidas por western blot de marcadores proteicos de estrés del RE, como GPR78, IRE, pIRE, JNK, pJNK, eIF2α y pEIF2α en hígado de ratones shLuciferasa (n = 7) y shp107 (n = 7) y las imágenes representativas. Los datos se expresan como media ±SEM. Después de aplicar el T-test: * p ≤ 0.05, ** p ≤ 0.01, *** p ≤ 0.001 entre los ratones shLuciferasa y shp107.

2.4 LA INHIBICIÓN HEPÁTICA DE p107 ACTÚA EN PRIMER LUGAR DESCENDIENDO LA ACUMULACIÓN DE GRASA, DISMINUYENDO LA EXPRESIÓN DE FAS E INCREMENTANDO LA DE PGC1β EN EL HÍGADO

Los claros resultados obtenidos con el modelo de dieta HFD durante 11 semanas en los ratones p107KO en hígado nos llevó a preguntarnos que eventos comenzarían primero en el metabolismo lipídico del hígado. Para averiguarlo, decidimos realizar un experimento a menor tiempo de dieta (7 semanas) para ver que cambios se producían primero. A ese tiempo observamos como la eficiencia de la infección es suficiente para producir una disminución de p107 en hígado (Fig. 18a), y analizamos el hígado de esos ratones a ese tiempo.

En estas primeras semanas como hemos visto en el anterior apartado no se han producido diferencias destacadas en el peso corporal entre ambos grupos de ratones (Fig. 18b). Sin embargo, si hay una menor acumulación de grasa en hígado en los ratones con inhibición de p107 hepática y alimentados con HFD, como se puede ver de forma clara en los análisis histológicos (Fig. 18c) y en la cuantificación de la tinción Oil Red O (Fig. 18d).

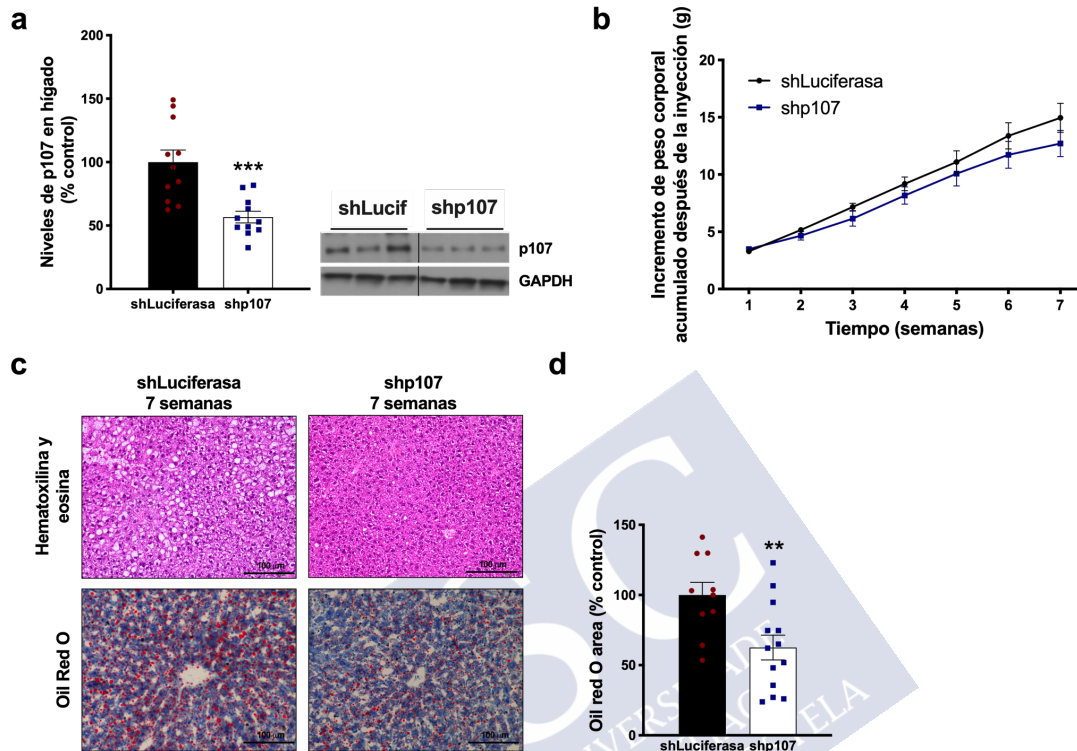


Figura 18. La inhibición hígado específica de p107 ya produce resistencia a la acumulación de grasa hepática desde las 7 semanas. (a) Cuantificación de la imagen obtenida por western blot de la expresión de p107 en hígados de ratones shLuciferasa (n = 11) y shp107 (n = 11). (b) Incremento de peso corporal acumulado durante 7 semanas con una HFD en ratones shLuciferasa (n = 11) y shp107 (n = 11). (c) Tinción representativa de hematoxilina y eosina (panel superior) y tinción de Oil Red O (panel inferior) de secciones de hígado de ratones shLuciferasa (n = 10) y shp107 (n = 13). (d) Cuantificación de la tinción Oil Red O. Los datos se expresan como media \pm SEM. Después de aplicar el T-test: ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$ entre los ratones shLuciferasa y shp107.

Por otro lado, quisimos comprobar si 7 semanas tras la inyección eran suficientes para presentar todos los cambios moleculares que encontramos en los ratones sacrificados a las once semanas post-inyección. Para ello analizamos la mayoría de las proteínas en las que habíamos encontrado cambios significativos en el apartado anterior. Observamos que, en este caso, de las proteínas relacionadas con la LDN solamente se mantenía el acusado descenso de FAS (Fig. 19a) y el aumento de PGC1 β (Fig. 19b). Además, no encontramos alteraciones en el estrés del RE (Fig. 19c). Sugiriendo que estos cambios son los que promueven, al menos en primera instancia, la menor acumulación de grasa y la posterior resistencia al desarrollo de estrés del RE.

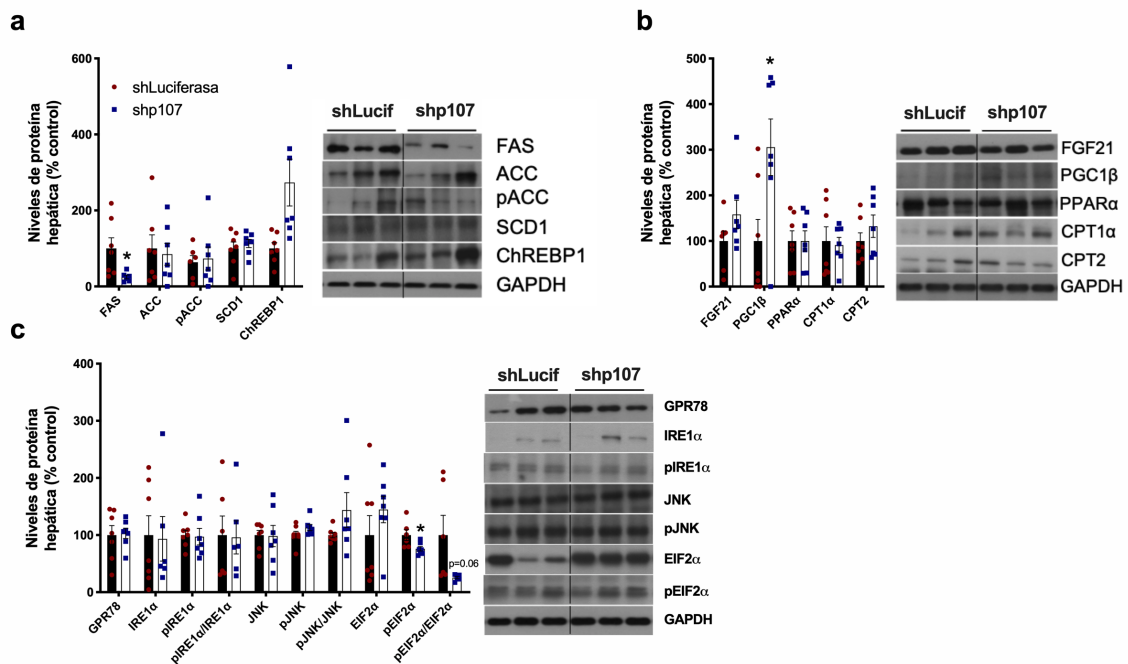


Figura 19. Cuantificación de imágenes obtenidas por western blot de (a) marcadores lipogénicos, como FAS, ACC, pACC, SCD1 y ChREBP1; (b) lipolíticos como FGF21, PGC1 β , PPAR α , CPT1 α y CPT2; y (c) marcadores de estrés del RE como GPR78, JNK y pJNK en hígado de ratones shLuciferasa (n = 7) y shp107 (n = 7) y las imágenes representativas. Los datos se expresan como media \pm SEM. Después de aplicar el T-test: *p \leq 0.05 entre los ratones shLuciferasa y shp107.

2.5 EN CONDICIONES DE STD LA INHIBICIÓN HÍGADO ESPECÍFICA DE P107 SOLAMENTE PRODUCE UN INCREMENTO DE PGC1 β Y CPT1 α

Quisimos ver si los efectos vistos en la inhibición de p107 y la exposición a HFD durante 11 semanas también se producían en un modelo de STD o eran necesarias unas condiciones de elevado aporte calórico para forzar el sistema y ver los claros efectos en el metabolismo lipídico.

Para ello, realizamos el mismo experimento de 11 semanas, pero con una dieta STD. Como podemos observar en la Figura 19 no se encontraron diferencias claras en el peso corporal (Fig. 20b) de los ratones ni en la acumulación hepática de grasa (Fig. 20c y 20d).

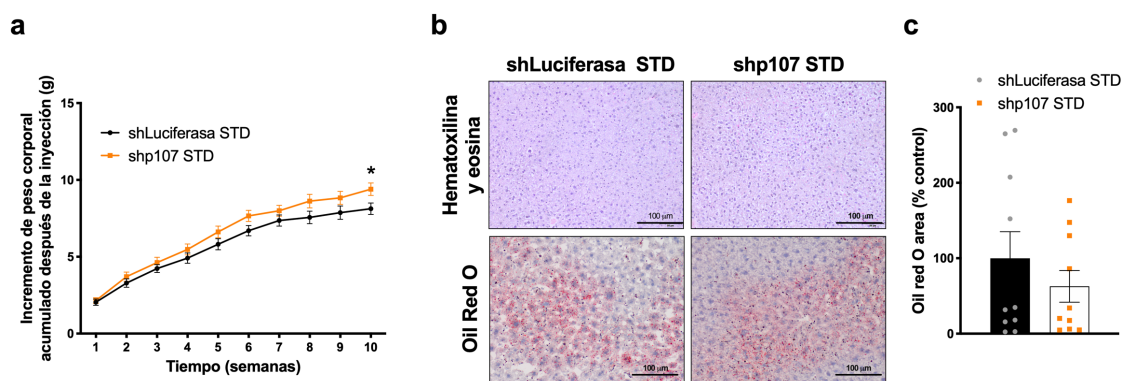


Figura 20. Inhibición hígado específica de p107 en ratones alimentados con STD. (a) Cuantificación de la imagen obtenida por western blot de la expresión de p107 en hígados de ratones shLuciferasa (n = 7) y shp107 (n = 7). (b) Incremento de peso corporal acumulado durante 10 semanas con una STD en ratones shLuciferasa (n = 10) y shp107 (n = 10). (c) Tinción representativa de hematoxilina y eosina (panel superior) y tinción de Oil Red O (panel inferior) de secciones de hígado de ratones shLuciferasa (n = 10) y shp107 (n = 13). (d) Cuantificación de la tinción Oil Red O. Los datos se expresan como media \pm SEM. Después de aplicar el T-test: *p \leq 0.05 entre los ratones shLuciferasa y shp107.

Por otro lado, el estudio de los diferentes marcadores moleculares que habíamos visto alterados en el modelo de HFD nos indicó que la inhibición en las enzimas de la LDN no se produce tras la inhibición de p107 en el hígado en un modelo de STD (Fig. 21a). En cuanto a los FT implicados en la lipólisis solamente vimos un claro incremento estadísticamente significativo de PGC1 β (Fig. 21b). En cuanto a los complejos mitocondriales solamente el complejo V se incrementó de forma estadísticamente significativa en el hígado de los ratones sin p107 hepático expuestos a STD (Fig. 21c).

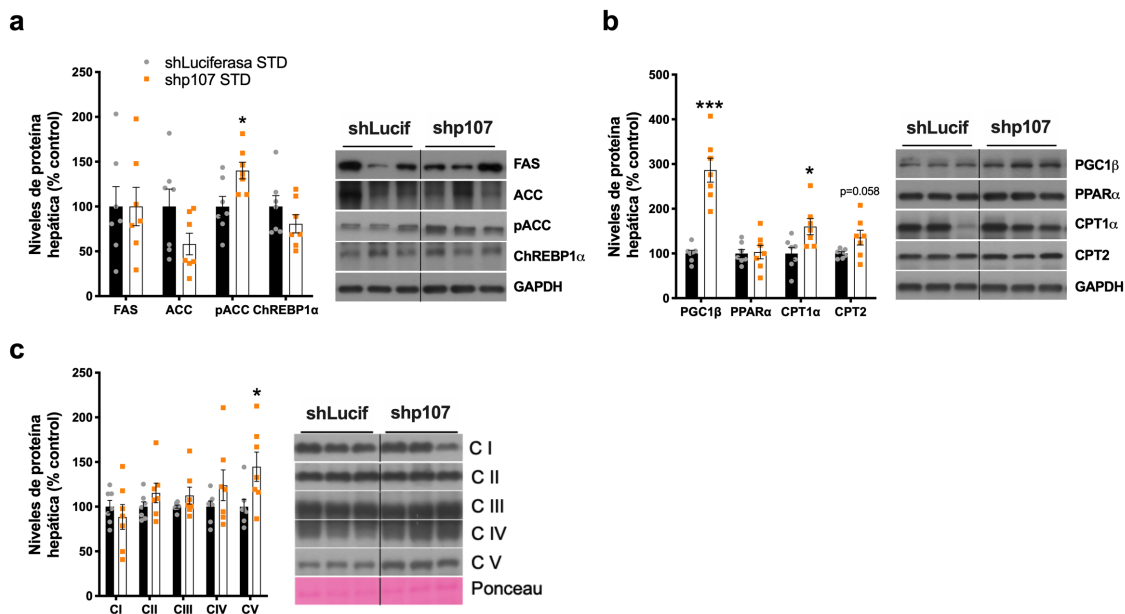


Figura 21. Cuantificación de imágenes obtenidas por western blot de (a) marcadores lipogénicos, como FAS, ACC, y ChREBP1; (b) lipolíticos como PGC1 β y PPAR α ; y (c) marcadores actividad mitocondrial como son los complejos de la cadena de transporte electrónico en hígado de ratones shLuciferasa (n = 7) y shp107 (n = 7) y las imágenes representativas. Los datos se expresan como media \pm SEM. Después de aplicar el T-test: *p \leq 0.05 y *** p \leq 0.001 entre los ratones shLuciferasa y shp107.

2.6 LA RECUPERACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE P107 EN EL HÍGADO DE LOS RATONES P107KO REVIERTE LOS EFECTOS EN LA ACUMULACIÓN DE GRASA HEPÁTICA Y LA INHIBICIÓN DE FAS

Dado el claro papel de p107 en la regulación del metabolismo hepático tanto en el modelo KO global de p107 como en el específico de hígado, quisimos ver si este efecto podría revertirse al normalizar los valores de p107. Para lograrlo hicimos un experimento de ganancia de función, por lo que inyectamos por la vena de la cola de ratones p107KO global alimentados con HFD un vector lentiviral que produce la expresión sostenida de p107 (Fig 22a). Como control, se usó un vector lentoviral que expresaba GFP.

Como podemos observar en la figura 21 la recuperación de la expresión de p107 específicamente en el hígado no tuvo ninguna influencia en el peso corporal (Fig. 22b), sin embargo, sí incrementó la acumulación de grasa hepática (Fig. 22c y 22d) y normalizó los niveles de FAS al aumentar su expresión en comparación con los p107KO y la expresión de FAS (Fig. 22e).

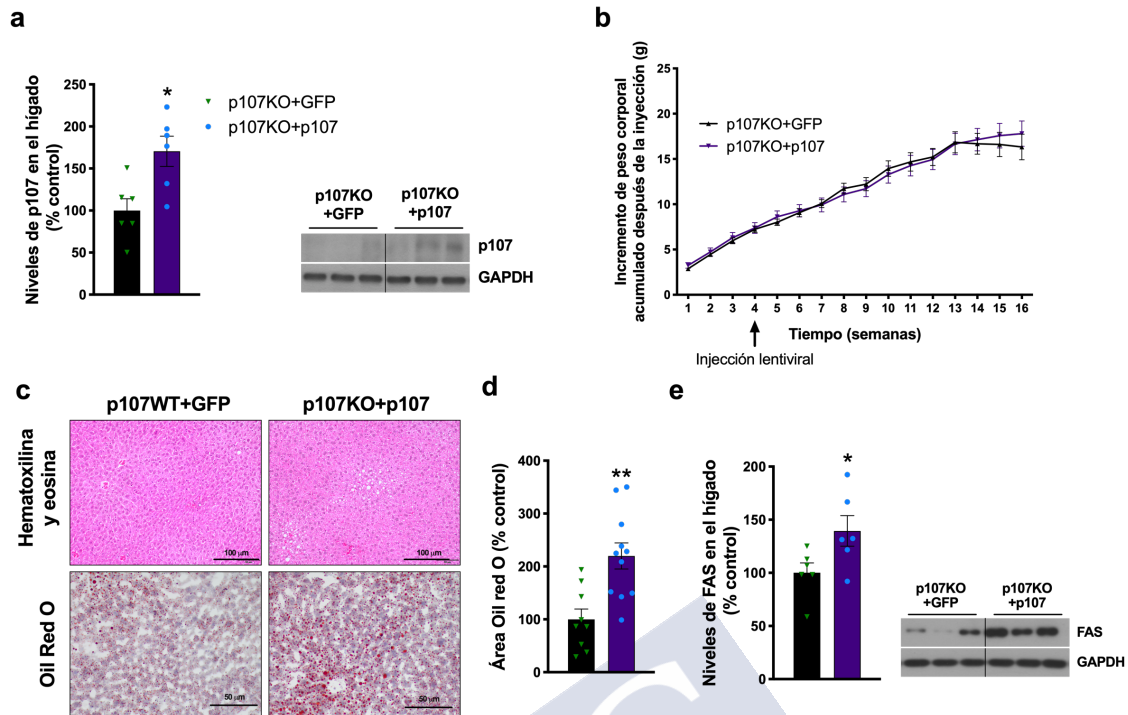


Figura 22. La recuperación de la expresión de p107 en el hígado de ratones p107KO revierte en gran medida los efectos vistos. (a) Cuantificación de la imagen obtenida por western blot de la expresión de p107 en hígado de ratones shLuciferasa (n = 3) y shp107 (n = 3) y su imagen representativa. (b) Incremento de peso corporal acumulado durante 16 semanas con una HFD en ratones p107KO+GFP (n = 10) y p107KO+p107 (n = 11). (c) Tinción representativa de hematoxilina y eosina (panel superior) y tinción de Oil Red O (panel inferior) de secciones de hígado de ratones p107KO+GFP (n = 10) y p107KO+p107 (n = 11). (d) Cuantificación de la tinción Oil Red O. (e) Cuantificación de la imagen obtenida por western blot de la expresión de FAS en hígados de ratones p107KO+GFP (n = 5) y p107KO+p107 (n = 6). Los datos se expresan como media \pm SEM. Después de aplicar el T-test: *p \leq 0.05 y ** p \leq 0.01 entre los ratones p107KO+GFP y p107KO+p107.

3 EFECTOS DE LA MANIPULACIÓN GENÉTICA DE p107 EN HEPATOCITOS HUMANOS

3.1 LA INHIBICIÓN DE P107 DISMINUYE LA CANTIDAD DE LÍPIDOS DEBIDO A LA INHIBICIÓN DE LA LIPOGÉNESIS *DE NOVO* Y AL INCREMENTO EN LA OXIDACIÓN DE LÍPIDOS.

Para confirmar los datos obtenidos en el modelo preclínico de ratón, quisimos averiguar si esto también podría ocurrir en el humano. Se utilizó una línea celular inmortalizada de hepatocitos procedentes de un hígado humano normal, conocida como THLE2. Primero quisimos comprobar si en hepatocitos humanos la inhibición de p107 producía las mismas alteraciones metabólicas que las vistas en el hígado de ratón (descritas en apartados anteriores). Se utilizaron ARNsi y los análisis fueron realizados 48 horas después de la transfección.

Los resultados mostraron que tras una eficiente inhibición de p107 (Fig. 23a), las células THLE2 presentaron una reducción de la acumulación de lípidos observada mediante la tinción Oil Red O (Fig. 23b). A nivel proteico se observó un claro descenso en la expresión del marcador lipogénico FAS (Fig. 23c), este descenso también fue

confirmado mediante el análisis de los niveles de ARNm (Fig. 23d). Además, también se ha visto disminuida la expresión de otro marcador lipogénico encargado de la desaturación de AGs como es SCD1. Para confirmar de una manera más precisa si la disminución de estas dos enzimas lipogénicas venía determinada por un descenso general en el proceso de la LDN, utilizamos acetato marcado radiactivamente. Esta técnica determinó que las células con la inhibición de p107 presentaban un descenso en la síntesis *de novo* de TGs (Fig. 23f) y una menor síntesis *de novo* de AGs libres, alcanzando estos últimos valores diferencias estadísticamente significativa (Fig. 23e).

