



TESIS DE DOCTORADO

**ADIPOSIDAD Y  
CARCINOGENESIS HEPÁTICA:  
UNA APROXIMACIÓN EPIGENÉTICA**

Andrea González Izquierdo

ESCUELA DE DOCTORADO INTERNACIONAL DE  
LA UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

PROGRAMA DE DOCTORADO EN ENDOCRINOLOGÍA

SANTIAGO DE COMPOSTELA

2021





## DECLARACIÓN DEL AUTOR/A DE LA TESIS

Dña. **Andrea González Izquierdo**

Título de la tesis: **ADIPOSIDAD Y CARCINOGENÉISIS HEPÁTICA:  
UNA APROXIMACIÓN EPIGENÉTICA**

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) De ser el caso, en la tesis se hace referencia a las colaboraciones que tuvo este trabajo.
- 3) Confirмо 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.
- 4) La tesis es la versión definitiva presentada para su defensa y coincide la versión impresa con la presentada en formato electrónico.

Y me comprometo a presentar el Compromiso Documental de Supervisión en el caso que el original no esté depositado en la Escuela.

En Santiago de Compostela, 05 de Xullo de 2021.

**Firma electrónica**





## AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR/TUTOR DE LA TESIS

Dña. **Ana Belén Crujeiras Martínez**

En condición de: **Directora**

Título de la tesis: **ADIPOSIDAD Y CARCINOGENESIS HEPÁTICA:  
UNA APROXIMACIÓN EPIGENÉTICA**

INFORMA:

Que la presente tesis, se corresponde con el trabajo realizado por Dña. **Andrea González Izquierdo**, bajo mi dirección/tutorización, y autorizo su presentación, considerando que reúne los requisitos exigidos en el Reglamento de Estudios de Doctorado de la USC, y que como director/tutor de esta no incurre en las causas de abstención establecidas en la Ley 40/2015.

En Santiago de Compostela, 05 de Xullo de 2021

**Firma electrónica**





## AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR/TUTOR DE LA TESIS

D. **Felipe Casanueva Freijo**

En condición de: **Tutor y director**

Título de la tesis: **ADIPOSIDAD Y CARCINOGENESIS HEPÁTICA:  
UNA APROXIMACIÓN EPIGENÉTICA**

INFORMA:

Que la presente tesis, se corresponde con el trabajo realizado por Dña. **Andrea González Izquierdo**, bajo mi dirección/tutorización, y autorizo su presentación, considerando que reúne los requisitos exigidos en el Reglamento de Estudios de Doctorado de la USC, y que como director/tutor de esta no incurre en las causas de abstención establecidas en la Ley 40/2015.

En Santiago de Compostela, 05 de Xullo de 2021

**Firma electrónica**







## **AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR / TUTOR DE LA TESIS**

### **ADIPOSIDAD Y CARCINOGENESIS HEPÁTICA: UNA APROXIMACIÓN EPIGENÉTICA**

Dña. Ana Belén Crujeiras Martínez y D. Felipe Casanueva Freijo

INFORMAN:

Que la presente tesis, se corresponde con el trabajo realizado por Dña. Andrea González Izquierdo, bajo mi dirección/tutorización, y autorizo su presentación, considerando que reúne los requisitos exigidos en el Reglamento de Estudios de Doctorado de la USC, y que como director de esta no incurre en las causas de abstención establecidas en la Ley 40/2015.

De acuerdo con lo indicado en el Reglamento de Estudios de Doctorado, declara también que la presente tesis doctoral es idónea para ser defendida en base a la modalidad de Monográfica con reproducción de publicaciones, en los que la participación de la doctoranda fue decisiva para su elaboración y las publicaciones se ajustan al Plan de Investigación.

En Santiago de Compostela, 05 de Xullo de 2021

Fdo. Ana Belén Crujeiras Martínez

Fdo. Felipe Casanueva Freijo





## DECLARACIÓN DE CONFLICTO DE INTERESES

Dña. Andrea González Izquierdo declara no tener ningún conflicto de intereses en relación con la Tesis Doctoral titulada:

### **ADIPOSIDAD Y CARCINOGENÉISIS HEPÁTICA: UNA APROXIMACIÓN EPIGENÉTICA**

En Santiago de Compostela, 05 de Xullo de 2021

Fdo. Andrea González Izquierdo



## AGRADECIMIENTOS

Y al fin ha llegado el momento. Tras mucho trabajo y esfuerzo compartido, aquí estoy, escribiendo los agradecimientos de mi tesis doctoral, hecho que me impone a la par que me emociona. Los que me conocéis, sabéis que expresar lo que siento no es mi punto fuerte, pero no quiero dejar pasar esta ocasión especial para hacerlo, ya que por suerte tengo mucho que agradecer.

Quiero dar las gracias a la Universidad de Santiago de Compostela y al Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago, por brindarme la oportunidad de realizar este trabajo, así como al CIBERobn del ISCIII, por apostar por la formación de jóvenes investigadores financiando mi contrato predoctoral.

A mis directores de tesis, Dra. Ana Belén Crujeiras y Dr. Felipe Casanueva, dos ejemplos de dedicación y tesón en este arduo mundo de la ciencia, sin los cuales esta aventura no habría sido posible. Quiero agradeceros enormemente vuestra confianza sin apenas conocerme, el mantenerla cuando ya lo habíais hecho y la que espero no perder con el paso del tiempo. Ana, gracias por transmitirme tu entusiasmo, por enseñarme infinidad de cosas, como el apasionante mundo de la epigenética, y por apoyarme y contar conmigo siempre. Como mentora, de ti he aprendido que cuando se unen esfuerzo e ilusión pueden alcanzarse los retos y a seguir luchando con la misma energía hacia nuevos objetivos cuando no siempre salen las cosas como nos gustaría. Felipe, gracias por tu cercanía desde el primer día, por tus consejos y tu sabiduría tanto en lo académico como en lo laboral. Me has enseñado día a día la fortaleza que otorga el trabajo en equipo, un equipo del que me siento muy afortunada de formar parte.

A mi laboratorio, mis compañeros del 2 y de Epigenómica, los cuales han hecho que este viaje haya sido mucho más enriquecedor y gratificante. A Marcos, Maribel y María, por hacerme sentir una más desde el minuto uno. Marcos, gracias por tu gran apoyo, por aportarle el toque de humor a la ciencia, porque sin tu chispa al labo 2 le faltaría algo. Maribel, mi mami en el laboratorio, gracias por tu entrega, por tus impagables consejos, por estar ahí incluso antes de que haga falta, porque sin ti el laboratorio estaría incompleto. María, mi compañera de batallas que tanto echo de menos, gracias por tu carisma, por tu buen rollo y energía, por tu ayuda infinita, gracias por seguir ahí para continuar sumando momentos como “Pili y Mili”. A mis compis Paula, Jesús y Alba, por hacer del laboratorio mi otra casa. Paula, gracias por tu amabilidad, por tu cariño, por tu paciencia, porque haces que trabajar contigo sea muy sencillo. Jesús, por estar siempre dispuesto a ayudar, por nunca dar un no como respuesta, por aguantar mis neuras. A mis chicos de Epi, en especial a Aitor y Aida, gracias por hacerlo todo siempre tan fácil, ha sido una suerte conocerlos y compartir esta etapa con vosotros. A Ángel, gracias por tu gran ayuda y tus consejos.

Al gran equipo humano que conforma el grupo de Endocrino. Al Servicio de Endocrinología y Nutrición, en especial al Dr. Martínez Olmos, Ana Castro, Aurelio Sueiro, Ana Cantón, Gemma Rodríguez, Antía Pombo y Pilar Bolaño, por vuestra dedicación, participación activa y trabajo diario, estableciendo el puente entre la investigación y los pacientes. A los IPs y compañeros de los laboratorios, estos años sin vosotros no hubieran sido lo mismo. A Sisi y María Pardo, dos mujeres luchadoras que nunca pierden la sonrisa, gracias por vuestro cariño tanto dentro como fuera. Gracias a las chicas del 14, en especial a Cintia, Silvia y Cecilia, a los chicos del labo 4 y 12, en especial a Carlitos e Icíá por vuestra generosidad y por estar siempre dispuestos a echarme una mano, y a mis vecinas del labo 3, Tamara y Nerea, por vuestra generosidad y alegría y por ser unas cracks con las que siempre se puede contar. Del mismo modo, quiero agradecer la ayuda y el cariño recibido por parte del resto de compañeros del IDIS, especialmente a los grupos de Neuro, Onco, Cardio y Nefro, al labo 13 y a la Unidad Mixta, ha sido un placer trabajar a vuestro lado. También quiero agradecer y destacar de manera relevante a todos los grupos de investigación con los que hemos

colaborado mano a mano a lo largo de estos años, trabajos que me han permitido conocer a grandes profesionales, de los cuales he aprendido mucho y me han contagiado su vocación.

A mis amigos, a los que compartís el caótico mundo de la ciencia y a los que no, todos y cada uno de vosotros siempre me habéis animado y motivado a seguir adelante con mis metas, gracias por tanto y sobre todo por aturarme. A mis bichólogos, porque la Biología sin ellos sería muy aburrida y gracias a ella por traeros a mi vida, por esas cañas que arreglan y arreglarán el mundo. A mis niñas, Patri, Roci y Lu, por estar siempre, porque sois tan bonitas por dentro como por fuera, porque una tarde con vosotras suma años de vida. A mis científicas, Alba, Sabela y Carmen, la ciencia hizo que nuestros caminos se cruzaran y sólo por eso sé que ha sido una de las mejores decisiones, por tantos momentos inmejorables juntas y por tantos que están por venir, porque sois incombustibles y me llenáis la vida de buena energía, mi suerte es teneros. A mi profe favorito, Diego, mi chico del 3 que se ha convertido en un amigo genial, gracias por venir a mi vida para quedarte. A los de Sanvi, un lugar mágico que nos ha unido desde enanos, gracias por hacerme reír, por ayudarme a desconectarme del mundo, porque sois especiales, un cachito de mí.

A mi familia, por apoyarme incondicionalmente. A mis padres, por estar al pie del cañón por y para todo siempre. Por enseñarme lo más importante, afrontar la vida con humildad, coraje y optimismo, valores que hacen que hoy sea la persona que soy. A Kiwi, por ser la mitad que me complementa, por comprenderme, por estar ahí y apostar por mí y, sobre todo, por tu inmensa paciencia y ánimo constante tan necesarios en esta recta final.





A mis padres





# RESUMEN





## **ADIPOSIDAD Y CARCINOGENESIS HEPÁTICA: UNA APROXIMACIÓN EPIGENÉTICA**

La enfermedad del hígado graso no alcohólica (NAFLD) es la principal causa del incremento de la incidencia del carcinoma hepatocelular (HCC) y se estima que su prevalencia relacionada con la NAFLD aumente concomitantemente con la creciente epidemia de la obesidad. Varios estudios epidemiológicos han demostrado que la obesidad es un factor de riesgo relevante para el HCC, sin embargo, los mecanismos moleculares a través de los cuales la obesidad causa el HCC todavía no están claros. De hecho, en la literatura no se han encontrado trabajos sobre la asociación entre la obesidad y el HCC centrados en estudiar si los mecanismos relacionados con las primeras fases del desarrollo tumoral podrían ser modificados hacia un estado procarcinogénico por efecto de la obesidad, antes incluso de la manifestación de una masa tumoral detectable en el hígado. Por tanto, el principal objetivo de la presente tesis doctoral consistió en evaluar la expresión de genes implicados en las primeras fases del desarrollo tumoral, específicamente en hígado, y su reflejo y regulación epigenética en los leucocitos circulantes de sangre periférica, según el grado de adiposidad y tras una intervención nutricional para inducir pérdida de peso en modelos animales y pacientes con obesidad. Los hallazgos de este trabajo determinaron que el exceso de adiposidad, característico de la obesidad, fue capaz de desencadenar una respuesta procarcinogénica en el hígado antes de la manifestación de una masa tumoral, asociada al estrés oxidativo e inflamación inducido por el tejido adiposo disfuncional obeso, y regulada por mecanismos epigenéticos como la metilación del ADN. Tras pérdida de peso por restricción calórica, los factores relacionados con la disfunción hepática y la expresión de los genes relacionados con la carcinogénesis se revirtió. Dichos resultados indican que una reducción en el grado de adiposidad es fundamental para prevenir la progresión hacia el HCC relacionado con la NAFLD causada por la obesidad.



## **ADIPOSITY AND LIVER CARCINOGENESIS: AN EPIGENETIC APPROACH**

Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) is the main cause of the increased incidence of hepatocellular carcinoma (HCC) and its prevalence related to NAFLD is estimated to increase concomitantly with the growing obesity epidemic. Several epidemiological studies have shown that obesity is a relevant risk factor for HCC, however, the molecular mechanisms through which obesity causes HCC are still unclear. In fact, no studies have been found in the literature on the association between obesity and HCC focused on studying whether the mechanisms related to the early stages of tumor development could be modified towards a procarcinogenic state due to the effect of obesity, even before the manifestation of a detectable tumor mass in the liver. Therefore, the main objective of this thesis consisted in evaluating the expression of genes involved in the early stages of tumor development, specifically in the liver, and their reflection and epigenetic regulation in circulating peripheral blood leukocytes, according to the degree of adiposity and after a nutritional intervention to induce weight loss in animal models and obese patients. The findings of this work determined that excess adiposity, characteristic of obesity, was able to trigger a procarcinogenic response in the liver before the manifestation of a tumor mass, induced by oxidative stress and inflammation, and regulated by epigenetic mechanisms such as methylation of DNA. After weight loss intervention by energy restriction, the liver dysfunction and expression of carcinogenesis-related genes was reverted. These results indicate that a reduction in the degree of adiposity is essential to prevent progression of NAFLD towards HCC related to obesity.





## **ADIPOSIDADE E CARCINOXÉNESE DO FÍGADO: UN ENFOQUE EPIXENÉTICO**

A enfermidade do fígado graxo non alcohólico (NAFLD) é a enfermidade hepática crónica máis común no mundo e a principal causa da maior incidencia de carcinoma hepatocelular (HCC). Estímase que a prevalencia de HCC relacionado coa NAFLD aumente concomitante co incremento da crecente epidemia de obesidade, considerada a principal causa de morte nos próximos anos. Estudos epidemiolóxicos recentes demostraron que a obesidade é un factor de risco relevante para o HCCs, non obstante, mecanismos moleculares a través dos cales a obesidade causa HCC aínda non están claros. Varias investigacións tenden a suxerir que a resistencia á insulina, os cambios nos lípidos séricos, a NAFLD e a esteatose non alcohólica exercen un papel importante. En suma, é sospeitoso de que os mediadores inflamatorios, metabólicos e endócrinos asociados á obesidade tamén contribúen para a promoción da hepatocarcinoxénese. Neste contexto, as hipóteses máis apoiadas pola comunidade científica sobre a asociación entre a obesidade e unha maior susceptibilidade ao desenvolvemento do cancro implica mecanismos biolóxicos responsables da resistencia á insulina, a inflamación xeral e de baixo grao do tecido adiposo, o estrés oxidativo, as alteracións na función inmune ou o papel dos perturbadores endócrinos, entre outros.

En relación ao papel da inflamación e o estrés oxidativo como mediadores da conexión entre a obesidade e o cancro, traballos anteriores do noso grupo de investigación evidenciaron que factores secretados polo tecido adiposo obeso disfuncional teñen un efecto procarcinóxénico e son responsables da xeración dun microambiente favorable para o desenvolvemento tumoral. En consonancia con estes achados, algúns estudos realizados nos últimos anos demostraron o efecto da obesidade e da inflamación asociada á promoción da carcinoxénese e a progresión tumoral de varios tipos importantes de

cancro, incluído o cancro de fígado. Aínda que o vínculo entre a obesidade e o cancro é relativamente recente, hai actualmente evidencia científica suficiente sobre o efecto da obesidade como factor de risco potencial para o desenvolvemento do tumor. Segundo a Axencia Internacional para a Investigación do Cancro (IARC), o exceso de graxa corporal está asociado cun aumento do risco de 13 tipos diferentes de cancro, incluíndo endometrio, mama postmenopáusicas, colorrectal, esofáxico, renal, meningioma, páncreas, estómago (cardias gástricas), fígado, mieloma múltiple, ovario, vesícula biliar e tiroide, destacando o cancro de mama, o colorrectal e o de fígado, xa que son dos máis prevalentes na poboación nos últimos anos.

Durante as últimas décadas, propuxéronse diversas intervencións para o control do sobrepeso e a obesidade. Entre as estratexias eficaces actuais para o tratamento da obesidade están as intervencións nutricionais para a perda de peso, os tratamentos farmacolóxicos e os procedementos cirúrxicos como a cirurxía bariátrica nos casos máis graves de obesidade. Unha das intervencións para perda de peso que reportou importantes beneficios foi a dieta cetoxénica moi baixa en calorías (VLCKD), concretamente na mellora da calidade de vida dos doentes, na redución da graxa visceral con preservación do músculo e na diminución da esteatose fídica. En consonancia cos beneficios reportados polas terapias de perda de peso en pacientes obesos, varios estudos demostraron que unha intervención no estilo de vida pode ser efectiva no tratamento de pacientes con NAFLD, o que resulta nun menor risco de desenvolver HCC. Describiuse que a perda de peso pode contribuír á regresión de enfermidades hepáticas, o que indica que incluso unha perda de peso moderada tamén pode contribuír positivamente á mellora da esteatose do fígado e da lipotoxicidade, consecuencia da acumulación excesiva de lípidos intrahepáticos desde a hiperplasia ata a hipertrofia dos adipocitos do tecido adiposo visceral obeso disfuncional. A actividade física e o exercicio tamén mostraron resultados satisfactorios na terapia de doentes con NAFLD. Recentemente, acordouse que a redución do peso corporal lograda mediante restrición calórica, con ou sen maior actividade física, leva a unha mellora da graxa no fígado, do grao de inflamación e da fibrose.

Ante as evidencias científicas descritas e baseadas en achados anteriores do grupo, plateámonos que a inflamación e o estrés oxidativo desencadeados pola graxa do tecido adiposo disfuncional poidan actuar como indutores na creación dun microambiente para a aparición da carcinoxénese no fígado e que este efecto protumoral asociado á obesidade podería estar mediado por mecanismos epixenéticos como a metilación do ADN. Neste contexto, sábese que, en resposta a un balance enerxético positivo, hai unha remodelación do tecido adiposo. Na obesidade, unha situación de equilibrio enerxético positivo prolongada no tempo, a remodelación do tecido adiposo sofre diferentes procesos celulares e estruturais que consisten nunha expansión tisular ligada a unha infiltración de células inmunes no tecido e na matriz extracelular. Como resultado desta expansión do tecido e do desequilibrio dos mecanismos homeostáticos adaptativos, prodúcese unha disfunción do tecido adiposo que desencadea un microambiente proinflamatorio. Esta inflamación local leva a un maior risco de comorbilidades metabólicas asociadas á obesidade como NAFLD, onde o estrés oxidativo xerado tamén é clave na patoxénese da obesidade e as súas comorbilidades asociadas. Neste sentido, propúxose que mecanismos epixenéticos como a metilación do ADN poden actuar como mediadores subxacentes nestes procesos patolóxicos. As marcas epigenéticas son adquiridas, herdadas e reversibles e son directamente moduladas pola acción do medio ambiente e axentes externos, xogando un papel importante na regulación de diversos procesos celulares importantes no corpo, incluíndo a patoxénese da enfermidade, de xeito que a presenza de alteracións aberrantes nos perfís de metilación globais do ADN foi asociada ao cancro, a obesidade e a enfermidade do fígado graxo.

Como consecuencia, o principal obxectivo da tese doutoral foi avaliar a expresión de xenes implicados nas fases iniciais do desenvolvemento do tumor, especialmente no fígado, e a súa reflexión e regulación epixenética nos leucocitos de sangue periférico circulantes, segundo o grao de adiposidade. e despois dunha intervención nutricional para inducir a perda de peso en modelos animais e doentes con obesidade. Para facelo, investigamos se a obesidade e o seu microambiente relacionado, o estrés oxidativo e a inflamación, poderían

inducir a expresión diferencial dos xenes asociados coa fase inicial da carcinoxénese do fígado e tecido adiposo en ratos obesos e a súa reflexión nos leucocitos de doentes con obesidade. A continuación, quixemos explorar se a disfunción e a carcinoxénese do fígado asociada ao exceso de adiposidade poderían revertirse despois das intervencións de adelgazamento. Así mesmo, quixemos determinar o posible efecto do secretoma do tecido adiposo e do soro de doentes con obesidade grave na expresión de xenes relacionados coa esteatose e carcinoxénese nunha liña celular de fígado e a súa reversibilidade a través do tratamento con corpos cetónicos, baseado nos datos semellantes anteriores do grupo con este tipo de tratamentos *in vitro*. Finalmente, quixemos explorar o papel da regulación epixenética na expresión dos xenes estudados en relación á carcinoxénese e á esteatose no fígado, estudando os niveis de metilación de xenes en leucocitos circulantes de doentes con obesidade e despois da perda de peso inducida por unha intervención nutricional.

Os principais resultados observados ao longo desta tese mostran que o exceso de adiposidade, ligada á manifestación de estrés oxidativo e inflamación está asociada á desregulación dos xenes implicados nas fases iniciais da carcinoxénese no fígado e no tecido adiposo de animais obesos e reflexada nos leucocitos de doentes obesos. É importante observar que a perda de peso inducida nos estudos *in vivo* foi capaz de revertir o patrón de expresión dos xenes implicados no inicio do desenvolvemento do cancro, xa que a diminución do peso corporal detectada despois das intervencións foi concomitante á redución de adiposidade, que reportou unha mellora na esteatose do fígado e na protección antioxidante. Estes resultados reforzáronse cos datos obtidos nunha liña celular de hepatocitos humanos, que recreou a desregulación xénica relacionada coa carcinoxénese nos tratamentos con secretoma de tecido adiposo e soro de doentes con obesidade grave, que foron capaces de reproducir o fenotipo de esteatose no fígado definido en probas de células tratadas con oleato de sodio. Ademais, o tratamento con corpos cetónicos en células con esteatose tratadas con oleato soubo inverter o patrón de expresión dos xenes ligado á carcinoxénese, concomitante coa redución da acumulación de pingas lipídicas citoplasmáticos vistas nas células despois do tratamento con butirato de

sodio, resultados similares aos obtidos en estudos *in vivo* despois da perda de peso. Os nosos descubrimentos sobre a asociación entre a adiposidade e a desregulación dos xenes implicados na iniciación da carcinoxénese poderían ser modulados pola acción das marcas epixenéticas, xa que a análise dos perfís de metilación do ADN dos xenes diana estudados en leucocitos circulantes de doentes obesos revelou cambios significativos en comparación cos perfís observados en voluntarios sans de peso normal e despois da intervención nutricional destes pacientes tras unha VLCKD.

En suma, os nosos descubrimentos mostran que o exceso de adiposidade característico da obesidade é capaz de desencadear unha resposta procarcinóxena no fígado antes da manifestación dunha masa tumoral. Esta resposta protumoral é inducida por estrés oxidativo e inflamación e está regulada por mecanismos epixenéticos como a metilación do ADN. Do mesmo xeito, determinouse que a perda de peso xoga un papel fundamental para contrarrestar as características do fenotipo da obesidade. Os beneficios observados consistiron nunha diminución dos marcadores de estrés oxidativo e inflamación, concomitante cunha redución do grao de adiposidade, o que deu lugar a unha regulación descendente dos xenes implicados na promoción da carcinoxénese. Polo tanto, é esencial unha redución significativa do grao de adiposidade para evitar a progresión ao HCC relacionada coa NAFLD causada pola obesidade.





# ÍNDICE





## ÍNDICE

<b>ABREVIATURAS Y ANGLICISMOS .....</b>	<b>37</b>
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>43</b>
1. OBESIDAD .....	45
1.1. Clasificación y epidemiología.....	46
1.2. Tratamientos para la obesidad.....	48
2. OBESIDAD Y CÁNCER.....	51
3. ENFERMEDAD DE HÍGADO GRASO NO ALCOHÓLICO .....	55
3.1. Acumulación de lípidos y lipotoxicidad como mecanismos principales en el desarrollo de NAFLD.....	58
3.2. Principales modelos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> de NAFLD .....	59
3.3. Genes relacionados con el metabolismo de los lípidos desregulados en NAFLD.....	61
4. TEJIDO ADIPOSO EN LA FISIOPATOLOGÍA DE LA OBESIDAD .....	65
4.1. Tejido adiposo como órgano endocrino.....	66
4.2. Disfunción del tejido adiposo.....	67
5. CARCINOGENÉISIS Y GENES RELACIONADOS CON LAS PRIMERAS FASES DEL DESARROLLO TUMORAL..	73
5.1. Oncogenes.....	74
5.2. Genes vinculados a la protección antioxidante.....	75
5.3. Supresores tumorales.....	77
6. REGULACIÓN EPIGENÉTICA.....	80

6.1. Mecanismos epigenéticos .....	81
6.2. La epigenética en la enfermedad humana.....	86
<b>HIPÓTESIS.....</b>	<b>91</b>
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>95</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>99</b>
1. ESTUDIOS <i>IN VIVO</i> .....	101
1.1. Animales de experimentación.....	101
1.1.2.1. Modelo de obesidad monogénica .....	104
1.1.2.1.1. <i>Protocolo de restricción energética de la</i> <i>dieta .....</i>	<i>106</i>
1.1.2.1.2. <i>Protocolo de ejercicio físico.....</i>	<i>107</i>
1.1.2.2. Modelo de obesidad inducida por la dieta.....	107
1.2. Pacientes .....	109
1.2.1.1. Cohortes transversales .....	111
1.2.1.1.1. <i>Sujetos normopeso .....</i>	<i>111</i>
1.2.1.1.2. <i>Pacientes con obesidad .....</i>	<i>111</i>
1.2.1.2. Cohortes longitudinales .....	112
1.2.1.2.1. <i>Pacientes con obesidad sometidos a una</i> <i>intervención nutricional .....</i>	<i>112</i>
1.2.2.1. Intervención nutricional basada en una dieta cetogénica muy baja en calorías .....	113
1.2.2.2. Obtención de secretoma de tejido adiposo.....	115
2. ESTUDIOS <i>IN VITRO</i> .....	117
2.1. Línea celular HepaRG.....	117
2.1.2.1. Diferenciación .....	118
2.1.2.2. Modelos de inducción de esteatosis <i>in vitro</i> .....	121
2.1.2.2.1. <i>Inducción mediante oleato .....</i>	<i>121</i>
2.1.2.2.2. <i>Inducción mediante secretomas de tejido</i> <i>adiposo y suero de pacientes con</i> <i>obesidad .....</i>	<i>123</i>
2.1.2.3. Modelo de reversión de esteatosis <i>in vitro</i> .....	126

3. TÉCNICAS ANALÍTICAS .....	131
3.1. Análisis histológicos.....	131
3.2. Análisis de metabolitos .....	133
3.2.1.1.Extracción de triacilgliceroles en hígado.....	133
3.2.1.2.Cuantificación de triacilgliceroles hepáticos.....	133
3.2.2.1.Cuantificación de malondialdehído .....	134
3.2.2.2.Cuantificación de la capacidad antioxidante .....	134
3.2.2.3.Cuantificación de 8-hidroxi-2-desoxiguanosina ....	135
3.3. Análisis de la expresión génica .....	136
3.3.1.1.Extracción desde tejido .....	136
3.3.1.2.Extracción desde células mononucleares de sangre periférica .....	137
3.3.1.3.Extracción desde línea celular .....	137
3.4. Análisis de expresión de proteína .....	140
3.4.3.1.Electroforesis.....	141
3.4.3.2.Transferencia.....	141
3.5. Análisis de la metilación del ADN .....	143
4. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.....	147
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>149</b>
1. ESTUDIO DEL PERFIL DE EXPRESIÓN DE GENES RELACIONADOS CON LA CARCINOGENESIS LIGADA A LA ESTEATOSIS HEPÁTICA EN RATAS ZUCKER.....	151
1.1. Papel de la obesidad .....	151
1.2. Efecto de la pérdida peso.....	156
2. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN HEPÁTICA DE <i>SIRT6</i> EN ASOCIACIÓN AL ESTRÉS OXIDATIVO INDUCIDO POR EXCESO DE ADIPOSIDAD .....	163
2.1. Análisis de la expresión de <i>SIRT6</i> en obesidad .....	163
2.2. Análisis de la expresión de <i>SIRT6</i> tras pérdida de peso .....	165