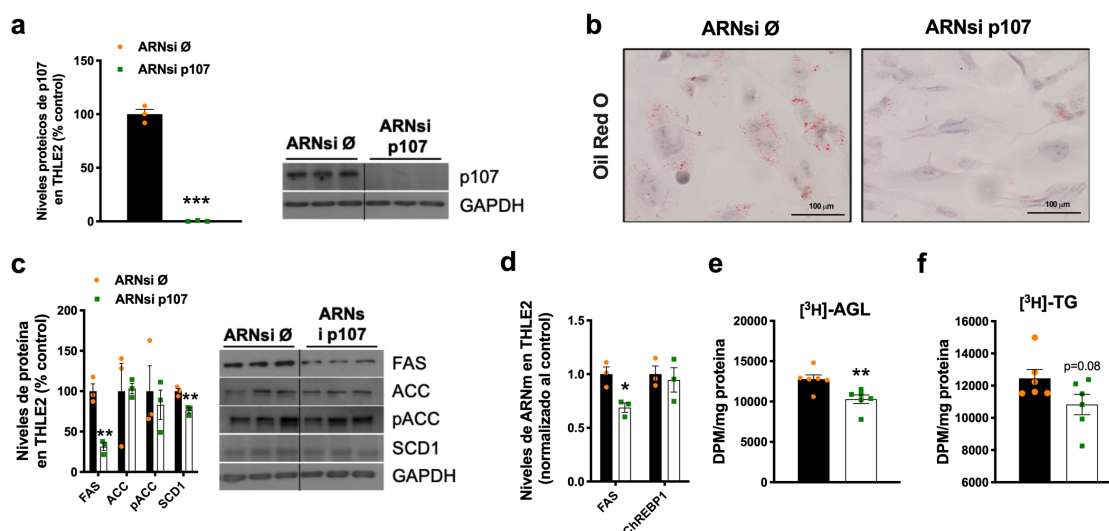


Figura 23. Efectos de la inhibición de p107 en la lipogénesis. (a) Cuantificación de la imagen obtenida por western blot de la expresión de p107 en THLE2 (n = 3 por grupo). (b) Imágenes representativas de la tinción de Oil Red O en THLE2. (c) Cuantificación de los niveles de proteínas implicadas en la lipogénesis FAS, ACC, pACC y SCD1 (n = 3 por grupo) y sus imágenes representativas. (d) Niveles de ARNm de FAS y ChREBP1 en THLE2 (n = 3 por grupo). (e) Síntesis *de novo* de (a) AG libres (FFA) y (f) triglicéridos (TG) en THLE2 (n = 6 por grupo). Los datos se expresan como media \pm SEM. Después de aplicar el T-test: * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$ entre los dos grupos.

Por otro lado, quisimos comprobar si este modelo celular humano también encontrábamos alteraciones en la oxidación lipídica derivadas de la inhibición de p107. En este caso, el análisis de las principales proteínas que habíamos visto alteradas en los modelos de roedores no presentaron los mismos cambios, de hecho, se vio un descenso significativo en la expresión de PPAR α y una bajada en CPT1 α (Fig. 24a). Sin embargo, el análisis de oxidación total de palmitato mediante marcaje radioactivo sí indicó un claro aumento del mismo en las células con el siARN de p107 (Fig. 24b).

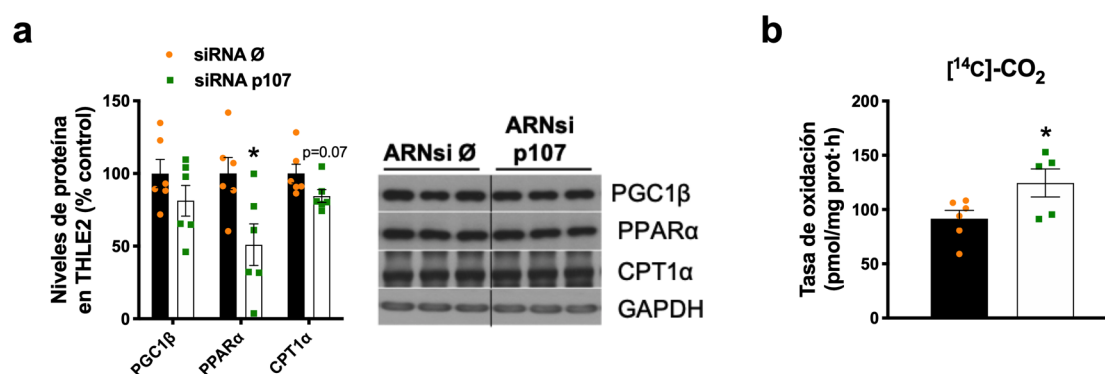


Figura 24. Efectos de la inhibición de p107 en la lipólisis. (a) Cuantificación de los niveles de proteínas implicadas en la lipólisis PGC1 β , PPAR α y CPT1 α (n = 6 por grupo) y sus imágenes representativas. (b)

Oxidación del ácido palmítico (n = 6 por grupo). Los datos se expresan como media \pm SEM. Después de aplicar el T-test: *p \leq 0.05 entre los dos grupos.

3.2 LA INHIBICIÓN DE p107 PRODUCE RESISTENCIA A LA ACUMULACIÓN DE LÍPIDOS INDUCIDA POR EXPOSICIÓN A ÁCIDO OLEICO DEBIDO A UN INCREMENTO EN LA OXIDACIÓN LIPÍDICA

Como hemos visto que la inhibición de p107 en hepatocitos humanos presenta importantes alteraciones en el metabolismo lipídico, reproduciéndose algunos de los resultados encontrados en los modelos de roedores, quisimos ver como se comportarían dichas células cuando se las exponía durante un largo periodo a un excedente lipídico (ácido oleico durante 36 horas) para intentar simular en cierto modo el modelo de HFD en ratones, donde hemos vistos las alteraciones más marcadas.

Tras 36 horas de exposición a ácido oleico 1mM las células con la inhibición de p107 mostraron resistencia a la acumulación de lípidos como muestra la histología oil red O (Fig. 25a) y su cuantificación (Fig. 25b). El análisis proteico reveló que en estas circunstancias la inhibición de p107 provoca, al contrario de lo esperado, un incremento en la expresión de los marcadores lipogénicos FAS y ACC (Fig. 25c). Por otro lado, el estudio de marcadores lipolíticos mostró un incremento de proteínas implicadas en la oxidación lipídica como son PGC1 β , FGF21 y CPT2 además de varios de los complejos de la cadena de transporte electrónico mitocondrial como los complejos mitocondriales I, II y IV que se encuentran estadísticamente incrementados (Fig. 25d).

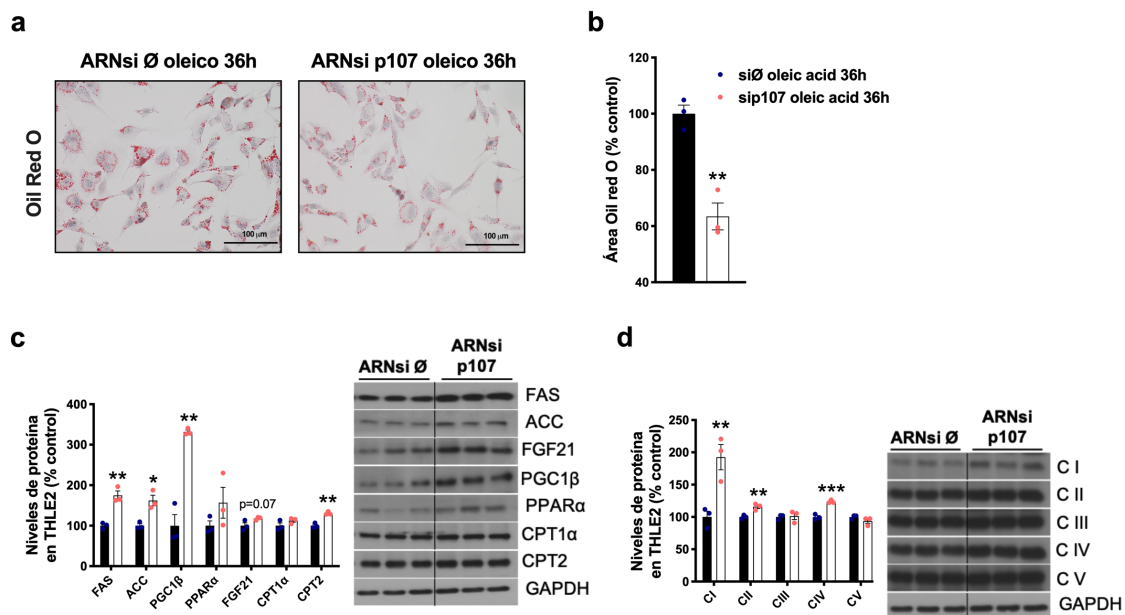


Figura 25. Respuesta de la inhibición de p107 en THLE2 a la exposición a ácido oleico durante 36 horas. (a) Imágenes representativas de la tinción de Oil Red O en THLE2 y su cuantificación (b). (c) Cuantificación de los niveles de proteínas implicadas en la lipogénesis y la lipólisis como FAS, ACC, PGC1 β , PPAR α , FGF21, CPT1 α y CPT2; y (d) los complejos de la cadena de transporte electrónico mitocondrial (n = 3 por grupo) y sus imágenes representativas. Los datos se expresan como media \pm SEM. Después de aplicar el T-test: *p \leq 0.05, ** p \leq 0.01, *** p \leq 0.001 entre los dos grupos.

Para comprobar que alteraciones metabólicas se producían en primera instancia tras la exposición a ácido oleico, realizamos el mismo experimento de exposición al AG pero en este caso durante 3 horas. Como observamos en la figura 25, la inhibición de p107 en hepatocitos humanos expuestos durante 3 horas a ácido oleico produjo un incremento en el FT activador de la oxidación de lípidos PPAR α (Fig. 26a), así como un aumento en la expresión de varios de los complejos mitocondriales, el II, III y V y sin cambios en FAS o ACC (Fig. 26b).

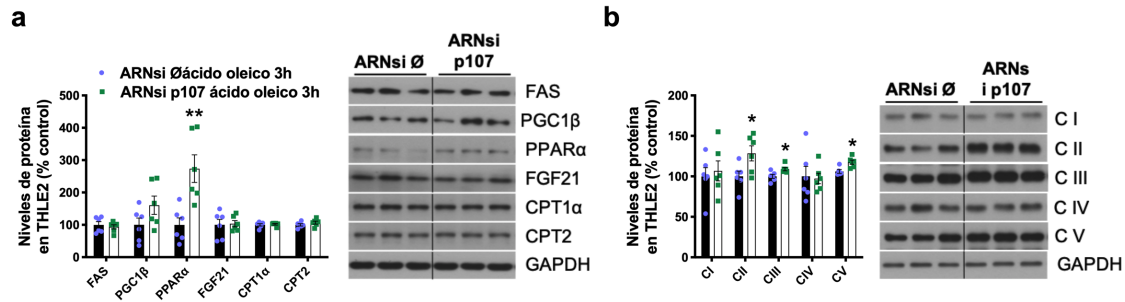


Figura 26. Respuesta de la inhibición de p107 en THLE2 a la exposición a ácido oleico durante 3 horas. (a) Cuantificación de los niveles de proteínas implicadas en la lipogénesis y la lipólisis como FAS, PGC1 β , PPAR α , FGF21, CPT1 α y CPT2; y (b) los complejos de la cadena de transporte electrónico mitocondrial (n = 3 por grupo) y sus imágenes representativas. Los datos se expresan como media \pm SEM. Después de aplicar el T-test: *p \leq 0.05 y ** p \leq 0.01 entre los dos grupos.

3.3 LA SOBREENEXPRESIÓN DE P107 PRODUCE UN INCREMENTO EN LA ACUMULACIÓN DE LÍPIDOS DERIVADO DE UN INCREMENTO DE FAS Y UNA MENOR ACTIVIDAD MITOCONDRIAL

Quisimos ver si la sobreexpresión de p107 en las células THLE2 revertía el efecto de la inhibición. Para ello transfectamos las células con un plásmido que expresa p107 con una clara eficiencia como se observa por el gran incremento de los niveles proteicos de p107 en la figura 27a.

El análisis con Oil Red O nos mostró que la sobreexpresión de p107 incrementaba la acumulación de lípidos en las células (Fig. 27b y 27c). A nivel proteico se produjo un claro incremento en la expresión de FAS y una inhibición en la expresión de PPAR α (Fig. 27d). Para realizar un análisis más detallado de actividad mitocondrial, utilizamos el Seahorse, que permite calcular la función mitocondrial y observamos que la sobreexpresión de p107 provoca una menor respiración mitocondrial basal, así como una menor capacidad respiratoria máxima (Fig. 27e).

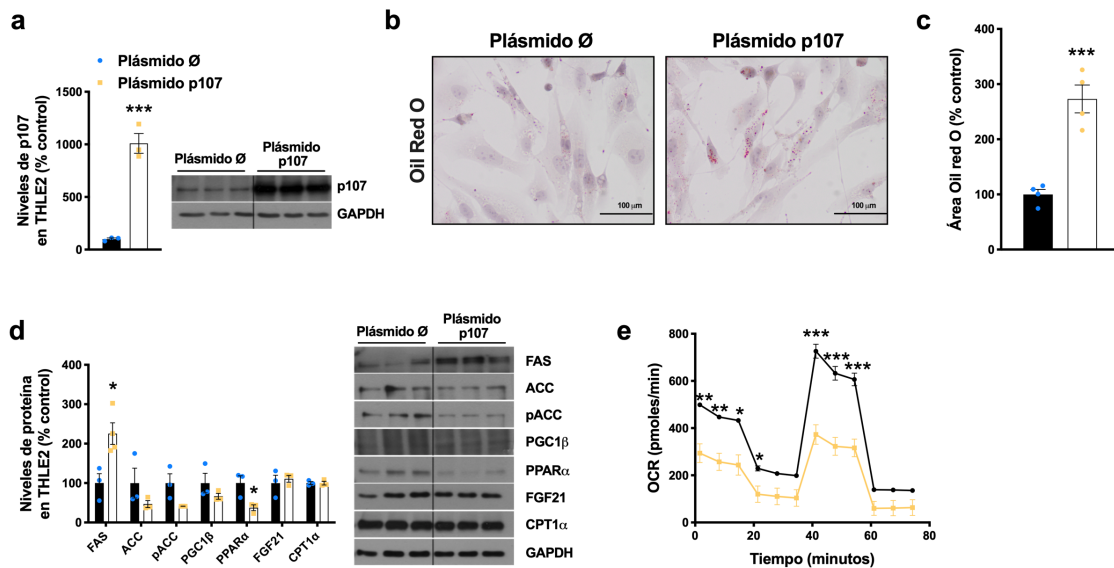


Figura 27. Efectos de la sobreexpresión de p107. (a) Cuantificación de la imagen obtenida por western blot de la expresión de p107 en THLE2 (n = 3 por grupo). (b) Imágenes representativas de la tinción de Oil Red O en THLE2 y su cuantificación (c). (d) Cuantificación de los niveles de proteínas implicadas en la lipogénesis y la lipólisis como FAS, ACC, pACC, PGC1 β , PPAR α , FGF21, y CPT1 α (n = 3 por grupo) y sus imágenes representativas. (e) Perfil de los niveles de OCR obtenidos con el test *Mito stress Seahorse*. Los datos se expresan como media \pm SEM. Después de aplicar el T-test: *p \leq 0.05, ** p \leq 0.01, *** p \leq 0.001 entre los dos grupos.

3.4 EL INCREMENTO EN LA ACUMULACIÓN DE GRASA EN LOS HEPATOCITOS CON LA INHIBICIÓN DE P107 ES DEPENDIENTE DEL INCREMENTO DE FAS

Como se ha visto en el punto anterior, el aumento de la expresión de p107 en hepatocitos humanos produjo un incremento en la acumulación lipídica y un claro aumento en la expresión de FAS. Por ello, quisimos comprobar si el efecto sobre la acumulación lipídica de la sobreexpresión de p107 podría ser dependiente, al menos en parte, del incremento de la enzima de la LDN. Así, realizamos una transfección con un siARN de FAS el cual inhibió su expresión (Fig. 28a). 24 horas después, transfectamos esas mismas células con el mismo plásmido ya utilizado en el apartado anterior que incrementó la expresión de p107, pero se mantuvo la inhibición de FAS (Fig. 28a). Como observamos en las imágenes de Oil Red O (Fig. 28c) y en su cuantificación (Fig. 28b), como era de esperar el plásmido de p107 incrementó la acumulación lipídica y el siARN de FAS la inhibió. Sin embargo, cuando se realizó la cotransfección, el siARN de FAS revertió el efecto del plásmido de p107 reduciendo la acumulación de lípidos en las células, pero sin llegar a ser esta diferencia estadísticamente significativa. Por ello, podemos decir que el efecto sobre la acumulación lipídica en las THLE2 es dependiente, al menos en parte, del consecuente incremento en la expresión de FAS.

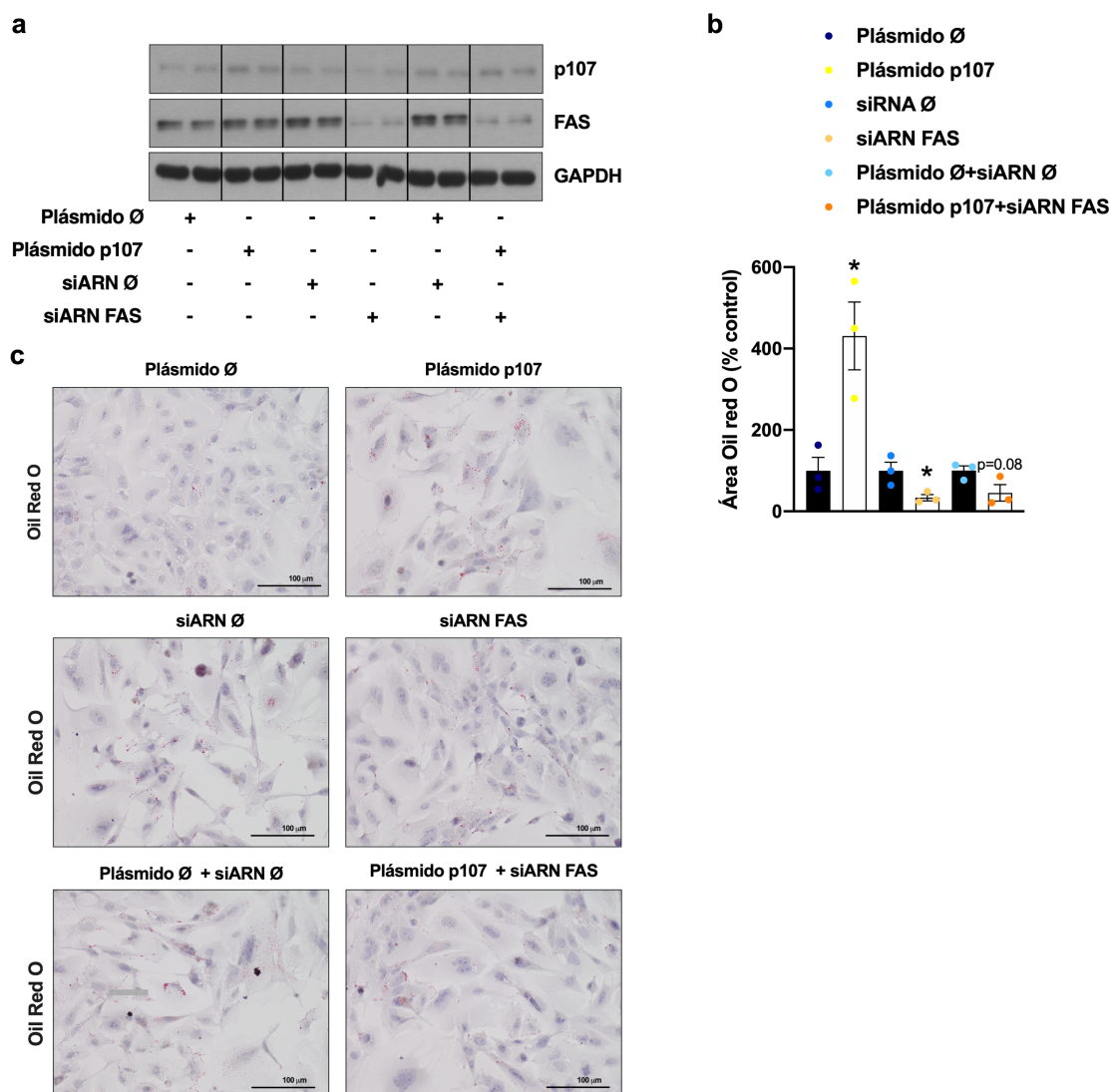


Figura 28. La mayor acumulación de lípidos en las THLE2 con sobreexpresión de p107 es, al menos en parte, debido al incremento en la expresión de FAS. (a) Imágenes de western blot de la expresión de p107 y FAS en THLE2 (n = 2 por grupo). (b) Cuantificación de las imágenes de Oil Red O y (c) las imágenes representativas de Oil Red O. Los datos se expresan como media \pm SEM. Después de aplicar el T-test: * $p \leq 0.05$ entre los dos grupos.