3. ESTUDIO DEL PERFIL DE EXPRESIÓN DEL ONCOGEN <i>SURVIVINA/BIRC5</i> EN TEJIDO ADIPOSO EN RELACIÓN AL GRADO DE ADIPOSIDAD .....	167
3.1. Papel de la obesidad y la pérdida de peso en animales .....	167
3.2. Papel de la obesidad y la pérdida de peso en humanos .....	175
4. ESTUDIO DEL PERFIL DE EXPRESIÓN DE GENES RELACIONADOS CON LA CARCINOGENESIS EN UN MODELO <i>IN VITRO</i> DE ESTEATÓISIS HEPÁTICA.....	179
4.1. Inducción de esteatosis en una línea celular de hepatocitos humana mediante secretoma y suero de pacientes con obesidad .....	179
4.2. Reversión de la esteatosis en una línea celular de hepatocitos humana mediante cuerpos cetónicos .....	189
5. ESTUDIO DEL PERFIL DE METILACIÓN DE LOS GENES ANALIZADOS EN RELACIÓN A ESTEATOSIS HEPÁTICA Y CARCINOGENESIS .....	193
5.1. Descripción general del metiloma tras el tratamiento con una VLCKD y comparación con normopeso .....	194
5.2. Perfil de metilación específico de los genes implicados en la esteatosis y la carcinogénesis en obesidad y tras pérdida de peso inducida por una VLCKD .....	196
<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>203</b>
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>221</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>225</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>297</b>

# **ABREVIATURAS Y ANGLICISMOS**





## LISTA DE ABREVIATURAS Y ANGLICISMOS

<b>5mC:</b>	5-metilcitosina
<b>8-OHdG:</b>	8-hidroxi-2'-desoxiguanosina.
<b>A:</b>	adenina
<b>ACACB:</b>	acetil-CoA carboxilasa beta
<b>ACTB:</b>	beta-actina
<b>Ad-L:</b>	<i>ad-libitum</i>
<b>ADN:</b>	ácido desoxirribonucleico
<b>ADSC:</b>	células madre derivadas del tejido adiposo
<b>ALB:</b>	albúmina
<b>ALDOB:</b>	aldolasa B
<b>ANOVA:</b>	análisis de varianza
<b>AOP:</b>	poder antioxidante total
<b>APOC3:</b>	apolipoproteína C3
<b>ARN:</b>	ácido ribonucleico
<b>ARNlnc:</b>	ARN largos no codificantes
<b>ARNnc:</b>	ARN no codificantes
<b>array:</b>	chip
<b>body:</b>	cuerpo
<b>C:</b>	citosina
<b>CC:</b>	circunferencia de la cintura
<b>CEEA:</b>	Comité de Ética de Experimentación Animal

<b>CGI:</b>	islas CpG
<b>CpG:</b>	citocina unida a guanina por grupo fosfato
<b>CYP3A4:</b>	citocromo P450 3A4
<b>dHepaRG:</b>	células HepaRG diferenciadas
<b>DIO:</b>	obesidad inducida por la dieta
<b>DMCpG:</b>	CpG diferencialmente metilado
<b>DMEM:</b>	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
<b>DMRs:</b>	regiones diferencialmente metiladas
<b>DMSO:</b>	dimetilsulfóxido
<b>DNMT:</b>	ADN metiltransferasas
<b>EX:</b>	ejercicio
<b>ER:</b>	restricción energética
<b>EREX:</b>	restricción energética y ejercicio
<b>FBS:</b>	suero bovino fetal
<b>FDR:</b>	<i>false discovery rate</i>
<b>G:</b>	guanina
<b>GAPDH:</b>	gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
<b>GSTM2:</b>	glutathiona-S-transferasa
<b>H&amp;E:</b>	hematoxilina y eosina
<b>HCC:</b>	carcinoma hepatocelular
<b><i>High Fat Diet:</i></b>	dieta alta en grasa
<b>IARC:</b>	Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer
<b>IL-10:</b>	interleucina 10
<b>IL-6:</b>	interleucina 6
<b>IMC:</b>	índice de masa corporal
<b>LCD:</b>	dietas bajas en calorías



<b>MCP-1:</b>	proteína quimioatrayente de monocitos 1
<b>MDA:</b>	Malondialdehído.
<b>MgCl<sub>2</sub>:</b>	Cloruro de magnesio
<b>mi-ARN:</b>	microARN
<b><i>microarray:</i></b>	microchip
<b>MYC:</b>	Protooncogén MYC
<b>n:</b>	tamaño muestral
<b>NaCl:</b>	cloruro de sodio
<b>NADPH:</b>	nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido
<b>NAFLD:</b>	enfermedad del hígado graso no alcohólico
<b>NASH:</b>	esteatohepatitis no alcohólica
<b>OB:</b>	obeso
<b><i>open sea:</i></b>	mar abierto
<b>PAI-1:</b>	inhibidor del activador del plasminógeno 1
<b>PBMCs:</b>	células mononucleares de sangre periférica
<b>PBS:</b>	solución salina tamponada con fosfato
<b>PCR:</b>	proteína C reactiva
<b>PDK4:</b>	piruvato deshidrogenasa quinasa isoenzima 4
<b>PLIN2:</b>	perilipina 2
<b>PTEN:</b>	homólogo de fosfatasa y tensina
<b>PTM:</b>	modificaciones postraduccionales de las histonas
<b>RMN:</b>	resonancia magnética nuclear
<b>ROS:</b>	especies reactivas de oxígeno
<b>RT-qPCR:</b>	reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real.
<b>SAT:</b>	tejido adiposo subcutáneo

<b>SCD:</b>	estearoil-CoA desaturasa
<b>SDS:</b>	dodecil sulfato de sodio
<b>SDS-PAGE:</b>	poliacrilamida de dodecilsulfato de sodio
<i>shelf:</i>	plataforma
<i>shore:</i>	orilla
<b>SIRT1:</b>	sirtuina 1
<b>SLC2A1:</b>	miembro 1 de la familia de transportadores facilitadores de glucosa
<b>SURVIVINA/BIRC5:</b>	survivina
<b>T:</b>	timina
<b>Tampón RIPA:</b>	tampón de ensayo de radioinmunoprecipitación
<b>TGFB1:</b>	factor de crecimiento transformante beta 1
<b>TNF<math>\alpha</math>:</b>	factor de necrosis tumoral alfa
<b>TP53:</b>	proteína tumoral p53
<b>Tris/HCl:</b>	clorhidrato de Tris
<b>Triton X-100:</b>	éter terc-butil fenílico de polietilenglicol
<b>u.a.:</b>	unidades arbitrarias
<b>VAT:</b>	tejido adiposo visceral
<b>VEGF:</b>	factor de crecimiento endotelial vascular
<b>VLCD:</b>	dietas bajas en carbohidratos y dietas muy bajas en calorías
<b>VLCKD:</b>	dietas cetogénicas muy bajas en calorías
<b>WST-1:</b>	sal de tetrazolio

# INTRODUCCIÓN





## 1. OBESIDAD

El sobrepeso y la obesidad se definen como una acumulación excesiva de grasa corporal, la cual se desencadena como consecuencia de un desequilibrio en el balance energético donde la ingesta calórica excede al gasto de energía (1). La obesidad se describe como una enfermedad crónica grave que afecta negativamente la función de diferentes de sistemas de órganos, disminuyendo de manera significativa la calidad y la esperanza de vida, ocasionando importantes costes sanitarios (2,3). Su etiopatogenia es compleja e incluye factores ambientales, socioculturales, fisiológicos, médicos, conductuales, genéticos y epigenéticos. Estos factores contribuyen tanto a la aparición, al desarrollo como al mantenimiento de este trastorno metabólico (4–6). Además, la obesidad es el principal factor de riesgo para un conjunto cada vez mayor de enfermedades crónicas, especialmente para diabetes tipo 2, enfermedades cardiovasculares y cerebrovasculares, síndrome metabólico, enfermedad de hígado graso no alcohólico (NAFLD) y diferentes tipos de cáncer (**Figura 1**) (7–9). Esta naturaleza multifactorial, refuerza la idea de que la obesidad es una enfermedad compleja que requiere un nuevo enfoque multidimensional para integrar y comprender todos los mecanismos subyacentes que la causan (10). Así mismo, el desconocimiento acerca de los mecanismos patogénicos involucrados en el vínculo entre la obesidad y sus comorbilidades asociadas, pone de manifiesto la necesidad de nuevos avances en investigación que permitan desarrollar y consolidar potentes estrategias para la prevención, el control y el tratamiento de esta enfermedad. Por todo ello, en los últimos años, el sobrepeso y la obesidad están siendo uno de los principales problemas de salud pública en todo el mundo (11,12).

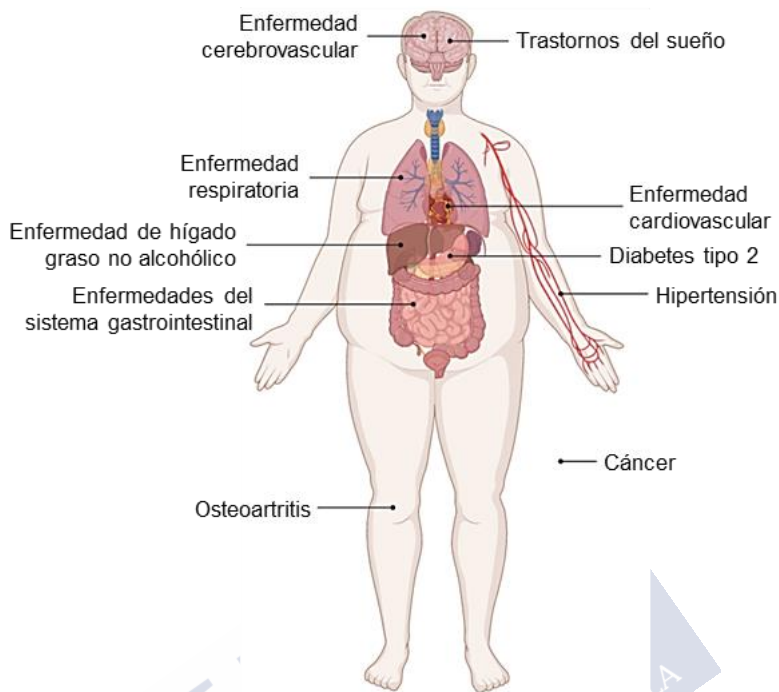


Figura 1. Representación de algunas de las enfermedades crónicas para las que la obesidad se ha descrito como el principal factor de riesgo. Fuente: elaboración propia creada con BioRender.com

### 1.1. CLASIFICACIÓN Y EPIDEMIOLOGÍA

La prevalencia del sobrepeso y la obesidad han aumentado notablemente a nivel mundial en las últimas décadas (13). De hecho, la obesidad está considerada como la pandemia del siglo XXI (14,15) y se estima que se convertirá en la principal causa de mortalidad en los próximos años (2), debido a la actual incapacidad para contener su alta prevalencia (11). Estimaciones recientes ajustadas por edad informan que en 2016 el 39% de la población adulta mundial tenía sobrepeso y que el 13% de esta padecía obesidad, según los datos del último informe de 2018 de la Organización Mundial de la Salud (14). Esta tendencia al alza de la obesidad en todo el mundo es extremadamente alarmante y convierte a esta enfermedad metabólica en un factor de

riesgo prioritario en la implementación de estrategias efectivas de control saludables (2). La incidencia ha aumentado tanto en los países desarrollados como en los países en vías de desarrollo debido, entre otros determinantes, a dietas desequilibradas, escasa actividad física, estrés crónico, ciertos tratamientos farmacológicos y contaminantes ambientales (16–20).

Desde el punto de vista clínico, en la actualidad existen marcadores clásicos que se utilizan habitualmente para la definición y el diagnóstico de la obesidad. Al respecto, se ha propuesto el índice de masa corporal (IMC), que se calcula como la relación entre el peso corporal (kg) y la altura en metros al cuadrado ( $m^2$ ), como método más utilizado para definir el sobrepeso ( $IMC\ 25-29,9\ kg/m^2$ ) y la obesidad ( $IMC\geq 30\ kg/m^2$ ) (21,22), debido a su fácil empleo en la práctica clínica (11,23). Recientes estudios epidemiológicos han identificado que un IMC alto se asocia a un mayor riesgo de desarrollo de enfermedades crónicas (13). Así, por cada aumento de 5 unidades en el IMC por encima de  $25\ kg/m^2$ , la mortalidad global aumenta en un 29%, la mortalidad vascular en un 41% y la mortalidad relacionada con la diabetes en un 210% (24). Sin embargo, este índice evalúa indirectamente la adiposidad, por lo que otros marcadores basados en las mediciones de la circunferencia de la cintura (CC) y la composición corporal están siendo ampliamente usados en clínica con el objetivo de cuantificar la adiposidad con más precisión que solo empleando los puntos de corte del IMC (25–27) (**Tabla 1**). El porcentaje de grasa corporal es uno de los estimadores más recomendados por su mayor capacidad para estratificar a los pacientes según sus riesgos metabólicos y cardiovasculares (28). En cuanto a su determinación, los métodos más precisos diseñados para medir la grasa corporal son la pletismografía por desplazamiento de aire, la impedancia bioeléctrica, la absorciometría de rayos X de energía dual y los calibradores de pliegues cutáneos (29).

Tabla 1. Marcadores empleados en clínica para definir y diagnosticar la obesidad.

Obesidad				
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	Sobrepeso	Obesidad tipo I	Obesidad tipo II	Obesidad tipo III
	25 - 29,9	30 - 34,9	35,0 - 39,9	≥40
	Hombres		Mujeres	
CC (cm)	>102		>88	
Grasa corporal (%)	≥25		≥32	

IMC, índice de masa corporal; CC, circunferencia de cintura.

## 1.2. TRATAMIENTOS PARA LA OBESIDAD

Los tratamientos para la obesidad deben adaptarse a las necesidades de cada paciente individual y deben estar enfocados a cumplir una serie de objetivos relacionados principalmente con la reducción del peso corporal a largo plazo, la mejora de factores de riesgo relacionados con la obesidad, la reducción de enfermedades relacionadas con la obesidad y la mejora de la calidad de vida (30). Además, todos los pacientes deben recibir por parte de los profesionales de la salud un asesoramiento sobre cambios potenciales en el estilo de vida basados en la promoción de una dieta saludable y actividad física (31). Durante las últimas décadas se han propuesto varias intervenciones para el manejo del sobrepeso y la obesidad. Entre las actuales estrategias efectivas para el tratamiento de la obesidad se encuentran las intervenciones nutricionales para pérdida de peso, los tratamientos farmacológicos y, en los casos más severos de obesidad, los procedimientos quirúrgicos como la cirugía bariátrica (29,32,33).

La base de cualquier tratamiento de la obesidad implica disminuir la ingesta energética y/o aumentar el gasto energético (ejercicio) para crear un balance energético negativo (34–37). Respecto a las terapias dietéticas, en términos generales, se han descrito cuatro tipos de intervenciones para pérdida de peso utilizados en el tratamiento de las



personas con sobrepeso u obesidad, que incluyen dietas bajas en calorías (LCD), dietas bajas en grasas, dietas bajas en carbohidratos y dietas muy bajas en calorías (VLCD) (38–41). El método o estrategia de tratamiento mediante el cual se logra la reducción de la ingesta calórica varía de una dieta a otra, aunque en última instancia resultan en una reducción de las calorías consumidas (42). Los investigadores clínicos afirman que el impacto de la restricción calórica que produce una dieta supera el impacto de la composición de macronutrientes de las calorías consumidas en esa dieta (42,43) y que la adherencia a la dieta es un factor importante determinante de la pérdida de peso (44,45). En este sentido, se hace imprescindible identificar dietas capaces de producir una pérdida de peso significativa y mantenida en el tiempo. Por ello y de acuerdo a los alentadores resultados de las dietas VLCD, en los últimos años esta intervención ha evolucionado a las actuales dietas cetogénicas muy bajas en calorías (VLCKD), cuyos resultados han evidenciado ser efectivas para lograr una pérdida de peso rápida y significativa (46).

### **1.2.1. Dieta cetogénica muy baja en calorías**

Recientemente, las VLCKD han ganado un creciente interés como opción terapéutica eficaz para el tratamiento de la obesidad y sus comorbilidades, así como herramienta útil para la pérdida de peso antes de procedimientos quirúrgicos como la cirugía bariátrica (47–50). Representa una intervención nutricional que imita el ayuno mediante una marcada restricción de la ingesta diaria de carbohidratos, generalmente inferior a 30 g/día ( $\approx 13\%$  del total ingesta energética), con un aumento relativo de las proporciones de grasas ( $\approx 44\%$ ) y proteínas ( $\approx 43\%$ ) y una ingesta de energía diaria total  $< 800$  kcal (47,48). Se caracteriza por un bajo contenido en lípidos, principalmente derivados del aceite de oliva ( $\approx 20$  g/día) y, a pesar de los porcentajes indicados, no es considerada como una dieta alta en proteínas, ya que la ingesta diaria de proteínas de alto valor biológico es de aproximadamente 1,2-1,5 g/kg de peso corporal ideal (51–53).

El programa de adelgazamiento se estructura en diferentes etapas e incluye un período cetogénico, característico de este tipo de dieta. La

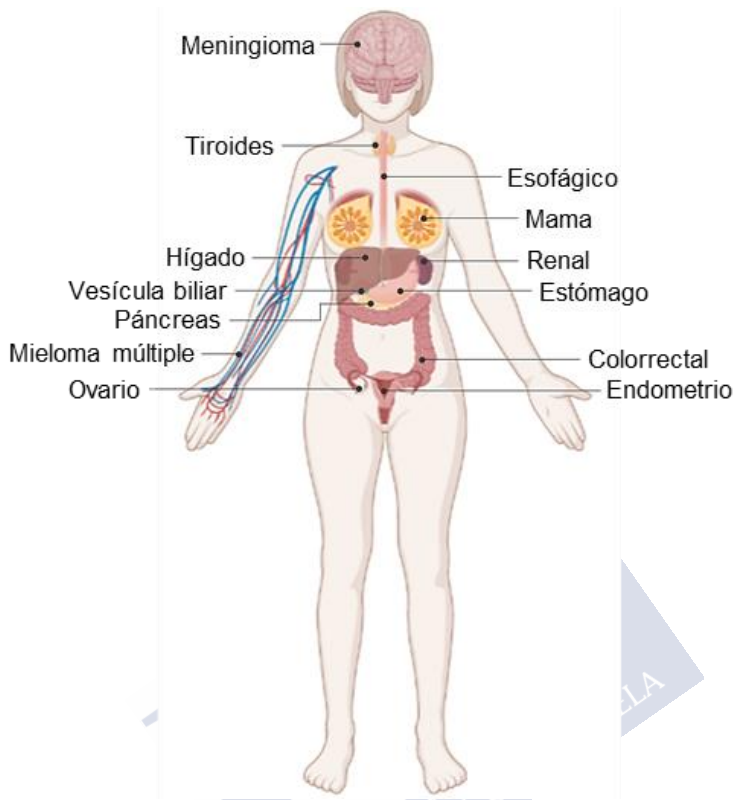
cetogénesis ocurre en las mitocondrias de los hepatocitos (54,55) y hace referencia a la producción de un grupo de pequeñas moléculas colectivamente conocidas como cuerpos cetónicos, entre los que se incluyen el betahidroxibutirato, el acetoacetato y la acetona, siendo el betahidroxibutirato el cuerpo cetónico más abundante en la sangre (56). Aunque los cuerpos cetónicos se producen en bajo grado en individuos sanos, la cetogénesis aumenta sustancialmente en condiciones de disponibilidad reducida de glucosa y después del agotamiento de las reservas celulares de glucógeno, incluyendo el ayuno, la actividad física intensiva y la VLCKD. Bajo estas circunstancias, los cuerpos cetónicos transfieren la energía almacenada como lípidos en el hígado a los órganos extrahepáticos, como corazón, riñón, músculo esquelético, sistema nervioso central, actuando como una fuente de combustible alternativa para los tejidos periféricos (57,58). Cabe remarcar, que la cetosis que ocurre durante la VLCKD representa un mecanismo fisiológico, completamente diferente de la condición patológica conocida como cetoacidosis diabética (59). De hecho, los estudios evidencian que las concentraciones de betahidroxibutirato durante este periodo de cetosis no suelen exceder de 0,70 mmol/l (60), concentración que se encuentra muy por debajo de la detectada en sangre en adultos con cetoacidosis diabética (3,8 mmol/l) (61).

Entre los actuales hallazgos y principales beneficios reportados desde los estudios realizados con intervenciones basadas en VLCKD destacan la disminución significativa del tejido adiposo visceral (62), la preservación de la masa muscular y la fuerza (63), la no afectación de la tasa metabólica en reposo (64), el mantenimiento de un estado de ánimo favorable y calidad de vida (65) así como, la seguridad en términos de equilibrio ácido-base (60). Actualmente, las VLCKD se recomiendan como una intervención dietética rápida y eficaz, donde los cuerpos cetónicos generados actúan como poderosos agentes anorexigénicos, dando como resultado una reducción general de la percepción de hambre e ingesta de alimentos (46,48,66,67).

## 2. OBESIDAD Y CÁNCER

La asociación entre la obesidad y el cáncer es relativamente reciente, siendo publicado en 2001 el primer metaanálisis que evidenció la asociación entre la obesidad y el cáncer (68). Las investigaciones llevadas a cabo en esta línea han evolucionado rápidamente durante las últimas dos décadas y en la actualidad existe suficiente evidencia científica sobre el efecto de la obesidad como potencial factor de riesgo para el desarrollo tumoral (69). Según la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) el exceso de grasa corporal se asocia con un mayor riesgo de 13 tipos diferentes de cáncer (**Figura 2**), incluidos endometrio, mama posmenopáusica, colorrectal, esofágico, renal, meningioma, páncreas, estómago (cardias gástrico), hígado, mieloma múltiple, ovario, vesícula biliar y tiroides (70), destacando el cáncer de mama, el colorrectal y el hepático por encontrarse entre los más prevalentes en la población en los últimos años (71).

Las elevadas tasas de sobrepeso y obesidad en la población mundial constituyen el determinante principal de la creciente prevalencia de muchos de estos tipos de cáncer, incluso superando al tabaquismo como la principal causa prevenible de cáncer (72). En este sentido, se estima que entre el 30% y el 40% de los cánceres se podrían prevenir mediante cambios en el estilo de vida, como una mejora de la dieta, promoción de la actividad física y menor exposición a factores ambientales de riesgo (73–77).



**Figura 2. Representación de los 13 tipos de cáncer asociados a la obesidad.**  
Fuente: elaboración propia creada con BioRender.com

Sin embargo, a pesar de las consistentes evidencias epidemiológicas hasta la fecha, los mecanismos moleculares subyacentes que podrían explicar cómo el exceso de adiposidad corporal se vincula con una mayor incidencia de cáncer todavía se desconocen. Las hipótesis más respaldadas por la comunidad científica, acerca del vínculo entre la obesidad abdominal y la susceptibilidad tumoral hacen referencia a los mecanismos biológicos responsables de la resistencia a la insulina, la inflamación general y de bajo grado del tejido adiposo, el estrés oxidativo, las alteraciones en la función inmunológica, o el papel de los disruptores endocrinos, entre otros (78–82).

En relación al papel de la inflamación y el estrés oxidativo como mediadores del vínculo entre la obesidad y el cáncer, anteriores trabajos realizados por nuestro grupo de investigación evidencian que los factores secretados por el tejido adiposo disfuncional obeso tienen un efecto procarcinogénico y son los responsables de la generación de un microambiente favorable para el desarrollo tumoral (80,83,84).

En línea con estos hallazgos, algunos estudios llevados a cabo en los últimos años han demostrado el efecto que ejerce la obesidad y la inflamación asociada a la obesidad en la promoción de la carcinogénesis y la progresión tumoral de varios tipos de cáncer importantes (79), como el cáncer de mama (85–87) el cáncer colorrectal (88–91) y cáncer de hígado (92–95), entre otros.

Estudios epidemiológicos han demostrado que la obesidad es un factor de riesgo relevante para el carcinoma hepatocelular (HCC) (96,97). En este sentido, se ha postulado que la asociación del HCC con la obesidad represente muy probablemente la progresión de la enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD) subyacente a la cirrosis (97), por lo que se estima que la prevalencia de HCC relacionado con NAFLD aumente concomitantemente con la creciente epidemia de la obesidad (98,99).

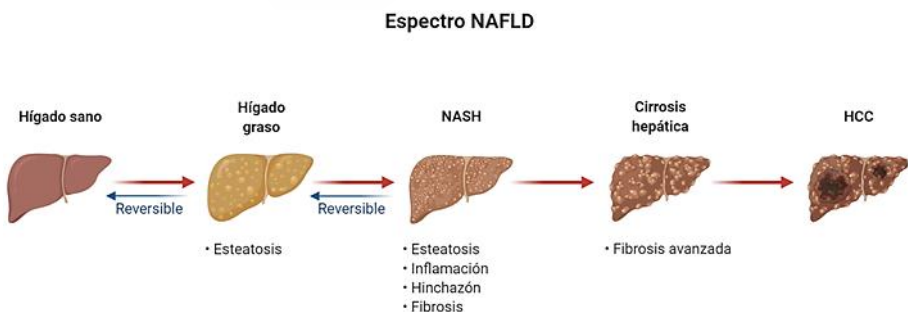
Los mecanismos a través de los cuales la obesidad causa el HCC todavía no están claros, aunque se ha observado que la resistencia a la insulina, las alteraciones de los lípidos séricos, la NAFLD y la esteatosis no alcohólica juegan un papel importante (100). Además, se sospecha que los mediadores inflamatorios, metabólicos y endocrinos asociados a la obesidad también contribuyen a la hepatocarcinogénesis (101).



### 3. ENFERMEDAD DE HÍGADO GRASO NO ALCOHÓLICO

La NAFLD es la forma más común de enfermedad hepática crónica en el mundo, afectando aproximadamente al 25% de la población general (98,102). La NAFLD es la principal causa del incremento de la incidencia del HCC, definido como el sexto cáncer más común en el mundo y la tercera causa de muerte relacionada con el cáncer (99,103,104). Además, debido al aumento alarmante de las enfermedades metabólicas, se espera que la incidencia del HCC relacionado con NAFLD se multiplique en el futuro y que este aumento sea concomitante a la creciente epidemia de la obesidad (99,103).

Clínicamente, NAFLD abarca un espectro de características histológicas que van desde la esteatosis simple, caracterizada por la acumulación de grasa en el hígado, hasta la esteatohepatitis no alcohólica (NASH), asociada con la hinchazón de los hepatocitos, inflamación y/o fibrosis, conduciendo finalmente a cirrosis hepática y HCC (105) (**Figura 3**).