4 ESTUDIO DEL PAPEL DE p107 EN LA PROGRESIÓN DE NAFLD

4.1 p107 SE ENCUENTRA INCREMENTADO EN MODELOS DE ROEDORES DE NAFLD INDUCIDA POR LA DIETA

Visto el claro papel de p107 en la regulación del metabolismo lipídico en el hígado nos preguntamos si p107 podría estar implicado en la progresión de enfermedad hepática desde esteatosis, NAFLD y NASH, por ello analizamos su expresión en los diferentes estadios de la enfermedad hepática. Para ello utilizamos modelos de ratón con NAFLD y NASH inducidos por la dieta y analizamos la expresión de ARNm de p107 en el hígado de esos ratones. Tanto en los ratones con esteatosis (dieta HFD) o con avanzada esteatosis

(dieta CDHFD) los niveles de p107 eran mayores que los comparados con los controles (Fig. 29a). Además, en los estadios más avanzados con fibrosis como es el NASH (dieta MCD) también se observaba ese incremento (Fig. 29b).

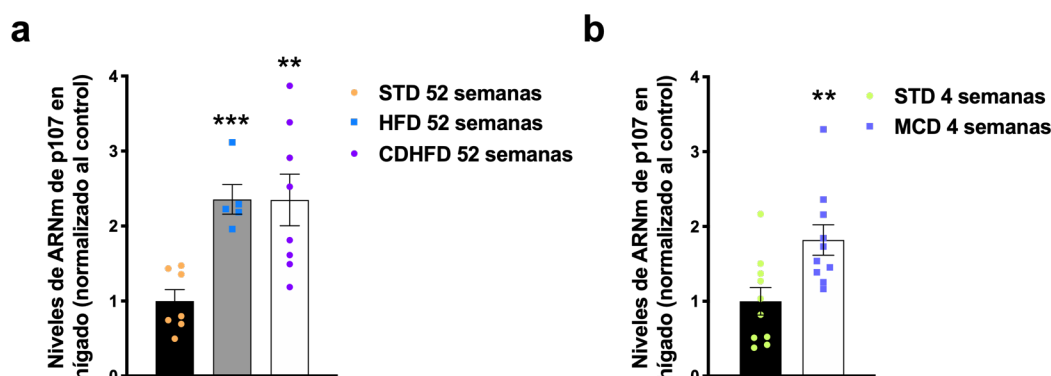


Figura 29. La expresión de p107 se encuentra incrementada en ratones expuestos a diferentes dietas. (a) Niveles de ARNm de p107 en hígado de ratones expuestos durante 52 semanas a STD (n = 7), HFD (n = 5), CDHFD (n = 8) o (b) 4 semanas a STD (n = 10) y MCD (n = 10). Los datos se expresan como media \pm SEM. Después de aplicar el T-test: ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$ entre los dos grupos.

4.2 LA EXPRESIÓN DE p107 SE CORRELACIONA POSITIVAMENTE CON VARIOS MARCADORES DE FIBROSIS

Como hemos visto en el apartado anterior, la expresión de p107 se encuentra incrementada en diferentes modelos de NAFLD inducida por la dieta y en NASH. Dado que la evolución de la enfermedad hepática puede alcanzar un daño fibrótico, por ello quisimos ver si en estos modelos la expresión de p107 se correlacionaba con diferentes marcadores de fibrosis hepática. Los resultados muestran que existe una correlación positiva estadísticamente significativa entre p107 y los marcadores fibróticos estudiados únicamente en los modelos de HFD y CDHFD de 52 semanas (Fig. 30a, 30c, 30e y 30g), sin embargo, en el modelo de MCD solamente se encuentra en alguno de ellos una ligera tendencia a la correlación positiva con la expresión génica de p107 (Fig. 30b, 30d, 30f y 30h).

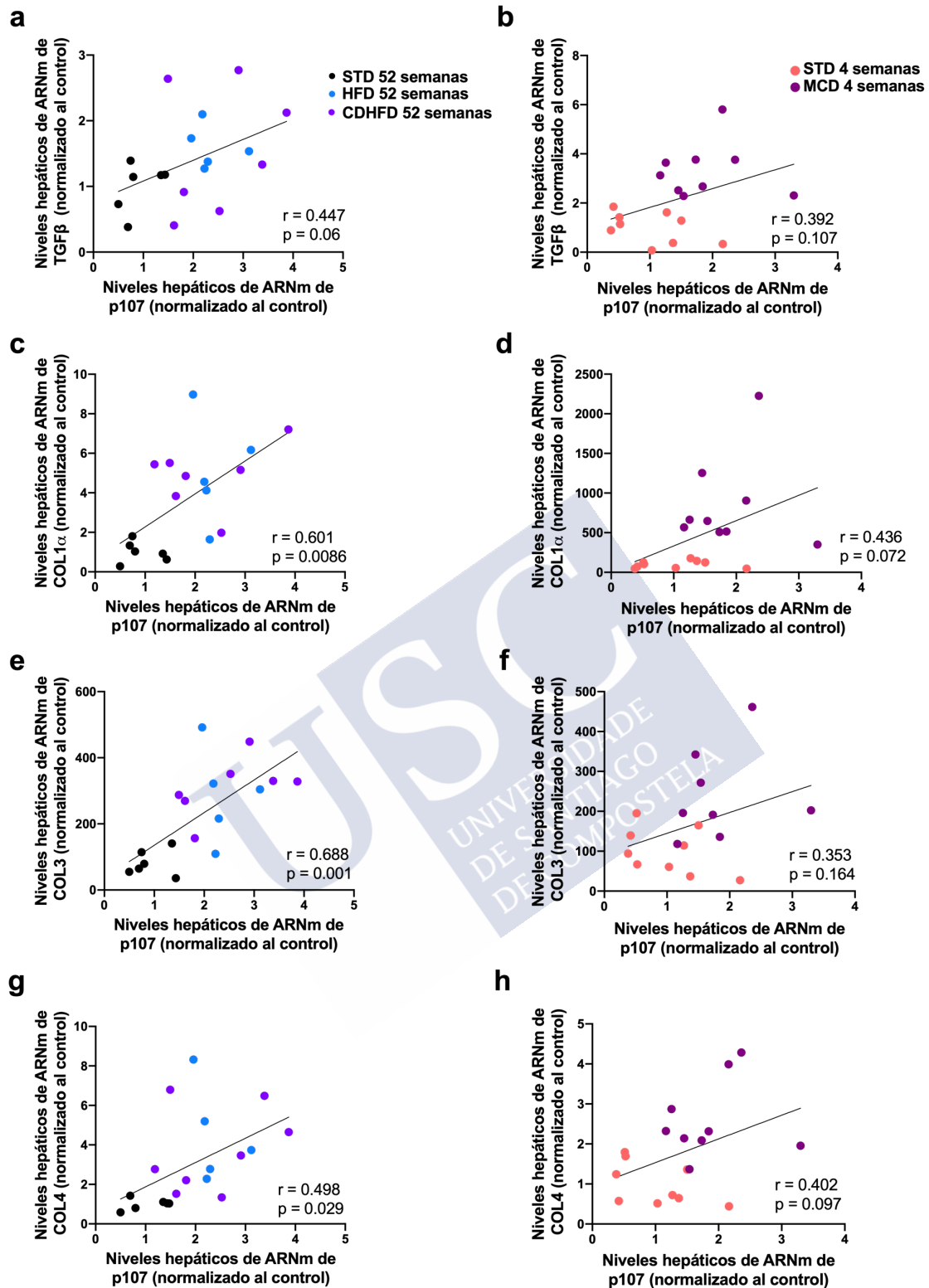


Figura 30. Correlación entre (a) niveles de p170 y niveles de TGFβ en HFD y CDHFD y (b) en MCD; (c) niveles de p170 y niveles de Colagenasa 1α en HFD y CDHFD y (d) en MCD; (e) niveles de p170 y niveles de colagenasa 3 en HFD y CDHFD y (f) en MCD; (g) niveles de p170 y niveles de colagenasa 4 en HFD y CDHFD y (h) en MCD. Las correlaciones entre los niveles de p170 y los diferentes factores fibrogénicos se analizaron mediante el coeficiente de correlación de Pearson (si los datos siguen una distribución normal) o el coeficiente de correlación de Spearman (si los datos no siguen una distribución normal) (r).

4.3 LOS RATONES CON EL SILENCIAMIENTO HEPÁTICO DE p107 MOSTRARON UNA DISMINUCIÓN EN LA EXPRESIÓN DE TGF β

Vista la clara relación de la expresión de p107 con la de diferentes marcadores y dietas asociadas al desarrollo de fibrosis hepática, quisimos medir la expresión de algunos de ellos en el hígado de los ratones con el silenciamiento de p107 específico de hígado y una exposición a HFD de 11 semanas. Como vemos en la figura 31 los ratones con el silenciamiento de p107 mostraron menores niveles de ARNm de TGF β , un factor clave en la activación del proceso fibrótico, principalmente a través de la activación de las células estelares. Además, se observaron ligeras tendencias a la disminución en la expresión de diferentes colagenasas (Fig. 31).

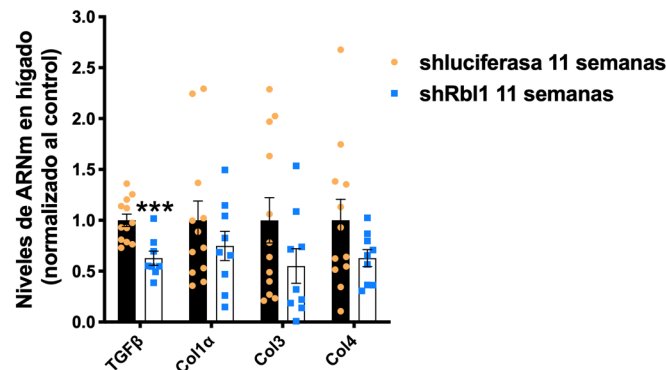


Figura 31. Niveles de ARNm de marcadores fibróticos como TGF β , Col1 α , Col3 y Col4 en hígado de ratones con shRb1 o shLuciferasa durante 11 semanas (n = 12 y 9 por grupo). Los datos se expresan como media \pm SEM. Después de aplicar el T-test: *** p \leq 0.001 entre los dos grupos.

4.4 LA ACTIVACIÓN CON TGF β DE UNA LÍNEA CELULAR DE CÉLULAS ESTELARES HUMANAS (LX2) PROVOCÓ UN INCREMENTO DE p107

Como hemos visto hasta ahora, la expresión de p107 se correlaciona positivamente con la del factor fibrótico TGF β y con la de varias colagenasas en hígado de ratón. Ya hemos comentado que las principales células hepáticas implicadas en el desarrollo de fibrosis son las células estelares, las cuales son principalmente activadas gracias a la expresión de TGF β ³¹⁰. Por ello, quisimos comprobar si p107 también podría ver alterada su expresión al activar una línea celular inmortalizada de células estelares humanas (LX2) con TGF β . Observamos como tras 24 horas después de añadir el tratamiento con TGF β se produjo un incremento estadísticamente significativo del mismo, así como de 4 tipos diferentes de colagenasas (Fig. 32a). Para comprobar si p107 también podría ver alterada su expresión tras la activación con TGF β medimos sus niveles de ARNm y observamos que se incrementaron debido a la estimulación de las células LX2 con TGF β (Fig. 32b).

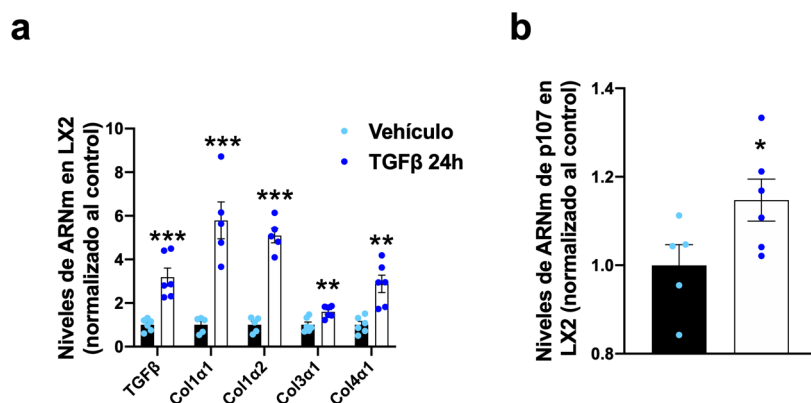


Figura 32. (a) Niveles de ARNm en LX2 de diferentes marcadores fibrogénicos como TGFβ, Colagenasa 1α1, 1α2, 3α1 y 4α1; y (b) de p107 (n = 5 por grupo). Los datos se expresan como media ±SEM. Después de aplicar el T-test: * p ≤ 0.05, ** p ≤ 0.01, *** p ≤ 0.001 entre los dos grupos.

5 ESTUDIO DE LOS NIVELES DE p107 EN MUESTRAS HUMANAS

Para estudiar la relevancia clínica de estos últimos resultados medimos los niveles de ARNm de p107 en muestras de pacientes obesos con diferentes grados de NAFLD y NASH, y correlacionamos su expresión con diferentes factores fibrogénicos. Como observamos en la figura 33 la expresión de p107 se correlaciona positivamente de forma estadísticamente significativa con TGFβ, la colagenasa 3α y con ACTA2.

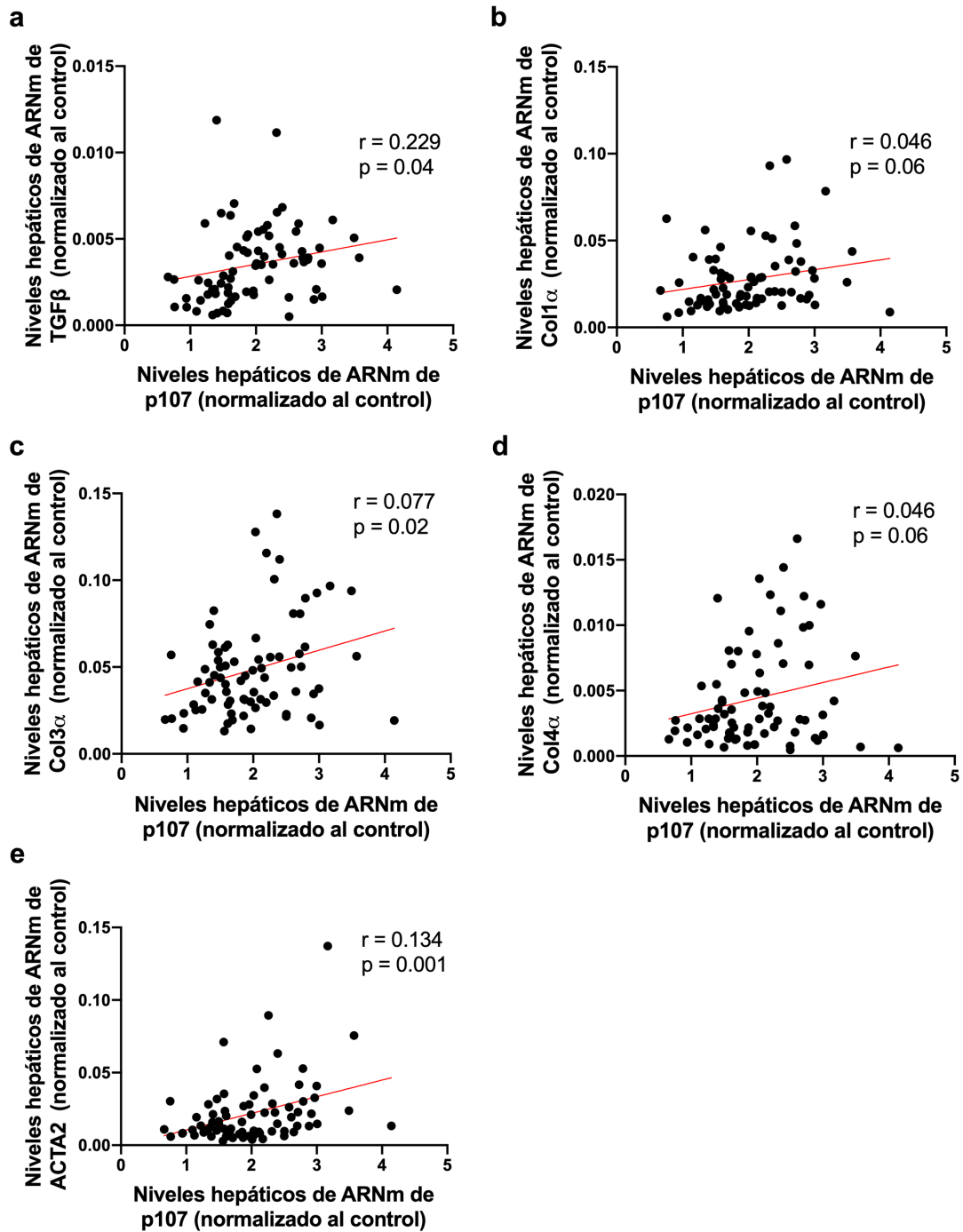


Figura 33. Correlación de muestras de pacientes humanos entre (a) niveles de ARNm hepático de p107 y de TGF β , (b) niveles de p107 y niveles de Colagenasa 1 α , (c) niveles de p107 y niveles de colagenasa 3 α , (d) niveles de p107 y niveles de colagenasa 4 α y (e) niveles de p107 y niveles de ACTA2. Las correlaciones entre los niveles de p107 y los diferentes factores fibrogénicos se analizaron mediante el coeficiente de correlación de Pearson (si los datos siguen una distribución normal) o el coeficiente de correlación de Spearman (si los datos no siguen una distribución normal) (r).





DISCUSIÓN



p107, un miembro de la familia de las PP, ha sido estudiado exhaustivamente en relación con el control del ciclo celular y la tumorigénesis³³¹, sin embargo, ahora ya se encuentra ampliamente aceptada su relación con el metabolismo energético. En relación a esto, se ha despertado un gran interés por los trabajos que sugieren que p107 es un regulador de la diferenciación de los adipocitos^{96, 284, 285}, ya que desempeña una función clave en los destinos del linaje de los adipocitos y la formación de adipocitos pro-termogénicos²⁹⁴. Además, los datos obtenidos en humanos indican que p107 podría estar asociado con la biogénesis mitocondrial en el músculo esquelético³⁰⁰, lo que abriría la posibilidad de su influencia en la homeostasis de la glucosa. Finalmente, en algunos estudios, ratones de la cepa BALB/c deficientes en p107 han mostrado resistencia a la obesidad inducida por la dieta y un aumento del estado oxidativo en el músculo²⁹⁹. No obstante, los mecanismos por los cuales p107 puede influir en la homeostasis energética son casi completamente desconocidos.

Por lo tanto, inicialmente, este estudio se diseñó para evaluar el impacto de la ausencia sistémica de p107 en el desarrollo de resistencia a la obesidad e intolerancia a la glucosa en un modelo de ratón obeso, de fondo mixto de la cepa C57BL6/129, la que es usada más ampliamente en el campo de la homeostasis metabólica y energética y con mayor predisposición a desarrollar obesidad inducida por la dieta; mientras que otras como BALB/C son menos adecuadas para estos estudios debido a que dicha cepa es resistente a la HFD^{332, 333}. De hecho, hay que destacar que algunos experimentos en células embrionarias de la misma cepa de ratones que usamos aquí (C57BL6/129) han dado resultados diferentes en la diferenciación de TAB en comparación con la cepa BALB/c^{280, 334}.

Dada la relevancia de la comunicación y flujos de sustratos metabólicos entre los principales órganos implicados en la homeostasis energética y metabólica, el presente estudio se llevó a cabo mediante una combinación de análisis fenotípicos en términos de ingesta de alimentos y gasto energético combinados con análisis moleculares e histológicos de diferentes tejidos involucrados en el fenotipo.

A nivel de homeostasis energética el primer hallazgo relevante fue que la deficiencia de p107 no modifica la ingesta cuando los animales son expuestos a una dieta tanto baja (STD) como alta en grasa (HFD), estando el peso corporal disminuido tras exposición a ambos tipos. En su conjunto estos datos sugieren que, al contrario que p53, otro “gen supresor de tumores”, p107 no parece desempeñar un papel importante en la regulación de la ingesta a nivel hipotalámico. De hecho, datos de nuestro grupo no publicados, sugieren lo mismo, dado que estos animales mostraron una respuesta orexigénica normal tras administración de grelina exógena. Por tanto, el hecho de que coexistiese una disminución del peso corporal y una ingesta normal indicaba que el mecanismo podría estar relacionado con la absorción de nutrientes a nivel intestinal, con una mayor excreción de sustratos metabólicos a nivel renal o bien por un incremento en el gasto energético. La primera posibilidad fue estudiada, y descartada, mediante el estudio de absorción postprandial de lípidos en animales normales y deficientes en p107. La segunda tampoco parece razonable a la vista de los cambios encontrados en homeostasis de la glucosa. Por tanto, nos centramos en el estudio del gasto energético. Tal como habíamos hipotetizado encontramos que, tanto en animales con dieta normal como alta en grasa, la deficiencia de p107 previene la ganancia de peso.

Se ha demostrado que el aumento de la termogénesis y la actividad del TAM protegen a los roedores de la obesidad inducida por la dieta al proporcionar un mecanismo para quemar los sustratos metabólicos y prevenir la acumulación excesiva de grasa^{62, 335} y para disipar el exceso de energía que llega de los alimentos³³⁶.

Más recientemente, el hallazgo de grasa marrón activa en adultos humanos ha despertado un gran interés en la investigación sobre el amarronamiento del tejido adiposo^{57, 337-340}. Los adipocitos beige comparten algunas características comunes con los adipocitos marrones, como el alto contenido de mitocondrias y la expresión de la proteína UCP1, que pueden inducirse en el TAB^{79, 80}. Este amarronamiento del TAB se ha relacionado con una disminución de la adiposidad en roedores y humanos^{341, 342}. Además, se ha demostrado en roedores que la estimulación termogénica promueve la eliminación del colesterol HDL en ratones³⁴³.

Nuestros resultados muestran la implicación de ambos procesos, habiendo encontrado que el fenotipo delgado de los ratones p107KO está asociado a un aumento en la termogénesis, como lo demuestra la mayor temperatura interescapular y el amarronamiento del TAB. Estos datos también pueden explicar el aumento del consumo de TG y FA libres en TAM. En este contexto, la mayor captación en TAB podría ser causada por un aumento de la lipólisis y de la oxidación de lípidos. En este sentido, se ha demostrado que la actividad del TAM controla los niveles plasmáticos de TG por la captación selectiva de ácidos grasos derivados de lipoproteínas ricas en triglicéridos y la actividad metabólica de la termogénesis en adipocitos está vinculada al metabolismo de las HDL³⁴³, que puede también explicar en cierto modo el fenotipo lipídico.

La mayor actividad termogénica en TAM y TAB está en relación con los niveles elevados de marcadores proteicos del programa termogénico en TAM, como UCP-1, PRDM16 y PCG1 α ; y el aumento de expresión de UCP-1 en TAB. Por lo tanto, nuestros resultados respaldan que tanto la actividad incrementada del TAM como el amarronamiento del TAB son responsables de la protección de los ratones p107KO contra la HFD.

Debido a que nuestros datos se basan en la evaluación de una eliminación genética global, es posible que el efecto sobre la actividad del TAM pueda ser secundario a otros efectos fisiológicos en diferentes tejidos. Este es un problema que solo se puede abordar mediante la eliminación específica de tejido de p107 en tejidos como TAB, TAM, hígado o músculo esquelético. La hipótesis más plausible, habiendo descartado algún candidato obvio como las hormonas tiroideas, es que p107 ejerza un efecto local en TAM y TAB. En este sentido, la relación entre p107 y PRDM16 parece ser especialmente relevante. PRDM16 es un corregulador transcripcional que controla el desarrollo de adipocitos marrones en los depósitos de TAM clásicos y también en la inducción adaptativa del amarronamiento dentro del TAB^{78, 344}. Hay datos que indican que la expresión sostenida de p107 bloquea la capacidad de PRDM16 para inducir genes típicos de grasa parda, y que la expresión de p107 en células madre compromete a las células al linaje adiposo blanco versus marrón⁹⁶. De acuerdo con estos datos de células madre, los niveles de proteína de PRDM16 están claramente aumentados en el TAM de los ratones p107KO durante la exposición a ambas dietas en nuestro estudio, lo que apunta a una relación directa entre los dos eventos de señalización transcripcional.

Cabe destacar que nuestros hallazgos sobre los ratones deficientes en p107, uno de los miembros de la familia pRb, se parecen al fenotipo metabólico encontrado en ratones con mutación específica de Rb en el tejido adiposo²⁹¹. Esos ratones están protegidos contra la obesidad inducida por la dieta debido al aumento del gasto energético, de la misma manera que nuestro modelo. Estos resultados contradicen de alguna manera el papel descrito para estas PP en el ciclo celular en el que usualmente tienen funciones redundantes³⁴⁵. Nuestros resultados muestran que, en relación con el metabolismo, cada una tiene una función definida. Esto significa que la falta de uno de los miembros de la familia, en este caso, no puede ser compensada por los demás, y en última instancia

conduce a una clara alteración en el metabolismo energético como se ve en nuestro modelo de ratón p107KO.

Después de realizar el análisis fenotípico de los ratones p107KO, encontrando un fenotipo tan claro de resistencia a la obesidad inducida por la dieta, así como la mejora en la sensibilidad a la glucosa y resistencia a la insulina debido principalmente a la estimulación del gasto energético, provocado por un incremento en la termogénesis tanto del TAM como del amarramiento del TAB, nos llamó especialmente la atención la clara resistencia a la acumulación de grasa en el hígado en el modelo de HFD. Además, hasta ahora no se conoce la relevancia de p107 en el control metabólico de tejidos específicos, solamente se asoció con la oxidación mitocondrial en determinadas fibras musculares²⁹⁹. Por ello nos propusimos continuar el estudio abordando un posible papel de p107 específicamente en el metabolismo hepático, para averiguar si podría ser también responsable de esa resistencia a la esteatosis.

En primer lugar, realizamos un estudio molecular del hígado de los ratones p107KO en HFD encontrando la inhibición de las principales enzimas implicadas en la LDN y el incremento de diferentes marcadores relacionados con la oxidación de AG y una alta actividad mitocondrial. Dadas estas claras alteraciones en el metabolismo hepático de los ratones p107KO parece evidente su papel en el control metabólico de los hepatocitos cuando son expuestos a un excedente calórico.

En este estudio establecimos un modelo de roedores con la inhibición de p107 específica de hígado. Esto nos permitió confirmar que la ausencia de p107 específicamente en el hígado de ratones alimentados con una dieta alta en grasa protege del desarrollo de esteatosis inducida por la dieta. Los mecanismos moleculares que conducen a esta situación pueden ser diversos. En el hígado con la inhibición específica de p107 encontramos una menor expresión de proteínas clave en la respuesta celular de la UPR, implicadas en el control del estrés del RE e incrementada la expresión de la chaperona GPR78, clave para el buen plegamiento de las proteínas. Además, estos hígados mostraron alteraciones de gran relevancia en el metabolismo lipídico, ya que presentaron una inhibición de la LDN y un incremento en la oxidación mitocondrial de lípidos.

Es muy conocida la asociación entre en metabolismo lipídico y el estrés del RE, sabiéndose que ambos pueden ser tanto causa como consecuencia del otro^{346, 347}. Parece claro que un incremento de la acumulación de grasa hepática debida al aumento de actividad de la LDN provocará un incremento del estrés del RE, pero además sabemos que un incremento del estrés del RE conduce a un aumento de la LDN. Lo que está claro es que el orden de esos factores no alterará el producto, que siempre será una mayor acumulación de grasa hepática induciendo daño en los hepatocitos³²⁷.

Un experimento a menor tiempo (7 semanas de dieta en lugar de 11) nos permitió concluir que la inhibición de la LDN precedía a la resistencia al desarrollo de estrés del RE. Por lo que, la inhibición de p107 en hígado y la exposición a HFD produce en primera instancia una inhibición de la enzima clave en la LDN FAS, provocando una resistencia a la acumulación de grasa hepática y en consecuencia posteriormente se produce una resistencia al desarrollo de estrés del RE. Este estudio nos permitió determinar que son necesarias más semanas de exposición a la dieta y a la inhibición de p107 para ver incremento en la oxidación lipídica.

En consonancia con lo anterior, la recuperación genética de p107 en el hígado de los ratones p107KO alimentados con HFD revertió la resistencia a la acumulación de grasa hepática y la inhibición de FAS, fortaleciendo la teoría de que la inhibición de p107 específicamente en el hígado produce resistencia al desarrollo de esteatosis inducida por la dieta debido a la disminución de la LDN.

Sin embargo, ratones con la inhibición de p107 específica de hígado alimentados con una dieta estándar no presentaron diferentes niveles de lípidos hepáticos ni alteraciones en la expresión de las enzimas implicadas en la LDN, por lo que los efectos de p107 sobre la LDN hepática en roedores se produce cuando están expuestos a un excedente calórico, lo que podría sugerir que la ausencia de p107 podría exacerbar el efecto inhibitorio de los AG de la dieta sobre la LDN³⁴⁸, pudiendo tener un importante papel en la adaptación de la LDN a una dieta muy alta en grasa en roedores. Por otro lado, la ausencia hepática de p107 en ratones alimentados con STD si produce un incremento en la expresión de diferentes FT y proteínas claves en la oxidación mitocondrial de lípidos, por lo que podría ejercer un efecto mecanísticamente distinto sobre la oxidación lipídica.

Parece que hay cierta controversia entre los resultados encontrados en roedores y en hepatocitos humanos en cuanto a la exposición a elevadas cantidades de grasa. Esto podría ser debido a que la línea celular solamente ha sido expuesta a elevadas concentraciones de un único tipo de AG monoinsaturado como es el ácido oleico, sin embargo, la dieta utilizada en los ratones posee aceites complejos compuestos por gran cantidad de diferentes AG tanto mono como poliinsaturados. Algo clave, ya que sabemos que la inhibición de la LDN provocada por una dieta alta en grasa viene dada por los AG poliinsaturados³⁴⁸.

A pesar de esta discrepancia, nuestros resultados obtenidos en una línea celular de hepatocitos humanos sanos se relacionan en gran parte con los datos obtenidos en roedores, proponiendo que, en condiciones de medio estándar, bajos niveles de p107 se asocian con una menor cantidad de grasa en los hepatocitos debido a la inhibición de la LDN y a un incremento en la oxidación de AG. Por otro lado, los elevados niveles de p107 provocan lo opuesto, una mayor acumulación de grasa derivada de un incremento en la LDN y la inhibición de la actividad mitocondrial asociada a la oxidación lipídica. Sin embargo, en nuestros modelos celulares de inhibición de p107, la exposición prolongada a ácido oleico potencia el incremento en la oxidación mitocondrial de lípidos y conduce a un incremento en la LDN, aunque el efecto fenotípico sigue siendo una resistencia a la acumulación de lípidos, debido probablemente al incremento en la oxidación de los mismos. Por lo tanto, en hepatocitos humanos con unas condiciones nutricionales estándar parece que el principal efecto protector viene dado por la inhibición de FAS, sin embargo, cuando los exponemos a un excedente de ácido oleico el incremento en la oxidación revierte la inhibición de FAS promoviendo su expresión, posiblemente como compensación a la incrementada oxidación lipídica.

Nuestros estudios demuestran por primera vez la implicación de p107 en el control de la LDN hepática, con una alta implicación en la regulación de la expresión de la enzima FAS. En la búsqueda del posible mecanismo se observó que ambas proteínas no interaccionaban directamente, sin embargo, dada la función de p107 como represor transcripcional ejerciendo una regulación a nivel génico^{96, 297, 299} se debería hacer un estudio de su unión a diferentes regiones génicas de FAS o proteínas reguladoras de la LDN con las que pueda interaccionar a dicho nivel.

Además, como ya se ha demostrado en músculo esquelético²⁹⁹, proponemos una relación directa entre p107 y la oxidación mitocondrial de AG, pero en este caso en el hígado. Parece que esta regulación sobre la oxidación de lípidos podría llevarse a cabo a través de la liberación y consecuente aumento en la expresión de los FT PPAR α y PGC1 β . El primero ha sido ampliamente relacionado como inductor de la expresión de genes implicados en la oxidación mitocondrial y extramitocondrial de AG¹³². PGC1 β sabemos que en hepatocitos puede estimular la síntesis y liberación de TG a través de la activación de FT lipogénicos como SREBP1 y ChREBP1, lo que puede explicar los inesperados incrementos de estos FT en algunos de nuestros modelos. Sin embargo, actuando junto

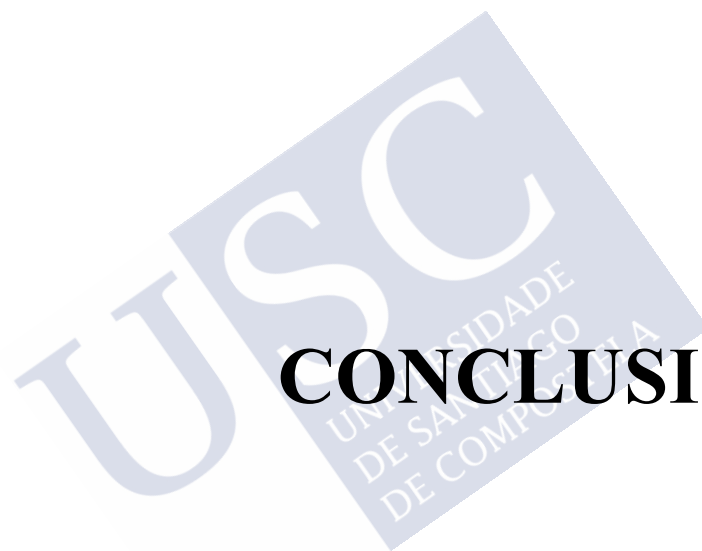
con PPAR α es capaz de activar la expresión de genes implicados en la oxidación de AG y en la fosforilación oxidativa¹³⁵. De hecho, como ya se ha dicho la sobreexpresión de PGC1 β protege frente al desarrollo de esteatosis y fibrosis hepática en roedores¹³⁷, por lo que parece que su efecto oxidativo es más fuerte que su posible implicación lipogénica. Además, estudios previos ya han demostrado la unión de p107 a otros miembros de la familia de PGC1 β como es PGC1 α actuando como un corepresor²⁹⁹, por lo que parece posible que en el hígado, p107 pueda actuar de alguna manera sobre el gen de PGC1 β y reprimir su expresión. Por ello, en los modelos de silenciamiento de p107 observamos elevadas expresiones de PGC1 β y en consecuencia un incremento de la oxidación de AG y de marcadores de la fosforilación oxidativa. Aunque, evidentemente, esta teoría deberá ser comprobada con un ensayo de interacción génica.

Curiosamente, nuestros modelos celulares de alteración genética de p107, aunque con experimentos preliminares, no muestran ninguna alteración en la proliferación celular. Por lo que p107 parece que no tiene ningún papel relevante en la proliferación de hepatocitos, aunque esto deberá ser confirmado más minuciosamente.

Nuestros resultados también muestran la clara implicación de p107 en la progresión de NAFLD a NASH. Como se ha mencionado con anterioridad, la progresión de NAFLD puede ser irreversible y letal en muchos casos, uno de los principales síntomas de progresión a NASH es la fibrosis^{142, 143}. Se sabe que las principales células implicadas en este evento son las HSC y en ellas el principal factor activador de este proceso el TGF β , que produce la activación de determinados factores fibróticos como las colagenasas¹⁸⁰. La expresión de p107 se correlaciona positivamente con la de TGF β y con la de numerosas colagenasas tanto en el hígado de ratón con esteatosis inducida por la dieta como en pacientes humanos obesos. Además, la activación de una línea celular de células estelares humanas con TGF β produce un incremento en la expresión de p107. Mostrando con todo esto que p107 podría tener cierta implicación en el desarrollo de fibrosis hepática.

Con todo, nuestros resultados dan por primera vez un importante papel a p107 en la regulación de la homeostasis energética y del metabolismo hepático. Por un lado, la ausencia global en roedores de p107 provoca un incremento en el gasto energético debido a un aumento de la termogénesis del TAM y del amarronamiento del TAB, produciendo una resistencia a la ganancia de peso y una mejora en la sensibilidad a la insulina y una mejor tolerancia a la glucosa. Por otro lado, hemos estudiado por primera vez el papel de p107 en el hígado, descubriendo como su ausencia en hígado de roedores y en hepatocitos humanos provoca la inhibición de la LDN y un incremento de la oxidación lipídica mitocondrial protegiendo contra la acumulación de grasa hepática. Además, los experimentos más recientes proponen un posible papel para p107 en el desarrollo de fibrosis en hígado de ratones y de pacientes humanos. En conjunto, estos resultados demuestran que p107 está implicada en la regulación fisiológica de la homeostasis energética y metabólica y puede ser una diana terapéutica en patología hepática.





CONCLUSIONES



Los resultados obtenidos en esta tesis nos permiten alcanzar las siguientes conclusiones:

- La deficiencia en p107 se asocia a una menor ganancia de peso incluso tras exposición a dieta alta en grasa.

- El fenotipo delgado de animales deficientes en p107 es debido a un incremento en la actividad termogénica del tejido adiposo marrón y a un amarronamiento del tejido adiposo blanco.

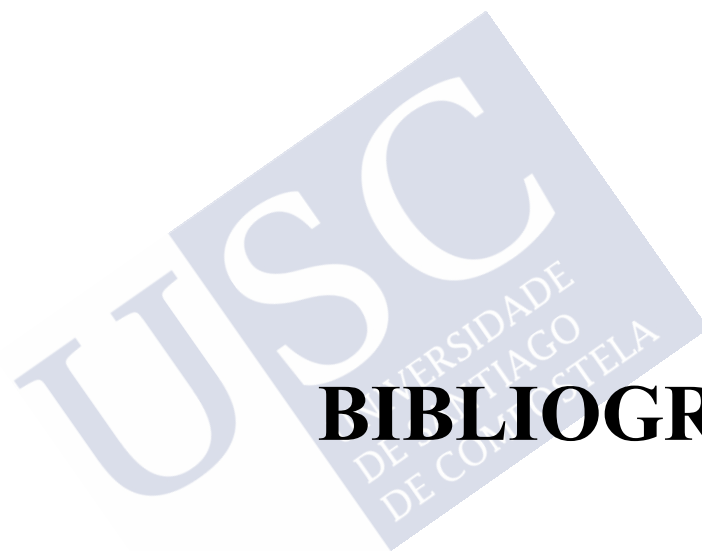
- En consonancia con su fenotipo delgado, los animales deficientes en p107 muestran una mejor sensibilidad a la insulina.

- Mediante experimentos específicos de ganancia/pérdida de función de p107 específicos a nivel hepático hemos demostrado que la deficiencia de p107 previene la acumulación lipídica a nivel hepático.

- Estudios en líneas celulares de hígado humanas y análisis de muestras de pacientes con MAFLD/MASH nos han permitido demostrar un papel similar en humanos; abriendo la posibilidad de ser usada p107 como diana terapéutica.







BIBLIOGRAFÍA



1. Organización Mundial de la Salud. Obesidad y sobrepeso 2016. Recuperado de: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>
2. Chooi YC, Ding C, Magkos F. The epidemiology of obesity. *Metabolism* 2019; **92**: 6-10.
3. Apovian CM. Obesity: definition, comorbidities, causes, and burden. *Am J Manag Care* 2016; **22**(7 Suppl): s176-85.
4. Lennon H, Sperrin M, Badrick E, Renehan AG. The Obesity Paradox in Cancer: a Review. *Curr Oncol Rep* 2016; **18**(9): 56-56.
5. Couselo-Seijas M, Almengló C, Agra-Bermejo R, Fernandez A, Alvarez E, González-Juanatey J *et al.* Higher ACE2 expression levels in epicardial than subcutaneous stromal cells from patients with cardiovascular disease: Diabetes and obesity as possible enhancer. *Eur J Clin Invest* 2020; **n/a**(n/a): e13463.
6. Kwok S, Adam S, Ho JH, Iqbal Z, Turkington P, Razvi S *et al.* Obesity: A critical risk factor in the COVID-19 pandemic. *Clin Obes* 2020; **10**(6): e12403-e12403.
7. A LMVLVP. Nutrición y Metabolismo. In: Interamericana M-H (ed) *Tratado de Endocrinología Pediátrica*, 4ª edn. McGraw-Hill Interamericana: Madrid, 2010, pp 809-815.
8. Westerterp KR. Control of energy expenditure in humans. *Eur J Clin Nutr* 2017; **71**(3): 340-344.
9. Leibel RL, Rosenbaum M, Hirsch J. Changes in Energy Expenditure Resulting from Altered Body Weight. *N Engl J Med* 1995; **332**(10): 621-628.
10. Broberger C. Brain regulation of food intake and appetite: molecules and networks. *J Intern Med* 2005; **258**(4): 301-27.
11. López M, Lelliott CJ, Vidal-Puig A. Hypothalamic fatty acid metabolism: a housekeeping pathway that regulates food intake. *Bioessays* 2007; **29**(3): 248-61.
12. Strader AD, Woods SC. Gastrointestinal hormones and food intake. *Gastroenterology* 2005; **128**(1): 175-91.
13. López M, Tovar S, Vázquez MJ, Williams LM, Diéguez C. Peripheral tissue-brain interactions in the regulation of food intake. *Proc Nutr Soc* 2007; **66**(1): 131-55.
14. Folgueira C, Barja-Fernandez S, Gonzalez-Saenz P, Pena-Leon V, Castelao C, Ruiz-Piñón M *et al.* Uroguanylin: a new actor in the energy balance movie. *J Mol Endocrinol* 2018; **60**(2): R31-r38.