**Figura 3. Representación del espectro de características histológicas de NAFLD.** NAFLD, enfermedad del hígado graso no alcohólico; NASH, esteatohepatitis no alcohólica; HCC, carcinoma hepatocelular. Fuente: elaboración propia creada con BioRender.com

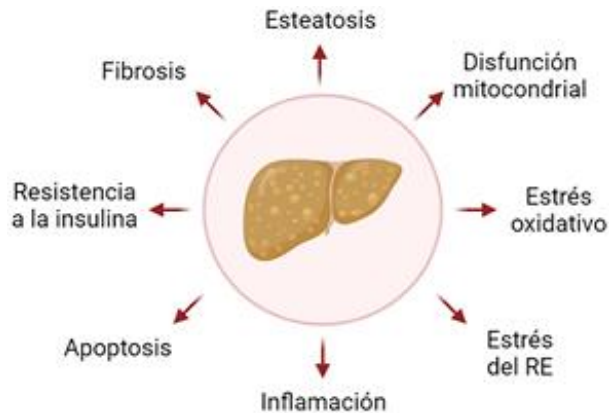
La patogenia de NAFLD y los mecanismos moleculares subyacentes de su progresión a NASH se han estudiado extensamente. Sin embargo, aunque los procesos que determinan la acumulación de grasa son en su mayoría claros, los mecanismos asociados con la progresión de la enfermedad no están completamente caracterizados (106). Se sabe que el primer paso en el desarrollo de NAFLD/NASH está representado por la acumulación de grasa en el hígado, una condición que comúnmente se asocia con características del síndrome metabólico, como obesidad, diabetes tipo 2, dislipidemia e hipertensión (102). La obesidad incrementa el riesgo de NAFLD (107,108) y datos recientes reflejan que la prevalencia de NAFLD es proporcional al incremento de IMC y que aumenta a más del 90% para las personas con obesidad (109). En este contexto, cada vez son más los estudios que demuestran que el efecto perjudicial que ejerce la obesidad sobre el desarrollo de NAFLD puede revertirse en las primeras fases de la esteatosis hepática mediante intervenciones para pérdida de peso basadas en dieta y ejercicio (110–113), donde las VLCKD también han evidenciado ser una alternativa eficaz para el tratamiento de NAFLD (114).

Otros mecanismos que participan en la patogénesis y progresión de NAFLD están asociados con la resistencia a la insulina y el síndrome metabólico, incluyendo, además de la acumulación de lípidos, la lipotoxicidad, el estrés oxidativo, la disfunción mitocondrial y las alteraciones en la señalización del eje intestino-hígado (115) (**Figura 4**).

Desde el punto de vista patológico, se han identificado al menos 3 mecanismos como fuente de acumulación excesiva de lípidos en el hígado. El mecanismo principal está representado por el aumento de la lipólisis de los depósitos de grasa visceral y su consiguiente flujo excesivo de ácidos grasos libres al hígado (59%), seguido de la activación de la lipogénesis *de novo* hepática (26%) y el alto contenido de calorías y/o grasas en la dieta (15%) (116). La acumulación de lípidos puede promover la lipotoxicidad y la disfunción mitocondrial, desencadenando así la muerte de los hepatocitos, la inflamación y la fibrosis (106). Mientras que la esteatosis simple se considera una afección más benigna, su evolución a NASH se asocia con un mayor



riesgo de cirrosis y desarrollo de HCC (117), resultado de una interacción compleja que involucra a las células hepáticas y a señales patológicas provenientes de otros órganos, como el tejido adiposo y el intestino (115).



**Figura 4.** Esquema de los sellos de identidad de NAFLD. RE, retículo endoplasmático. Fuente: elaboración propia creada con BioRender.com

Los mecanismos moleculares asociados con el desarrollo y la progresión de NAFLD deben explorarse más a fondo. En este contexto, la identificación precoz de los pacientes predispuestos a desarrollar NAFLD sería útil para establecer procedimientos que modifiquen el estilo de vida de los pacientes para evitar la progresión a enfermedad hepática grave y sus complicaciones (118). Durante la última década, los estudios de asociación genética han demostrado ser útiles para identificar biomarcadores de susceptibilidad a enfermedades complejas multifactoriales, incluida la NAFLD (119), aunque en la mayoría de los casos, las pruebas funcionales de los genes identificados son insuficientes. Por lo tanto, son necesarias más investigaciones que permitan identificar los genes y las vías subyacentes que están asociadas e influyen directamente en el desarrollo de NAFLD.

### 3.1. ACUMULACIÓN DE LÍPIDOS Y LIPOTOXICIDAD COMO MECANISMOS PRINCIPALES EN EL DESARROLLO DE NAFLD

Como se ha mencionado, la distribución de los depósitos de grasa en el cuerpo es importante. Los ácidos grasos libres que proceden de la lipólisis activa del VAT son absorbidos por el hígado para convertirse en la principal fuente de lípidos que contribuyen al almacenamiento de triglicéridos hepáticos en NAFLD (120,121). Esta liberación masiva de ácidos grasos libres por parte del tejido adiposo tiene lugar en un estado de resistencia a la insulina, evento patogénico clave asociado con el desarrollo de esteatosis hepática (122). Además de la acumulación de triglicéridos, la lipotoxicidad es otro de los mecanismos más investigados en la patogenia de NAFLD. La lipotoxicidad juega un papel relevante en la patogénesis de la esteatosis hepática, la inflamación y la fibrosis, dado que no sólo la cantidad de lípidos acumulados es importante en la lesión de las células hepáticas, sino también el tipo de molécula lipídica (123,124).

En este contexto, los triglicéridos representan una forma principal de lípidos intrahepáticos acumulados en NAFLD y son responsables de la esteatosis hepática. El aumento de la ingesta de triglicéridos en la dieta y el transporte de ácidos grasos liberados del tejido adiposo resistente a la insulina, así como la lipogénesis *de novo* intensiva en el hígado, son las vías más importantes que conducen a la acumulación intrahepática de triglicéridos, almacenados como pequeñas gotas lipídicas (125,126).

Otras moléculas lipídicas, los ácidos grasos no esterificados, se encuentran entre las moléculas más comunes susceptibles de producir lipotoxicidad. Los ácidos grasos hepáticos derivan principalmente de la reserva de plasma (lipólisis del tejido adiposo), de la síntesis o lipogénesis *de novo* en el hígado o liberados de los lisosomas después de la autofagia (127). La acumulación de ácidos grasos hepáticos como lípidos complejos promueve la esteatosis y el exceso que no es incorporado como formas más complejas es lipotóxico, conduciendo a los hepatocitos a estrés del retículo endoplásmico, disfunción mitocondrial y estrés oxidativo seguido de la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS). Estos procesos activan vías proinflamatorias y profibróticas, promoviendo la progresión de la enfermedad hacia NASH (126,128).

### 3.2. PRINCIPALES MODELOS *IN VITRO* E *IN VIVO* DE NAFLD

Los modelos *in vitro* de NAFLD han variado desde sistemas basados en cultivos celulares simples expuestos a varios lípidos y citocinas hasta modelos más sofisticados basados en cultivos de organoides multicelulares en 3D (129,130). Los hepatocitos humanos primarios se consideran el modelo “estándar de oro” a corto plazo para representar el modelo de hígado humano *in vitro* para los estudios de toxicidad y metabolismo de xenobióticos, debido a su alta funcionalidad en relación con el órgano humano *in vivo* (131). Sin embargo, a causa de sus importantes limitaciones (obtención de la muestra, variabilidad y escasa duración en cultivo), en los últimos años se ha propuesto el uso de líneas celulares de hepatoma humano como alternativa fiable para modelizar la esteatosis y NAFLD *in vitro* (130,132).

En este contexto, las células HepG2 se han utilizado ampliamente (133–135), sin embargo, un inconveniente importante en el uso de HepG2 es la pérdida de diversas funciones específicas del hígado, como su falta o baja expresión de enzimas metabolizadoras de fármacos. Estudios recientes realizados con la línea celular HepaRG exhiben mejoras relevantes (136–138). Estas células se caracterizan por formar colonias típicas de tipo hepatocito rodeadas por células de tipo epitelial biliar, por expresar varios citocromos (CYP1A2, 2B6, 2C9, 2E1, 3A4) y receptores nucleares constitutivos a niveles comparables a los encontrados en hepatocitos humanos primarios cultivados, junto con albúmina, haptoglobina y aldolasa B, un marcador específico de los hepatocitos adultos (139–141). Así, se evidencia la utilidad de las células HepaRG como un sistema de ensayo para el cribado de la esteatosis hepática inducida por fármacos (141) y para estudios de toxicidad y metabolismo xenobiótico (142).

Los modelos animales de NASH se pueden clasificar en términos generales como modelos inducidos por la dieta, modelos genéticos o una combinación de más de una intervención (143). Aunque muchos modelos pueden conducir a la acumulación de lípidos en el hígado, no todos lo hacen por vías que se sabe que son relevantes para NASH humana, y aunque la apariencia histológica de muchos modelos puede

parecerse es posible que las características metabólicas y transcriptómicas en el hígado no lo sean (144). Por ello, cada vez más los modelos se evalúan sobre la base de las características proteómicas, lipidómicas y transcriptómicas, en lugar de la histología sola, para evaluar su relevancia para las enfermedades humanas (128).

Dentro de los modelos animales de NASH desarrollados a partir de obesidad inducida por la dieta, es muy común emplear ratones de la cepa C57Bl/6J (145,146) y ratas Sprague Dawley (147,148), aunque estos roedores no desarrollan de forma constante esteatohepatitis o fibrosis avanzada con una dieta rica en grasas (149).

Los principales modelos animales genéticos de NASH incluyen los ratones ob/ob (deficiencia de leptina) y db/db (deficiencia del receptor de leptina), y las ratas Zucker (fa/fa, deficiencia del receptor de leptina). Entre estos, el modelo más comúnmente usado de NAFLD es empleando ratas Zucker obesas, también utilizadas como modelo animal de obesidad genética y síndrome metabólico (150).

Las ratas Zucker se caracterizan por desarrollar obesidad grave, son hiperleptinémicos, hiperfágicos, inactivos, resistentes a la insulina, con presión arterial sistólica aumentada (a las 28 semanas) y niveles de adiponectina plasmática más altos en comparación a las ratas delgadas (Fa/fa) (151–154). En los animales con fenotipo obeso (fa/fa), la acumulación de grasa en forma de triglicéridos en el hígado se localiza en el área periportal (155,156), la esteatosis macrovesicular o microvesicular está presente (157) y se detectan bajas cantidades de GSH y vitamina E junto con una actividad disminuida de la catalasa, relacionado con la presencia de estrés oxidativo (158).

### 3.3. GENES RELACIONADOS CON EL METABOLISMO DE LOS LÍPIDOS DESREGULADOS EN NAFLD

#### 3.3.1. Genes regulados positivamente

La acetil-CoA carboxilasa beta (**ACACB**) es una enzima asociada a la membrana de la mitocondria que regula negativamente la oxidación de ácidos grasos, produciendo malonil-CoA, sustrato para la biosíntesis de ácidos grasos e inhibidor de la cetogénesis (159). Juega un papel crucial en el metabolismo de los ácidos grasos y se expresa principalmente en tejidos oxidativos como corazón y músculo esquelético (160), y en hígado (161), donde su expresión génica está regulada por el estado nutricional (162). En modelos animales de NAFLD y resistencia a la insulina, modelos de obesidad inducida por dieta y en pacientes con hígado graso se ha descrito que tratamientos que inhiben o disminuyen los niveles de expresión hepática de ACACB dan como resultado una reducción de la esteatosis hepática con elevación de los triglicéridos plasmáticos (163–166). También se ha observado un aumento de la expresión de ACACB en HCC, por lo que varios estudios postulan que los inhibidores de ACACB podrían ser agentes terapéuticos potenciales para el tratamiento eficaz de los cánceres relacionados con la obesidad (167).

La piruvato deshidrogenasa quinasa isoenzima 4 (**PDK4**) es una enzima mitocondrial que juega un papel clave en el metabolismo de la glucosa, regulando la actividad del complejo piruvato deshidrogenasa (168). PDK4 está altamente expresada en hígado, corazón y músculo esquelético, y es un regulador de control para el metabolismo de la glucosa (169,170). La expresión hepática de PDK4 está aumentada tanto en humanos como en ratones con NAFLD, así como en hepatocitos tratados con ácido oleico, cuya función se ha relacionado con el metabolismo de los lípidos hepáticos (171,172). Cuando se produce una deficiencia de PDK4, se observa una alteración del metabolismo de la glucosa y los lípidos en el hígado. Como consecuencia de esta deficiencia, en ratones NASH se evidencia una mejora significativa de la esteatosis hepática, reflejada como un menor peso del hígado y niveles reducidos de TG hepáticos (173). Estos hallazgos evidencian

que PDK4 contribuye potencialmente a la patogénesis de NAFLD y NASH a través de la regulación de vías del metabolismo de la glucosa y de los lípidos en hígado, por lo que puede ser una nueva estrategia terapéutica contra NAFLD (173,174).

La perilipina 2 (**PLIN2**) o proteína relacionada con la diferenciación adiposa es una proteína constitutivamente ubicada en la superficie de las gotas de lípidos (175). En NAFLD está regulada al alza y se encuentra asociada a los hepatocitos inflamados, demostrando que PLIN2 se une preferentemente a lípidos proinflamatorios (176,177). En ratones, la ablación global de PLIN2 disminuyó los niveles de triglicéridos hepáticos y protegió contra la obesidad inducida por la dieta, la inflamación adiposa y la esteatosis hepática (178,179). Estos ratones también exhibieron una expresión hepática disminuida de marcadores proinflamatorios y una expresión reducida de las proteínas de estrés del retículo endoplásmico (180). La reducción de sus niveles de PLIN2 resultó en una disminución de los lípidos hepáticos, acumulación y aumento de la sensibilidad a la insulina (181). Estos datos apoyan el papel de PLIN2 en la promoción de la esteatosis hepática y su uso como objetivo terapéutico, aunque se sabe relativamente poco acerca de si esta proteína contribuye a la patogénesis de NAFLD relacionada con la inflamación (180).

La interleucina 6 (**IL-6**) es una citoquina inflamatoria importante. En condiciones fisiológicas, es esencial para la correcta homeostasis del tejido hepático, la regeneración del hígado, la defensa contra infecciones y la regulación de las funciones metabólicas. Sin embargo, la activación persistente de la IL-6 parece ser perjudicial e incluso puede conducir al desarrollo de cáncer de hígado (182). La síntesis y secreción de IL-6 por parte de fibroblastos, monocitos, macrófagos, células T y células endoteliales se induce durante condiciones inflamatorias (183). Varios estudios han explorado las asociaciones entre el gen de la IL-6 y la susceptibilidad a las enfermedades hepáticas. Aunque los resultados siguen siendo ambiguos, la IL-6 podría desempeñar un papel central en el desarrollo y progresión de las enfermedades hepáticas, así como en la regeneración del hígado (184–186). En este contexto, se han evidenciado altos niveles séricos de IL-6

en las enfermedades hepáticas, (187) y niveles plasmáticos altos de IL-6 se han sugerido como un biomarcador para el pronóstico precario de los pacientes con HCC (188), ya que la IL-6 es crucial para el desarrollo del HCC. El papel de la señalización de IL-6 en el metabolismo hepático, la obesidad y la resistencia a la insulina también es controvertido, aunque se ha detectado que los niveles séricos de IL-6 se correlacionan con el grado de obesidad (189) y el desarrollo de diabetes tipo 2 (190), lo que sugiere que la IL-6 está relacionada causalmente con el desarrollo de enfermedades metabólicas (182).

### 3.3.2. Genes regulados negativamente

El miembro 1 de la familia de transportadores facilitadores de glucosa (**SLC2A1**), está expresado en músculo, tejido adiposo y particularmente en hígado, donde recientemente se le ha definido como marcador de enfermedades oncogénicas y metabólicas hepáticas (191). Aunque previamente SLC2A1 ha sido relacionado con diabetes tipo 2 (192), en los últimos años se ha observado que la expresión de SLC2A1 está disminuida en biopsias hepáticas de pacientes con NAFLD y que su silenciamiento en líneas celulares aumenta significativamente los niveles de especies reactivas del oxígeno (ROS), indicando que SLC2A1 contribuye activamente a regular un entorno proinflamatorio en las primeras etapas de la enfermedad del hígado graso (119,193). Estas observaciones ponen de manifiesto el papel potencial de SLC2A1 en el hígado, por su implicación en el almacenamiento de lípidos y en la respuesta inflamatoria y dañina, ambas características críticas de NAFLD, proporcionan nuevos conocimientos relevantes sobre la patogénesis de NAFLD (194,195).

La apolipoproteína C3 (**APOC3**) es una proteína de unión a lípidos que circula principalmente en lipoproteínas ricas en TG. Es secretado principalmente por el hígado y afecta al metabolismo de los TG a través de múltiples mecanismos (196–198). Su desregulación se asocia con un metabolismo anormal de los TG, de ahí su importancia en la patogenia de la hipertrigliceridemia (199,200). Sin embargo, la contribución funcional de APOC3 como factor predisponente para NAFLD sigue siendo controvertido, aunque estudios en esta línea han evidenciado que

APOC3 es un factor de riesgo para NAFLD y podría contribuir a un mayor contenido de grasa hepática (201–203), ya que en un estudio en humanos se determinó que una disminución de la expresión de APOC3 se correlacionaba con un aumento del nivel de TG hepáticos y una mayor prevalencia de NAFLD (203).

La esteroil-CoA desaturasa (**SCD**) es una enzima involucrada en la biosíntesis de ácidos grasos monoinsaturados (principalmente oleato y palmitato), sustratos principales para la síntesis de triacilgliceroles y otros lípidos, a partir de la conversión de los ácidos grasos saturados (204). Se considera una enzima clave en la regulación del metabolismo de los lípidos y la síntesis de triacilgliceroles y se expresa de forma diferencial en el hígado (205). Diversos estudios han demostrado que SCD participa en la modulación de fenotipos asociados al síndrome metabólico (206), incluida la obesidad (207), la resistencia a la insulina (208) y NAFLD (209), aunque su papel específico en el desarrollo de enfermedades metabólicas humanas es controvertido. Estudios han indicado que la actividad y la expresión de SCD no están reguladas positivamente en sujetos con hígado graso y que el índice de actividad de SCD hepático se correlaciona negativamente con el contenido de grasa hepática (210). En modelos animales de NAFLD inducido por la dieta, hígado graso se asocia con la regulación a la baja de la transcripción hepática de SCD, cambios que no se vieron muy afectados por el estado de resistencia a la insulina periférica (205).



#### **4. TEJIDO ADIPOSO EN LA FISIOPATOLOGÍA DE LA OBESIDAD**

En mamíferos, el tejido adiposo se divide en tejido adiposo pardo, responsable de la actividad termogénica, y tejido adiposo blanco, responsable del almacenamiento de grasa (211–213), sobre el que centraremos este apartado. El tejido adiposo blanco se distribuye en múltiples depósitos en el cuerpo y se compone de células grasas o adipocitos, células progenitoras adiposas o preadipocitos y otros tipos de células no adipogénicas (fibroblastos, células endoteliales, macrófagos y otras células inmunes) (214). Los adipocitos, el principal componente celular, son células secretoras metabólicamente activas y potentes capaces de liberar una gran cantidad de adipocinas involucradas en la regulación del apetito, funciones inflamatorias e inmunes, metabolismo de la glucosa y de los lípidos, homeostasis cardiovascular y reproducción, entre otras importantes funciones biológicas y fisiológicas (215,216).

El tejido adiposo blanco es muy heterogéneo y desempeña un papel clave en el metabolismo energético, ya que su principal función es el mantenimiento de la homeostasis energética (217). Atendiendo a la disposición anatómica, el tejido adiposo blanco consta principalmente de un componente intraabdominal central, denominado tejido adiposo visceral (VAT), y un depósito periférico superficial, denominado tejido adiposo subcutáneo (SAT) (217,218). Estos depósitos de grasa presentan importantes diferencias entre ellos. En concreto, el VAT comparado con el SAT se ha descrito como más vascular e innervado, caracterizado por contener un mayor número de células inflamatorias e inmunes, menor capacidad de diferenciación de preadipocitos, mayor porcentaje de adipocitos maduros grandes y más receptores de glucocorticoides y andrógenos. Además, los adipocitos de tipo visceral

son más activos metabólicamente, más sensibles a la lipólisis y más resistentes a la insulina, tienen una mayor capacidad para generar ácidos grasos libres y captar glucosa. En cambio, el SAT presenta una mayor capacidad de absorción de ácidos grasos libres y triglicéridos circulantes (219,220).

En términos generales, el VAT se ha asociado con riesgo metabólico y el SAT con efectos protectores sobre la homeostasis energética (218), o lo que es lo mismo, la adiposidad central, más que la adiposidad periférica, es un factor de riesgo importante en el establecimiento de enfermedades metabólicas (221,222). En este sentido, la distribución anatómica de los diferentes depósitos de grasa en el interior del cuerpo determina su identidad metabólica y roles fisiológicos siendo también un factor relevante que influye en el desarrollo de comorbilidades asociadas a la obesidad (223).

#### **4.1. TEJIDO ADIPOSO COMO ÓRGANO ENDOCRINO**

Tradicionalmente, se consideraba al tejido adiposo como un órgano de almacenamiento de energía a largo plazo a partir del cual se liberan ácidos grasos libres durante el ayuno para cubrir las demandas de energía del organismo (224). Actualmente, la visión del tejido adiposo ha cambiado significativamente y ahora se reconoce como un órgano endocrino complejo y dinámico que ejerce un papel importante en la homeostasis corporal (225–227).

El tejido adiposo se comunica con otros órganos centrales y periféricos mediante la síntesis y secreción de una gran cantidad de moléculas denominadas adipocinas, sustancias bioactivas que participan en la homeostasis de varios procesos fisiológicos (228). Entre las principales adipocinas secretadas por el tejido adiposo encontramos la leptina, el factor de necrosis tumoral alfa ( $TNF\alpha$ ), la interleucina-6 (IL-6), el inhibidor del activador del plasminógeno 1 (PAI-1), la adiponectina, la resistina, la visfatina, la omentina y la apelina (228,229). Los niveles de algunas adipocinas se correlacionan con estados metabólicos específicos y su desregulación se ha relacionado con obesidad, diabetes

tipo 2, hipertensión, enfermedades cardiovasculares y una lista cada vez mayor de cambios patológicos en varios órganos (228).

La implicación de las adipocinas en la respuesta inflamatoria también ha sido descrita, destacando el papel de la leptina, TNF $\alpha$ , IL-6 y adiponectina. La leptina es secretada en proporción al contenido de grasa y estado nutricional para regular la ingesta de alimentos creando una sensación de saciedad (230), de ahí que la obesidad se haya asociado con niveles altos de leptina, lo que promueve inflamación y estrés oxidativo (231–233). El TNF $\alpha$ , una de las primeras citocinas identificadas, participa en la respuesta inflamatoria sistémica (234,235) y en la patogénesis del síndrome metabólico incluyendo resistencia a la insulina, obesidad y diabetes (236,237). La IL-6 ejerce muchos efectos en relación a la inflamación y daño tisular (238) y sus niveles circulantes se han correlacionado con IMC, resistencia a la insulina e intolerancia a los carbohidratos (239,240). La adiponectina tiene fuerte acción antiinflamatoria, participa en la regulación de la homeostasis energética y el metabolismo de la glucosa y los lípidos (241,242) y su expresión está disminuida en obesidad y resistencia a la insulina (243,244). Además, una producción irregular de adipocinas se ha asociado con la generación de estrés oxidativo en enfermedades metabólicas (245–248).

#### **4.2. DISFUNCIÓN DEL TEJIDO ADIPOSO**

En respuesta a un balance energético positivo, una serie de eventos y mecanismos dinámicos reorganizan el tejido adiposo, proceso que se conoce como "remodelación del tejido adiposo" (249). En obesidad, situación de balance energético positivo prolongado en el tiempo, el remodelado del tejido adiposo experimenta diferentes procesos de tipo celular y estructural para adaptarse a esta captación y almacenamiento excesivo de grasa (250,251). Estos procesos consisten en una expansión tisular mediante la regulación de la hiperplasia de adipocitos (aumento del número de células) y la hipertrofia (aumento del tamaño de las células) (252) junto con una infiltración de células inmunitarias en el tejido (253,254) y la matriz extracelular (255) (**Figura 5**).

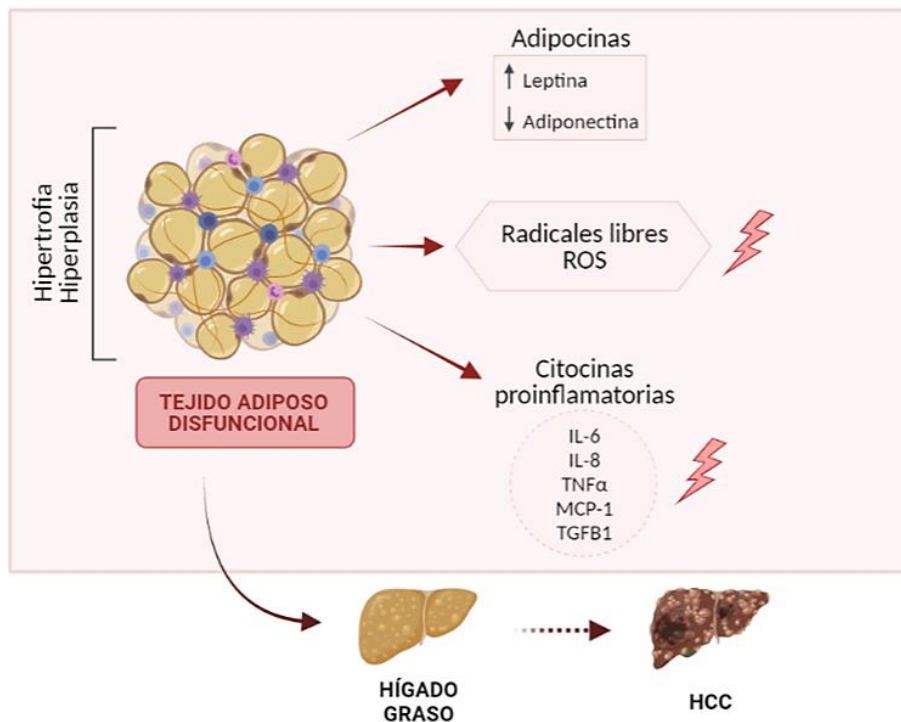


Figura 5. Representación de la disfuncionalidad del tejido adiposo y sus principales consecuencias en el organismo. ROS, especies reactivas del oxígeno; HCC, carcinoma hepatocelular. Fuente: elaboración propia creada con BioRender.com

Resultado de esta expansión tisular y desequilibrio de los mecanismos homeostáticos adaptativos, se produce una disfuncionalidad del tejido adiposo (252,256), donde los adipocitos hipertróficos-hiperplásicos estimulan la infiltración de monocitos al estroma adiposo desencadenando un microambiente proinflamatorio (228). En consecuencia, se induce la desregulación de las citocinas secretadas por el tejido adiposo dando lugar a una inflamación sistémica y adipogénesis alterada de las células precursoras (257). La inflamación local conduce a una resistencia a la insulina y un mayor riesgo de comorbilidades metabólicas asociadas a la obesidad (258). Estas alteraciones metabólicas junto con la limitación en la capacidad de expansión del tejido adiposo (plasticidad) afectan a su correcto

funcionamiento, interfiriendo en la homeostasis metabólica global y provocando una acumulación de grasa ectópica en tejidos periféricos, con consecuencias lipotóxicas como la NAFLD y su posterior evolución al HCC (259–261).

#### **4.2.1. Estrés oxidativo e inflamación asociado a la disfunción del tejido adiposo obeso**

El estrés oxidativo se desencadena como consecuencia de un desequilibrio entre la producción de ROS y las defensas antioxidantes (82,262). Concentraciones bajas de radicales libres y de ROS son necesarias para estado redox normal de las células, para la función celular y para la señalización intracelular (263). Sin embargo, en situaciones no fisiológicas, se produce un exceso de radicales libres y un aumento en la concentración de ROS, los cuales generan estrés oxidativo celular pudiendo ocasionar daño en el ADN, en las proteínas o en los componentes lipídicos y por consiguiente promoviendo el desarrollo de enfermedades (264). Para evaluar el estrés oxidativo, a menudo se utilizan técnicas simples que miden biomarcadores o productos finales de procesos oxidativos mediados por radicales libres. El malondialdehído (MDA), biomarcador de estrés oxidativo de referencia, se utiliza ampliamente como indicador del daño por peroxidación lipídica (265).