15. Folgueira C, Beiroa D, González-Rellán MJ, Porteiro B, Milbank E, Castelao C *et al.* Uroguanylin Improves Leptin Responsiveness in Diet-Induced Obese Mice. *Nutrients* 2019; **11**(4).
16. Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 1999; **402**(6762): 656-660.
17. Callahan HS, Cummings DE, Pepe MS, Breen PA, Matthys CC, Weigle DS. Postprandial suppression of plasma ghrelin level is proportional to ingested caloric load but does not predict intermeal interval in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; **89**(3): 1319-24.
18. Tschöp M, Smiley DL, Heiman ML. Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature* 2000; **407**(6806): 908-13.
19. López M, Lage R, Saha AK, Pérez-Tilve D, Vázquez MJ, Varela L *et al.* Hypothalamic fatty acid metabolism mediates the orexigenic action of ghrelin. *Cell Metab* 2008; **7**(5): 389-99.
20. Velásquez DA, Martínez G, Romero A, Vázquez MJ, Boit KD, Dopeso-Reyes IG *et al.* The central Sirtuin 1/p53 pathway is essential for the orexigenic action of ghrelin. *Diabetes* 2011; **60**(4): 1177-85.
21. Castañeda TR, Tong J, Datta R, Culler M, Tschöp MH. Ghrelin in the regulation of body weight and metabolism. *Front Neuroendocrinol* 2010; **31**(1): 44-60.
22. Kennedy GC, Parkes AS. The role of depot fat in the hypothalamic control of food intake in the rat. *Proc R Soc London* 1953; **140**(901): 578-592.
23. Banting FG, Best CH, Collip JB, Campbell WR, Fletcher AA. Pancreatic Extracts in the Treatment of Diabetes Mellitus. *Can Med Assoc J* 1922; **12**(3): 141-146.
24. Ikeda H, West DB, Pustek JJ, Figlewicz DP, Greenwood MR, Porte D, Jr. *et al.* Intraventricular insulin reduces food intake and body weight of lean but not obese Zucker rats. *Appetite* 1986; **7**(4): 381-6.
25. Stanley S, Wynne K, McGowan B, Bloom S. Hormonal regulation of food intake. *Physiol Rev* 2005; **85**(4): 1131-58.
26. Saltiel AR, Pessin JE. Insulin signaling pathways in time and space. *Trends Cell Biol* 2002; **12**(2): 65-71.
27. Ingalls AM, Dickie MM, Snell GD. Obese, a new mutation in the house mouse. *J Hered* 1950; **41**(12): 317-8.

28. Hervey GR. The effects of lesions in the hypothalamus in parabiotic rats. *J Physiol* 1959; **145**(2): 336-352.
29. Coleman DL. Effects of parabiosis of obese with diabetes and normal mice. *Diabetologia* 1973; **9**(4): 294-298.
30. Coleman DL. Obesity genes: beneficial effects in heterozygous mice. *Science* 1979; **203**(4381): 663-5.
31. Friedman JM, Halaas JL. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature* 1998; **395**(6704): 763-70.
32. Banks WA, Kastin AJ, Huang W, Jaspan JB, Maness LM. Leptin enters the brain by a saturable system independent of insulin. *Peptides* 1996; **17**(2): 305-11.
33. Berglund ED, Vianna CR, Donato J, Jr., Kim MH, Chuang JC, Lee CE *et al*. Direct leptin action on POMC neurons regulates glucose homeostasis and hepatic insulin sensitivity in mice. *J Clin Invest* 2012; **122**(3): 1000-9.
34. Cernkovich ER, Deng J, Bond MC, Combs TP, Harp JB. Adipose-specific disruption of signal transducer and activator of transcription 3 increases body weight and adiposity. *Endocrinology* 2008; **149**(4): 1581-90.
35. La Cava A, Matarese G. The weight of leptin in immunity. *Nat Rev Immunol* 2004; **4**(5): 371-9.
36. Speakman JR. Body size, energy metabolism and lifespan. *J Exp Biol* 2005; **208**(Pt 9): 1717-30.
37. Pettersen AK, Marshall DJ, White CR. Understanding variation in metabolic rate. *J Exp Biol* 2018; **221**(Pt 1).
38. Kozak LP. Brown fat and the myth of diet-induced thermogenesis. *Cell Metab* 2010; **11**(4): 263-7.
39. Speakman JR, Selman C. Physical activity and resting metabolic rate. *Proc Nutr Soc* 2003; **62**(3): 621-34.
40. Frühbeck G. Does a NEAT difference in energy expenditure lead to obesity? *Lancet* 2005; **366**(9486): 615-6.
41. Barlow JC, Sellers EA. Effect of exposure to cold on response of the rat to whole body radiation. *Am J Physiol* 1953; **172**(1): 147-51.
42. Havel PJ. Update on adipocyte hormones: regulation of energy balance and carbohydrate/lipid metabolism. *Diabetes* 2004; **53 Suppl 1**: S143-51.

43. Bays HE, González-Campoy JM, Bray GA, Kitabchi AE, Bergman DA, Schorr AB *et al.* Pathogenic potential of adipose tissue and metabolic consequences of adipocyte hypertrophy and increased visceral adiposity. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 2008; **6**(3): 343-68.
44. Blüher M. Adipose tissue dysfunction in obesity. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2009; **117**(6): 241-50.
45. Lee MJ, Wu Y, Fried SK. Adipose tissue heterogeneity: implication of depot differences in adipose tissue for obesity complications. *Mol Aspects Med* 2013; **34**(1): 1-11.
46. Shi H, Clegg DJ. Sex differences in the regulation of body weight. *Physiol Behav* 2009; **97**(2): 199-204.
47. Wang H, Eckel RH. Lipoprotein lipase: from gene to obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2009; **297**(2): E271-88.
48. Lampidonis AD, Rogdakis E, Voutsinas GE, Stravopodis DJ. The resurgence of Hormone-Sensitive Lipase (HSL) in mammalian lipolysis. *Gene* 2011; **477**(1-2): 1-11.
49. Haffner SM. Relationship of metabolic risk factors and development of cardiovascular disease and diabetes. *Obesity (Silver Spring)* 2006; **14 Suppl 3**: 121s-127s.
50. Virtue S, Vidal-Puig A. It's not how fat you are, it's what you do with it that counts. *PLoS Biol* 2008; **6**(9): e237.
51. Frühbeck G, Gómez-Ambrosi J, Muruzábal FJ, Burrell MA. The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signaling in energy metabolism regulation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2001; **280**(6): E827-47.
52. Kershaw EE, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; **89**(6): 2548-56.
53. Cannon B, Nedergaard J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev* 2004; **84**(1): 277-359.
54. Sidossis L, Kajimura S. Brown and beige fat in humans: thermogenic adipocytes that control energy and glucose homeostasis. *J Clin Invest* 2015; **125**(2): 478-86.
55. Cypess AM, Lehman S, Williams G, Tal I, Rodman D, Goldfine AB *et al.* Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. *N Engl J Med* 2009; **360**(15): 1509-17.

56. Nedergaard J, Bengtsson T, Cannon B. Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007; **293**(2): E444-52.
57. Virtanen KA, Lidell ME, Orava J, Heglind M, Westergren R, Niemi T *et al.* Functional brown adipose tissue in healthy adults. *N Engl J Med* 2009; **360**(15): 1518-25.
58. Zingaretti MC, Crosta F, Vitali A, Guerrieri M, Frontini A, Cannon B *et al.* The presence of UCP1 demonstrates that metabolically active adipose tissue in the neck of adult humans truly represents brown adipose tissue. *The FASEB J* 2009; **23**(9): 3113-3120.
59. Contreras C, Gonzalez F, Fernø J, Diéguez C, Rahmouni K, Nogueiras R *et al.* The brain and brown fat. *Ann Med* 2015; **47**(2): 150-168.
60. Enerbäck S, Jacobsson A, Simpson EM, Guerra C, Yamashita H, Harper ME *et al.* Mice lacking mitochondrial uncoupling protein are cold-sensitive but not obese. *Nature* 1997; **387**(6628): 90-4.
61. Kontani Y, Wang Y, Kimura K, Inokuma KI, Saito M, Suzuki-Miura T *et al.* UCP1 deficiency increases susceptibility to diet-induced obesity with age. *Aging Cell* 2005; **4**(3): 147-55.
62. Feldmann HM, Golozoubova V, Cannon B, Nedergaard J. UCP1 ablation induces obesity and abolishes diet-induced thermogenesis in mice exempt from thermal stress by living at thermoneutrality. *Cell Metab* 2009; **9**(2): 203-9.
63. Wang GX, Zhao XY, Meng ZX, Kern M, Dietrich A, Chen Z *et al.* The brown fat-enriched secreted factor Nrg4 preserves metabolic homeostasis through attenuation of hepatic lipogenesis. *Nat Med* 2014; **20**(12): 1436-1443.
64. Rosell M, Kaforou M, Frontini A, Okolo A, Chan YW, Nikolopoulou E *et al.* Brown and white adipose tissues: intrinsic differences in gene expression and response to cold exposure in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2014; **306**(8): E945-64.
65. Whittle AJ, Carobbio S, Martins L, Slawik M, Hondares E, Vázquez MJ *et al.* BMP8B increases brown adipose tissue thermogenesis through both central and peripheral actions. *Cell* 2012; **149**(4): 871-85.
66. Hondares E, Iglesias R, Giralt A, Gonzalez FJ, Giralt M, Mampel T *et al.* Thermogenic activation induces FGF21 expression and release in brown adipose tissue. *J Biol Chem* 2011; **286**(15): 12983-90.
67. Planavila A, Redondo I, Hondares E, Vinciguerra M, Munts C, Iglesias R *et al.* Fibroblast growth factor 21 protects against cardiac hypertrophy in mice. *Nat Commun* 2013; **4**: 2019.

68. Villarroya J, Cereijo R, Gavaldà-Navarro A, Peyrou M, Giralt M, Villarroya F. New insights into the secretory functions of brown adipose tissue. *J Endocrinol* 2019; **243**(2): R19-r27.
69. Villarroya F, Cereijo R, Villarroya J, Giralt M. Brown adipose tissue as a secretory organ. *Nat Rev Endocrinol* 2017; **13**(1): 26-35.
70. Whittle AJ, López M, Vidal-Puig A. Using brown adipose tissue to treat obesity - the central issue. *Trends Mol Med* 2011; **17**(8): 405-11.
71. McNeill BT, Morton NM, Stimson RH. Substrate Utilization by Brown Adipose Tissue: What's Hot and What's Not? *Front Endocrinol* 2020; **11**: 571659-571659.
72. Betz MJ, Enerbäck S. Targeting thermogenesis in brown fat and muscle to treat obesity and metabolic disease. *Nat Rev Endocrinol* 2018; **14**(2): 77-87.
73. Harms M, Seale P. Brown and beige fat: development, function and therapeutic potential. *Nat Med* 2013; **19**(10): 1252-63.
74. Rui L. Brown and Beige Adipose Tissues in Health and Disease. *Compr Physiol* 2017; **7**(4): 1281-1306.
75. Dong M, Yang X, Lim S, Cao Z, Honek J, Lu H *et al*. Cold exposure promotes atherosclerotic plaque growth and instability via UCP1-dependent lipolysis. *Cell Metab* 2013; **18**(1): 118-29.
76. Xiong Y, Page JC, Narayanan N, Wang C, Jia Z, Yue F *et al*. Peripheral Neuropathy and Hindlimb Paralysis in a Mouse Model of Adipocyte-Specific Knockout of Lkb1. *EBioMedicine* 2017; **24**: 127-136.
77. López M. BAT Expansion: A Panacea against Obesity? Lessons from LKB1. *EBioMedicine* 2017; **24**: 11-13.
78. Seale P, Bjork B, Yang W, Kajimura S, Chin S, Kuang S *et al*. PRDM16 controls a brown fat/skeletal muscle switch. *Nature* 2008; **454**(7207): 961-967.
79. Shabalina IG, Petrovic N, de Jong JM, Kalinovich AV, Cannon B, Nedergaard J. UCP1 in brite/beige adipose tissue mitochondria is functionally thermogenic. *Cell Rep* 2013; **5**(5): 1196-203.
80. Wu J, Boström P, Sparks LM, Ye L, Choi JH, Giang AH *et al*. Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. *Cell* 2012; **150**(2): 366-76.
81. Dodd GT, Worth AA, Nunn N, Korpak AK, Bechtold DA, Allison MB *et al*. The thermogenic effect of leptin is dependent on a distinct population of prolactin-

- releasing peptide neurons in the dorsomedial hypothalamus. *Cell Metab* 2014; **20**(4): 639-49.
82. Dodd GT, Decherf S, Loh K, Simonds SE, Wiede F, Balland E *et al.* Leptin and insulin act on POMC neurons to promote the browning of white fat. *Cell* 2015; **160**(1-2): 88-104.
83. Xu Y, Nedungadi TP, Zhu L, Sobhani N, Irani BG, Davis KE *et al.* Distinct hypothalamic neurons mediate estrogenic effects on energy homeostasis and reproduction. *Cell Metab* 2011; **14**(4): 453-65.
84. López M, Varela L, Vázquez MJ, Rodríguez-Cuenca S, González CR, Velagapudi VR *et al.* Hypothalamic AMPK and fatty acid metabolism mediate thyroid regulation of energy balance. *Nat Med* 2010; **16**(9): 1001-8.
85. Martínez-Sánchez N, Seoane-Collazo P, Contreras C, Varela L, Villarroja J, Rial-Pensado E *et al.* Hypothalamic AMPK-ER Stress-JNK1 Axis Mediates the Central Actions of Thyroid Hormones on Energy Balance. *Cell Metab* 2017; **26**(1): 212-229.e12.
86. Sarruf DA, Thaler JP, Morton GJ, German J, Fischer JD, Ogimoto K *et al.* Fibroblast growth factor 21 action in the brain increases energy expenditure and insulin sensitivity in obese rats. *Diabetes* 2010; **59**(7): 1817-1824.
87. Rothwell NJ, Stock MJ. A role for brown adipose tissue in diet-induced thermogenesis. *Obes Res* 1997; **5**(6): 650-6.
88. Wu MV, Bikopoulos G, Hung S, Ceddia RB. Thermogenic capacity is antagonistically regulated in classical brown and white subcutaneous fat depots by high fat diet and endurance training in rats: impact on whole-body energy expenditure. *J Biol Chem* 2014; **289**(49): 34129-40.
89. Barquissau V, Beuzelin D, Pisani DF, Beranger GE, Mairal A, Montagner A *et al.* White-to-brite conversion in human adipocytes promotes metabolic reprogramming towards fatty acid anabolic and catabolic pathways. *Mol Metab* 2016; **5**(5): 352-365.
90. Petrovic N, Walden TB, Shabalina IG, Timmons JA, Cannon B, Nedergaard J. Chronic peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) activation of epididymally derived white adipocyte cultures reveals a population of thermogenically competent, UCP1-containing adipocytes molecularly distinct from classic brown adipocytes. *J Biol Chem* 2010; **285**(10): 7153-64.
91. Ohno H, Shinoda K, Spiegelman BM, Kajimura S. PPAR γ agonists induce a white-to-brown fat conversion through stabilization of PRDM16 protein. *Cell Metab* 2012; **15**(3): 395-404.

92. Villanueva CJ, Vergnes L, Wang J, Drew BG, Hong C, Tu Y *et al.* Adipose subtype-selective recruitment of TLE3 or Prdm16 by PPAR γ specifies lipid storage versus thermogenic gene programs. *Cell Metab* 2013; **17**(3): 423-35.
93. Mottillo EP, Bloch AE, Leff T, Granneman JG. Lipolytic products activate peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) α and δ in brown adipocytes to match fatty acid oxidation with supply. *J Biol Chem* 2012; **287**(30): 25038-48.
94. Hondares E, Rosell M, Díaz-Delfín J, Olmos Y, Monsalve M, Iglesias R *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α) induces PPAR γ coactivator 1 α (PGC-1 α) gene expression and contributes to thermogenic activation of brown fat: involvement of PRDM16. *J Biol Chem* 2011; **286**(50): 43112-22.
95. Harms M, Seale P. Brown and beige fat: development, function and therapeutic potential. *Nat Med* 2013; **19**(10): 1252-1263.
96. De Sousa M, Porras DP, Perry CGR, Seale P, Scimè A. p107 Is a Crucial Regulator for Determining the Adipocyte Lineage Fate Choices of Stem Cells. *Stem Cells* 2014; **32**(5): 1323-1336.
97. Cohen P, Levy JD, Zhang Y, Frontini A, Kolodin DP, Svensson KJ *et al.* Ablation of PRDM16 and beige adipose causes metabolic dysfunction and a subcutaneous to visceral fat switch. *Cell* 2014; **156**(1-2): 304-16.
98. Harms MJ, Ishibashi J, Wang W, Lim HW, Goyama S, Sato T *et al.* Prdm16 is required for the maintenance of brown adipocyte identity and function in adult mice. *Cell Metab* 2014; **19**(4): 593-604.
99. Cao W, Daniel KW, Robidoux J, Puigserver P, Medvedev AV, Bai X *et al.* p38 mitogen-activated protein kinase is the central regulator of cyclic AMP-dependent transcription of the brown fat uncoupling protein 1 gene. *Mol Cell Biol* 2004; **24**(7): 3057-67.
100. Scimè A, Grenier G, Huh MS, Gillespie MA, Bevilacqua L, Harper M-E *et al.* Rb and p107 regulate preadipocyte differentiation into white versus brown fat through repression of PGC-1 α . *Cell Metab* 2005; **2**(5): 283-295.
101. Krishnan J, Danzer C, Simka T, Ukropec J, Walter KM, Kumpf S *et al.* Dietary obesity-associated Hif1 α activation in adipocytes restricts fatty acid oxidation and energy expenditure via suppression of the Sirt2-NAD $^{+}$ system. *Genes Dev* 2012; **26**(3): 259-70.
102. Puigserver P, Rhee J, Lin J, Wu Z, Yoon JC, Zhang CY *et al.* Cytokine stimulation of energy expenditure through p38 MAP kinase activation of PPAR γ coactivator-1. *Mol Cell* 2001; **8**(5): 971-82.

103. Kleiner S, Mepani RJ, Laznik D, Ye L, Jurczak MJ, Jornayvaz FR *et al.* Development of insulin resistance in mice lacking PGC-1 α in adipose tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012; **109**(24): 9635-9640.
104. Ikeda K, Yamada T. UCP1 Dependent and Independent Thermogenesis in Brown and Beige Adipocytes. *Front Endocrinol* 2020; **11**(498).
105. Bechmann LP, Hannivoort RA, Gerken G, Hotamisligil GS, Trauner M, Canbay A. The interaction of hepatic lipid and glucose metabolism in liver diseases. *J Hepatol* 2012; **56**(4): 952-964.
106. Ipsen DH, Lykkesfeldt J, Tveden-Nyborg P. Molecular mechanisms of hepatic lipid accumulation in non-alcoholic fatty liver disease. *Cell Mol Life Sci* 2018; **75**(18): 3313-3327.
107. Ameer F, Scandiuzzi L, Hasnain S, Kalbacher H, Zaidi N. *De novo* lipogenesis in health and disease. *Metab Clin Exp* 2014; **63**(7): 895-902.
108. Solinas G, Borén J, Dulloo AG. *De novo* lipogenesis in metabolic homeostasis: More friend than foe? *Mol Metab* 2015; **4**(5): 367-377.
109. Beigneux AP, Kosinski C, Gavino B, Horton JD, Skarnes WC, Young SG. ATP-Citrate Lyase Deficiency in the Mouse. *J Biol Chem* 2004; **279**(10): 9557-9564.
110. Abu-Elheiga L, Matzuk MM, Kordari P, Oh W, Shaikenov T, Gu Z *et al.* Mutant mice lacking acetyl-CoA carboxylase 1 are embryonically lethal. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; **102**(34): 12011.
111. Chirala SS, Chang H, Matzuk M, Abu-Elheiga L, Mao J, Mahon K *et al.* Fatty acid synthesis is essential in embryonic development: Fatty acid synthase null mutants and most of the heterozygotes die in utero. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; **100**(11): 6358.
112. Chow JDY, Lawrence RT, Healy ME, Dominy JE, Liao JA, Breen DS *et al.* Genetic inhibition of hepatic acetyl-CoA carboxylase activity increases liver fat and alters global protein acetylation. *Mol Metab* 2014; **3**(4): 419-431.
113. Solinas G, Summermatter S, Mainieri D, Gubler M, Pirola L, Wymann MP *et al.* The direct effect of leptin on skeletal muscle thermogenesis is mediated by substrate cycling between *de novo* lipogenesis and lipid oxidation. *FEBS Lett* 2004; **577**(3): 539-544.
114. Mottillo EP, Balasubramanian P, Lee YH, Weng C, Kershaw EE, Granneman JG. Coupling of lipolysis and *de novo* lipogenesis in brown, beige, and white adipose tissues during chronic β 3-adrenergic receptor activation. *J Lipid Res* 2014; **55**(11): 2276-86.

115. Strable MS, Ntambi JM. Genetic control of de novo lipogenesis: role in diet-induced obesity. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2010; **45**(3): 199-214.
116. Schwarz J-M, Linfoot P, Dare D, Aghajanian K. Hepatic de novo lipogenesis in normoinsulinemic and hyperinsulinemic subjects consuming high-fat, low-carbohydrate and low-fat, high-carbohydrate isoenergetic diets. *Am J Clin Nutr* 2003; **77**(1): 43-50.
117. Ter Horst KW, Serlie MJ. Fructose Consumption, Lipogenesis, and Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Nutrients* 2017; **9**(9): 981.
118. Hudgins LC, Seidman CE, Diakun J, Hirsch J. Human fatty acid synthesis is reduced after the substitution of dietary starch for sugar. *Am J Clin Nutr* 1998; **67**(4): 631-639.
119. Sanders FWB, Griffin JL. De novo lipogenesis in the liver in health and disease: more than just a shunting yard for glucose. *Biol Rev* 2016; **91**(2): 452-468.
120. Dentin R, Tomas-Cobos L, Foufelle F, Leopold J, Girard J, Postic C *et al.* Glucose 6-phosphate, rather than xylulose 5-phosphate, is required for the activation of ChREBP in response to glucose in the liver. *J Hepatol* 2012; **56**(1): 199-209.
121. Arden C, Tudhope SJ, Petrie JL, Al-Oanzi ZH, Cullen KS, Lange AJ *et al.* Fructose 2,6-bisphosphate is essential for glucose-regulated gene transcription of glucose-6-phosphatase and other ChREBP target genes in hepatocytes. *Biochem J* 2012; **443**(1): 111-23.
122. Uyeda K, Repa JJ. Carbohydrate response element binding protein, ChREBP, a transcription factor coupling hepatic glucose utilization and lipid synthesis. *Cell Metab* 2006; **4**(2): 107-110.
123. Oosterveer MH, Schoonjans K. Hepatic glucose sensing and integrative pathways in the liver. *Cell Mol Life Sci* 2014; **71**(8): 1453-67.
124. Repa JJ, Liang G, Ou J, Bashmakov Y, Lobaccaro JM, Shimomura I *et al.* Regulation of mouse sterol regulatory element-binding protein-1c gene (SREBP-1c) by oxysterol receptors, LXRA and LXRbeta. *Genes Dev* 2000; **14**(22): 2819-2830.
125. Joseph SB, Laffitte BA, Patel PH, Watson MA, Matsukuma KE, Walczak R *et al.* Direct and indirect mechanisms for regulation of fatty acid synthase gene expression by liver X receptors. *J Biol Chem* 2002; **277**(13): 11019-25.
126. Wang D, Sul HS. Upstream Stimulatory Factors Bind to Insulin Response Sequence of the Fatty Acid Synthase Promoter USF1 IS REGULATED. *J Biol Chem* 1995; **270**(48): 28716-28722.

127. Lin J, Yang R, Tarr PT, Wu P-H, Handschin C, Li S *et al.* Hyperlipidemic Effects of Dietary Saturated Fats Mediated through PGC-1 β Coactivation of SREBP. *Cell* 2005; **120**(2): 261-273.
128. Nagai Y, Yonemitsu S, Erion DM, Iwasaki T, Stark R, Weismann D *et al.* The role of peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 beta in the pathogenesis of fructose-induced insulin resistance. *Cell Metab* 2009; **9**(3): 252-264.
129. Brownsey RW, Boone AN, Elliott JE, Kulpa JE, Lee WM. Regulation of acetyl-CoA carboxylase. *Biochem Soc Trans* 2006; **34**(Pt 2): 223-7.
130. Alves-Bezerra M, Cohen DE. Triglyceride Metabolism in the Liver. *Compr Physiol* 2017; **8**(1): 1-8.
131. Schlaepfer IR, Joshi M. CPT1A-mediated Fat Oxidation, Mechanisms, and Therapeutic Potential. *Endocrinology* 2020; **161**(2).
132. Bellanti F, Villani R, Facciorusso A, Vendemiale G, Serviddio G. Lipid oxidation products in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis. *Free Radic Biol Med* 2017; **111**: 173-185.
133. Stacpoole PW. Therapeutic Targeting of the Pyruvate Dehydrogenase Complex/Pyruvate Dehydrogenase Kinase (PDC/PDK) Axis in Cancer. *J Natl Cancer Inst* 2017; **109**(11).
134. Owen OE, Kalhan SC, Hanson RW. The Key Role of Anaplerosis and Cataplerosis for Citric Acid Cycle Function. *J Biol Chem* 2002; **277**(34): 30409-30412.
135. Ducheix S, Vegliante MC, Villani G, Napoli N, Sabbà C, Moschetta A. Is hepatic lipogenesis fundamental for NAFLD/NASH? A focus on the nuclear receptor coactivator PGC-1 β . *Cell Mol Life Sci* 2016; **73**(20): 3809-22.
136. Chambers KT, Chen Z, Lai L, Leone TC, Towle HC, Kralli A *et al.* PGC-1 β and ChREBP partner to cooperatively regulate hepatic lipogenesis in a glucose concentration-dependent manner. *Mol Metab* 2013; **2**(3): 194-204.
137. Bellafante E, Murzilli S, Salvatore L, Latorre D, Villani G, Moschetta A. Hepatic-specific activation of peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1 β protects against steatohepatitis. *Hepatology* 2013; **57**(4): 1343-1356.
138. Bellentani S, Scaglioni F, Marino M, Bedogni G. Epidemiology of non-alcoholic fatty liver disease. *Dig Dis* 2010; **28**(1): 155-61.
139. Younossi ZM, Koenig AB, Abdelatif D, Fazel Y, Henry L, Wymer M. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease-Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology* 2016; **64**(1): 73-84.

140. Hardy T, Oakley F, Anstee QM, Day CP. Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Pathogenesis and Disease Spectrum. *Ann Rev Pathol* 2016; **11**(1): 451-496.
141. Shiha G, Korenjak M, Eskridge W, Casanovas T, Velez-Moller P, Högström S *et al.* Redefining fatty liver disease: an international patient perspective. *Lancet Gastroenterol Hepatol* 2021; **6**(1): 73-79.
142. Sweet PH, Khoo T, Nguyen S. Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Prim Care* 2017; **44**(4): 599-607.
143. Cohen JC, Horton JD, Hobbs HH. Human fatty liver disease: old questions and new insights. *Science* 2011; **332**(6037): 1519-23.
144. Yamaguchi K, Yang L, McCall S, Huang J, Yu XX, Pandey SK *et al.* Inhibiting triglyceride synthesis improves hepatic steatosis but exacerbates liver damage and fibrosis in obese mice with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2007; **45**(6): 1366-1374.
145. Samuel VT, Petersen KF, Shulman GI. Lipid-induced insulin resistance: unravelling the mechanism. *Lancet* 2010; **375**(9733): 2267-2277.
146. Tilg H, Moschen AR. Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: the multiple parallel hits hypothesis. *Hepatology* 2010; **52**(5): 1836-46.
147. Neuschwander-Tetri BA. Hepatic lipotoxicity and the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis: The central role of nontriglyceride fatty acid metabolites. *Hepatology* 2010; **52**(2): 774-788.
148. De Minicis S, Svegliati-Baroni G. Fibrogenesis in nonalcoholic steatohepatitis. *Exp Rev Gastroenterol Hepatol* 2011; **5**(2): 179-187.
149. Perry RJ, Samuel VT, Petersen KF, Shulman GI. The role of hepatic lipids in hepatic insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature* 2014; **510**(7503): 84-91.
150. Wilcox G. Insulin and insulin resistance. *Clin Biochem Rev* 2005; **26**(2): 19-39.
151. Buqué X, Aspichueta P, Ochoa B. Fundamento molecular de la esteatosis hepática asociada a la obesidad. *Rev Esp Enferm Dig* 2008; **100**: 565-578.
152. Farese Robert V, Jr., Zechner R, Newgard Christopher B, Walther Tobias C. The Problem of Establishing Relationships between Hepatic Steatosis and Hepatic Insulin Resistance. *Cell Metab* 2012; **15**(5): 570-573.
153. Samuel VT, Liu Z-X, Qu X, Elder BD, Bilz S, Befroy D *et al.* Mechanism of Hepatic Insulin Resistance in Non-alcoholic Fatty Liver Disease. *J Biol Chem* 2004; **279**(31): 32345-32353.

154. Kumashiro N, Erion DM, Zhang D, Kahn M, Beddow SA, Chu X *et al.* Cellular mechanism of insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; **108**(39): 16381-16385.
155. Farese RV, Sajan MP. Metabolic functions of atypical protein kinase C: "good" and "bad" as defined by nutritional status. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2010; **298**(3): E385-94.
156. Brown MS, Goldstein JL. Selective versus total insulin resistance: a pathogenic paradox. *Cell Metab* 2008; **7**(2): 95-6.
157. Biddinger SB, Hernandez-Ono A, Rask-Madsen C, Haas JT, Alemán JO, Suzuki R *et al.* Hepatic Insulin Resistance Is Sufficient to Produce Dyslipidemia and Susceptibility to Atherosclerosis. *Cell Metab* 2008; **7**(2): 125-134.
158. Semple RK, Sleight A, Murgatroyd PR, Adams CA, Bluck L, Jackson S *et al.* Postreceptor insulin resistance contributes to human dyslipidemia and hepatic steatosis. *J Clin Invest* 2009; **119**(2): 315-322.
159. Gregor MF, Hotamisligil GS. Inflammatory Mechanisms in Obesity. *Ann Rev Immunol* 2011; **29**(1): 415-445.
160. Hummasti S, Hotamisligil GS. Endoplasmic reticulum stress and inflammation in obesity and diabetes. *Circ Res* 2010; **107**(5): 579-91.
161. Taniguchi CM, Ueki K, Kahn CR. Complementary roles of IRS-1 and IRS-2 in the hepatic regulation of metabolism. *J Clin Invest* 2016; **126**(11): 4387-4387.
162. Jacome-Sosa MM, Parks EJ. Fatty acid sources and their fluxes as they contribute to plasma triglyceride concentrations and fatty liver in humans. *Curr Opin Lipidol* 2014; **25**(3): 213-20.
163. Lambert JE, Ramos-Roman MA, Browning JD, Parks EJ. Increased De Novo Lipogenesis Is a Distinct Characteristic of Individuals With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology* 2014; **146**(3): 726-735.
164. Kirk E, Reeds DN, Finck BN, Mayurranjan MS, Patterson BW, Klein S. Dietary Fat and Carbohydrates Differentially Alter Insulin Sensitivity During Caloric Restriction. *Gastroenterology* 2009; **136**(5): 1552-1560.
165. Diraison F, Dusserre E, Vidal H, Sothier M, Beylot M. Increased hepatic lipogenesis but decreased expression of lipogenic gene in adipose tissue in human obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2002; **282**(1): E46-E51.

166. Sobrecases H, Lê KA, Bortolotti M, Schneiter P, Ith M, Kreis R *et al.* Effects of short-term overfeeding with fructose, fat and fructose plus fat on plasma and hepatic lipids in healthy men. *Diabetes Metab* 2010; **36**(3): 244-246.
167. Horton TJ, Drougas H, Brachey A, Reed GW, Peters JC, Hill JO. Fat and carbohydrate overfeeding in humans: different effects on energy storage. *Am J Clin Nutr* 1995; **62**(1): 19-29.
168. Adiels M, Taskinen MR, Packard C, Caslake MJ, Soro-Paavonen A, Westerbacka J *et al.* Overproduction of large VLDL particles is driven by increased liver fat content in man. *Diabetologia* 2006; **49**(4): 755-65.
169. Higuchi N, Kato M, Tanaka M, Miyazaki M, Takao S, Kohjima M *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**(6): 1077-1081.
170. Fujita K, Nozaki Y, Wada K, Yoneda M, Fujimoto Y, Fujitake M *et al.* Dysfunctional very-low-density lipoprotein synthesis and release is a key factor in nonalcoholic steatohepatitis pathogenesis. *Hepatology* 2009; **50**(3): 772-80.
171. Pierantonelli I, Svegliati-Baroni G. Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Basic Pathogenetic Mechanisms in the Progression From NAFLD to NASH. *Transplantation* 2019; **103**(1): e1-e13.
172. Musso G, Cassader M, Gambino R. Non-alcoholic steatohepatitis: emerging molecular targets and therapeutic strategies. *Nat Rev Drug Discov* 2016; **15**(4): 249-274.
173. Simões ICM, Fontes A, Pinton P, Zischka H, Wieckowski MR. Mitochondria in non-alcoholic fatty liver disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2018; **95**: 93-99.
174. Lim CY, Jun DW, Jang SS, Cho WK, Chae JD, Jun JH. Effects of Carnitine on Peripheral Blood Mitochondrial DNA Copy Number and Liver Function in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Korean J Gastroenterol* 2010; **55**(6): 384-389.
175. Haque M, Sanyal AJ. The metabolic abnormalities associated with non-alcoholic fatty liver disease. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2002; **16**(5): 709-31.
176. Reddy JK, Hashimoto T. Peroxisomal beta-oxidation and peroxisome proliferator-activated receptor alpha: an adaptive metabolic system. *Annu Rev Nutr* 2001; **21**: 193-230.
177. Robertson G, Leclercq I, Farrell GC. Nonalcoholic steatosis and steatohepatitis. II. Cytochrome P-450 enzymes and oxidative stress. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001; **281**(5): G1135-9.

178. Spahis S, Delvin E, Borys JM, Levy E. Oxidative Stress as a Critical Factor in Nonalcoholic Fatty Liver Disease Pathogenesis. *Antioxid Redox Signal* 2017; **26**(10): 519-541.
179. Gonzalez A, Huerta-Salgado C, Orozco-Aguilar J, Aguirre F, Tacchi F, Simon F *et al.* Role of Oxidative Stress in Hepatic and Extrahepatic Dysfunctions during Nonalcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD). *Oxid Med Cell Longev* 2020; **2020**: 1617805.
180. Koyama Y, Brenner DA. Liver inflammation and fibrosis. *J Clin Invest* 2017; **127**(1): 55-64.
181. Hardy T, Oakley F, Anstee QM, Day CP. Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Pathogenesis and Disease Spectrum. *Annu Rev Pathol* 2016; **11**: 451-96.
182. Feldstein AE, Canbay A, Angulo P, Taniai M, Burgart LJ, Lindor KD *et al.* Hepatocyte apoptosis and fas expression are prominent features of human nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology* 2003; **125**(2): 437-43.
183. Malhi H, Gores GJ. Cellular and molecular mechanisms of liver injury. *Gastroenterology* 2008; **134**(6): 1641-54.
184. Cao L, Quan X-B, Zeng W-J, Yang X-O, Wang M-J. Mechanism of Hepatocyte Apoptosis. *J Cell Death* 2016; **9**: 19-29.
185. Kim OK, Jun W, Lee J. Mechanism of ER Stress and Inflammation for Hepatic Insulin Resistance in Obesity. *Ann Nutr Metab* 2015; **67**(4): 218-227.
186. Hirsova P, Ibrahim SH, Verma VK, Morton LA, Shah VH, LaRusso NF *et al.* Extracellular vesicles in liver pathobiology: Small particles with big impact. *Hepatology* 2016; **64**(6): 2219-2233.
187. Harris HE, Raucci A. Alarmin(g) news about danger: workshop on innate danger signals and HMGB1. *EMBO Rep* 2006; **7**(8): 774-778.
188. McDonald B, Pittman K, Menezes GB, Hirota SA, Slaba I, Waterhouse CC *et al.* Intravascular danger signals guide neutrophils to sites of sterile inflammation. *Science* 2010; **330**(6002): 362-6.
189. Turnbaugh PJ, Hamady M, Yatsunenko T, Cantarel BL, Duncan A, Ley RE *et al.* A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature* 2009; **457**(7228): 480-484.
190. Qin J, Li Y, Cai Z, Li S, Zhu J, Zhang F *et al.* A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. *Nature* 2012; **490**(7418): 55-60.
191. Boursier J, Mueller O, Barret M, Machado M, Fizanne L, Araujo-Perez F *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**(3): 764-75.
192. Wan J, Benkdane M, Teixeira-Clerc F, Bonnafous S, Louvet A, Lafdil F *et al.* M2 Kupffer cells promote M1 Kupffer cell apoptosis: a protective mechanism against alcoholic and nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2014; **59**(1): 130-42.
193. Chen J, Deng X, Liu Y, Tan Q, Huang G, Che Q *et al.* Kupffer Cells in Non-alcoholic Fatty Liver Disease: Friend or Foe? *Int J Biol Sci* 2020; **16**(13): 2367-2378.
194. Wieckowska A, Papouchado BG, Li Z, Lopez R, Zein NN, Feldstein AE. Increased hepatic and circulating interleukin-6 levels in human nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Gastroenterol* 2008; **103**(6): 1372-9.
195. Hui JM, Hodge A, Farrell GC, Kench JG, Kriketos A, George J. Beyond insulin resistance in NASH: TNF-alpha or adiponectin? *Hepatology* 2004; **40**(1): 46-54.
196. Hirosumi J, Tuncman G, Chang L, Görgün CZ, Uysal KT, Maeda K *et al.* A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature* 2002; **420**(6913): 333-336.
197. Ganz M, Bukong TN, Csak T, Saha B, Park JK, Ambade A *et al.* Progression of non-alcoholic steatosis to steatohepatitis and fibrosis parallels cumulative accumulation of danger signals that promote inflammation and liver tumors in a high fat-cholesterol-sugar diet model in mice. *J Transl Med* 2015; **13**: 193.
198. Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol* 2008; **8**(12): 958-969.
199. Meex RCR, Watt MJ. Hepatokines: linking nonalcoholic fatty liver disease and insulin resistance. *Nat Rev Endocrinol* 2017; **13**(9): 509-520.
200. Haukeland JW, Damås JK, Konopski Z, Løberg EM, Haaland T, Goverud I *et al.* Systemic inflammation in nonalcoholic fatty liver disease is characterized by elevated levels of CCL2. *J Hepatol* 2006; **44**(6): 1167-74.
201. Blaner WS, O'Byrne SM, Wongsiriroj N, Kluwe J, D'Ambrosio DM, Jiang H *et al.* Hepatic stellate cell lipid droplets: a specialized lipid droplet for retinoid storage. *Biochim Biophys Acta* 2009; **1791**(6): 467-73.
202. Kisseleva T, Brenner D. Molecular and cellular mechanisms of liver fibrosis and its regression. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2020.
203. Pradere JP, Kluwe J, De Minicis S, Jiao JJ, Gwak GY, Dapito DH *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**(4): 1461-73.

204. Wang J, Leclercq I, Brymora JM, Xu N, Ramezani-Moghadam M, London RM *et al.* Kupffer cells mediate leptin-induced liver fibrosis. *Gastroenterology* 2009; **137**(2): 713-23.
205. Kim YS, Kim SG. Endoplasmic reticulum stress and autophagy dysregulation in alcoholic and non-alcoholic liver diseases. *Clin Mol Hepatol* 2020; **26**(4): 715-727.
206. Malhi H, Kaufman RJ. Endoplasmic reticulum stress in liver disease. *J Hepatol* 2011; **54**(4): 795-809.
207. Song MJ, Malhi H. The unfolded protein response and hepatic lipid metabolism in non alcoholic fatty liver disease. *Pharmacol Ther* 2019; **203**: 107401.
208. Puri P, Mirshahi F, Cheung O, Natarajan R, Maher JW, Kellum JM *et al.* Activation and dysregulation of the unfolded protein response in nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 2008; **134**(2): 568-76.
209. Gregor MF, Yang L, Fabbrini E, Mohammed BS, Eagon JC, Hotamisligil GS *et al.* Endoplasmic reticulum stress is reduced in tissues of obese subjects after weight loss. *Diabetes* 2009; **58**(3): 693-700.
210. Kammoun HL, Chabanon H, Hainault I, Luquet S, Magnan C, Koike T *et al.* GRP78 expression inhibits insulin and ER stress-induced SREBP-1c activation and reduces hepatic steatosis in mice. *J Clin Invest* 2009; **119**(5): 1201-1215.
211. Ahsan MK, Tchernychev B, Kessler MM, Solinga RM, Arthur D, Linde CI *et al.* Linaclotide activates guanylate cyclase-C/cGMP/protein kinase-II-dependent trafficking of CFTR in the intestine. *Physiol Rep* 2017; **5**(11).
212. Lee AH, Scapa EF, Cohen DE, Glimcher LH. Regulation of hepatic lipogenesis by the transcription factor XBP1. *Science* 2008; **320**(5882): 1492-6.
213. Cnop M, Foufelle F, Velloso LA. Endoplasmic reticulum stress, obesity and diabetes. *Trends Mol Med* 2012; **18**(1): 59-68.
214. Gotoh T, Mori M. Nitric oxide and endoplasmic reticulum stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; **26**(7): 1439-46.
215. Sabio G, Cavanagh-Kyros J, Ko HJ, Jung DY, Gray S, Jun JY *et al.* Prevention of steatosis by hepatic JNK1. *Cell Metab* 2009; **10**(6): 491-498.
216. Tabas I, Ron D. Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress. *Nat Cell Biol* 2011; **13**(3): 184-190.
217. Urano F, Wang X, Bertolotti A, Zhang Y, Chung P, Harding HP *et al.* Coupling of Stress in the ER to Activation of JNK Protein Kinases by Transmembrane Protein Kinase IRE1. *Science* 2000; **287**(5453): 664-666.