En este contexto, estudios recientes evidencian que el estrés oxidativo juega un papel crítico en la patogénesis de la obesidad y sus comorbilidades asociadas (266–268). Entre los posibles factores que contribuyen al estrés oxidativo en la obesidad se incluyen hiperglucemia, niveles elevados de lípidos tisulares, baja defensa antioxidante, inflamación, hiperleptinemia, deterioro de la función mitocondrial y tipo de dieta, entre otros (246,266,269–272). La obesidad *per se* también puede inducir estrés oxidativo sistémico a través de varios mecanismos bioquímicos, como la generación de superóxido a partir de las NADPH oxidasas, la fosforilación oxidativa, la autooxidación de gliceraldehído o la activación de proteína quinasa C (268). Este estrés oxidativo inducido por la obesidad provoca el desarrollo de varios eventos patológicos, como resistencia a la insulina

y diabetes, complicaciones cardiovasculares, trastornos del sueño, carcinogénesis e insuficiencia hepática (246,273). Además, se ha demostrado que el estrés oxidativo puede desencadenar la obesidad, provocando un aumento de la proliferación de los preadipocitos, de la diferenciación de los adipocitos y del tamaño de los adipocitos maduros (274,275), o debido a la implicación de las ROS en el control del peso corporal, ejerciendo diferentes efectos sobre las neuronas hipotalámicas que controlan el comportamiento de saciedad y hambre (276).

La inflamación se desencadena como consecuencia de un excesivo incremento de la adiposidad asociada a la disfuncionalidad del tejido adiposo (277,278). La disfunción del tejido adiposo obeso altera la funcionalidad celular y modifica el perfil de secreción de varias adipocinas proinflamatorias y citosinas (215,279). El aumento en la secreción de TNF $\alpha$ , IL-6, IL-8 y la proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1) (280–282) por parte de los adipocitos hipertróficos conduce a cambios en la señalización de la insulina (283), promueve la inflamación local y sistémica y aumenta el reclutamiento de macrófagos y células T (257,284). Esta hipertrofia también induce hipoxia local del tejido adiposo (285,286) y compromete la diferenciación a adipocito maduro, ya que se inhibe la adipogénesis por la liberación del factor de crecimiento transformante beta (TGFB) por parte de los adipocitos hipertróficos (287,288). En este sentido, la obesidad ha sido asociada con la generación de un microambiente inflamatorio crónico de bajo grado consecuencia de una disfunción del tejido adiposo (279,289,290). La secreción de citocinas proinflamatorias también se ha vinculado a un incremento de la lipólisis basal, aumentando la fuga de ácidos grasos libres hacia tejidos periféricos (291,292), efecto relevante en enfermedades asociadas a la obesidad. Algunos biomarcadores clásicos implicados en el proceso inflamatorio son la proteína C reactiva (PCR) y, especialmente, MCP-1 (293–295).

En resumen, en estado de obesidad, el tejido adiposo experimenta una producción aberrante de varios factores moleculares debido al significativo aumento del grado de adiposidad corporal. En consecuencia, se genera un tejido adiposo disfuncional capaz de

desencadenar una respuesta inflamatoria crónica y un aumento del estrés oxidativo, potenciales mediadores en la promoción de un microambiente celular favorable para el desarrollo de comorbilidades asociadas a la obesidad como la carcinogénesis (296–298), la esteatosis hepática y el HCC (123,299) (**Figura 6**).

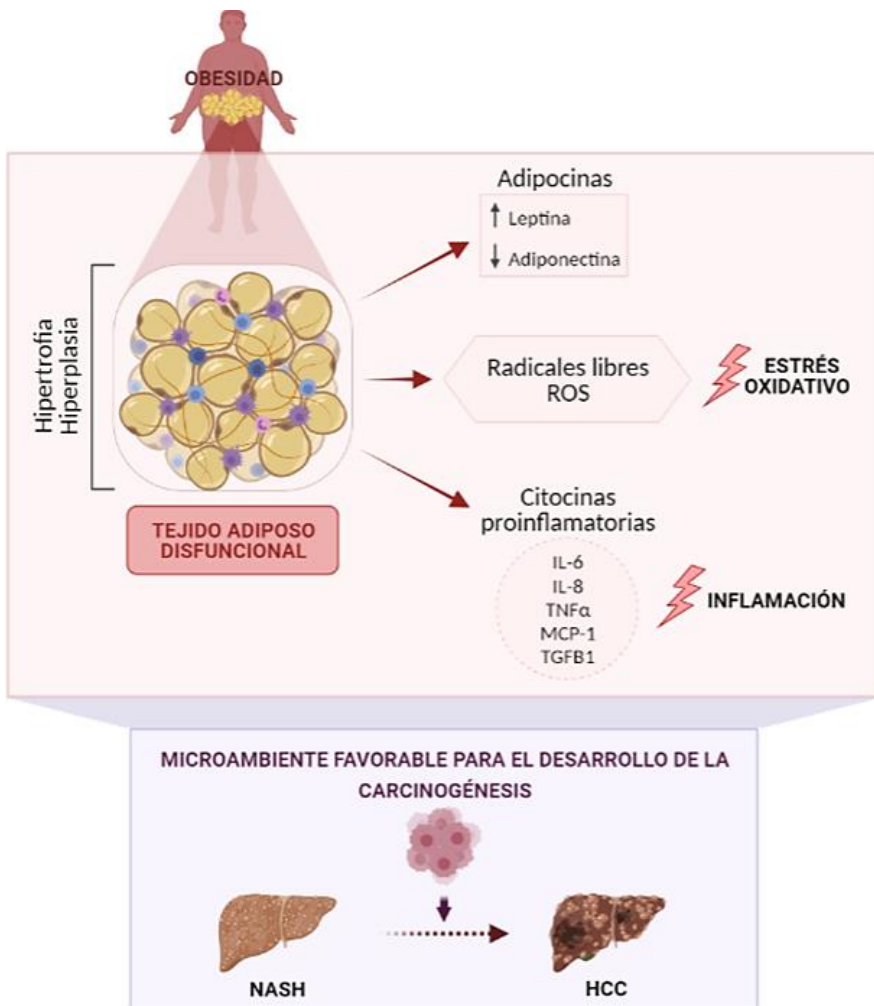


Figura 6. Representación de la disfuncionalidad del tejido adiposo obeso como promotor de un microambiente favorable para el desarrollo de la carcinogénesis. ROS, especies reactivas del oxígeno; NASH, esteatohepatitis no alcohólica; HCC, carcinoma hepatocelular. Fuente: elaboración propia creada con BioRender.com





## **5. CARCINOGENESIS Y GENES RELACIONADOS CON LAS PRIMERAS FASES DEL DESARROLLO TUMORAL**

La carcinogénesis se define como el proceso a través del cual las células normales son transformadas en células cancerosas. Este complejo proceso comprende tres etapas bien diferenciadas, tales como inicio, promoción y progresión, donde las dos primeras etapas subyacen al desencadenamiento de la transformación celular y la tercera determina la transformación, el mantenimiento y la evolución de la malignidad (300,301). Se sabe que en la compleja etiología de la carcinogénesis contribuyen tanto factores exógenos como endógenos (302).

En los últimos años, los conocimientos acerca de los mecanismos moleculares y celulares que median la carcinogénesis han evolucionado notablemente (303). Entre los principales determinantes de la carcinogénesis, se estima que la inflamación crónica contribuye a aproximadamente el 25% de los cánceres humanos (304). Como se ha mencionado anteriormente, en condiciones inflamatorias, las células liberan ROS capaces de causar daño al ADN, el cual puede provocar mutaciones e inestabilidad genómica si no se repara adecuadamente. Esta respuesta al daño del ADN también puede inducir un microambiente inflamatorio, caracterizado por hipoxia, que aumenta los niveles de ROS intracelulares dando como resultado daño del ADN en progresión con mal pronóstico. La interconexión entre el daño del ADN y la inflamación puede desempeñar un papel importante en el desarrollo del cáncer (305,306).

Entre los principales genes descritos con potenciales acciones en las primeras fases de la carcinogénesis, recopilamos una serie de genes implicados en la proliferación celular, la protección antioxidante y la

supresión de tumores en base a los hallazgos obtenidos acerca de la modulación de su expresión génica en estudios previos del grupo sobre la asociación entre la obesidad y el cáncer de mama (83) (**Figura 7**).

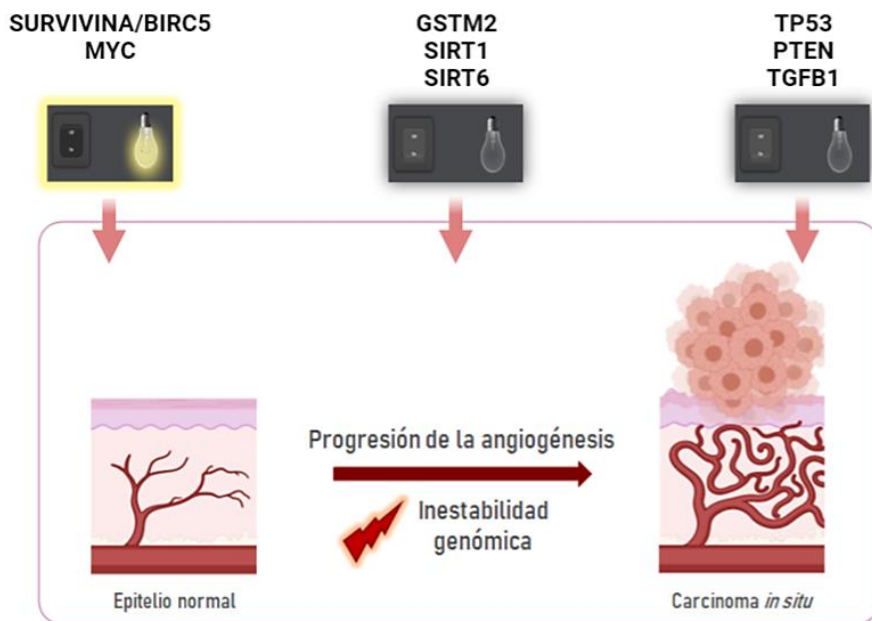


Figura 7. Principales genes implicados en las primeras fases de desarrollo de la carcinogénesis. Fuente: elaboración propia creada con BioRender.com

## 5.1. ONCOGENES

El oncogen **SURVIVINA**, también designado como **BIRC5**, es un miembro de la familia de proteínas inhibidoras de la apoptosis que funciona como un regulador clave de la apoptosis y la proliferación celular. Se expresa en tejidos fetales y apenas está presente en tejidos diferenciados, aunque su expresión se incrementa en la mayoría de tumores (79,307–310). Niveles altos de SURVIVINA/BIRC5 pueden afectar a la respuesta al tratamiento de las células tumorales y su sobreexpresión se ha asociado con alteraciones en la supervivencia y peor pronóstico de los pacientes en diversos procesos carcinogénicos

(310–313). En los últimos años se ha demostrado que la SURVIVINA actúa sobre varios tipos de células no tumorales y tejidos libres de tumor (314), como la fracción de células madre derivadas del tejido adiposo (ADSC) de sujetos obesos (315), y ha sido identificado como un regulador clave del almacenamiento de lípidos y el metabolismo de los adipocitos (316). En estudios previos de nuestro grupo, se ha encontrado una expresión alterada de SURVIVINA/BIRC5 en tejido mamario no tumoral de ratas y en una línea celular humana de mama no tumoral en asociación con el efecto de factores secretados por el tejido adiposo en obesidad (83). Estos efectos se reflejaron en los leucocitos circulantes de mujeres con obesidad con cáncer de mama y libres de tumor (83). Además, la sobreexpresión de SURVIVINA/BIRC5 ha sido ampliamente descrita en HCC humano (317–320). Recientemente, un estudio ha evidenciado que la SURVIVINA/BIRC5 impulsa la reprogramación de macrófagos asociados a tumores, descrito como un mecanismo novedoso con potencial impacto para la obesidad (321).

El oncogen de la familia MYC tiene un papel central en casi todos los aspectos del proceso oncogénico, orquestando la proliferación, apoptosis, diferenciación y metabolismo (322,323). Está desregulado en más del 50% de los cánceres humanos, y esta desregulación se asocia con frecuencia con un pronóstico desfavorable y una supervivencia desfavorable del paciente (324). La mayor parte de los datos muestran que la sobreexpresión de MYC estimula progresión del ciclo celular, mientras que su regulación a la baja la inhibe (325–327). Aunque la inhibición de MYC sería un enfoque eficaz para el tratamiento de muchos tipos de cánceres, esto ha supuesto un desafío en las últimas décadas debido a su estructura proteica "no farmacológica" (324). Diversos estudios han reflejado que la sobreexpresión de MYC es uno de los eventos genéticos más frecuentes en HCC (328–331).

## **5.2. GENES VINCULADOS A LA PROTECCIÓN ANTIOXIDANTE**

La glutatión S-transferasa Mu 2 (**GSTM2**) es una enzima antioxidante que desempeña un papel importante en el metabolismo celular y en la detoxificación, por lo que es clave en la resistencia al estrés oxidativo

confiriendo protección contra insultos tóxicos (332–335). GSTM2 es una isoenzima específica del músculo estriado (336) implicadas en muchos procesos celulares importantes, como las respuestas al estrés, la proliferación, la apoptosis, la oncogénesis, la progresión tumoral y la resistencia a los fármacos (337–339). Aunque se conoce poco acerca de la relación entre GSTM2 y el pronóstico del cáncer, se ha reportado que la falta de expresión de GSTM2 puede estar relacionada con la susceptibilidad al cáncer y que su actividad tiene un papel relevante en la prevención del daño del ADN (340,341). Se expresa en niveles bajos en algunos tipos de cáncer (339,342), en cambio, está altamente expresada en cáncer de hígado de ratón (343). En cáncer de próstata se ha propuesto como un potencial supresor de tumores (344).

La sirtuina 1 (**SIRT1**), una proteína desacetilasa, es el miembro más ampliamente expresado y estudiado de la familia de las sirtuinas (345,346). Se encuentra tanto en el núcleo como en el citoplasma y tiene un papel fundamental en el desarrollo del cáncer, la muerte celular programada, la regulación de la expresión génica, la reparación del ADN y los mecanismos de envejecimiento (347–350). SIRT1 controla la homeostasis energética durante el estrés celular y en ausencia de control promueve el envejecimiento celular para evitar la inestabilidad genómica (351). Así, SIRT1 regula la estabilidad del ADN y asegura la supervivencia de la célula (352,353). Está involucrada en las enfermedades del hígado graso y desempeña funciones beneficiosas en la regulación del metabolismo de los lípidos hepáticos, el control del estrés oxidativo hepático y la mediación de la inflamación hepática (354–357) por lo que se ha postulado como un potencial objetivo terapéutico para el tratamiento de NAFLD (358).

La sirtuina 6 (**SIRT6**), es una enzima histona desacetilasa considerada como la enzima pro-longevidad, la cual presenta múltiples funciones en el mantenimiento de la homeostasis celular, siendo crítica en la modulación de la expresión génica, el metabolismo, o la reparación del ADN y regulación de la vida útil (359–362). Se ha demostrado que SIRT6 desempeña un papel clave como supresor de tumores y modulador crítico de la homeostasis metabólica (363,364). En este contexto, recientemente se ha evidenciado que SIRT6 se relaciona con

la iniciación y desarrollo de tumores, como cáncer hepático, cáncer de pulmón, cáncer de mama y tumores del sistema genital, generalmente actuando como supresor tumoral (365), aunque se ha demostrado una función dicotómica en la determinación del destino celular que interfiere en la iniciación y progresión del cáncer (365). Los trastornos asociados con la deficiencia de SIRT6 incluyen diabetes, obesidad, disfunción inflamatoria, cáncer y envejecimiento poco saludable de los organismos (366–368). En cuanto al papel de SIRT6 en hígado, se ha descrito que la delección hepática específica de SIRT6 en ratones conduce a un aumento de la glucólisis, síntesis de triglicéridos, reducción de la beta-oxidación y formación de hígado graso (369), que SIRT6 juega un papel crítico en la protección contra el desarrollo de NASH y puede servir como un objetivo terapéutico potencial para combatir NASH (370) y como un biomarcador pronóstico del HCC (371). Además, SIRT6 regula varias vías metabólicas y prepara la transcripción para responder rápidamente a las fluctuaciones de energía, como los cambios en la disponibilidad de nutrientes, lo que sugiere un mecanismo por el cual SIRT6 mantiene un hígado sano (372). En definitiva, la importancia de SIRT6 en la biología humana y las enfermedades justifica más investigaciones sobre su función y potencial utilidad como diana terapéutica (373).

### 5.3. SUPRESORES TUMORALES

La proteína tumoral (**TP53**) es un supresor de tumores crítico que juega un papel fundamental y multifacético en el desarrollo y la terapia del cáncer (374–376), afectando prácticamente a todas las características distintivas del cáncer (377). La importancia de TP53 como supresor tumoral se destaca en el cáncer humano, donde es el gen mutado con más frecuencia, con mutaciones encontradas en una amplia variedad de tipos de cáncer (378–380). Las terapias dirigidas específicamente a aumentar o restaurar la función de TP53 han demostrado ser efectivas para provocar la regresión tumoral en modelos preclínicos (381,382). Puede ser activado por diversos estreses celulares, incluida la expresión de oncogenes, daño del ADN, hipoxia, disfunción metabólica y estrés replicativo, resultando su activación en una variedad de respuestas

celulares como apoptosis, senescencia celular, detención del ciclo celular, reparación del ADN, adaptaciones metabólicas y cambios en las características celulares (374,381). Además, ejerce un control sustancial sobre la homeostasis celular en estado estable, incluso antes de la activación por señales de estrés (383). Las perturbaciones de las funciones metabólicas reguladas por TP53 contribuyen a diversos trastornos metabólicos y son fundamentales durante la progresión del cáncer, jugando un papel fundamental en obesidad, diabetes tipo 2 y NAFLD (384–388).

La fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa (**PTEN**) se descubrió por primera vez como un supresor de tumores con funciones reguladoras de crecimiento y supervivencia (389–391) y, en los últimos años, se ha evidenciado su función como regulador metabólico (392), con efectos en la glucólisis, la gluconeogénesis, la síntesis de glucógeno, el metabolismo de lípidos y el metabolismo mitocondrial (392–394). Su papel en la carcinogénesis como supresor tumoral ha sido bien definido (395,396), pero se requiere más información acerca de su uso en aplicaciones clínicas y posibles terapias contra el cáncer (397). En este contexto, la pérdida de función PTEN es uno de los eventos más comunes observados en muchos tipos de cáncer humanos primarios y metastásicos (398,399). Además, respecto a las funciones de PTEN en la regulación metabólica, existen estudios que demuestran su acción en el desarrollo de la esteatosis hepática (395,396), así como su participación en resistencia a la insulina asociada con la obesidad (400).

El factor de crecimiento transformante beta1 (**TGF $\beta$ 1**) es una potente citocina que participa en la regulación del crecimiento celular, la proliferación celular y la apoptosis (401,402). TGF- $\beta$ 1 tiene un papel importante en procesos fisiopatológicos como la reparación de tejidos, la defensa inmunológica, la inflamación y la carcinogénesis (403). El papel de TGF $\beta$ 1 como supresor de tumores en la carcinogénesis es fundamental para mantener el control homeostático del crecimiento, no solo en las células premalignas, sino también en las células que progresan a través de las primeras etapas de la carcinogénesis (404,405). Sin embargo, se han encontrado datos contradictorios sobre

su participación en el desarrollo del cáncer, probablemente relacionado a su efecto pleiotrópico (406–408). También se ha estudiado el papel TGFB1 en el desarrollo de la fibrosis hepática (409), en la enfermedad del hígado graso asociado a la obesidad (410), en la progresión de NAFLD (411), en obesidad (412,413) y en la asociación entre obesidad y envejecimiento (414).

En los últimos años, numerosas evidencias científicas señalan que procesos biológicos fundamentales implicados en la carcinogénesis son regulados por la acción de mecanismos epigenéticos, como procesos relacionados con el ciclo celular, el crecimiento y la diferenciación celular, la replicación y la recombinación del ADN y/o la transformación y la progresión de la enfermedad, poniendo de manifiesto la importancia de comprender sistemáticamente esta regulación de la maquinaria celular y su papel en la patogenia del cáncer (415–419).

Por tanto, a luz de estos hallazgos, hoy en día la comunidad científica ha corroborado y reforzado el papel central de las aberraciones epigenéticas en la etiología del cáncer (420), manifestando que marcas epigenéticas, como la metilación del ADN, pueden considerarse marcadores potenciales del desarrollo y la progresión del cáncer (421,422).

## 6. REGULACIÓN EPIGENÉTICA

El concepto de epigenética (del griego epi, “en” o “sobre”, y – genética) fue establecido por primera vez en 1942 por Conrad Waddington, quien la definió como la rama de la biología que estudia las interacciones causales entre los genes y sus productos que dan lugar al fenotipo (423). Posteriormente, el término epigenética fue redefinido por varios autores y en la actualidad se define como la ciencia encargada de estudiar los cambios en la expresión de los genes que no implican alteraciones en la secuencia de nucleótidos del ADN subyacente del organismo (424–426).

En los últimos años, los estudios realizados en el campo de la epigenética han demostrado que el epigenoma, a diferencia del genoma que generalmente permanece inmutable a lo largo de la vida, puede ser modulado por el ambiente, en concreto por la acción de determinados factores externos como el estilo de vida, la dieta, la actividad física, el estrés, los ritmos circadianos, la exposición a toxinas o los tratamientos farmacológicos (427,428), de esta forma permitiendo al organismo proporcionar una respuesta dinámica en un corto período de tiempo (429). Así, la epigenética actúa como una conexión entre el genotipo y el fenotipo, determinando las complejas interacciones que tienen lugar entre el genoma y el ambiente y que afectan al desarrollo y la diferenciación de organismos pluricelulares (430).

Las marcas epigenéticas son estables y pueden transmitirse a las siguientes generaciones (431), aunque también pueden cambiar en respuesta a estímulos específicos del organismo (432). Por tanto, las marcas epigenéticas se caracterizan por ser adquiridas, heredables y reversibles (433).



## 6.1. MECANISMOS EPIGENÉTICOS

En la regulación epigenética están involucrados diversos mecanismos moleculares (**Figura 8**). Entre ellos, los más relevantes son (428,434):

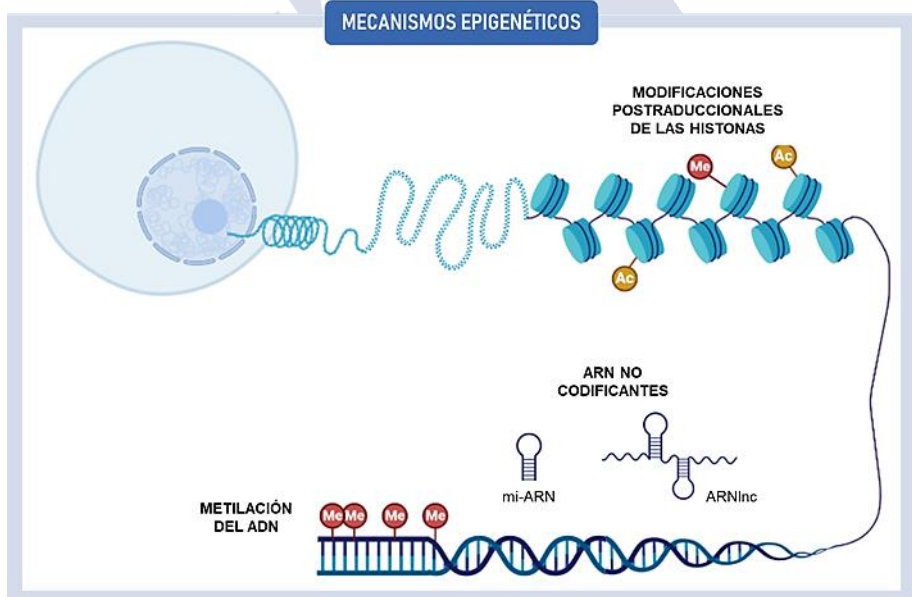
**Metilación del ADN.**

La metilación del ADN, foco de interés en nuestros estudios, es el mecanismo epigenético más abundante en el organismo humano y, en consecuencia, ha sido uno de los más estudiados en las últimas décadas (435).

**Modificaciones postraduccionales de las histonas (PTM).**

**ARN no codificantes (ARNnc).**

Estos incluyen a los microARN (mi-ARN) y a los ARN largos no codificantes (ARNlnc).



**Figura 8. Representación esquemática de los principales mecanismos epigenéticos.** Mi-ARN, micro ARN; ARNlnc, ARN pequeños no codificantes. Fuente: elaboración propia creada con BioRender.com

### 6.1.1. Metilación del ADN

La metilación del ADN es una marca epigenética por excelencia. Desempeña un papel importante en la regulación de la estructura de la cromatina y la expresión génica (435), es elativamente estable, específica de tejido, dinámica y heredada entre generaciones (436–438). En la mayoría de las células eucariotas, se define como el proceso bioquímico que implica la adición covalente de un grupo metilo (-CH<sub>3</sub>) al quinto carbono de la citosina (C), dando como resultado la 5-metilcitosina (5mC) (439). Esta actividad enzimática es catalizada por las enzimas ADN metiltransferasas (DNMTs) (440). Las principales DNMTs incluyen a la DNMT1, que interviene principalmente en el mantenimiento de los perfiles de metilación en cada replicación celular y preferentemente metila el ADN hemimetilado (441) y a las DNMT3a y DNMT3b, con una actividad de metilación *de novo* relativamente alta (442).

En mamíferos, la metilación del ADN generalmente se limita a las citosinas que están unidas a las guaninas por los grupos fosfato, llamados sitios CpG (440,443), aunque un pequeño porcentaje de metilación puede ocurrir en sitios no CpG como CHG y CHH (H = Adenina (A), Citosina (C) o Timina (T)) (440,444). Nuestro genoma tiene aproximadamente 28 millones de sitios CpG, de los cuales del 60 al 80% están metilados (444). Las regiones genómicas con una alta densidad de dinucleótidos CpG, conocidas como islas CpG (CGI), a menudo se encuentran en las regiones promotoras de los genes (445,446), aunque también aparecen en otros contextos como los cuerpos del gen, los sitios de inicio de la transcripción, los elementos reguladores y las secuencias de repetición (447,448). En general, la mayoría de las CGI ubicadas en los promotores no están metiladas para mantener la transcripción del gen activo (449), al contrario de lo que suele ocurrir en los sitios CpG de las regiones intergénicas (450).

Según esto, se ha establecido como regla general que la metilación en las regiones promotoras del gen se correlaciona con el silenciamiento génico, mientras que en el resto de regiones genómicas se correlaciona

positivamente con la expresión génica (435,447), aunque recientes estudios han determinado que no siempre ocurre así (451,452).

Recientemente, el análisis de la metilación del ADN se ha centrado en identificar las regiones diferencialmente metiladas (DMRs) entre diferentes condiciones biológicas (453). Las DMRs constituyen áreas del genoma con múltiples sitios CpG adyacentes con diferentes estados de metilación entre los fenotipos, consideradas potenciales regiones funcionales involucradas en la regulación transcripcional de los genes (454,455). Desde el punto de vista biológico, la metilación diferencial del ADN ha sido definida como una herramienta más interpretable y con mayor poder estadístico que los sitios CpG medidos individualmente (456). Estas características hacen que las DMRs sean consideradas potentes biomarcadores, los cuales podrían emplearse como alternativa a tratamientos basados en intervenciones terapéuticas (457,458).

La metilación del ADN está implicada en una multitud de procesos biológicos como la represión transcripcional, la inactivación del cromosoma X, el desarrollo embrionario, la impronta genómica o la inactivación de los transposones, entre otros (447,459). Sin embargo, la participación más significativa de la metilación del ADN en las células es el papel que ejerce en la expresión de los genes (435).

En este sentido, la evaluación de los niveles de metilación del ADN en el genoma humano se ha postulado como una herramienta poderosa en el manejo de enfermedades (439,460,461). En los últimos años, se han descrito importantes hallazgos acerca del uso de la metilación del ADN en las enfermedades autoinmunes, las enfermedades metabólicas, los trastornos psicológicos y en el envejecimiento (462).

### **6.1.2. Modificaciones postraduccionales de las histonas (PTM)**

Las PTM son los principales reguladores de la maquinaria epigenética debido a su capacidad para modular la expresión génica, la reparación del ADN y la condensación cromosómica (463). Las histonas son los componentes principales de la cromatina, proteínas que forman junto con el ADN los cromosomas (424). Después de la traducción, las histonas se pueden modificar mediante metilación, fosforilación, acetilación o ubiquitinación (464). Estos procesos químicos están asociados con la remodelación de la cromatina, produciendo un estado más o menos compactado que activa (eucromatina) o inactiva (heterocromatina) la transcripción del ADN (424).

Estas modificaciones pueden ocurrir en diferentes sitios de manera simultánea y su regulación puede tener lugar dentro del mismo sitio, entre diferentes colas de histonas o en la misma cola de histonas (430). Además, estos procesos requieren de metabolitos que actúen como cosustratos activadores o inhibidores, lo que ocasiona que el metabolismo pueda verse influenciado por el cambio en las concentraciones locales de estos metabolitos clave (465).

Las PTM están involucradas tanto en la homeostasis celular como en condiciones patológicas relacionadas con diversas enfermedades (464). Los últimos avances en metodologías analíticas han aportado información adicional sobre las PTMs de factores transcripcionales implicados en el desarrollo de enfermedades, evidenciando así su relevancia en la clínica (466). Específicamente, estudios recientes han revelado el efecto de las PTM sobre procesos celulares como la adipogénesis (467,468) y sobre trastornos metabólicos como la obesidad (469–471), la resistencia a la insulina (466) y la diabetes tipo 2 (472,473).

### 6.1.3. ARN no codificantes (ARNnc)

Los ARNnc son reguladores epigenéticos caracterizados por su potencial papel en la regulación de la cromatina (474). Están involucrados en el establecimiento y mantenimiento de muchas marcas epigenéticas y en la transmisión multigeneracional de los rasgos epigenéticos (475). Participan como factores transcripcionales relevantes en la modulación de las vías adaptativas en condiciones fisiológicas y patológicas, por lo que su uso en procesos de silenciamiento génico podría utilizarse como estrategia terapéutica (476). Estudios de genoma completo han determinado la existencia de diferentes tipos de ARNnc, clasificados en función de su tamaño en el genoma humano en mi-ARN y ARNlnc (477).

Los mi-ARN se definen como pequeñas moléculas de ARN no codificantes monocatenarias de entre 21 a 25 nucleótidos, conservadas evolutivamente. Representan del 1 al 5% del genoma humano y regulan al menos el 30% de los genes que codifican a las proteínas (478). Actualmente, se sabe poco sobre sus funciones biológicas, aunque existen evidencias de su papel en la regulación de la expresión génica en el control de diversas rutas metabólicas (479). Estudios recientes han destacado su uso potencial como dianas terapéuticas (480,481) y cada vez son más los estudios que describen a los mi-ARN como moléculas que afectan a vías determinantes para el control metabólico en los organismos superiores (482–484). En esta línea, varios mi-ARN se han relacionado con la regulación del desarrollo y metabolismo del tejido adiposo y con la secreción y acción de la insulina, indicando que su desequilibrio puede jugar un papel relevante en el desarrollo de la obesidad y sus complicaciones metabólicas asociadas (485–487).

Los ARNlnc se definen como moléculas de ARN no codificantes con más de 200 nucleótidos presentes en grandes cantidades en el genoma e implicadas en procesos como la remodelación de la cromatina y la regulación transcripcional y postranscripcional (488). Durante mucho tiempo se los consideró como el "ruido" transcripcional del genoma, por lo que su función es aún menos conocida que la de los mi-ARN (425). Sin embargo, en los últimos años estudios han

determinado que pueden ser elementos clave de la homeostasis celular (PMID: 22094949). Se han identificado varios ARNlnc por su papel en la regulación de la adipogénesis y el metabolismo energético (489–491), por lo que actualmente se están considerando como nuevas dianas terapéuticas para combatir enfermedades metabólicas y patologías asociadas (492–494).

## 6.2. LA EPIGENÉTICA EN LA ENFERMEDAD HUMANA

Como se ha descrito, la epigenética juega un papel importante en la regulación de muchos procesos celulares importantes en el organismo, incluyendo la patogenia de la enfermedad (461). La presencia de alteraciones aberrantes en los patrones globales de metilación del ADN se han asociado con diversas enfermedades humanas, como el cáncer (495,496), la hipertensión (497), las enfermedades cardiovasculares (498), los procesos inflamatorios (499), las enfermedades autoinmunes (499), la obesidad (500), la diabetes tipo 2 (501), el síndrome metabólico (502) y NAFLD (503).

A pesar de las evidencias científicas y de los recientes avances tecnológicos, los procesos moleculares implicados en la determinación de estos perfiles epigenéticos todavía se desconocen (417), evidenciando la necesidad por comprender cómo la epigenética regula la maquinaria celular en la patogénesis de la enfermedad (**Figura 9**).

En los últimos años, el creciente interés por el epigenoma se ha centrado en avanzar en el conocimiento de las marcas epigenéticas subyacentes a la fisiopatología de las enfermedades, con el objetivo de dirigir los tratamientos hacia una medicina de precisión y terapia personalizadas (504,505). En consecuencia, marcas epigenéticas como la metilación del ADN están emergiendo como potenciales biomarcadores de diagnóstico y pronóstico de numerosas patologías y enfermedades metabólicas (506–508).

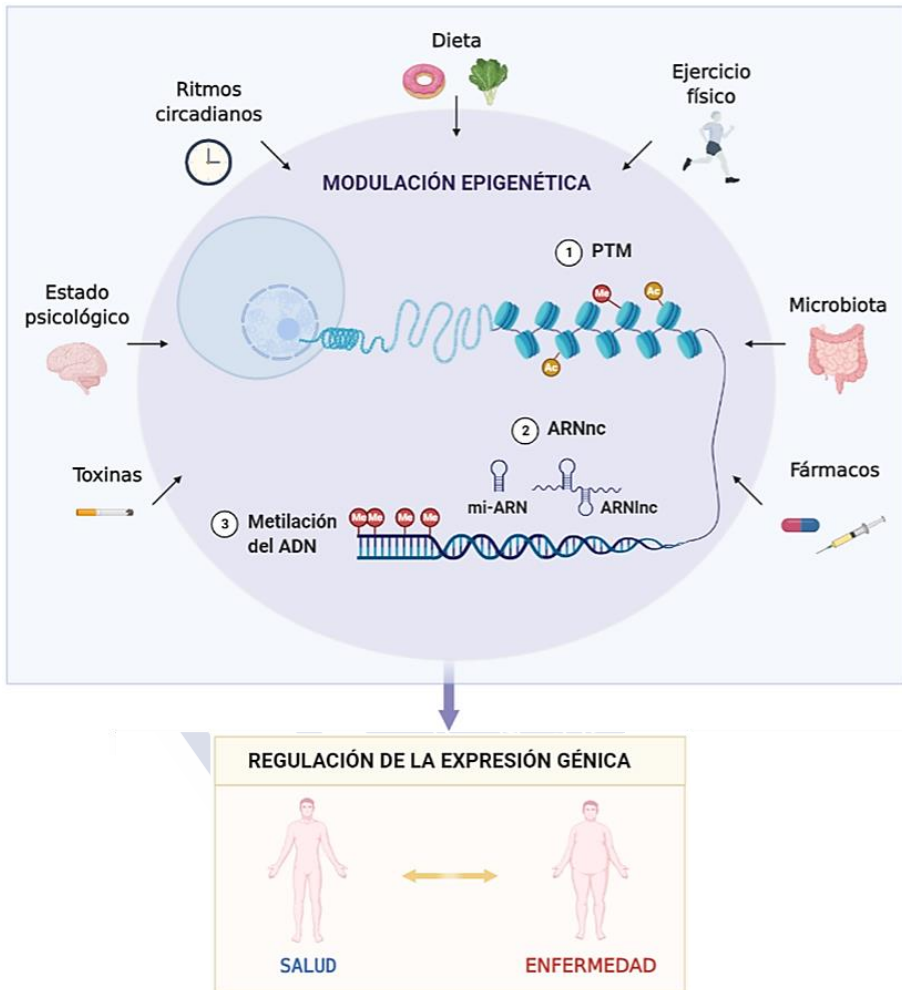


Figura 9. Representación de los principales factores y agentes externos contribuyentes a la modulación de la acción de los mecanismos epigenéticos y su potencial efecto sobre la salud y la enfermedad. Fuente: elaboración propia

### **6.2.1. Metilación del ADN en la obesidad y sus enfermedades asociadas**

Cada vez son más las evidencias científicas que demuestran la importancia de la metilación del ADN en el estudio de la obesidad y sus comorbilidades. Este creciente interés radica en el hecho de que esta marca epigenética está modulada por diferentes agentes externos, lo que la conecta con el efecto que ejercen factores como el ambiente y el estilo de vida en la determinación de las enfermedades metabólicas (509–511). En la actualidad, es posible identificar biomarcadores epigenéticos para la obesidad y sus patologías asociadas, los cuales se postulan como potenciales predictores del estado biológico específico de gran utilidad para el futuro de la medicina personalizada (512,513).

Los descubrimientos acerca del perfil de metilación global del ADN en obesidad han sido numerosos en la última década. Los principales hallazgos en esta línea han proporcionado nuevos y valiosos biomarcadores epigenéticos relevantes en la patogénesis del tejido adiposo relacionada con la obesidad (514–516).

Además, estudios recientes llevados a cabo en nuestro grupo de investigación también han evidenciado el reflejo de estas marcas epigenéticas del tejido adiposo obeso en leucocitos circulantes de sangre periférica de pacientes con obesidad (427,517), poniendo de manifiesto el potencial uso de este tipo de muestras mínimamente invasivas en estudios en lo que la recolección de muestras de tejido diana es cada vez más compleja (518,519).

En cuanto al efecto de la metilación del ADN en la promoción de las comorbilidades de la obesidad, existe abundante evidencia en la literatura. En este contexto, se han realizado análisis del perfil de metilación global del ADN en obesidad asociada a la resistencia a la insulina (418,520–522), en obesidad y NAFLD (523–525) y en la asociación entre la obesidad y el cáncer (91,526,527). Algunos de estos estudios fueron realizados por nuestro grupo de investigación.



Además, las conexiones entre intervenciones para pérdida de peso y las alteraciones epigenéticas también han sido analizadas. En esta línea, existen estudios que han demostrado el efecto que ejerce una determinada dieta, suplemento dietético o intervención nutricional, así como el tratamiento quirúrgico de la obesidad mediante cirugía bariátrica (528–530), sobre el epigenotipo en la obesidad (511,531–533) y enfermedades asociadas (75,534–536).





# HIPÓTESIS





Numerosos estudios han demostrado que la obesidad es el principal factor de riesgo para un conjunto cada vez mayor de enfermedades crónicas, entre las que se incluyen la NAFLD y el HCC. En este sentido, cada vez son más las evidencias epidemiológicas que muestran la fuerte asociación entre la obesidad y el HCC, indicando que muy probablemente la progresión del NAFLD inducido por la obesidad represente el puente o el vínculo en esta asociación. De hecho, se estima que la prevalencia de HCC relacionado con NAFLD aumente concomitantemente con la creciente epidemia de la obesidad. Sin embargo, los mecanismos moleculares subyacentes a la asociación entre la obesidad y el HCC todavía no están claros.

En la literatura se ha propuesto que la NAFLD y la esteatosis no alcohólica juegan un papel importante o que mediadores inflamatorios, metabólicos y endocrinos asociados a la obesidad también contribuyen a la hepatocarcinogénesis. En este contexto, la mayor parte de la investigación reciente se ha centrado en la disfunción del tejido adiposo obeso como potencial mediador entre la obesidad y sus comorbilidades y se ha puesto de manifiesto la relevancia de la regulación epigenética en la fisiopatología de la obesidad.

En base a estos hallazgos y a estudios realizados previamente por el grupo, hipotetizamos que los factores secretados por el tejido adiposo obeso disfuncional, responsables de desencadenar inflamación y estrés oxidativo en tejidos periféricos como el hígado, podrían actuar como potenciales promotores en el desarrollo de un microambiente favorable para el inicio de la carcinogénesis hepática y que este efecto podría estar mediado por mecanismos epigenéticos como la metilación del ADN.



# OBJETIVOS







El principal objetivo de la presente tesis doctoral consistió en evaluar la expresión de genes implicados en las primeras fases del desarrollo tumoral, específicamente en hígado, y su reflejo y regulación epigenética en los leucocitos circulantes de sangre periférica, según el grado de adiposidad y tras una intervención nutricional para inducir pérdida de peso en modelos animales y pacientes con obesidad.

Dicho objetivo principal se desglosó en los siguientes objetivos específicos:

1. Investigar si la obesidad en sí misma y el microambiente relacionado con la obesidad (p. ej., estrés oxidativo e inflamación) pueden inducir la expresión diferencial de genes comúnmente asociados con la fase inicial de la carcinogénesis en el hígado y tejido adiposo de ratas obesas y su reflejo en leucocitos circulantes de pacientes con obesidad.
2. Explorar si los cambios moleculares observados en el modelo de obesidad en ratas y en pacientes con obesidad en relación a la disfunción y carcinogénesis hepática podrían revertirse después de intervenciones para pérdida de peso.
3. Evidenciar el efecto del secretoma de tejido adiposo y el suero de pacientes con obesidad severa sobre la expresión de genes relacionados con la esteatosis y la carcinogénesis en una línea celular hepática y su reversibilidad mediante el tratamiento con cuerpos cetónicos.
4. Estudiar los niveles de metilación de los genes relacionados con la esteatosis y la carcinogénesis hepática en leucocitos circulantes de pacientes con obesidad y tras pérdida de peso inducida por una intervención nutricional.



# **MATERIAL Y MÉTODOS**





## 1. ESTUDIOS *IN VIVO*

### 1.1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Los procedimientos experimentales con animales incluidos en la presente tesis doctoral fueron realizados en la Universidad de Santiago de Compostela y aprobados por el Comité de Ética de Experimentación Animal (CEEA) de la Consellería de Medio Rural de la Xunta de Galicia, registrados bajo el número de procedimiento 15005/2015/003 (IP: Felipe Casanueva Freijo), de acuerdo a la legislación vigente europea y española para el cuidado y uso de animales de experimentación (Directiva 2010/63/UE del Parlamento y Consejo Europeo del 22 de septiembre de 2010 relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos; Real Decreto 53/2013, del 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia).

Los certificados de capacitación en materia de protección de animales utilizados, criados o suministrados con fines de experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia conforme con la Orden ECC/566/2015 de 20 de marzo son B522, C560 y D316, expedidos por la Consellería de Medio Rural de la Xunta de Galicia – Agencia Gallega de la Calidad Alimentaria.

Los centros usuarios autorizados donde se realizó la experimentación con animales fueron las instalaciones del Animalario de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Santiago de Compostela, con código REGA ES 150780263401, y del Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago de Compostela (IDIS), con código REGA ES 1507802928[01].

Todos los animales de experimentación fueron mantenidos bajo condiciones controladas de temperatura de 20-24°C y ciclos de 12h de luz/oscuridad, con un periodo de aclimatación de 4-7 días previo al inicio de cualquier experimento donde tuvieron acceso libre a agua y comida estándar. La estabulación de los animales fue colectiva (a excepción de los casos en los que se requiera una estabulación individual) para preservar el comportamiento social de los mismos. Una valoración del correcto aspecto físico y adaptación de los animales fue seguida periódicamente con el fin de minimizar el posible estrés, sufrimiento o angustia generado durante el desarrollo de los distintos procedimientos experimentales.

Para todos los animales, la monitorización semanal del peso corporal e ingesta de alimentos se determinó mediante una balanza de precisión y el registro la composición corporal se evaluó periódicamente por resonancia magnética nuclear usando un sistema EchoMRI-700 (Echo Medical Systems, Houston, TX, EE. UU.). La ingesta de alimentos fue promediada en función del número de individuos por caja.

Al término de los experimentos, los animales fueron eutanasiados por decapitación. Inmediatamente, se recogieron muestras de sangre del tronco, que se mantuvieron a 4°C y, su llegada al laboratorio, se centrifugaron a 3500 rpm durante 15 minutos a una temperatura de 4°C para la obtención de plasma, que fue almacenado a -80°C para posteriores mediciones bioquímicas.

Los órganos y tejidos extraídos fueron pesados y congelados en hielo seco y, su llegada al laboratorio, almacenados a -80°C hasta el momento de su posterior procesamiento y análisis. Para el estudio histológico de las muestras hepáticas, la fijación de las piezas se realizó en paraformaldehído al 4% para su posterior inclusión en parafina.

### 1.1.1. Cepas de roedores y dietas

La caracterización de los animales empleados en los distintos modelos experimentales se detalla a continuación.

- Ratas macho de la cepa Zucker de 5 y 8 semanas de edad, fenotipo delgado (Fa/fa) y obeso (fa/fa), procedentes de los Laboratorios Charles River de Barcelona.
- Ratas macho de la cepa Sprague Dawley de 3 semanas de edad, procedentes del Animalario Central de la Universidad de Santiago de Compostela.
- Ratones macho de la cepa C57BL/6J de 8 semanas de edad, procedentes del Animalario Central de la Universidad de Santiago de Compostela.

La alimentación de los animales se realizó en base a dos tipos de dieta, cuya composición calórica de macronutrientes constaba de lo siguiente:

- Dieta estándar de animalario, compuesta por 5,5% de lípidos, 23% de proteínas y 70% de carbohidratos (3,5 Kcal/g) (SAFE-Panlab, Barcelona, España).
- Dieta alta en grasa, compuesta por 60% de lípidos, 20% de proteínas y 20% de carbohidratos (5,24 Kcal/g) (*High Fat Diet* D12492; Research Diets, Inc., New Brunswick, NJ, EE. UU.).

## 1.1.2. Diseños experimentales

### 1.1.2.1. Modelo de obesidad monogénica

Se seleccionaron las ratas de la cepa Zucker como modelo de obesidad genética (153,537), cuyo proceso experimental constó de dos partes (**Figura 10**).

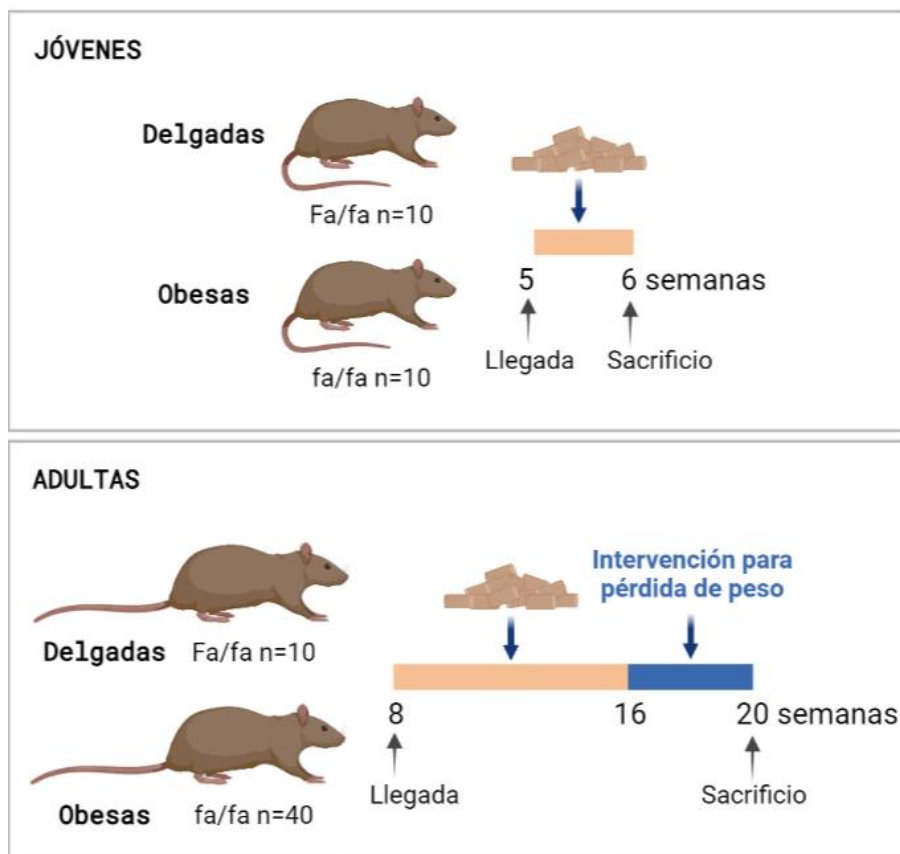


Figura 10. Representación del diseño experimental empleado en ratas Zucker como modelo de obesidad genética. n, tamaño muestral. Fuente: elaboración propia creada con BioRender.com



En la primera parte, se emplearon un total de 20 ratas jóvenes (5 semanas de edad) obesas y delgadas (n=10/grupo experimental), mantenidas *ad libitum* con dieta estándar y eutanasiadas después de una semana de experimento (6 semanas de edad).

En la segunda parte, se emplearon un total de 50 ratas adultas (8 semanas de edad) obesas (n=40) y delgadas (n=10), mantenidas *ad libitum* con dieta estándar durante 8 semanas y eutanasiadas tras 12 semanas de periodo experimental (20 semanas de edad). Parte del set de ratas adultas obesas (n=30) fueron sometidas a intervenciones para pérdida de peso basadas en restricción energética y/o ejercicio durante las últimas 4 semanas de experimento, mientras que el grupo de ratas obesas control (n=10) se mantuvieron *ad libitum* con dieta estándar, al igual que el grupo de ratas adultas delgadas.

Al término de la fase 1 o fase de engorde, después de las 8 semanas de alimentación *ad libitum* con dieta estándar, las ratas adultas obesas se dividieron aleatoriamente en los siguientes grupos experimentales de acuerdo a los protocolos para pérdida de peso seleccionados (**Figura 11**): grupo Ad-L, ratas obesas control, grupo ER, ratas sometidas a restricción energética, grupo EX, ratas sometidas a ejercicio, y grupo EREX, ratas sometidas a restricción energética y ejercicio (n=10/grupo experimental).

A lo largo de este periodo de intervenciones de 4 semanas, designado como fase 2 o fase de dieta y ejercicio, las ratas del grupo Ad-L control continuaron su alimentación *ad libitum* con dieta estándar, como se ha descrito previamente, y el resto de grupos se sometieron a los distintos protocolos experimentales que se detallan seguidamente.

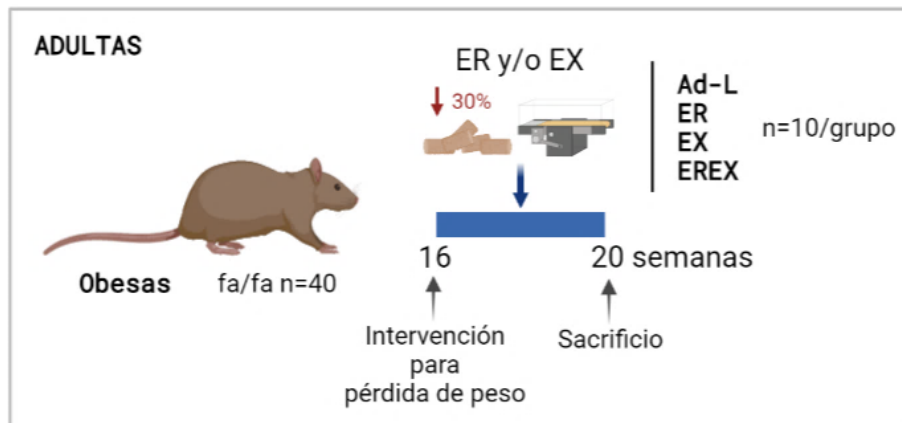


Figura 11. Representación de los protocolos de intervención para pérdida de peso basados en restricción energética y/o ejercicio en ratas Zucker adultas. n, tamaño muestral; Ad-L, grupo de ratas obesas control ad libitum; ER, grupo de ratas restricción energética; EX, grupo de ratas ejercicio; EREX, grupo de ratas restricción energética y ejercicio. Fuente: elaboración propia creada con BioRender.com

#### 1.1.2.1.1. Protocolo de restricción energética de la dieta

En el grupo ER, el protocolo de restricción energética se basó en una reducción del 30% de la ingesta de alimento respecto a los datos medios registrados la semana anterior. Para ello, las ratas se estabularon de manera individual durante el tiempo establecido para la intervención (4 semanas). En la primera semana, se registró la ingesta individual de los animales para promediar la cantidad de comida (peso en gramos) correspondiente a un 30% menos del total que ingerían en cada caso. El resto de semanas del protocolo, consistieron en alimentar a las ratas con esta restricción del 30% respecto a la ingesta *ad libitum*.

En el grupo EREX, las ratas fueron sometidas a una intervención para pérdida de peso que combina este protocolo de restricción energética junto con el un protocolo de ejercicio, el cual se describe a continuación.

#### 1.1.2.1.2. Protocolo de ejercicio físico

En el grupo EX, el protocolo de ejercicio se basó en poner a correr a las ratas en una cinta rodante para roedores (*Treadmill system* 303401-R-04/C, TSE-Systems, Inc., Chesterfield, MO, EE. UU.). Durante la primera semana, el tiempo de exposición a la cinta fue de 10 minutos/día, con una velocidad inicial de 10 m/min aumentada hasta una final de 20 m/min, y con una inclinación de 0°. Una vez los animales se familiarizaron con el equipo, durante las últimas semanas el tiempo sobre la cinta alcanzó los 30 minutos/día, a una velocidad estable de 20 m/min y con una inclinación de 0°. Para incitar a las ratas a correr y permanecer en la cinta, el equipo incorpora en la parte de atrás un dispositivo que aplica un ligero estímulo eléctrico cuya intensidad no supera los 3 mA.

Por último, como se ha mencionado anteriormente, los animales pertenecientes al grupo experimental EREX fueron alojados individualmente y sometidos a ambos protocolos de pérdida de peso descritos (restricción energética + ejercicio).

#### 1.1.2.2. Modelo de obesidad inducida por la dieta

Se adquirieron ratas de la cepa Sprague Dawley y ratones de la cepa C57BL/6J para seguir una alimentación basada en una dieta alta grasa con el fin de obtener roedores con obesidad inducida por la dieta (DIO) (**Figura 12**).

Se emplearon 26 ratas Sprague Dawley (3 semanas de edad), asignadas al azar en dos grupos experimentales, grupo de ratas DIO (n=14) y grupo de ratas delgadas control (n=12). Durante un periodo de 12 semanas, ambos grupos fueron mantenidos *ad libitum* hasta su sacrificio (21 semanas de edad), bajo una dieta alta en grasa para el grupo de ratas DIO y una dieta estándar para el grupo de ratas delgadas.