218. Hyslop PA, York DA, Corina DL. Changes in the composition and fluidity of membranes in obese (*ob/ob*) mice: a study of hepatic microsomal NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase activity. *Int J Obes* 1982; **6**(3): 279-89.
219. Chakravarthy MV, Neuschwander-Tetri BA. The metabolic basis of nonalcoholic steatohepatitis. *Endocrinology, Diabetes Metab* 2020; **3**(4): e00112.
220. Friend SH, Bernards R, Rogelj S, Weinberg RA, Rapaport JM, Albert DM *et al.* A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma. *Nature* 1986; **323**(6089): 643-6.
221. Lee WH, Bookstein R, Hong F, Young LJ, Shew JY, Lee EY. Human retinoblastoma susceptibility gene: cloning, identification, and sequence. *Science* 1987; **235**(4794): 1394.
222. Huppi K, Siwarski D, Mock BA, Dosik J, Hamel PA. Molecular cloning, chromosomal mapping, and expression of the mouse p107 gene. *Mamm Genome* 1996; **7**(5): 353-5.
223. Stiegler P, Giordano A. Role of pRB2/p130 in cellular growth regulation. *Anal Quant Cytol Histol* 1999; **21**(4): 363-6.
224. Lee JO, Russo AA, Pavletich NP. Structure of the retinoblastoma tumour-suppressor pocket domain bound to a peptide from HPV E7. *Nature* 1998; **391**(6670): 859-65.
225. Liban TJ, Medina EM, Tripathi S, Sengupta S, Henry RW, Buchler NE *et al.* Conservation and divergence of C-terminal domain structure in the retinoblastoma protein family. *Proc Natl Acad Sci USA* 2017; **114**(19): 4942-4947.
226. DeCaprio JA. How the Rb tumor suppressor structure and function was revealed by the study of Adenovirus and SV40. *Virology* 2009; **384**(2): 274-84.
227. Liban TJ, Thwaites MJ, Dick FA, Rubin SM. Structural Conservation and E2F Binding Specificity within the Retinoblastoma Pocket Protein Family. *J Mol Biol* 2016; **428**(20): 3960-3971.
228. Kolupaeva V, Janssens V. PP1 and PP2A phosphatases – cooperating partners in modulating retinoblastoma protein activation. *FEBS J* 2013; **280**(2): 627-643.
229. Trimarchi JM, Lees JA. Sibling rivalry in the E2F family. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002; **3**(1): 11-20.
230. Hsu J, Sage J. Novel functions for the transcription factor E2F4 in development and disease. *Cell Cycle* 2016; **15**(23): 3183-3190.

231. Jacks T, Fazeli A, Schmitt EM, Bronson RT, Goodell MA, Weinberg RA. Effects of an Rb mutation in the mouse. *Nature* 1992; **359**(6393): 295-300.
232. Mulligan G, Jacks T. The retinoblastoma gene family: cousins with overlapping interests. *Trends Genet* 1998; **14**(6): 223-9.
233. Classon M, Harlow E. The retinoblastoma tumour suppressor in development and cancer. *Nat Rev Cancer* 2002; **2**(12): 910-7.
234. Asimakopoulos F, White N, Nacheva E, Green A. Molecular analysis of chromosome 20q deletions associated with myeloproliferative disorders and myelodysplastic syndromes. *Blood* 1994; **84**(9): 3086-3094.
235. Dick FA, Rubin SM. Molecular mechanisms underlying RB protein function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2013; **14**(5): 297-306.
236. Guiley KZ, Liban TJ, Felthousen JG, Ramanan P, Litovchick L, Rubin SM. Structural mechanisms of DREAM complex assembly and regulation. *Genes Dev* 2015; **29**(9): 961-974.
237. Ferreira R, Magnaghi-Jaulin L, Robin P, Harel-Bellan A, Trouche D. The three members of the pocket proteins family share the ability to repress E2F activity through recruitment of a histone deacetylase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**(18): 10493-8.
238. Nielsen SJ, Schneider R, Bauer UM, Bannister AJ, Morrison A, O'Carroll D *et al.* Rb targets histone H3 methylation and HP1 to promoters. *Nature* 2001; **412**(6846): 561-5.
239. Ewen ME, Xing Y, Lawrence JB, Livingston DM. Molecular cloning, chromosomal mapping, and expression of the cDNA for p107, a retinoblastoma gene product-related protein. *Cell* 1991; **66**(6): 1155-1164.
240. Burkhart DL, Sage J. Cellular mechanisms of tumour suppression by the retinoblastoma gene. *Nat Rev Cancer* 2008; **8**(9): 671-682.
241. Garriga J, Limón A, Mayol X, Rane SG, Albrecht JH, Reddy EP *et al.* Differential regulation of the retinoblastoma family of proteins during cell proliferation and differentiation. *Biochem J* 1998; **333** (Pt 3)(Pt 3): 645-654.
242. Puri PL, Cimino L, Fulco M, Zimmerman C, La Thangue NB, Giordano A *et al.* Regulation of E2F4 Mitogenic Activity during Terminal Differentiation by Its Heterodimerization Partners for Nuclear Translocation. *Cancer Res* 1998; **58**(7): 1325.
243. Zini N, Trimarchi C, Claudio PP, Stiegler P, Marinelli F, Maltarello MC *et al.* pRb2/p130 and p107 control cell growth by multiple strategies and in association

- with different compartments within the nucleus. *J Cell Physiol* 2001; **189**(1): 34-44.
244. Burkhardt DL, Viatour P, Ho VM, Sage J. GFP reporter mice for the retinoblastoma-related cell cycle regulator p107. *Cell Cycle* 2008; **7**(16): 2544-2552.
245. Zhu L, Zhu L, Xie E, Chang LS. Differential roles of two tandem E2F sites in repression of the human p107 promoter by retinoblastoma and p107 proteins. *Mol Cell Biol* 1995; **15**(7): 3552-3562.
246. Robanus-Maandag E, Dekker M, van der Valk M, Carrozza ML, Jeanny JC, Dannenberg JH *et al.* p107 is a suppressor of retinoblastoma development in pRb-deficient mice. *Genes Dev* 1998; **12**(11): 1599-1609.
247. Cao L, Faha B, Dembski M, Tsai L-H, Harlow E, Dyson N. Independent binding of the retinoblastoma protein and p107 to the transcription factor E2F. *Nature* 1992; **355**(6356): 176-179.
248. Zhu L, van den Heuvel S, Helin K, Fattaey A, Ewen M, Livingston D *et al.* Inhibition of cell proliferation by p107, a relative of the retinoblastoma protein. *Genes Dev* 1993; **7**(7a): 1111-1125.
249. Beijersbergen RL, Carlée L, Kerkhoven RM, Bernards R. Regulation of the retinoblastoma protein-related p107 by G1 cyclin complexes. *Genes Dev* 1995; **9**(11): 1340-1353.
250. Xiao ZX, Ginsberg D, Ewen M, Livingston DM. Regulation of the retinoblastoma protein-related protein p107 by G1 cyclin-associated kinases. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; **93**(10): 4633-4637.
251. Balciunaite E, Spektor A, Lents NH, Cam H, Te Riele H, Scime A *et al.* Pocket protein complexes are recruited to distinct targets in quiescent and proliferating cells. *Mol Cell Biol* 2005; **25**(18): 8166-8178.
252. Garriga J, Jayaraman AL, Limón A, Jayadeva G, Sotillo E, Truongcao M *et al.* A Dynamic Equilibrium between CDKs and PP2A Modulates Phosphorylation of pRB, p107 and p130. *Cell Cycle* 2004; **3**(10): 1320-1330.
253. Voorhoeve PM, Hijmans EM, Bernards R. Functional interaction between a novel protein phosphatase 2A regulatory subunit, PR59, and the retinoblastoma-related p107 protein. *Oncogene* 1999; **18**(2): 515-524.
254. Lee EY, Cam H, Ziebold U, Rayman JB, Lees JA, Dynlacht BD. E2F4 loss suppresses tumorigenesis in Rb mutant mice. *Cancer Cell* 2002; **2**(6): 463-472.

255. Ewen ME, Faha B, Harlow E, Livingston DM. Interaction of p107 with cyclin A independent of complex formation with viral oncoproteins. *Science* 1992; **255**(5040): 85.
256. Lees E, Faha B, Dulic V, Reed SI, Harlow E. Cyclin E/cdk2 and cyclin A/cdk2 kinases associate with p107 and E2F in a temporally distinct manner. *Genes Dev* 1992; **6**(10): 1874-1885.
257. Castaño E, Kleyner Y, Dynlacht BD. Dual cyclin-binding domains are required for p107 to function as a kinase inhibitor. *Mol Cell Biol* 1998; **18**(9): 5380-5391.
258. Woo MS, Sánchez I, Dynlacht BD. p130 and p107 use a conserved domain to inhibit cellular cyclin-dependent kinase activity. *Mol Cell Biol* 1997; **17**(7): 3566-3579.
259. Datta PK, Raychaudhuri P, Bagchi S. Association of p107 with Sp1: genetically separable regions of p107 are involved in regulation of E2F- and Sp1-dependent transcription. *Mol Cell Biol* 1995; **15**(10): 5444-5452.
260. Chen C-R, Kang Y, Siegel PM, Massagué J. E2F4/5 and p107 as Smad Cofactors Linking the TGF β Receptor to c-myc Repression. *Cell* 2002; **110**(1): 19-32.
261. Gu W, Bhatia K, Magrath IT, Dang CV, Dalla-Favera R. Binding and suppression of the Myc transcriptional activation domain by p107. *Science* 1994; **264**(5156): 251.
262. Beijersbergen RL, Hijmans EM, Zhu L, Bernards R. Interaction of c-Myc with the pRb-related protein p107 results in inhibition of c-Myc-mediated transactivation. *EMBO J* 1994; **13**(17): 4080-4086.
263. Lee MH, Williams BO, Mulligan G, Mukai S, Bronson RT, Dyson N *et al.* Targeted disruption of p107: functional overlap between p107 and Rb. *Genes Dev* 1996; **10**(13): 1621-1632.
264. LeCouter JE, Kablar B, Hardy WR, Ying C, Megeney LA, May LL *et al.* Strain-dependent myeloid hyperplasia, growth deficiency, and accelerated cell cycle in mice lacking the Rb-related p107 gene. *Mol Cell Biol* 1998; **18**(12): 7455-7465.
265. Ruiz S, Segrelles C, Bravo A, Santos M, Perez P, Leis H *et al.* Abnormal epidermal differentiation and impaired epithelial-mesenchymal tissue interactions in mice lacking the retinoblastoma relatives p107 and p130. *Development* 2003; **130**(11): 2341.
266. Cobrinik D, Lee MH, Hannon G, Mulligan G, Bronson RT, Dyson N *et al.* Shared role of the pRB-related p130 and p107 proteins in limb development. *Genes Dev* 1996; **10**(13): 1633-1644.

267. Yeh N, Miller JP, Gaur T, Capellini TD, Nikolich-Zugich J, de la Hoz C *et al.* Cooperation between p27 and p107 during endochondral ossification suggests a genetic pathway controlled by p27 and p130. *Mol Cell Biol* 2007; **27**(14): 5161-5171.
268. Vanderluit JL, Ferguson KL, Nikolettoulou V, Parker M, Ruzhynsky V, Alexson T *et al.* p107 regulates neural precursor cells in the mammalian brain. *J Cell Biol* 2004; **166**(6): 853-863.
269. Marino S, Hoogervorst D, Brandner S, Berns A. Rb and p107 are required for normal cerebellar development and granule cell survival but not for Purkinje cell persistence. *Development* 2003; **130**(15): 3359.
270. Lara MF, Santos M, Ruiz S, Segrelles C, Moral M, Martínez-Cruz AB *et al.* p107 acts as a tumor suppressor in pRb-deficient epidermis. *Mol Carcinog* 2008; **47**(2): 105-113.
271. Vasavada RC, Cozar-Castellano I, Sipula D, Stewart AF. Tissue-Specific Deletion of the Retinoblastoma Protein in the Pancreatic β -Cell Has Limited Effects on β -Cell Replication, Mass, and Function. *Diabetes* 2007; **56**(1): 57.
272. Harb G, Vasavada RC, Cobrinik D, Stewart AF. The retinoblastoma protein and its homolog p130 regulate the G1/S transition in pancreatic beta-cells. *Diabetes* 2009; **58**(8): 1852-1862.
273. Cai EP, Wu X, Schroer SA, Elia AJ, Nostro MC, Zacksenhaus E *et al.* Retinoblastoma tumor suppressor protein in pancreatic progenitors controls α - and β -cell fate. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013; **110**(36): 14723-14728.
274. Cai EP, Luk CT, Wu X, Schroer SA, Shi SY, Sivasubramaniyam T *et al.* Rb and p107 are required for alpha cell survival, beta cell cycle control and glucagon-like peptide-1 action. *Diabetologia* 2014; **57**(12): 2555-2565.
275. Hallenborg P, Feddersen S, Madsen L, Kristiansen K. The tumor suppressors pRB and p53 as regulators of adipocyte differentiation and function. *Expert Opin Ther Targets* 2009; **13**(2): 235-246.
276. Chen PL, Riley DJ, Chen Y, Lee WH. Retinoblastoma protein positively regulates terminal adipocyte differentiation through direct interaction with C/EBPs. *Genes Dev* 1996; **10**(21): 2794-2804.
277. Petrov PD, Palou A, Bonet ML, Ribot J. Cell-Autonomous Brown-Like Adipogenesis of Preadipocytes From Retinoblastoma Haploinsufficient Mice. *J Cell Physiol* 2016; **231**(9): 1941-1952.
278. Hansen JB, Jørgensen C, Petersen RK, Hallenborg P, De Matteis R, Bøye HA *et al.* Retinoblastoma protein functions as a molecular switch determining white

- versus brown adipocyte differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; **101**(12): 4112-7.
279. Hansen JB, Petersen RK, Larsen BM, Bartkova J, Alsner J, Kristiansen K. Activation of Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ Bypasses the Function of the Retinoblastoma Protein in Adipocyte Differentiation. *J Biol Chem* 1999; **274**(4): 2386-2393.
280. Classon M, Kennedy BK, Mulloy R, Harlow E. Opposing roles of pRB and p107 in adipocyte differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; **97**(20): 10826-31.
281. Shao D, Lazar MA. Peroxisome Proliferator Activated Receptor γ , CCAAT/Enhancer-binding Protein α , and Cell Cycle Status Regulate the Commitment to Adipocyte Differentiation. *J Biol Chem* 1997; **272**(34): 21473-21478.
282. Puigserver P, Ribot J, Serra F, Gianotti M, Luisa Bonet M, Nadal-Ginard B *et al.* Involvement of the retinoblastoma protein in brown and white adipocyte cell differentiation: Functional and physical association with the adipogenic transcription factor C/EBP α . *Eur J Cell Biol* 1998; **77**(2): 117-123.
283. Hansen JB, Petersen RK, Jørgensen C, Kristiansen K. Deregulated MAPK Activity Prevents Adipocyte Differentiation of Fibroblasts Lacking the Retinoblastoma Protein. *J Biol Chem* 2002; **277**(29): 26335-26339.
284. Richon VM, Lyle RE, McGehee RE. Regulation and Expression of Retinoblastoma Proteins p107 and p130 during 3T3-L1 Adipocyte Differentiation. *J Biol Chem* 1997; **272**(15): 10117-10124.
285. May JS, Prince AM, Lyle RE, McGehee RE. Antisense Suppression of p107 Inhibits 3T3-L1 Adipocyte Differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; **283**(4): 837-842.
286. Liu K, Guan Y, MacNicol MC, MacNicol AM, McGehee RE. Early expression of p107 is associated with 3T3-L1 adipocyte differentiation. *Mol Cell Endocrinol* 2002; **194**(1): 51-61.
287. Ross AS, Tsang R, Shewmake K, McGehee RE, Jr. Expression of p107 and p130 during human adipose-derived stem cell adipogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; **366**(4): 927-931.
288. Moreno-Navarrete JM, Petrov P, Serrano M, Ortega F, García-Ruiz E, Oliver P *et al.* Decreased RB1 mRNA, protein, and activity reflect obesity-induced altered adipogenic capacity in human adipose tissue. *Diabetes* 2013; **62**(6): 1923-1931.
289. Mercader J, Ribot J, Murano I, Feddersen S, Cinti S, Madsen L *et al.* Haploinsufficiency of the retinoblastoma protein gene reduces diet-induced

- obesity, insulin resistance, and hepatosteatosis in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2009; **297**(1): E184-E193.
290. Petrov PD, Ribot J, Palou A, Luisa Bonet M. Improved metabolic regulation is associated with retinoblastoma protein gene haploinsufficiency in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2014; **308**(2): E172-E183.
291. Dali-Youcef N, Mataki C, Coste A, Messaddeq N, Giroud S, Blanc S *et al.* Adipose tissue-specific inactivation of the retinoblastoma protein protects against diabetes because of increased energy expenditure. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; **104**(25): 10703-10708.
292. Lu Z, Marcelin G, Bauzon F, Wang H, Fu H, Dun SL *et al.* pRb is an obesity suppressor in hypothalamus and high-fat diet inhibits pRb in this location. *EMBO J* 2013; **32**(6): 844-857.
293. Petrov PD, Ribot J, López-Mejía IC, Fajas L, Palou A, Bonet ML. Retinoblastoma Protein Knockdown Favors Oxidative Metabolism and Glucose and Fatty Acid Disposal in Muscle Cells. *J Cell Physiol* 2016; **231**(3): 708-718.
294. Porras DP, Abbaszadeh M, Bhattacharya D, D'Souza NC, Edjiu NR, Perry CGR *et al.* p107 Determines a Metabolic Checkpoint Required for Adipocyte Lineage Fates. *Stem Cells* 2017; **35**(5): 1378-1391.
295. Carrière A, Jeanson Y, Berger-Müller S, André M, Chenouard V, Arnaud E *et al.* Browning of white adipose cells by intermediate metabolites: an adaptive mechanism to alleviate redox pressure. *Diabetes* 2014; **63**(10): 3253-65.
296. Cai L, Sutter BM, Li B, Tu BP. Acetyl-CoA induces cell growth and proliferation by promoting the acetylation of histones at growth genes. *Mol Cell* 2011; **42**(4): 426-37.
297. Nicolas E, Roumillac C, Trouche D. Balance between acetylation and methylation of histone H3 lysine 9 on the E2F-responsive dihydrofolate reductase promoter. *Mol Cell Biol* 2003; **23**(5): 1614-22.
298. Pan D, Huang L, Zhu LJ, Zou T, Ou J, Zhou W *et al.* Jmjd3-Mediated H3K27me3 Dynamics Orchestrate Brown Fat Development and Regulate White Fat Plasticity. *Dev Cell* 2015; **35**(5): 568-583.
299. Scimè A, Soleimani VD, Bentzinger CF, Gillespie MA, Le Grand F, Grenier G *et al.* Oxidative status of muscle is determined by p107 regulation of PGC-1 α . *J Cell Biol* 2010; **190**(4): 651-662.
300. Bhattacharya D, Ydfors M, Hughes MC, Norrbom J, Perry CGR, Scimè A. Decreased transcriptional corepressor p107 is associated with exercise-induced

- mitochondrial biogenesis in human skeletal muscle. *Physiol Rep* 2017; **5**(5): e13155.
301. Weir JBDB. New methods for calculating metabolic rate with special reference to protein metabolism. *Journal Physiol* 1949; **109**(1-2): 1-9.
302. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 1985; **28**(7): 412-9.
303. Martínez-Uña M, Varela-Rey M, Mestre D, Fernández-Ares L, Fresnedo O, Fernandez-Ramos D *et al.* S-Adenosylmethionine increases circulating very-low density lipoprotein clearance in non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol* 2015; **62**(3): 673-81.
304. Quiroga AD, Lian J, Lehner R. Carboxylesterase1/Esterase-x regulates chylomicron production in mice. *PLoS One* 2012; **7**(11): e49515.
305. Yen C-LE, Cheong M-L, Grueter C, Zhou P, Moriwaki J, Wong JS *et al.* Deficiency of the intestinal enzyme acyl CoA:monoacylglycerol acyltransferase-2 protects mice from metabolic disorders induced by high-fat feeding. *Nat Med* 2009; **15**(4): 442-446.
306. 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**(5): 1017-1026.
307. Hirschey MD, Shimazu T, Goetzman E, Jing E, Schwer B, Lombard DB *et al.* SIRT3 regulates mitochondrial fatty-acid oxidation by reversible enzyme deacetylation. *Nature* 2010; **464**(7285): 121-5.
308. 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**(23): 20423-30.
309. Dewidar B, Meyer C, Dooley S, Meindl B, Nadja. TGF- β in Hepatic Stellate Cell Activation and Liver Fibrogenesis-Updated 2019. *Cells* 2019; **8**(11): 1419.
310. Kang KH, Qian ZJ, Ryu B, Karadeniz F, Kim D, Kim SK. Hepatic Fibrosis Inhibitory Effect of Peptides Isolated from *Navicula incerta* on TGF- β 1 Induced Activation of LX-2 Human Hepatic Stellate Cells. *Prev Nutr Food Sci* 2013; **18**(2): 124-32.
311. Wright K. Antibodies a laboratory manual: By E Harlow and D Lane. pp 726. Cold Spring Harbor Laboratory. 1988. \$50 ISBN 0-87969-314-2. *Biochem Educ* 1989; **17**(4): 220-220.