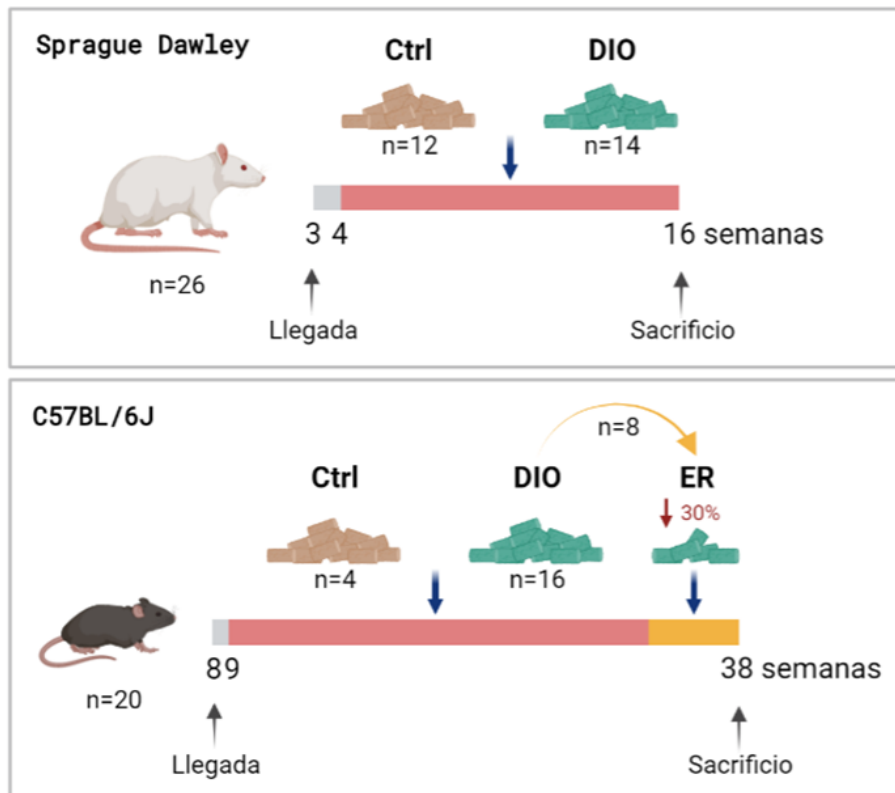


Figura 12. Representación del diseño experimental empleado en ratas Sprague Dawley y ratones C57BL/6J como modelo de obesidad inducida por la dieta. n, tamaño muestral; Ctrl, grupo de roedores control; DIO, grupo de roedores con obesidad inducida por la dieta; ER, grupo de ratones con restricción energética. Fuente: elaboración propia creada con BioRender.com

Se emplearon 20 ratones de la cepa C57BL/6J (8 semanas de edad), agrupados al azar como grupo de ratones DIO ( $n=16$ ) y grupo de ratones delgados control ( $n=4$ ). Se empleó una dieta alta en grasa para el grupo de ratones DIO y una dieta estándar para el grupo de ratones delgados, cuya alimentación *ad libitum* se mantuvo durante 29 semanas hasta el sacrificio de los animales (38 semanas de edad). Antes de finalizar el presente experimento, parte del grupo de ratones DIO ( $n=8$ ), se sometieron a un protocolo de pérdida de peso durante las 3 últimas semanas. Esta intervención se basó en una restricción calórica, bajo la

cual los animales fueron alimentados con un 30% menos en cantidad de ingesta respecto a los datos medios registrados las semanas anteriores. El protocolo llevado a cabo fue el mismo que se especifica en el apartado anterior sobre la restricción energética de la dieta.

## 1.2. PACIENTES

Los procedimientos experimentales realizados a partir de muestras procedentes de los participantes reclutados en las distintas cohortes de estudio e incluidos en la presente tesis doctoral fueron realizados en el Grupo de Epigenómica en Endocrinología y Nutrición del Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago de Compostela (IDIS).

Todos los participantes de los estudios recibieron un consentimiento informado por escrito validado y aprobado por el Comité de Ética y los protocolos de estudio fueron aprobados por las Juntas de Revisión Institucional correspondientes a cada institución participante (CEIC Galicia No. 2009/076; CI: 40/13, PNK-DHA 2013-01).

Todas las mediciones antropométricas se realizaron por duplicado y en condiciones de reposo, después de un ayuno nocturno de 8 a 10 horas. Todos los participantes fueron pesados en una báscula calibrada (báscula Seca 200, Medical Resources, EPI Inc OH, EE.UU.). El IMC se calculó como el peso corporal en kg, dividido por el cuadrado de la altura corporal en metros ( $IMC = \text{peso (kg)} / \text{altura (m}^2\text{)}$ ). La circunferencia de la cintura (CC) se midió utilizando una cinta métrica estándar flexible no elástica colocada sobre el punto medio entre la última costilla y la cresta ilíaca, con el paciente de pie y exhalando.

Para todas las cohortes de estudio, la recolección de las muestras de sangre se realizó después de ayunar durante la noche en tubos específicos para la obtención de plasma y células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) (Tubos con EDTA Vacutainer, BD Biosciences, Madrid, España) y en tubos específicos para la obtención de suero (Tubos con gel SST™ II Vacutainer, BD Biosciences, Madrid,

España), según la cohorte de estudio y procedimiento experimental posterior.

El plasma y el suero se separaron por centrifugación a 3.500 g durante 15 minutos a 4°C y seguidamente se conservaron en alícuotas a -80°C para análisis posteriores. La fracción de PBMCs se aisló mediante centrifugación por gradiente de densidad utilizando el reactivo Polymorphprep Axis Shield (Axis-Shield Diagnostics, Oslo, Noruega) de acuerdo a las indicaciones del fabricante. Tras la centrifugación diferencial, la fracción celular correspondiente a las PBMCs se resuspendió en 1,5 ml de reactivo Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU.) e inmediatamente las alícuotas se congelaron a -80°C para procedimientos posteriores de extracción de ARN.

La recolección de las muestras de sangre total para la extracción de ADN genómico se realizó después de ayunar durante la noche en tubos específicos (Tubos con EDTA Vacutainer, BD Biosciences, Madrid, España) y se conservaron en alícuotas a -80°C.

La recolección de las muestras de tejido adiposo blanco se realizó en el momento en el que se intervino a los pacientes con obesidad severa a una cirugía bariátrica. Las muestras extraídas desde depósitos de tejido adiposo subcutáneo bajo la piel (zona hipocondrial izquierda), y desde depósitos de tejido adiposo visceral localizados alrededor de órganos internos (zona hipocondrial-flanco izquierdo), se recogieron en condiciones estériles en tubos con solución salina tamponada con fosfato 1X (PBS) (Lonza Group, Basilea, Suiza) suplementado con 1% penicilina/estreptomicina (Lonza Group, Basilea, Suiza) para la posterior obtención de secretoma.

## 1.2.1. Cohortes

### 1.2.1.1. Cohortes transversales

#### 1.2.1.1.1. *Sujetos normopeso*

La población incluyó 41 sujetos con una edad comprendida entre 18 y 65 años y un  $IMC \leq 25 \text{ kg/m}^2$ .

Todos los participantes fueron reclutados en colaboración con el Servicio de Endocrinología y Nutrición del Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela y manifestaban un buen estado de salud de acuerdo a un examen físico inicial y a los resultados hematológicos y bioquímicos analizados de rutina.

Los participantes informaron que no usaban suplementos a base de vitaminas y/o minerales, ni que recibieran prescripción regular de medicamentos durante los 3 meses anteriores.

#### 1.2.1.1.2. *Pacientes con obesidad*

La población incluyó 28 sujetos con una edad comprendida entre 18 y 65 años y un  $IMC > 35 \text{ kg/m}^2$ .

Todos los participantes fueron reclutados en colaboración con el Servicio de Endocrinología y Nutrición del Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela. Ninguno de los participantes padecía ninguna otra enfermedad distinta a la obesidad, de acuerdo a su historial médico, así como a un examen físico inicial y a los resultados hematológicos y bioquímicos analizados de rutina.

Los participantes informaron que no usaban suplementos a base de vitaminas y/o minerales, que estuvieron libres de cualquier infección en el mes anterior al estudio y su peso corporal se había mantenido estable durante al menos 3 meses antes del estudio.

### 1.2.1.2. Cohortes longitudinales

#### *1.2.1.2.1. Pacientes con obesidad sometidos a una intervención nutricional*

La población incluyó un grupo de pacientes con obesidad ( $\text{IMC} > 30 \text{ kg/m}^2$ ) participantes en un estudio longitudinal de intervención nutricional para pérdida de peso. Específicamente, 10 sujetos con una media de edad de  $48,8 \pm 9,2$  años y un IMC promedio de  $32,9 \pm 1,4 \text{ kg/m}^2$ , reclutados en colaboración con el Servicio de Endocrinología y Departamento de Nutrición del Hospital Clínico Universitario de Valladolid.

Esta intervención tuvo una duración máxima de 6 meses y los análisis se realizaron a partir de las muestras recogidas a los 0 (Basal), a los 30 (Máxima Cetosis) y a los 180 días (Punto Final) desde el inicio del tratamiento.

Todos los participantes del estudio estaban recibiendo tratamiento por obesidad y manifestaron no presentar ninguna condición médica grave distinta a la obesidad y el síndrome metabólico, información validada por su historial médico, examen físico inicial y resultados hematológicos y bioquímicos analizados de rutina.

Los criterios generales de inclusión fueron tener una edad comprendida entre 18 y 65 años,  $\text{IMC} > 30 \text{ kg/m}^2$ , peso corporal estable en los 3 meses anteriores, deseo manifiesto de perder peso y antecedentes de esfuerzos dietéticos fallidos. Los principales criterios de exclusión fueron alteración tiroidea, diabetes mellitus, obesidad inducida por otros trastornos endocrinos o fármacos y participación en cualquier programa activo de pérdida de peso en los 3 meses anteriores.

Además, pacientes con cirugía bariátrica previa, abuso reportado o sospechado de narcóticos o alcohol, depresión severa o cualquier otra enfermedad psiquiátrica, insuficiencia hepática grave, cualquier tipo de insuficiencia renal o episodios de gota, nefrolitiasis, neoplasia, casos previos de enfermedad cardiovascular o enfermedad cerebrovascular,



hipertensión no controlada, hipotensión ortostática y alteraciones hidroelectrolíticas o electrocardiográficas fueron excluidos. Mujeres embarazadas, en periodo de lactancia, con intención de embarazo y en edad fértil potencial que no estaban usando métodos anticonceptivos adecuados también fueron excluidas.

### 1.2.2. Diseños experimentales

#### 1.2.2.1. Intervención nutricional basada en una dieta cetogénica muy baja en calorías

La intervención nutricional se basó en un programa de adelgazamiento comercial de cinco pasos (método PNK<sup>®</sup>) (63). Este método consiste en un tratamiento médico de pérdida de peso que combina dieta y recomendaciones de ejercicio (**Figura 13**).

Los primeros tres pasos del programa de pérdida de peso radican en el seguimiento de una VLCKD (600-800 kcal/día), baja en carbohidratos (<50 g de vegetales/día) y lípidos (10 g de aceite de oliva/día) y con aporte de proteínas de alto valor biológico (0,8-1,2 g de proteína/kg de peso corporal ideal). A lo largo de estas fases cetogénicas, la cetosis se determinó midiendo los cuerpos cetónicos, específicamente beta-hidroxibutirato, en sangre capilar utilizando un medidor portátil (GlucoMen LX Sensor, A. Menarini Diagnostics, Neuss, Alemania) tras un ayuno nocturno de 8-10 horas y el estado de cetosis total no superó los 60 días.

En los dos últimos pasos del programa, se inicia el seguimiento de una dieta hipocalórica (800-1500 kcal/día) que incorpora de manera progresiva los diferentes grupos de alimentos. La dieta de mantenimiento consistió en un plan de alimentación equilibrado (1500-2000 kcal/día) con el objetivo de mantener la pérdida de peso y promover un estilo de vida saludable.

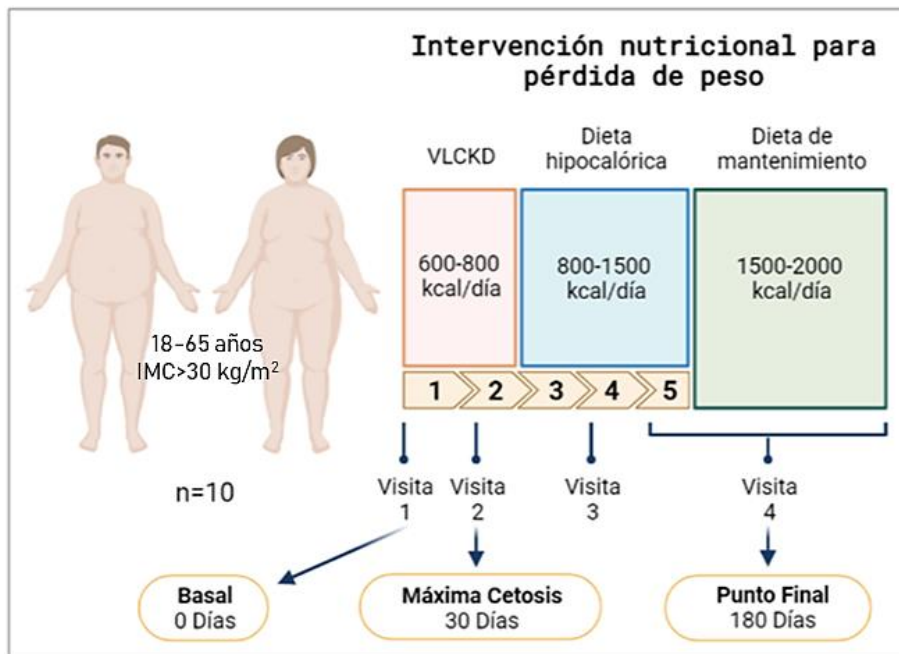


Figura 13. Representación del programa de intervención nutricional y esquema de visitas basado en una dieta cetogénica muy baja en calorías. n, tamaño muestral; IMC, índice de masa corporal; VLCKD, dieta cetogénica muy baja en calorías. Fuente: elaboración propia creada con BioRender.com

Durante este estudio, los pacientes siguieron los pasos del método hasta alcanzar el peso objetivo o hasta un máximo de 6 meses de seguimiento, aunque los pacientes permanecieron bajo supervisión médica durante los meses siguientes.

Para determinar la evolución de cada paciente y evaluar la adherencia y los posibles efectos secundarios, se establecieron visitas de acuerdo a los pasos del programa de cetosis y pérdida de peso: visita 1 (Inicio o Basal), visita 2 (Máxima cetosis), visita 3 (Cetosis reducida) y visita 4 (Punto final o criterio de valoración). En todas las visitas, los pacientes se sometieron a antropometría completa, composición corporal y evaluación bioquímica, además de recibir instrucciones dietéticas, asesoramiento de apoyo y estímulo para hacer ejercicio de forma regular.

### 1.2.2.2. Obtención de secretoma de tejido adiposo

Como se ha indicado previamente, las muestras de SAT y VAT a partir de las cuales se obtuvo el secretoma, procedían de 6 pacientes con obesidad severa sometidos a cirugía bariátrica en el Servicio de Endocrinología y Nutrición del Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela.

Las muestras recogidas en tubos con PBS 1X (Lonza Group, Basilea, Suiza) suplementado con 1% penicilina/estreptomicina (Lonza Group, Basilea, Suiza) se procesaron en condiciones estériles. Se realizaron una serie de lavados en PBS con 1% penicilina/estreptomicina y se retiraron restos de vasos sanguíneos con ayuda de un bisturí.

Con las muestras ya limpias, fragmentos de aproximadamente 2-3 g de tejido se distribuyeron en placas de 6 pocillos conteniendo 3 ml de Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) con 4,5 g/L glucosa, sin L-glutamina, sin rojo fenol (Lonza Group, Basilea, Suiza) suplementado con 1% penicilina/estreptomicina y se mantuvieron en cultivo a 37°C con 5% CO<sub>2</sub> durante 2 horas. Seguidamente, se retiró este medio, se añadió medio fresco y se incubó a 37°C con 5% CO<sub>2</sub> durante 16-18 horas. Tras este tiempo, se realizó otro reemplazo de medio que se mantuvo en cultivo a 37°C con 5% CO<sub>2</sub> durante 24 horas.

Finalizada esta incubación, los medios conteniendo factores secretados por las muestras de tejido adiposo o secretomas, se recogieron en condiciones estériles en alícuotas de 1,5 ml y se conservaron a -80°C hasta su uso posterior.



## **2. ESTUDIOS *IN VITRO***

### **2.1. LÍNEA CELULAR HEPARG**

La línea celular HepaRG se estableció a partir de una paciente afectada por hepatocarcinoma, en concreto un tumor hepático bien diferenciado grado I de Edmondson, e infección por hepatitis C. Es una línea celular progenitora bipotente humana capaz de diferenciarse hacia dos fenotipos celulares diferentes, células similares a las biliares y células similares a los hepatocitos (538).

Las células HepaRG diferenciadas (dHepaRG) comparten algunas características y propiedades con los hepatocitos adultos y poseen la capacidad de expresar de manera estable las características específicas del hígado, como los genes albúmina (ALB), aldolasa B (ALDOB) y citocromo P450 3A4 (CYP3A4) (539,540).

#### **2.1.1. Cultivo celular**

Las células HepaRG (HPRGC10, Gibco, ThermoScientific, Waltan, MA, EE.UU.) fueron mantenidas en monocapa a 37°C con 5% CO<sub>2</sub> utilizando como medio de crecimiento E de William con GlutaMAX (Gibco, ThermoScientific, Waltan, MA, EE.UU.), suplementado con 10% suero bovino fetal (FBS) (Sigma-Aldrich; Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) y 1% penicilina/estreptomicina (Lonza Group, Basilea, Suiza).

El subcultivo se produjo al 80% de confluencia mediante un lavado con solución salina tamponada con fosfato 1X (PBS) (Lonza Group, Basilea, Suiza) e incubación de 1-2 minutos con solución de tripsina-EDTA al 0.25% (Sigma-Aldrich; Merck KGaA, Darmstadt, Alemania)

en ratios 1:3-1:5. El medio de crecimiento fue renovado cada 2-3 días durante la fase de mantenimiento, donde las células proliferan con un tiempo de duplicación de alrededor de 24 horas.

La criopreservación se realizó a partir del pellet celular, obtenido tras una centrifugación a 500 g durante 3 minutos, en medio de congelación (FBS (Sigma-Aldrich; Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) suplementado con 10% dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich; Merck KGaA, Darmstadt, Alemania)).

## **2.1.2. Tratamientos**

### **2.1.2.1. Diferenciación**

El proceso de diferenciación de la línea celular HepaRG consiste en la exposición de las células al 2% DMSO tras 21 días de mantenimiento en cultivo a 37°C con 5% CO<sub>2</sub>.

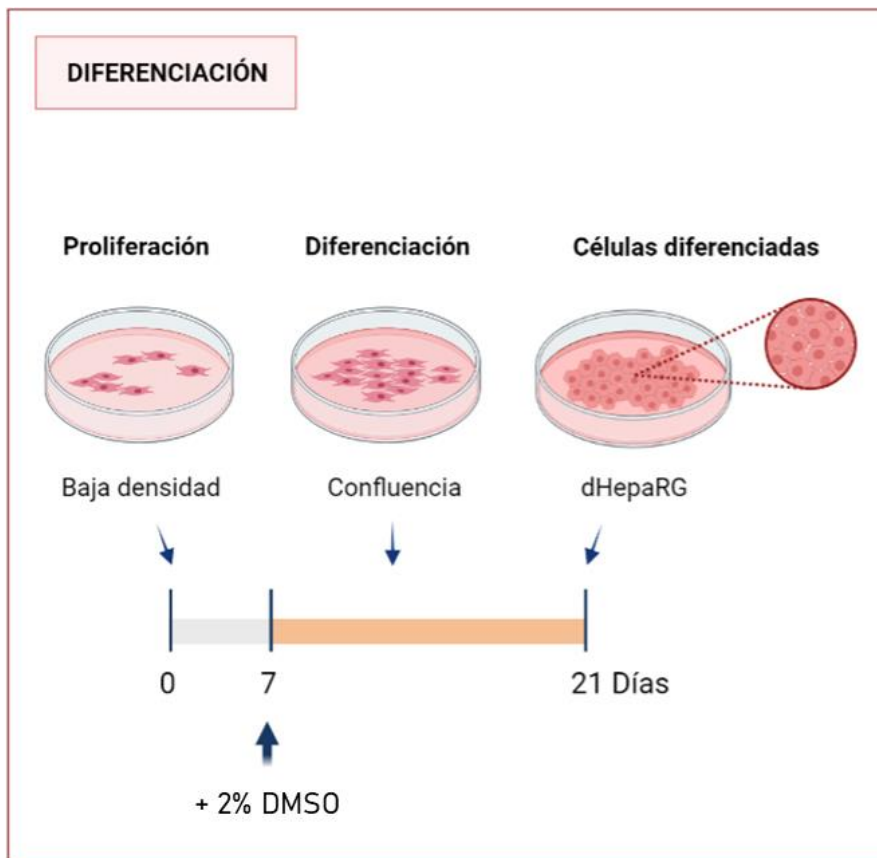
Los medios empleados durante este proceso fueron los siguientes:

- Medio de proliferación: E de William con GlutaMAX (Gibco, ThermoScientific, Waltan, MA, EE.UU.), suplementado con 10% suero bovino fetal (FBS) (Sigma-Aldrich; Merck KGaA, Darmstadt, Alemania), 1% penicilina/estreptomicina (Penicillin-Streptomycin Mixture, Lonza Group, Basilea, Suiza), 5 µg/ml de insulina (Insulina humana 100 UI/ml, Actrapid, Novo Nordisk Pharma S.A., Bagsværd, Dinamarca) y 0,5 µM hemisuccinato de hidrocortisona (Sigma-Aldrich; Merck KGaA, Darmstadt, Alemania).
- Medio de diferenciación: E de William con GlutaMAX (Gibco, ThermoScientific, Waltan, MA, EE.UU.), suplementado con 10% suero bovino fetal (FBS) (Sigma-Aldrich; Merck KGaA, Darmstadt, Alemania), 1% penicilina/estreptomicina (Penicillin-Streptomycin Mixture,

Lonza Group, Basilea, Suiza), 5 µg/ml de insulina (Insulina humana 100 UI/ml, Actrapid, Novo Nordisk Pharma S.A., Bagsværd, Dinamarca), 50 µM hemisuccinato de hidrocortisona (Sigma-Aldrich; Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) y 2% DMSO (Sigma-Aldrich; Merck KGaA, Darmstadt, Alemania).

El procedimiento experimental seguido durante el proceso de diferenciación se realizó de acuerdo a un protocolo previamente diseñado (138) que se describe a continuación (**Figura 14**):

- Día 0 - Siembra: Se siembran las células HepaRG a baja densidad ( $2,5 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup>) en placas de cultivo con el volumen apropiado de medio de proliferación. En nuestro caso, las condiciones fueron en placas de 6 pocillos con 250.000 células/pocillo en 2 ml de medio.
- Día 2 y 4 - Cambio de medio: Se aspira el medio, se lavan las células con 1 ml de PBS y añaden 2 ml de medio de proliferación por pocillo. Las células se mantienen en crecimiento hasta la confluencia.
- Día 7 - Adición de medio de diferenciación: Las células 100% confluentes se lavan con 1 ml de PBS y se añaden 2 ml de medio de diferenciación por pocillo.
- Día 8, 9, 12, 15 y 18 - Cambio de medio: Se aspira el medio, se lavan las células con 1 ml de PBS y añaden 2 ml de medio de diferenciación por pocillo.
- Día 21 - Diferenciación: Las células se observan bajo el microscopio como cultivos diferenciados confluentes que denominamos células HepaRG diferenciadas (dHepaRG).



**Figura 14. Representación esquemática del proceso de diferenciación de la línea celular HepaRG.** DMSO, dimetilsulfóxido. Fuente: elaboración propia creada con BioRender.com

Tras finalizar la diferenciación, parte de las células dHepaRG se recogen como extractos celulares y se conservan a  $-80^{\circ}\text{C}$  para extracciones de ARN.

El resto de las células dHepaRG se mantienen en cultivo a  $37^{\circ}\text{C}$  con  $5\% \text{ CO}_2$  en medio de diferenciación para continuar con tratamientos de inducción de esteatosis.



## 2.1.2.2. Modelos de inducción de esteatosis *in vitro*

### 2.1.2.2.1. Inducción mediante oleato

El tratamiento de células dHepaRG con la sal de ácido graso oleato de sodio ha sido establecido como modelo celular *in vitro* de esteatosis vesicular hepática, ya que dicho tratamiento conduce a la generación de pequeñas gotas de lípidos citoplasmáticos imitando los efectos del hígado graso (136,539).

La inducción de esteatosis *in vitro* en células dHepaRG tratadas con 250  $\mu\text{M}$  de oleato de sodio se realizó de nuevo en base a un protocolo previamente diseñado (138) que se describe a continuación (**Figura 15**):

- Día 21 - Inicio esteatosis: Se diluye el oleato de sodio (100 mM de concentración stock) con un volumen apropiado de medio de diferenciación hasta una concentración final de 250  $\mu\text{M}$  (1:400). Se añade 99% metanol en medio de diferenciación, el mismo volumen que el usado con el oleato de sodio (1:400), para emplear como control (vehículo). Se lavan las células con 1 ml de PBS y añade el vehículo o medio de oleato de sodio según el caso. Nuestras condiciones por pocillo fueron 5  $\mu\text{l}$  de 100 mM oleato de sodio/99% metanol por cada 2 ml de medio de diferenciación.
- Día 23 y 25 - Cambio de medio: Se aspira el medio y añaden 2 ml de medio de diferenciación por pocillo con vehículo u oleato de sodio según el caso.
- Día 26 - Esteatosis: Se observa bajo el microscopio una acumulación de pequeñas gotas lipídicas en el citoplasma de las células tratadas con oleato.

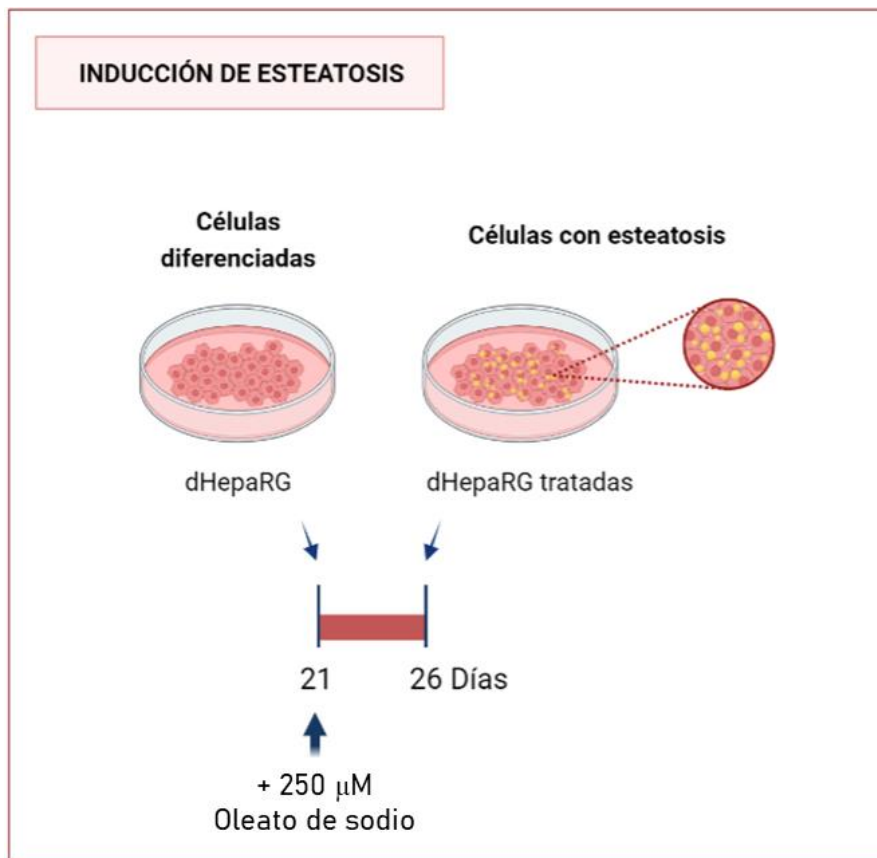


Figura 15. Representación esquemática del modelo de inducción de esteatosis mediante tratamiento con oleato de sodio en la línea celular HepaRG. Fuente: elaboración propia creada con BioRender.com

Tras la inducción de esteatosis, parte de las células se recogieron como lisados celulares y se conservaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  para extracciones de ARN y otras se emplearon para la determinación del contenido lipídico mediante tinción con *Oil Red O*.

El resto de las células dHepaRG tratadas con oleato se mantuvieron en cultivo a  $37^{\circ}\text{C}$  con 5%  $\text{CO}_2$  para continuar con el proceso de reversión de esteatosis.

#### 2.1.2.2.2. *Inducción mediante secretomas de tejido adiposo y suero de pacientes con obesidad*

El tratamiento de líneas celulares con secretomas obtenidos a partir de fragmentos de SAT y VAT, así como con tratamientos con suero, han reportado hallazgos relevantes, como cambios en la proliferación celular y desregulación de la expresión génica (83).

En base a estos datos, evaluamos el efecto de la obesidad *per se* como inductor de la esteatosis *in vitro* reflejada a través de la acumulación de gotas lipídicas en el citoplasma celular, como se ha descrito en el modelo con el ácido graso oleato de sodio.