312. Miller J. Reaction time analysis with outlier exclusion: bias varies with sample size. *Q J Exp Psychol A* 1991; **43**(4): 907-12.
313. Mohd Razali N, Yap B. Power Comparisons of Shapiro-Wilk, Kolmogorov-Smirnov, Lilliefors and Anderson-Darling Tests. *J. Stat. Model. Analytics* 2011; **2**.
314. Shapiro SS, Wilk MB. An Analysis of Variance Test for Normality (Complete Samples). *Biometrika* 1965; **52**(3/4): 591-611.
315. Yap BW, Sim CH. Comparisons of various types of normality tests. *J Stat Comput Simul* 2011; **81**(12): 2141-2155.
316. Nijijima A. Blood glucose levels modulate efferent activity in the vagal supply to the rat liver. *J Physiol* 1985; **364**: 105-12.
317. Kao LS, Green CE. Analysis of variance: is there a difference in means and what does it mean? *J Surg Res* 2008; **144**(1): 158-70.
318. Winter J. Using the Student's "t"-Test with Extremely Small Sample Sizes. *Pract Assess Res Eval* 2013; **18**: 10.
319. Student. The Probable Error of a Mean. *Biometrika* 1908; **6**(1): 1-25.
320. Milton JS. *Estadística para biología y ciencias de la salud*, McGraw-Hill Interamericana de España S.L., 2007.
321. Dunn OJ. Multiple Comparisons Using Rank Sums. *Technometrics* 1964; **6**(3): 241-252.
322. Campbell G, Skillings JH. Nonparametric Stepwise Multiple Comparison Procedures. *J Am Stat Assoc* 1985; **80**(392): 998-1003.
323. Bridge PD, Sawilowsky SS. Increasing physicians' awareness of the impact of statistics on research outcomes: comparative power of the t-test and Wilcoxon Rank-Sum test in small samples applied research. *J Clin Epidemiol* 1999; **52**(3): 229-35.
324. Mukaka MM. Statistics corner: A guide to appropriate use of correlation coefficient in medical research. *Malawi Med J* 2012; **24**(3): 69-71.
325. Alexopoulos EC. Introduction to multivariate regression analysis. *Hippokratia* 2010; **14**(Suppl 1): 23-28.
326. Martínez-Sánchez N, Moreno-Navarrete JM, Contreras C, Rial-Pensado E, Fernø J, Nogueiras R *et al*. Thyroid hormones induce browning of white fat. *J Endocrinol* 2017; **232**(2): 351-362.

327. López M, Alvarez CV, Nogueiras R, Diéguez C. Energy balance regulation by thyroid hormones at central level. *Trends Mol Med* 2013; **19**(7): 418-27.
328. Fisher FM, Kleiner S, Douris N, Fox EC, Mepani RJ, Verdeguer F *et al.* FGF21 regulates PGC-1 α and browning of white adipose tissues in adaptive thermogenesis. *Genes Dev* 2012; **26**(3): 271-81.
329. Quesada-López T, Cereijo R, Turatsinze J-V, Planavila A, Cairó M, Gavaldà-Navarro A *et al.* The lipid sensor GPR120 promotes brown fat activation and FGF21 release from adipocytes. *Nat Commun* 2016; **7**(1): 13479.
330. Palmer BF, Clegg DJ. The sexual dimorphism of obesity. *Mol Cell Endocrinol* 2015; **402**: 113-9.
331. Vidal A, Carneiro C, Zalvide JB. Of mice without pockets: mouse models to study the function of Rb family proteins. *Front Biosci* 2007; **12**: 4483-96.
332. Fearnside JF, Dumas M-E, Rothwell AR, Wilder SP, Cloarec O, Tøye A *et al.* Phylometabonomic Patterns of Adaptation to High Fat Diet Feeding in Inbred Mice. *PLoS One* 2008; **3**(2): e1668.
333. Marcelin G, Liu SM, Schwartz GJ, Chua SC, Jr. Identification of a loss-of-function mutation in Ube2l6 associated with obesity resistance. *Diabetes* 2013; **62**(8): 2784-95.
334. Landsberg RL, Sero JE, Danielian PS, Yuan TL, Lee EY, Lees JA. The role of E2F4 in adipogenesis is independent of its cell cycle regulatory activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; **100**(5): 2456-61.
335. Lowell BB, V SS, Hamann A, Lawitts JA, Himms-Hagen J, Boyer BB *et al.* Development of obesity in transgenic mice after genetic ablation of brown adipose tissue. *Nature* 1993; **366**(6457): 740-2.
336. Calderon-Dominguez M, Mir JF, Fucho R, Weber M, Serra D, Herrero L. Fatty acid metabolism and the basis of brown adipose tissue function. *Adipocyte* 2016; **5**(2): 98-118.
337. Söderlund V, Larsson SA, Jacobsson H. Reduction of FDG uptake in brown adipose tissue in clinical patients by a single dose of propranolol. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2007; **34**(7): 1018-22.
338. Cypess AM, Chen YC, Sze C, Wang K, English J, Chan O *et al.* Cold but not sympathomimetics activates human brown adipose tissue in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012; **109**(25): 10001-5.
339. Cereijo R, Giralt M, Villarroya F. Thermogenic brown and beige/brite adipogenesis in humans. *Ann Med* 2015; **47**(2): 169-77.

340. Cypess AM, Weiner LS, Roberts-Toler C, Franquet Elía E, Kessler SH, Kahn PA *et al.* Activation of human brown adipose tissue by a β 3-adrenergic receptor agonist. *Cell Metab* 2015; **21**(1): 33-8.
341. Beiroa D, Imbernon M, Gallego R, Senra A, Herranz D, Villarroya F *et al.* GLP-1 agonism stimulates brown adipose tissue thermogenesis and browning through hypothalamic AMPK. *Diabetes* 2014; **63**(10): 3346-58.
342. Suárez-Zamorano N, Fabbiano S, Chevalier C, Stojanović O, Colin DJ, Stevanović A *et al.* Microbiota depletion promotes browning of white adipose tissue and reduces obesity. *Nat Med* 2015; **21**(12): 1497-1501.
343. Bartelt A, John C, Schaltenberg N, Berbée JFP, Worthmann A, Cherradi ML *et al.* Thermogenic adipocytes promote HDL turnover and reverse cholesterol transport. *Nat Commun* 2017; **8**(1): 15010.
344. Seale P, Kajimura S, Yang W, Chin S, Rohas LM, Uldry M *et al.* Transcriptional control of brown fat determination by PRDM16. *Cell Metab* 2007; **6**(1): 38-54.
345. Sage J, Miller AL, Pérez-Mancera PA, Wysocki JM, Jacks T. Acute mutation of retinoblastoma gene function is sufficient for cell cycle re-entry. *Nature* 2003; **424**(6945): 223-8.
346. Zheng Z, Zhang C, Zhang K. Role of unfolded protein response in lipogenesis. *World J Hepatol* 2010; **2**(6): 203-7.
347. Lee JS, Mendez R, Heng HH, Yang ZQ, Zhang K. Pharmacological ER stress promotes hepatic lipogenesis and lipid droplet formation. *Am J Transl Res* 2012; **4**(1): 102-13.
348. Ferramosca A, Zara V. Modulation of hepatic steatosis by dietary fatty acids. *World J Gastroenterol* 2014; **20**(7): 1746-55.







ANEXOS





XUNTA DE GALICIA
CONSELLERÍA DO MEDIO RURAL

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

REGISTRO XERAL DA XUNTA DE GALICIA
REGISTRO DO EDIFICIO ADMINISTRATIVO DE A CORUÑA
A CORUÑA

SAÍDA 18161 / RX 264122

Data 21/02/2018 10:09:53



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

RESOLUCIÓN DE AUTORIZACIÓN DE PROXECTOS DE EXPERIMENTACIÓN ANIMAL

Expediente núm.: 15010/17/002

Data de inicio: 19.02.2018

Persoa interesada: Sulay Tovar Carro

Forma de inicio: solicitude da interesada

Procedemento: resolución de autorización

ANTECEDENTES

A persoa interesada, como representante do centro CIMUS (Universidade de Santiago de Compostela), presentou con data 29.06.2017 e rexistro de entrada 72838/RX 1687426, unha solicitude para a realización do proxecto de experimentación animal, cuxos datos se detallan a continuación:

Denominación do proxecto: Estudo de clásicos e novos candidatos na regulación a nivel hipotalámico e periférico da homeostase da glucosa

Nome do centro usuario: CIMUS

Persoa responsable do proxecto: Sulay Tovar Carro

Establecemento onde se realizarán os procedementos do proxecto (ou lugar xeográfico no caso de traballos de campo): 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 poña fin o procedemento decidirá todas as cuestións expostas polos interesados e aquelas outras derivadas deste.

CVE: n6S6v1n1
Verificación: <https://sede.xunta.gal/cve>





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, 19 de febreiro de 2018
O xefe territorial

Manuel Rodríguez Vázquez

Achado por: RODRÍGUEZ VÁZQUEZ, MANUEL
Cargo: XEFE TERRITORIAL
Data e hora: 20/02/2018 12:17:02

CVE: a3d4ur1q1
Verificación: <https://sede.xunta.gal/cve>



Ref.: CAP-T-0714-15

D./D.ª JUAN CUÑARRO GÓMEZ
 EDIF. CIMUS - AVDA. DE
 BARCELONA, S/N
 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 JUAN CUÑARRO GÓMEZ, con N.I.F. 76580921Y, 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 JUAN CUÑARRO GÓMEZ, con N.I.F. 76580921Y, 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.”

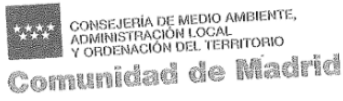
Se adjunta Certificado de Capacitación.

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

Fdo.: Sonia García Gómez

REGISTRO DE SALIDA
 Ref.: 10/228306.9/15 Fecha: 24/11/2015 13:10

 Cons. Medio Amb. Admin. Local y O.T.
 Reg. C. Medio Amb. Local y O.T. (ALC)
 Destino: JUAN CUÑARRO GÓMEZ-EDIF. CIMUS



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

D./D.ª **JUAN CUÑARRO GÓMEZ**, con N.I.F. **76580921Y**, ha obtenido el reconocimiento de la capacitación para realizar, sin limitación de especie, las funciones de:

EUTANASIA DE LOS ANIMALES
REALIZACIÓN DE LOS PROCEDIMIENTOS

Nº de certificado: **CAP-T-0714-15**

ORGANISMO QUE EXPIDE EL CERTIFICADO

Dirección General de Agricultura y Ganadería
Consejería de Medio Ambiente, Administración Local y Ordenación del Territorio

El reconocimiento de la capacitación para la realización de las funciones relacionadas en este certificado surtirá efecto en todo el territorio nacional.

Fecha

13 de octubre de 2015

Sello



Nombre y firma

EL DIRECTOR GENERAL DE AGRICULTURA Y GANADERÍA

Fdo.: José Luis Sanz Vicente



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 JUAN CUÑARRO GÓMEZ, con N.I.F. 76580921Y, 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 JUAN CUÑARRO GÓMEZ, con N.I.F. 76580921Y, 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 Sanz Vicente



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
Salamanca

Proyecto 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](#)

**HOSPITAL
UNIVERSITARIO
DE SALAMANCA**
Paseo de San Vicente, 58-182
37007 Salamanca
Comité Ético de Investigación Clínica
Teléfono: 923 29 15 15
Fax: 923 29 11 13



E-mail: mesanchezm@saludcastillayleon.es

**EL COMITE ETICO DE INVESTIGACION CLINICA DEL AREA DE SALUD DE
SALAMANCA,**

INFORMA:

Que el Proyecto de Investigación presentado por D. MIGUEL MARCOS MARTÍN,

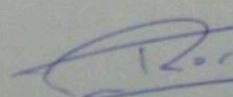
Titulado:

**“ROLE OF OBESITY IN THE DEVELOPMENT OF HEPATOCELLULAR
CARCINOMA”.**

Que presenta como Investigador Responsable a la Convocatoria de Proyectos de Investigación Fundamental No Orientada (MICINN), SE AJUSTA A LAS NORMAS ETICAS Y DE BUENA PRÁCTICA CLÍNICA, establecidas para tales estudios.

Y para que conste lo firma en Salamanca con fecha 8 de abril de 2010.

EL SECRETARIO


**HOSPITAL UNIVERSITARIO DE SALAMANCA
COMITE ETICO DE
INVESTIGACION CLINICA**

Fdo.: Dr. Ricardo Tostado Menéndez

SPRINGER NATURE LICENSE
TERMS AND CONDITIONS

Jun 07, 2021

This Agreement between Mr. Juan Cuñarro ("You") and Springer Nature ("Springer Nature") consists of your license details and the terms and conditions provided by Springer Nature and Copyright Clearance Center.

License Number	5042401086246
License date	Apr 05, 2021
Licensed Content Publisher	Springer Nature
Licensed Content Publication	Nature Medicine
Licensed Content Title	Brown and beige fat: development, function and therapeutic potential
Licensed Content Author	Matthew Harms et al
Licensed Content Date	Sep 29, 2013
Type of Use	Thesis/Dissertation
Requestor type	non-commercial (non-profit)
Format	print and electronic
Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables/illustrations	1

High-res required	no
Will you be translating?	no
Circulation/distribution	1 - 29
Author of this Springer Nature content	no
Title	Papel de p107 en la regulación de la homeostasis energética
Institution name	Universidade de Santiago de Compostela
Expected presentation date	Jul 2021
Portions	Figure 2
Requestor Location	Mr. Juan Cuñarro Rúa do Parque 13 3B Chantada, Lugo 27500 Spain Attn: Mr. Juan Cuñarro
Total	0.00 USD

OXFORD UNIVERSITY PRESS LICENSE
TERMS AND CONDITIONS

Jun 07, 2021

This Agreement between Mr. Juan Cuñarro ("You") and Oxford University Press ("Oxford University Press") consists of your license details and the terms and conditions provided by Oxford University Press and Copyright Clearance Center.

License Number	5042391320955
License date	Apr 05, 2021
Licensed content publisher	Oxford University Press
Licensed content publication	Endocrine Reviews
Licensed content title	Emerging Therapeutic Strategies for Obesity
Licensed content author	Foster-Schubert, Karen E.; Cummings, David E.
Licensed content date	Dec 1, 2006
Type of Use	Thesis/Dissertation
Institution name	
Title of your work	Papel de p107 en la regulación de la homeostasis energética
Publisher of your work	Universidade de Santiago de Compostela
Expected publication date	Jul 2021

Permissions cost	0.00 EUR
Value added tax	0.00 EUR
Total	0.00 EUR
Title	Papel de p107 en la regulación de la homeostasis energética
Institution name	Universidade de Santiago de Compostela
Expected presentation date	Jul 2021
Portions	Figure 3
Requestor Location	Mr. Juan Cuñarro Rúa do Parque 13 3B Chantada, Lugo 27500 Spain Attn: Mr. Juan Cuñarro
Publisher Tax ID	GB125506730
Total	0.00 EUR



AGRADECIMIENTOS



Afortunadamente, podo comezar dicindo que esta debería ser a parte máis longa deste manuscrito, pola gran cantidade de xente e de cualificativos positivos que se me veñen a cabeza. Por elo, considérome infinitamente afortunado. Non obstante, a estas alturas o que máis desexo e terminar este proceso. Así, tentarei facer un breve resumo de toda a xente que fixo posible que se remate esta tese doutoral e sobre todo que me enriqueceron científica e persoalmente.

En primeiro lugar, véxome na obriga de agradecer a unhas das primeiras persoas que me fixeron descubrir a miña paixón pola ciencia. A Inmaculada e ao Profesor Jose Miguel López Novoa, cando inda non sabía nin pipetear abríronme a porta da súa casa e do seu laboratorio, onde me trataron coma un máis, dándome tamén a oportunidade de acudir a ver a miña primeira tese. A partires dese día tiven claro cal era o meu obxectivo.

Grazas a todos eses profesores e compañeiros que me axudaron a manter a miña paixón pola bioloxía.

Como parte fundamental no desenvolvemento desta tese e moitos outros proxectos nos que tiven a sorte de participar teño que agradecer aos meus directores, a Profesora Sulay Tovar e ao Profesor Carlos Diéguez. Grazas por darme a oportunidade de gozar da miña paixón. Grazas pola comprensión, os consellos e polo financiamento. Gustaríame agradecer de xeito especial ao Profesor Rubén Nogueiras, por escoitarme sempre que o necesitei, asesorarme, guiarme e abrirme as portas dos seu laboratorio sentíndome como un máis. Agradecer a calidade científica que hai no CiMUS, construíndo sinerxías claves para o desenvolvemento da ciencia. Especialmente grazas ao Profesor Miguel López, por todos os consellos transmitidos e por abrirme tamén as portas do seu laboratorio e ao Profesor Anxo Vidal, pola súa paciencia e por atenderme sempre que o requirín. Grazas por suposto a todas esas colaboracións con grandes investigadoras, aportando pezas e consellos imprescindibles para o desenvolvemento deste traballo, especialmente grazas as Profesoras Guadalupe Sabio e Patricia Aspichueta e aos Doutores Alfonso Mora e Xabier Buque.

Para chegar ata aquí, foi imprescindible a increíble labor que fai todo o persoal técnico do CiMUS, grazas Pili pola túa amabilidade e disposición, Ana Senra pola túa paciencia, consideración e por todas esas conversas nas longas mañás sacando fotos. Grazas a multiusos Marisol por facernos a vida moito máis sinxela día a día, pero sobre todo por seren unha veciña de escritorio e de pobo extraordinaria.

Obviamente unha das partes máis importantes neste longa etapa foron todos eses compañeiros que me axudaron a crecer científica e persoalmente e sobre todo que fixeron esta aventura moito máis levadeira. Podo dicir con orgullo que me levo moitos amigos para toda a vida.

En primeiro lugar, grazas a todos cos que empecei esta aventura. Grazas Gabriela por acollerme cando comecei completamente perdido no laboratorio. Grazas a Eva, Amparo, Mar, Pamela, Marta, Omar por todas esas charlas enriquecedoras e por transmitirme tanta experiencia. Falando de experiencia non me podo esquecer de Mónica, Noelia, Patri, Ángela e Dani, vinvos convertervos en grandes Doutoradas sendo referentes. Grazas infinitas por toda a vosa sabedoría e risas compartidas.

En xeral debo agradecer a todas as persoas que pasaron pola gran familia científica dos P0LES. Dende o P0L5, gracias Mari, Ángela, Sihara, Alberto, Chenlo, Fer; ata o P0L2 grazas Eva, Laura, Ánxela, Valentina, María, Iara, Verónica, Óscar e pasando polo P0L4; grazas Nati, Eva, Uxi, Sara, Violeta... E sobre todo aos meus compañeiros do P0L3; grazas Sabela, Tadeu, Javi e a todos os TFG/TFM. Todos participaron da miña formación científica e do meu enriquecemento persoal.

A Chusa e a Marcos, comezamos a carreira na Bioloxía xuntos e o destino tivo a ben darnos unha nova oportunidade de reencontrarnos para coñecermos máis. Alégrome

moito de que iso pasara e puidéramos gozar de tantas charlas científicas e non tan científicas. E sobre todo de levarme a mellor parella de padel posible, chegaremos lonxe...

Unha das cousas de maior valor que me deu esta experiencia foi a posibilidade de coñecer a xentes doutros lugares e con outras culturas, algo que me enriqueceu enormemente ademais de levarme amigos por diversas partes do mundo. Por elo, teño que acordarme do meu chapito René e do sorriso máis grande do Brasil meu irmau Leonardinho. Cada día no laboratorio era moito máis sinxelo convosco. Grazas por suposto a miña parella favorita Nathalia e Edward, dous grandes amigos para sempre cos que compartín e seguirei compartindo grandes momentos.

Esta etapa deume moitas cousas, pero sobre todo lévome catro piares que me sostiveron todo este tempo e que estou seguro de que o seguirán facendo. Grazas David, contigo comezou todo, grazas por todas as ensinanzas, pero sobre todo por tanto divertimento compartido. Bego, grazas simplemente por entenderme cunha mirada, por guiarme sempre que o necesitei e por facerme o camiño máis sinxelo cada día. Á lucense máis ilustre e máis forte, Sintiiiaaaa grazas por todas esas charlas e por ser un referente da loita neste mundo tan complexo. Cris, coñecinte tarde pero moi a tempo, meu maior referente de como hai que facer ciencia e unha das mellores persoas que coñezo. Todos e cada un únicos e insustituíbles a súa maneira.

Teño que agradecer a todos eses amigos que dende neno me fixeron chegar a onde estou e que me fixeron máis sinxela esta etapa a base de divertimento. Grazas ZGP et al.

Non me podo esquecer das grandes persoas que coñecín neste último ano mentres escribía este manuscrito. Especialmente agradecer a Ichi e Lau por acollerme na súa casa como si fose un máis e aos Survivors por facerme moito máis levadeira a escritura.

Grazas Patri, por chegar xusto a tempo para darme o último empurrón para cerrar esta etapa e así poder comezar todas as que nos quedan.

Por último, e por suposto moito máis importante (sen desprezar) a meus avós, a meus país e a meus tios. Os verdadeiros causantes de todo. Grazas por facerme ser o que son, pero sobre todo por transmitirme a máis importante educación. Por suposto, grazas Ali por ser a alegría da casa.