Para ello, las células dHepaRG fueron sometidas a tratamientos con secretomas de SAT, de VAT o con suero obeso (OB), a distintas concentraciones de estudio. Las muestras a partir de las cuales se elaboraron estos tratamientos proceden de pacientes con obesidad severa, extraídas en el momento de someterse a una cirugía bariátrica para pérdida de peso.

El protocolo a seguir para la obtención de los secretomas de tejido adiposo y del suero desde muestras de sangre se ha explicado en el apartado de pacientes.

Los tratamientos se elaboraron a partir de la mezcla o *pool* de 3-6 muestras desde las diferentes alícuotas obtenidas de los pacientes con obesidad, y las concentraciones ensayadas fueron a 1, 2,5 y 5% (v/v), seleccionadas de acuerdo a estudios previos del grupo donde se aplicaron tratamientos similares (83).

La inducción de esteatosis *in vitro* en células dHepaRG tratadas con secretomas SAT y VAT y con suero OB se realizó a partir del seguimiento del protocolo para tratamiento con oleato de sodio (138) incluyendo las siguientes modificaciones que se detallan a continuación (**Figura 16**):

- Día 21 - Inicio esteatosis: Se prepararon los *pools* de muestras de secretomas SAT, VAT o suero OB y se adicionaron a un volumen apropiado de medio de diferenciación hasta las concentraciones de 1, 2,5 y 5%. Se añade FBS al medio de diferenciación, a las mismas concentraciones usadas en los tratamientos, para emplear como control (vehículo). Se lavaron las células con 1 ml de PBS y añadió el vehículo o medio con secretomas o suero según el caso. Nuestras condiciones por pocillo fueron 20  $\mu$ l de pool para tratamientos al 1%, 50  $\mu$ l de pool para 2,5 % y 100  $\mu$ l de pool para tratamientos al 5%, por cada 2 ml de medio de diferenciación.
- Día 23 y 25 - Cambio de medio: Se aspiró el medio y añadieron 2 ml de medio de diferenciación por pocillo con vehículo o tratamiento según el caso.
- Día 26 - Esteatosis: Se esperaba observar bajo el microscopio una acumulación de grasa en forma de pequeñas gotas lipídicas en el citoplasma de las células tratadas con los tratamientos de secretomas SAT y VAT y con suero OB.

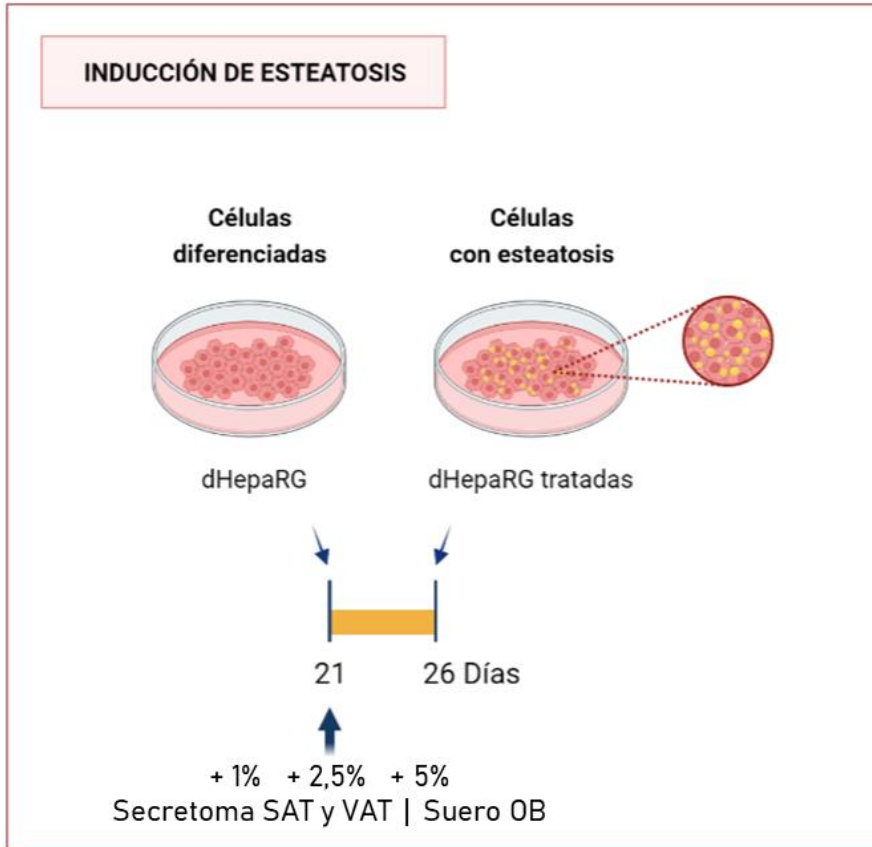


Figura 16. Representación esquemática del modelo de inducción de esteatosis mediante tratamiento con secretoma de tejido adiposo y suero de pacientes con obesidad en la línea celular HepaRG. SAT, tejido adiposo subcutáneo; VAT, tejido adiposo visceral; OB, obesidad. Fuente: elaboración propia creada con BioRender.com

Tras la inducción de esteatosis, parte de las células fueron recogidas como lisados celulares y conservadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  para realizar extracciones de ARN.

El resto de las células se emplearon para la determinación del contenido lipídico mediante tinción con *Oil Red O*.

### 2.1.2.3. Modelo de reversión de esteatosis *in vitro*

La suplementación con cuerpos cetónicos se ha asociado con una mejora del perfil metabólico y con una mejora del estado oxidativo celular (541–543). El tratamiento de líneas celulares con cuerpos cetónicos ha evidenciado hallazgos interesantes en esta línea (544–546).

Por ello, evaluamos el efecto del tratamiento con cuerpos cetónicos sobre la esteatosis hepática *in vitro* inducida por oleato de sodio. El procedimiento llevado a cabo consistió en la exposición de las células dHepaRG tratadas con oleato de sodio (compuesto de referencia ya descrito como inductor de esteatosis) a un tratamiento con la sal de sodio del ácido butírico.

Así, en células dHepaRG tratadas con 250  $\mu\text{M}$  de oleato de sodio se adicionaron concentraciones crecientes de butirato de sodio (Sodium 3-hydroxybutyrate, Sigma-Aldrich; Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) y la exposición de las células a este compuesto se mantuvo durante 72 horas. El protocolo experimental se detalla a continuación (**Figura 17**):

- Día 26 - Inicio del tratamiento con butirato: Diluir el butirato de sodio (1M de concentración stock, diluyente H<sub>2</sub>O DEPC) con un volumen apropiado de medio de diferenciación hasta las concentraciones finales de 10, 25, 50, 75 y 100 mM. Se lavan las células a tratar con 1 ml de PBS y se añade el medio con butirato a las distintas concentraciones según el caso. Se reemplaza el medio con oleato en los pocillos que se mantienen como control. Nuestras condiciones por pocillo fueron 20, 50, 100, 150 y 200  $\mu\text{l}$  de 1M butirato de sodio por cada 2 ml de medio de diferenciación para las concentraciones finales establecidas de 10, 25, 50, 75 y 100 mM, respectivamente. Para las células mantenidas como control, las condiciones por pocillo fueron 5  $\mu\text{l}$  de 100 mM oleato de sodio por cada 2 ml de medio de diferenciación.

- Día 29 – Reversión de esteatosis: Tras 72 horas de exposición al tratamiento con butirato, se espera observar bajo el microscopio una reducción en el número o contenido de gotas lipídicas presentes en el citoplasma de las células previamente tratadas con oleato.

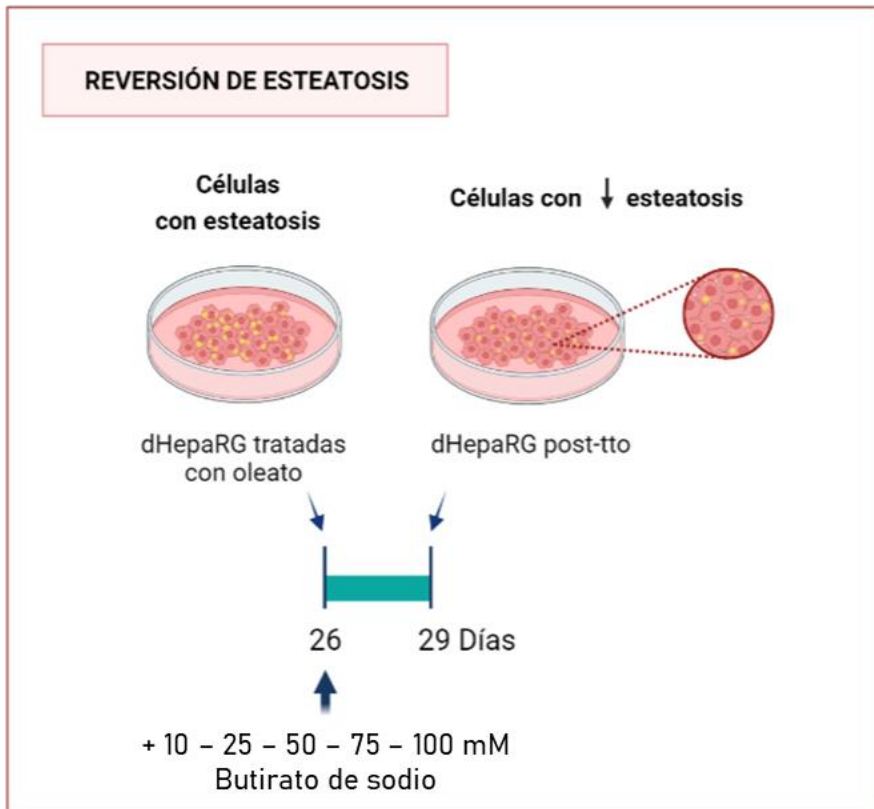


Figura 17. Representación esquemática del modelo de reversión de esteatosis mediante tratamiento con butirato de sodio en células dHepaRG tratadas con oleato. post-tto, post-tratamiento. Fuente: elaboración propia creada con BioRender.com

Finalizado el proceso, parte de las células se recogieron como lisados celulares y se conservaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  para extracciones de ARN. El resto de las células se emplearon para la determinación del contenido lipídico mediante tinción con *Oil Red O*.

### 2.1.3. Evaluación del contenido lipídico (*Oil Red O*)

La acumulación de gotas de lípidos se puede detectar fácilmente mediante la tinción *Oil Red O*, un colorante químico liposoluble del grupo de los lisocromos que tiñe los triglicéridos y lípidos neutros de rojo anaranjado (547,548).

Para determinar el contenido de lípidos presente en el citoplasma de las células dHepaRG tras los distintos tratamientos descritos para la inducción y reversión de esteatosis vesicular hepática *in vitro*, se realizaron tinciones con el reactivo *Oil Red O* al final de cada tratamiento como se detalla a continuación:

- Se prepara la solución de trabajo *Oil Red O* con 6 ml de solución madre (0,35 g de reactivo en 100 ml de isopropanol) por cada 4 ml de H<sub>2</sub>O destilada. Se agita, se deja reposar a temperatura ambiente durante 20 minutos y se filtra con un filtro de 0,2 µm.
- Se lavan las células con PBS y se añade 1ml de paraformaldehído frío al 4% por pocillo durante 1 hora a 37°C para fijar las células.
- Se elimina el paraformaldehído y se lavan las células con H<sub>2</sub>O destilada (3 veces).
- Se añade 1ml de isopropanol al 60% por pocillo durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se retire el isopropanol y se dejan secar las células completamente a temperatura ambiente o durante 5-10 minutos en estufa a 50°C.
- Añadir 1 ml de la solución de trabajo *Oil Red O* y se incuba durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se retira el colorante y se lavan las células con H<sub>2</sub>O destilada (4 veces). Se dejan secar las tinciones completamente a temperatura ambiente o durante 10 minutos en estufa a 50°C.



- Se adquieren imágenes bajo el microscopio para su análisis a 40 aumentos (Leica MC170 HD, Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania).
- Se eluye el colorante *Oil Red O* para determinar la cantidad de tinción en las células por medición de la absorbancia. Se añade 1 mL de isopropanol durante 10 minutos con agitación suave a temperatura ambiente. Se transfiere el eluido a placas de 96 pocillos en triplicado, usando isopropanol al 100% como blanco, y se mide la absorbancia 500 nm en un espectrofotómetro para microplacas (Epoch 2, Biotek Instruments Inc., Winooski, VT, EE.UU.).

#### **2.1.4. Ensayos de viabilidad celular**

La evaluación de la viabilidad celular *in vitro* se realizó mediante el uso del reactivo de proliferación celular WST-1 (Cell Proliferation Reagent WST-1, Roche Applied Science, Penzberg, Alemania).

Se trata de un ensayo colorimétrico simple diseñado para medir las tasas de proliferación relativa de las células en cultivo. El principio del ensayo se basa en la conversión de la sal de tetrazolio WST-1 en un tinte de color mediante enzimas deshidrogenasas mitocondriales, color que es directamente proporcional a la cantidad de deshidrogenasa mitocondrial en un cultivo dado.

Como resultado, el ensayo mide realmente la actividad metabólica neta de las células, lo que refleja el número de células (cuantas más células, más deshidrogenasa disponible para reducir el reactivo).

Este kit también se puede utilizar para medir la viabilidad celular o la citotoxicidad y ha sido aplicado de acuerdo a las indicaciones del fabricante.

En concreto, se utilizó un protocolo previamente descrito (138), el cual se especifica seguidamente:

- Se sembraron las células dHepaRG en una placa de 96 pocillos con una densidad de  $1 \times 10^5$  células/pocillo en un volumen final de 100  $\mu$ l de medio de diferenciación.
- Pasadas 24 horas, se adicionan a las células los distintos tratamientos y controles/vehículos anteriormente explicados en cuadruplicado. Adicionalmente, se ensaya el oleato de sodio a 125  $\mu$ M y 500  $\mu$ M y el compuesto palmitato de sodio 125  $\mu$ M, 250  $\mu$ M y 500  $\mu$ M. Todos los tratamientos se diluyen en un volumen final de 100  $\mu$ l por pocillo.
- Se reemplazan los medios con los correspondientes tratamientos cada 24 horas hasta alcanzar las 96 horas de exposición a dichas condiciones.
- Se añaden 10  $\mu$ L de reactivo WST-1 en cada pocillo de la placa de ensayo. Se incluye un control de fondo o *background* adicionando 10  $\mu$ L de reactivo en 100  $\mu$ L de medio de diferenciación sin células. Se incuba la placa a 37°C con 5% CO<sub>2</sub> durante 60 minutos. Se registra la absorbancia a 450 nm en un espectrofotómetro para microplacas (Epoch 2, Biotek Instruments Inc., Winooski, VT, EE.UU.). Se corrigen los valores de absorbancia obtenidos tras la lectura restando el valor medio los pocillos *background*.

### 3. TÉCNICAS ANALÍTICAS

#### 3.1. ANÁLISIS HISTOLÓGICOS

El análisis histológico de tejidos se desarrolló en colaboración con el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela. Las tinciones de Hematoxilina/Eosina y de *Oil Red O* se realizaron en la Plataforma de Inmunohistoquímica perteneciente a este mismo servicio empleando los protocolos que se describen a continuación.

Las secciones de las muestras hepáticas fueron examinadas a ciegas por un patólogo certificado perteneciente al servicio colaborador, el cual calificó el grado de esteatosis hepática promediando las calificaciones en 10 campos de aumento de alta potencia (200x).

Las puntuaciones utilizadas fueron las siguientes: (0) no esteatosis, (1) <33% de esteatosis en el parénquima hepático, (2) 34% -66% de esteatosis en el parénquima hepático y (3) >66% de esteatosis en el parénquima hepático.

Las fotografías de los cortes a 40 aumentos se tomaron en el microscopio Axio Vert.A1 (Carl Zeiss Meditec Iberia S.A.U., Madrid, España).

##### 3.1.1. Tinción Hematoxilina/Eosina

Se fija el tejido hepático en paraformaldehído al 4% y se incluye en parafina para ser seccionado en cortes de 5 µm en un criostato (Leica CM1850 UV Cryostat, Leica Biosystems, Barcelona, España). Los cortes se desparafinan con xilol y se rehidratan con etanol a

concentraciones decrecientes de 100, 95 y 70°C. Se realiza un lavado con H<sub>2</sub>O destilada, se sumergen los cortes en hematoxilina (Sigma-Aldrich; Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) durante 10 minutos, se lavan nuevamente y se sumergen durante 1 minuto en eosina (Sigma-Aldrich; Merck KGaA, Darmstadt, Alemania). Se realiza un lavado con H<sub>2</sub>O, se deshidratan los cortes a concentraciones crecientes de etanol (2x96°C y 2x100°C) y se sumergen en xilol durante 10 minutos antes de montaje en medio permanente (Entellan).

Esta técnica histológica tiñe diferencialmente las estructuras celulares, otorgando un color azul a las partes ácidas como el núcleo celular y un color rosa a las partes básicas como el citoplasma, permitiendo analizar la estructura general del tejido.

### **3.1.2. Tinción Oil Red O**

Las muestras de tejido hepático se depositaron en criomoldes y se embebieron en OCT o gel crioprotector. Se congelaron en isopentano a -160°C y se cortaron en secciones de 8 µm en un criostato (Leica CM1850 UV Cryostat, Leica Biosystems, Barcelona, España). Los cortes se tiñen con una solución filtrada de Oil Red O (Sigma-Aldrich; Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) durante 15 minutos. Se realiza un lavado con H<sub>2</sub>O destilada, las secciones se contratiñen con solución de hematoxilina modificada según Gill II (Sigma-Aldrich; Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) durante 30 segundos, se lavan los cortes con H<sub>2</sub>O destilada a 30°C durante 10 minutos y se realiza el montaje con medio de acuoso.

Esta técnica se basa en la detección de grasas neutras o gránulos de polietileno en tejidos histológicos, proporcionando una intensa y luminosa coloración en rojo de los lípidos en contraste al color azul de los núcleos celulares teñidos con la solución de hematoxilina según Gill II. Al tratarse de una tinción específica de lípidos permite evaluar la esteatosis hepática.

## 3.2. ANÁLISIS DE METABOLITOS

### 3.2.1. Determinación del contenido de triacilgliceroles

#### 3.2.1.1. Extracción de triacilgliceroles en hígado

La extracción de lípidos se realizó a partir de fragmentos de aproximadamente 100 mg desde tejido hepático criopreservado (congelados a  $-80^{\circ}\text{C}$ ). Los fragmentos de hígado se introdujeron en tubos con cierre de seguridad (Safe-Lock Tubes 2,0 mL, Eppendorf, Hamburgo, Alemania) con una bola de acero inoxidable y una solución 2:1 de cloroformo:metanol a  $4^{\circ}\text{C}$ , para su disgregación y rotura celular mecánica mediante un homogeneizador (TissueLyser II, Qiagen, Germantown, MD, EE.UU.) durante 2-3 minutos a 25-30 Hz. Los homogeneizados hepáticos se mantuvieron en agitación durante 4 horas a temperatura ambiente. Para la separación de fases, se añadieron 300  $\mu\text{l}$  de H<sub>2</sub>O DEPC por muestra, se centrifugaron a 13.000 rpm durante 30 minutos y se recogió la fase orgánica conteniendo los extractos lipídicos. El solvente orgánico se evaporó completamente durante la noche en una campana de extracción de gases a temperatura ambiente.

#### 3.2.1.2. Cuantificación de triacilgliceroles hepáticos

La determinación de la cantidad de triacilgliceroles a partir de los homogeneizados hepáticos se realizó en un espectrofotómetro para microplacas (Epoch 2, Biotek Instruments Inc., Winooski, VT, EE.UU.) por medio de una detección colorimétrica mediante el uso de un kit comercial específico (Triglicéridos GPO-POD. Enzymatic-Colorimetric, SPINREACT, Girona, España). La absorbancia de cada muestra se midió a 505 nm por triplicado y la cuantificación se calculó a partir de los valores obtenidos respecto a la recta patrón del kit. Los datos se corrigieron por la masa del fragmento de tejido y se presentaron como mg de triacilgliroles/g de tejido hepático, medida utilizada como reflejo del grado de esteatosis hepática.

### **3.2.2. Determinación de marcadores de estrés oxidativo**

#### **3.2.2.1. Cuantificación de malondialdehído**

Los peróxidos de ácidos grasos poliinsaturados generan MDA al descomponerse, el cual se ha utilizado como indicador de peroxidación lipídica, mecanismo de daño celular utilizado para determinar el estrés oxidativo en células y tejidos (549).

La cuantificación de los niveles de MDA se realizó en muestras de lisados de hígado y plasma, obtenidos según la aplicación de protocolos previamente descritos, utilizando un kit comercial (BIOXYTECH LPO-586 Colorimetric Assay For Lipid Peroxidation Markers, OXIS Health Products, Inc., Portland, OR, EE. UU.). Este ensayo colorimétrico se basa en la reacción a 45°C del MDA con un reactivo cromogénico, N-metil-2-fenilindol (R1), la cual produce un cromóforo estable. La medición de este producto a una absorbancia máxima de 586 nm se realiza en un espectrofotómetro para microplacas (Epoch 2, Biotek Instruments Inc., Winooski, VT, EE.UU.) para determinar la cantidad de MDA presente en las muestras ensayadas.

#### **3.2.2.2. Cuantificación de la capacidad antioxidante**

La detección de la capacidad antioxidante total es útil para valorar la cantidad o contenido de antioxidantes presentes en una muestra y determinar así su efecto potencial contra reacciones de oxidación (550).

La cuantificación de los niveles de la potencia total antioxidante (AOP) activa se realizó en muestras de lisados de hígado y plasma, obtenidos según la aplicación de protocolos previamente descritos, utilizando un kit comercial (BIOXYTECH AOP-450 Assay for Total Antioxidant Potential, OXIS Health Products, Inc., Portland, OR, EE. UU.). Este ensayo colorimétrico cuantitativo se basa en el potencial de reducción de la muestra o estándar para convertir de manera efectiva  $\text{Cu}^{+2}$  en  $\text{Cu}^{+1}$ . Esta forma reducida de cobre formará selectivamente un complejo estable con el reactivo cromogénico. La

medición de este complejo a una absorbancia de 450 nm en un espectrofotómetro para microplacas (Epoch 2, Biotek Instruments Inc., Winooski, VT, EE.UU.) determina el nivel de AOP presente en las muestras ensayadas.

### 3.2.2.3. Cuantificación de 8-hidroxi-2-desoxiguanosina

La determinación de 8-hidroxi-2-desoxiguanosina (8-OHdG), producido durante la reparación del ADN, es considerada como un marcador de daño oxidativo (551).

La cuantificación de los niveles de 8-OHdG se realizó en muestras de lisados de hígado y plasma, obtenidos según la aplicación de protocolos previamente descritos, utilizando un kit comercial (Highly Sensitive 8-OHdG Check ELISA, Japan Institute for the Control of Aging (JalCA), Shizuoka, Japan). Este kit se basa en un ensayo ELISA competitivo que cuantifica la cantidad de reacción antígeno-anticuerpo de forma colorimétrica tras la adición de cromógeno. La medición de la absorbancia a 450 nm en un espectrofotómetro para microplacas (Epoch 2, Biotek Instruments Inc., Winooski, VT, EE.UU.) determina el nivel de 8-OHdG presente en las muestras ensayadas.

### 3.2.3. Determinación de marcadores de inflamación

Las citocinas y las quimiocinas, un tipo de citocinas de pequeño tamaño, juegan un papel relevante en la respuesta inmunitaria e inflamatoria, por lo que son consideradas como marcadores inflamatorios (552).

La cuantificación de los niveles de una selección de marcadores inflamatorios se realizó en muestras de plasma, obtenido en base a protocolos previamente descritos, mediante el uso de un panel multiplex de citocinas/quimiocinas comercial (The Bio-Plex Pro Rat Cytokine 5-Plex Immunoassay, Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, EE.UU.), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Este panel permite la detección del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), el

factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), la interleucina 10 (IL10), la interleucina 6 (IL6) y la proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1) a partir de muestras de plasma sanguíneo mediante un ensayo ELISA, que cuantifica las citocinas y quimiocinas según la cantidad de reacción antígeno-anticuerpo medible por absorbancia en un espectrofotómetro para microplacas (Epoch 2, Biotek Instruments Inc., Winooski, VT, EE.UU.).

### **3.3. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA**

#### **3.3.1. Extracción de ARN**

##### **3.3.1.1. Extracción desde tejido**

Se seleccionó el uso del Reactivo TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU.) como método de extracción de ARN para tejidos criopreservados (congelados a  $-80^{\circ}\text{C}$ ). El ARN total se aisló a partir de muestras de hígado y de tejido adiposo subcutáneo y visceral de aproximadamente 100 mg.

Dichas muestras se introdujeron en tubos con cierre de seguridad (Safe-Lock Tubes 2,0 mL, Eppendorf, Hamburgo, Alemania) conteniendo 800  $\mu\text{l}$  de reactivo junto con una bola de acero inoxidable, para proceder a su disgregación y rotura celular mecánica mediante un homogeneizador (TissueLyser II, Qiagen, Germantown, MD, EE.UU.) durante 2-3 minutos a 25-30 Hz.

Finalizado el proceso de extracción de ARN, tras el seguimiento del protocolo y recomendaciones del fabricante, el ARN total aislado se resuspendió en 50 $\mu\text{l}$  de H<sub>2</sub>O DEPC y se conservó a  $-80^{\circ}\text{C}$ .



### 3.3.1.2.Extracción desde células mononucleares de sangre periférica

De nuevo se seleccionó el uso del Reactivo TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.) como método de extracción de ARN total desde PBMCs. En este caso, el ARN se aisló desde alícuotas de PBMCs conservadas en 1,5 ml de reactivo TRIzol y congeladas a -80°C, siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Finalizado el proceso de extracción, el ARN total aislado se resuspendió en 30 µl de H<sub>2</sub>O DEPC y se conservó a -80°C. La separación de PBMCs a partir de muestras de sangre periférica fue descrita anteriormente.

### 3.3.1.3.Extracción desde línea celular

El aislamiento de ARN total desde células mantenidas en cultivo fue con el uso del kit comercial GeneJet RNA Purification Kit (ThermoScientific, Waltham, MA, EE.UU.), basado en un método de separación por columnas. Las células se lisaron y homogeneizaron en 600 µl de tampón de lisis suministrado en el kit y suplementado con β-mercaptoetanol (Sigma-Aldrich; Merck KGaA, Darmstadt, Alemania), de acuerdo al protocolo del fabricante. Finalmente, se eluyó el ARN total en 50 µl de H<sub>2</sub>O DEPC y se conservó a -80°C.

## 3.3.2. Cuantificación de ARN

La determinación de la concentración del ARN total extraído desde las distintas muestras de origen se cuantificó mediante un espectrofotómetro de gota en pedestal utilizando el equipo NanoDrop 2000c (ThermoScientific, Waltham, MA, EE.UU.) ajustado a las longitudes de onda 260 y 280 nm. El grado de pureza de las muestras se determinó en base a la ratio 260/280, según el cual un valor cercano a 2 es considerado como óptimo o aceptable para mediciones de ARN.

### 3.3.3. Retrotranscripción

Previo al proceso de retrotranscripción, se realizó la purificación de las muestras de ARN extraídas con TRIzol aplicando un tratamiento con DNasas con un kit comercial ((DNase Free, Ambion, Austin, TX, EE.UU.), a partir de 1 µg de cantidad de ARN total. La conversión cuantitativa de ARN total a ADN complementario (ADNc) monocatenario se realizó con un kit de transcripción inversa de gran capacidad (High-Capacity cDNA Reverse Transcription, Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.), basado en una única reacción que parte de 1 µg de ARN en 20 µl de volumen final y siguiendo las recomendaciones del fabricante. El equipo utilizado fue el termociclador Swift MaxPro (Esco Healthcare Pte. Ltd., Singapore) bajo las condiciones de incubación de 25°C durante 10 minutos, 37°C durante 120 minutos y 85°C durante 5 minutos.

### 3.3.4. PCR en tiempo real

Los experimentos cuantitativos de PCR en tiempo real (RT-qPCR) se realizaron en el equipo Step One Plus system de acuerdo a las indicaciones del fabricante para ensayos de expresión génica TaqMan (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.). Todas las reacciones, a un volumen final de 10 µl, se ensayaron por duplicado y/o triplicado para cada gen y muestra analizada utilizando los siguientes parámetros de ciclado: 50°C durante 2 minutos, 95°C durante 10 minutos, seguido de 40 ciclos de 95°C durante 15 segundos + 60°C durante 1 minuto. Las sondas TaqMan adquiridas para los diferentes genes de interés ensayados se detallan en la **tabla 2**.

Para el análisis de los datos, los niveles de expresión génica de ARNm se normalizaron utilizando beta-actina (ATCB) y/o gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) como control interno o housekeeping dependiendo del experimento. El cálculo se basó en el método de cuantificación relativa de  $2^{-\Delta\Delta CT}$  (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.).

Tabla 2. Lista de sondas TaqMan utilizadas para la técnica RT-qPCR.

Gen	Referencia	Casa comercial	Especie diana
<i>Survivina/BIRC5</i>	Rn00574012_m1, Hs04194392_s1	Applied Biosystems, EE.UU.	Rata, humano
<i>MYC</i>	Rn00561507_m1, Hs00153408_m1	Applied Biosystems, EE.UU.	Rata, humano
<i>GSTM2</i>	Rn00598597_m1, Hs03044640_gH	Applied Biosystems, EE.UU.	Rata, humano
<i>SIRT1</i>	Rn01428093_m1, Hs01009000_m1	Applied Biosystems, EE.UU.	Rata, humano
<i>SIRT6</i>	Rn01408249_m1, Hs00213036_m1	Applied Biosystems, EE.UU.	Rata, humano
<i>TGFB1</i>	Rn00572010_m1, Hs00998133_m1	Applied Biosystems, EE.UU.	Rata, humano
<i>TP53</i>	Rn00755717_m1, Hs01034249_m1	Applied Biosystems, EE.UU.	Rata, humano
<i>PTEN</i>	Rn00477208_m1, Hs02621230_s1	Applied Biosystems, EE.UU.	Rata, humano
<i>CYP3A4</i>	Hs00604506_m1	Applied Biosystems, EE.UU.	Humano
<i>ALB</i>	Hs00609410_m1	Applied Biosystems, EE.UU.	Humano
<i>ALDOB</i>	Hs01551887_m1	Applied Biosystems, EE.UU.	Humano
<i>SLC2A1</i>	Hs01682761_m1	Applied Biosystems, EE.UU.	Humano
<i>APOC3</i>	Hs00163644_m1	Applied Biosystems, EE.UU.	Humano
<i>SCD</i>	Hs01682761_m1	Applied Biosystems, EE.UU.	Humano
<i>ACACB</i>	Hs01565914_m1	Applied Biosystems, EE.UU.	Humano
<i>PLIN2</i>	Hs00605340_m1	Applied Biosystems, EE.UU.	Humano
<i>PK4</i>	Hs01037712_m1	Applied Biosystems, EE.UU.	Humano
<i>IL6</i>	Hs00174131_m1	Applied Biosystems, EE.UU.	Humano
<i>DNMT1</i>	Hs00945875_m1	Applied Biosystems, EE.UU.	Humano
<i>DNMT3A</i>	Hs01027162_m1	Applied Biosystems, EE.UU.	Humano
<i>DNMT3B</i>	Hs00171876_m1	Applied Biosystems, EE.UU.	Humano
<i>GAPDH</i>	Hs02758991_g1	Applied Biosystems, EE.UU.	Humano
<i>ACTB</i>	Rn00667869_m1, Hs03023943_g1	Applied Biosystems, EE.UU.	Rata, humano

### **3.4. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE PROTEÍNA**

#### **3.4.1. Extracción de proteína**

La extracción de proteínas desde tejido se realizó a 4°C en muestras de hígado criopreservados (congelados a -80°C) a partir de fragmentos de aproximadamente 50 mg. Los fragmentos de tejido se introdujeron en tubos con cierre de seguridad (Safe-Lock Tubes 2,0 mL, Eppendorf, Hamburgo, Alemania) con una bola de acero inoxidable y 1 ml de tampón RIPA frío (200 mM Tris-HCl a pH 7,4, 130 mM NaCl, 10% Glicerol, 0,1% dodecil sulfato de sodio (SDS), 1% Triton X-100 y 10 mM MgCl<sub>2</sub>, suplementado con un cóctel de anti-proteasas y anti-fosfatasa (Sigma-Aldrich; Merck KGaA, Darmstadt, Alemania), para su disgregación y rotura celular mecánica mediante un homogeneizador (TissueLyser II, Qiagen, Germantown, MD, EE.UU.) durante 3 minutos a 25-30 Hz. Los lisados de tejido se centrifugaron a 13.000 rpm durante 30 minutos a 4°C. Este proceso se repitió 3 veces, transfiriendo los sobrenadantes a nuevos tubos cada vez, para eliminar la presencia de la película lipídica que se genera en las muestras que proceden de hígados grasos.

#### **3.4.2. Cuantificación de proteína**

La cuantificación de los extractos proteicos se realizó con el kit DC Protein Assay (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, EE.UU.), basado en el método de Bradford, siguiendo las instrucciones del fabricante y midiendo la absorbancia a 750 nm por triplicado en un espectrofotómetro para microplacas (Epoch 2, Biotek Instruments Inc., Winooski, VT, EE.UU.). La concentración de las muestras se calculó en base a una recta patrón de calibrado de concentraciones conocidas (Protein Assay Standard II, Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, EE.UU.). Se prepararon alícuotas a una concentración de 20 µg de proteína para cada muestra, se añadieron 5 µl de tampón de carga (400 mM Tris-HCl a pH 6,8, 50% Glicerol, 10% SDS, 0,5% Azul de Bromofenol y 5% β-mecaptoetanol) y se calentaron a 95°C durante 5 minutos (thermoblock Thermomixer Compact, Eppendorf, Hamburgo, Alemania).

### 3.4.3. Western blot

#### 3.4.3.1. Electroforesis

La separación de las proteínas en función del tamaño o peso molecular se realizó mediante una electroforesis en gel de poliacrilamida con 10% de SDS (SDS-PAGE). Los geles se prepararon a partir de bis-acrilamida (30% Acrylamide/Bis Solution, Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, EE.UU.) conteniendo una fracción concentradora en la parte superior (5% de acrilamida) y una fracción separadora en la parte inferior (10% de acrilamida). Para determinar el tamaño de las proteínas de interés se empleó un marcador de peso molecular (Precision Plus Protein Standards-Dual Color, Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, EE.UU.) y las condiciones de electroforesis establecidas fueron 15 minutos a 60 V seguidos de 1-2 horas a 120 V.

#### 3.4.3.2. Transferencia

Las proteínas ya separadas se transfirieron membranas de nitrocelulosa de 0,45  $\mu\text{m}$  (Nitrocellulose Membrane, 0.45  $\mu\text{m}$ , Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, EE.UU.) mediante una electrotransferencia húmeda en el equipo Trans-Blot Transfer System (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, EE.UU.). La transferencia se realizó durante 1 hora a 4°C bajo las condiciones de 100 V y 0,25 A, en los casos en los que se transfirieron 4 membranas a la vez.

### 3.4.4. Inmunodetección

Las membranas se bloquearon en albúmina de suero bovino (BSA) (Sigma-Aldrich; Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) al 5% en PBS-T (20 mM Tris-HCl pH 7,4, 150 mM NaCl, 0,1% Tween-20) durante 1 hora a temperatura ambiente y en agitación.

Para la detección de proteínas, las membranas se incubaron con los anticuerpos primarios específicos de las proteínas de estudio (**Tabla 3**) durante la noche a 4 ° C y en agitación. Tras el overnight, las

membranas se incubaron en presencia de los anticuerpos secundarios (Tabla 3) durante 1 hora a temperatura ambiente y en agitación. La inmunodetección o unión específica antígeno-anticuerpo se visualizó con un sistema de quimioluminiscencia (Clarity Western ECL Substrate, Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, EE.UU.) usando el equipo ChemiDoc MP Imager System (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, EE.UU.), de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

**Tabla 3. Lista de anticuerpos primarios y secundarios utilizados para la técnica Western blot.**

Proteína	Referencia	Casa comercial	Reactividad	Dilución
SURVIVINA/BIRC5	sc-17779	Santa Cruz Biotechnology, Alemania	Ratón, monoclonal	1:500
MYC	ab32072	Abcam, España	Conejo, monoclonal	1:1.000
GSTM2	ab175282	Abcam, España	Conejo, policlonal	1:1.000
SIRT1	sc-74465	Santa Cruz Biotechnology, Alemania	Ratón, monoclonal	1:500
TGFB1	3711	Cell Signaling Technology, EE.UU.	Conejo, policlonal	1:1.000
TP53	AF1355	R&D Systems, EE.UU.	Conejo, policlonal	1:1.000
PTEN	sc-7974	Santa Cruz Biotechnology, Alemania	Ratón, monoclonal	1:500
GAPDH	AM4300	Life Technologies Ltd, Reino Unido	Ratón, monoclonal	1:2000
HRP Anti-ratón	31430	Thermo Fisher Scientific, EE.UU.	Cabra, monoclonal	1:10.000
HRP Anti-conejo	31460	Thermo Fisher Scientific, EE.UU.	Cabra, monoclonal	1:10.000

Para la determinación semicuantitativa de señal de la cantidad de proteína presente en la muestra se midió la densidad óptica de los volúmenes de las bandas específicas utilizando el Software ImageJ (Institutos Nacionales de Salud, Bethesda, MD, EE. UU.). Los valores obtenidos en cada muestra para las distintas proteínas estudiadas fueron corregidos por los niveles de proteína de un gen de expresión constitutiva, nuestro caso gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH). Los resultados se expresaron como porcentaje de nivel de proteína frente al control.

### **3.5. ANÁLISIS DE LA METILACIÓN DEL ADN**

#### **3.5.1. Extracción de ADN**

La extracción del ADN genómico a partir de las muestras de sangre total criopreservadas (congelación a  $-80^{\circ}\text{C}$ ) se realizó usando un kit comercial de purificación de ADN (MasterPure DNA Extraction Kit, Epicentre Biotechnologies, Madison, WI, EE. UU.), siguiendo las especificaciones del fabricante. Finalmente, el ADN se resuspendió en  $40\ \mu\text{l}$  de tampón TE suministrado en el propio kit.

#### **3.5.2. Cuantificación de ADN**

La determinación de la concentración del ADN genómico extraído desde las distintas muestras de origen se cuantificó mediante un método fluorimétrico usando un kit comercial (Quan-iT PicoGreen DsDNA Assay, Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Reino Unido) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

El grado de pureza de las muestras se determinó en base a la ratio  $260/280$ , según el cual un valor cercano a 1,8 es considerado como óptimo o aceptable para mediciones de ADN. Las mediciones se realizaron en un espectrofotómetro de gota en pedestal utilizando el equipo NanoDrop 2000c (ThermoScientific, Waltan, MA, EE.UU.) ajustado a las longitudes de onda  $260$  y  $280\ \text{nm}$ .

### 3.5.3. Conversión con bisulfito

Tras verificar la integridad del ADN genómico mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1,5% (Promega Biotech Corporation, Madison, WI, EE.UU.), las muestras de ADN, 500 ng de cantidad, se trataron con bisulfito de sodio usando el kit EZ DNA Methylation-Direc KIT (Zymo Research, Irvine, CA, EE.UU.) según las indicaciones del fabricante. Este kit comercial combina en un solo paso la desnaturalización del ADN por temperatura con la conversión con bisulfito, proceso en el que las citosinas metiladas se convierten a uracilos.

El equipo utilizado fue el termociclador Swift MaxPro (Esco Healthcare Pte. Ltd., Singapore) bajo las condiciones de incubación a 95°C durante 30 segundos + 50°C durante 60 minutos en 16 ciclos.

### 3.5.4. Metilación del ADN

Las muestras de ADN genómico de alta calidad, tras el proceso de conversión con bisulfito, se hibridaron en la plataforma Infinium MethylationEPIC BeadChip (Illumina Inc., CA, EE.UU.) de acuerdo al seguimiento del protocolo de metilación Illumina Infinium HD del fabricante. Este kit comercial emplea una tecnología de *microarrays* que permite determinar el estado de metilación del ADN de más de 850.000 sitios CpG en todo el genoma con una resolución de un solo nucleótido. La hibridación al *microarray* se hace por complementariedad de bases con las sondas inmovilizadas al soporte, generando señales lumínicas en dos canales que permiten distinguir las hibridaciones de secuencias metiladas y no metiladas.

La detección se realizó en el HiScan SQ System (Illumina Inc., CA, EE.UU.), un secuenciador de nueva generación y analizador de alto rendimiento integrados en un mismo equipo. La visualización de los datos de metilación del ADN y el análisis de la metilación diferencial se realizó con el módulo GenomeStudio (Illumina Inc., CA, EE.UU.), software empleado para datos generados en este tipo de plataformas de *arrays* en estudios a pequeña escala. La anotación y



categorización genómica fue en base a la distancia y posición respecto a las regiones con alta densidad de sitios CpG, denominadas como islas CG (CGIs). En el contexto de distancia, se distinguieron las regiones adyacentes a las CGIs designadas como *shore* y *shelf* (*shore*, secuencias de 2 kb que flanquean una CGI; *shelf*, secuencias de 2 kb que flanquean un *shore*) y las regiones que no incluyen CGIs u *open sea*. En el contexto de posición relativa a los genes, se distinguieron entre regiones localizadas en el promotor, regiones intragénicas o *body* y regiones intergénicas.

Los niveles de metilación del ADN de cada citosina se calcularon cuantitativamente a partir de la ratio de las señales fluorescentes de los sitios metilados frente a los no metilados, expresado como valor beta ( $\beta$ ), que oscila entre 0 (completamente no metilado) y 1 (completamente metilado). El control de calidad y la normalización de los datos se realizó utilizando diferentes controles internos presentes en el Infinium MethylationEPIC BeadChip a través del software GenomeStudio, de acuerdo a procedimientos experimentales previamente descritos (553,554).



## 4. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Los análisis estadísticos se realizaron mediante el software GraphPad Prism 7 (GraphPad Software Inc., EE.UU.) y el software IBM SPSS Statistics 25 (SPSS Inc, EE. UU.) para Windows 10 (Microsoft, EE. UU.). En general, el tamaño muestral de los estudios se calculó en base a un nivel de significación ( $\alpha$ ) igual a 0,05 y una potencia estadística ( $1-\beta$ ) de 0,80. Los datos obtenidos en los distintos experimentos son expresados como media  $\pm$  desviación estándar en las tablas y como media  $\pm$  error estándar de la media en las figuras. En todos los análisis, se consideraron estadísticamente significativos los resultados con un  $p < 0,05$ , y se consideró indicativo de una tendencia a la significación un  $p \leq 0,1$ .

La normalidad de la distribución de los datos se evaluó mediante la prueba Shapiro-Wilk y la prueba Kolmogorov-Smirnov, según el caso. En base al resultado obtenido para evaluar la normalidad, se aplicaron test paramétricos, cuando los datos seguían una distribución normal, o test no paramétricos, en el caso contrario.

En concreto, se aplicaron:

- Prueba t de Student, para comparar las diferencias entre las medias de dos grupos.
- Análisis de la varianza (ANOVA), para examinar las diferencias entre las medias de tres o más grupos, aplicando un post-hoc o prueba de comparación múltiple de Bonferroni para determinar qué medias difieren.
- ANOVA de medidas repetidas (en los estudios con cohortes longitudinales), para estudiar el efecto de uno o más factores cuando

al menos uno de ellos es un factor intra-sujetos, aplicando un post-hoc de Bonferroni para determinar qué medias difieren.

- Coeficiente de correlación de Pearson y Spearman, para evaluar la asociación o relación lineal entre variables cuantitativas.

Para el filtrado y análisis estadístico de los niveles de metilación global, se consideraron válidos los valores de detección con un  $p < 0,01$ . La identificación de patrones consistentes de sitios DMCpGs entre los diferentes pasos de la intervención nutricional fueron evaluados mediante un modelo de regresión lineal B-spline, ajustado por comparaciones múltiples mediante un test de “false discovery rate” (FDR) de Benjamini and Hochberg, donde un valor  $FDR < 0,10$  se consideró estadísticamente significativo. Adicionalmente, se seleccionaron las DMCpGs con un cambio en la metilación  $\beta > 2\%$ . Estos análisis se realizaron utilizando el software R Project (The R Foundation for Statistical Computing, EE. UU.).



# RESULTADOS





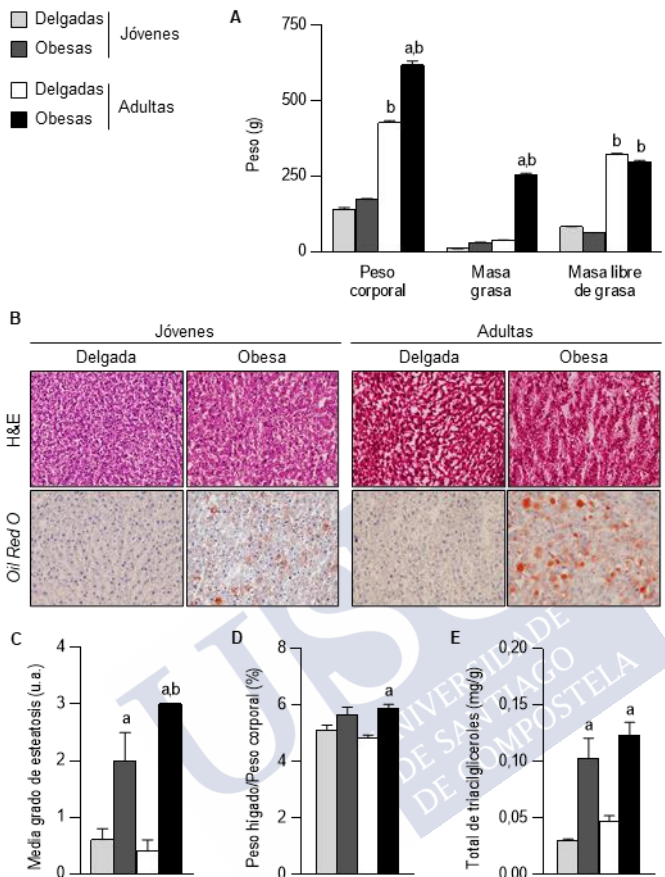
# 1. ESTUDIO DEL PERFIL DE EXPRESIÓN DE GENES RELACIONADOS CON LA CARCINOGENÉISIS LIGADA A LA ESTEATÓISIS HEPÁTICA EN RATAS ZUCKER

Empleamos ratas Zucker, modelo animal de obesidad monogénica, para estudiar el papel que ejerce una acumulación excesiva de grasa corporal sobre el desarrollo de la esteatosis hepática y sobre la regulación de la expresión de genes implicados en el inicio de la carcinogénesis en el hígado. Los distintos grupos experimentales incluidos en este estudio se establecieron en función de la edad y el fenotipo, así como por el método de intervención en el grupo de ratas adultas obesas sometidas a pérdida de peso.

## 1.1. PAPEL DE LA OBESIDAD

### 1.1.1. Cuantificación del contenido de lípidos intrahepático según el grado de adiposidad

Se analizó el grado de adiposidad en las ratas delgadas y obesas de ambos grupos de edad, jóvenes (6 semanas de edad) y adultas (20 semanas de edad), examinando el peso y la composición corporal. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en el peso corporal, en la masa grasa y en la masa libre de grasa entre el grupo de ratas delgadas y obesas jóvenes (**Figura 18A**). En el grupo de ratas adultas, las ratas obesas presentaron un mayor peso corporal y una mayor cantidad de masa grasa que sus homólogas delgadas, los cuales también fueron valores más altos que los observados en el grupo de ratas jóvenes obesas (**Figura 18A**).



**Figura 18. Evaluación del contenido de lípidos intrahepáticos relacionado con el grado de adiposidad en ratas jóvenes y adultas. (A)** Peso y composición corporal en ratas delgadas y obesas. **(B)** Imágenes representativas de secciones de hígado teñidas con hematoxilina y eosina y con *Oil Red O* (magnificación 40x). Las manchas rojas muestran pequeñas gotas de lípidos en los hepatocitos. **(C)** Grado de esteatosis. **(D)** Relación entre el peso del hígado y el peso corporal (%). **(E)** Contenido hepático total de triacilglicerol. Los datos se presentan como media  $\pm$  error estándar de la media (n=7-10 animales/grupo). La significación estadística se calculó mediante ANOVA y prueba *post-hoc* de Bonferroni. a, Diferencias estadísticamente significativas en comparación con el grupo de ratas homólogas delgadas ( $p < 0,05$ ). b, Diferencias estadísticamente significativas en comparación con el grupo de ratas jóvenes ( $p < 0,05$ ). H&E, tinción hematoxilina y eosina; u.a., unidades arbitrarias.

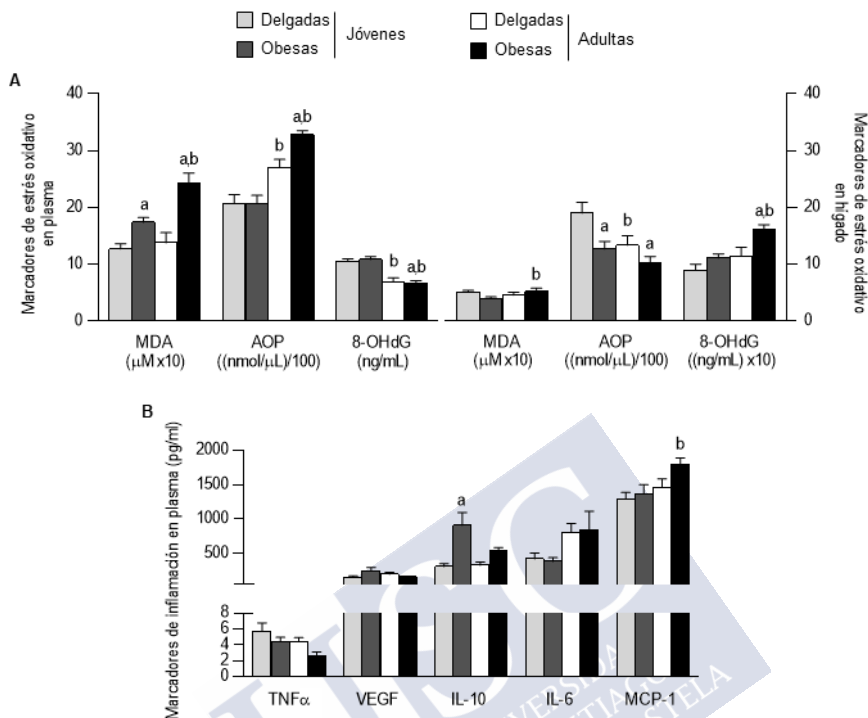


Para evaluar si este incremento en la adiposidad se manifestaba en el contenido de lípidos intrahepático, se realizaron las siguientes determinaciones. Las tinciones histológicas hematoxilina y eosina y *Oil Red O* de muestras hepáticas mostraron una mayor acumulación de lípidos en el hígado de las ratas obesas (**Figura 18B**) que se tradujo de manera estadísticamente significativa en niveles más altos de grado de esteatosis (**Figura 18C**), en la proporción de peso del hígado/peso corporal (**Figura 18D**) y en el contenido total de triacilgliceroles (**Figura 18E**).

### 1.1.2. Análisis de marcadores de estrés oxidativo e inflamación según grado de adiposidad

En base a la cantidad de masa grasa y grado de esteatosis hepática, observamos que las ratas adultas obesas registraron niveles circulantes más elevados y estadísticamente significativos de MDA y AOP en comparación con las ratas delgadas (jóvenes y adultas) y con sus homólogas jóvenes (**Figura 19A**). En cambio, niveles circulantes de 8-OHdG más bajos se registraron en el grupo de ratas adultas, los cuales fueron estadísticamente significativos entre ellos y en comparación con el grupo de ratas jóvenes (**Figura 19A**). En el lisado de hígado, no se observaron diferencias en la concentración de MDA entre las ratas delgadas y obesas, aunque el aumento de los niveles en el grupo de ratas adultas obesas mostró significancia estadística respecto de sus homólogas jóvenes (**Figura 19A**). Sin embargo, los niveles de AOP y 8-OHdG medidos en el lisado fueron opuestos a los obtenidos en el plasma (**Figura 19A**).

En cuanto a los marcadores de inflamación, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de animales en los niveles de TNF $\alpha$ , VEGF e IL-6, (**Figura 19B**). En cambio, las ratas jóvenes obesas mostraron mayores niveles circulantes de IL-10 y las ratas adultas obesas presentaron mayores niveles de MCP-1, ambos marcadores con diferencias estadísticamente significativas (**Figura 19B**).

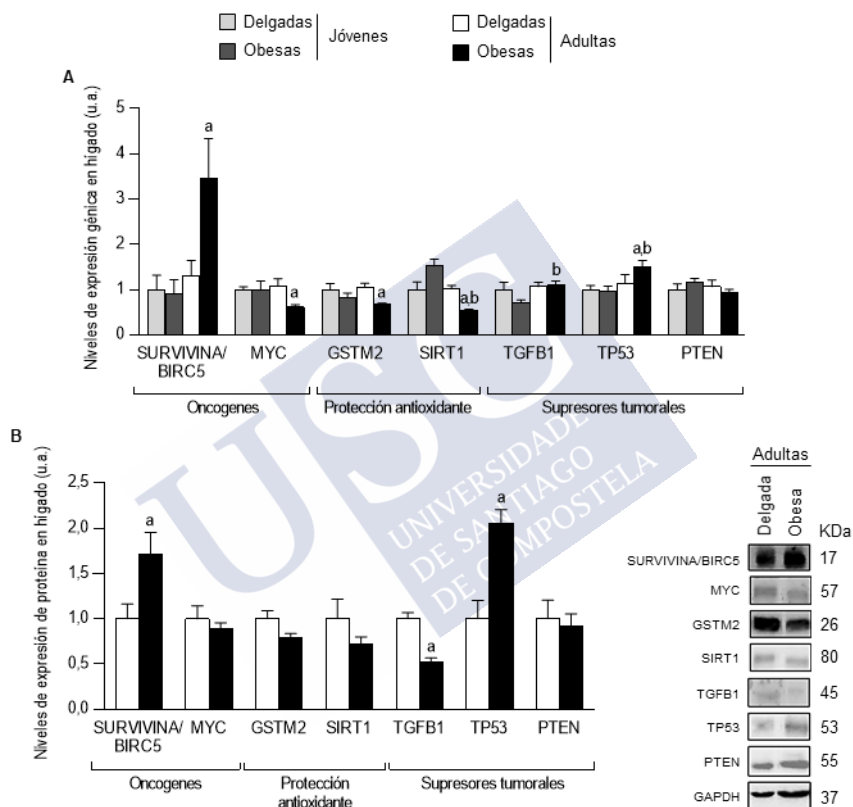


**Figura 19. Niveles de biomarcadores de estrés oxidativo e inflamación según grado de adiposidad en ratas jóvenes y adultas. (A) Niveles plasmáticos y tisulares hepáticos de los marcadores de estrés oxidativo MDA, AOP y 8-OHdG. (B) Niveles plasmáticos de los marcadores de inflamación TNF $\alpha$ , VEGF, IL-10, IL-6 y MCP-1. Los datos se presentan como media  $\pm$  error estándar de la media (n=7-10 animales/grupo). La significación estadística se calculó mediante ANOVA y prueba *post-hoc* de Bonferroni. a, Diferencias estadísticamente significativas en comparación con el grupo de ratas homólogas delgadas ( $p < 0,05$ ). b, Diferencias estadísticamente significativas en comparación con el grupo de ratas jóvenes ( $p < 0,05$ ).**

### 1.1.3. Análisis de la expresión de genes relacionados con la carcinogénesis según grado de adiposidad

Cuando se evaluó la expresión de genes relacionados con el inicio de la carcinogénesis, los cambios estadísticamente significativos se evidenciaron en las muestras hepáticas del grupo de ratas adultas obesas. Se observó un importante incremento en la expresión del gen

*SURVIVINA/BIRC5* acompañado de una disminución en los niveles de expresión de los genes *MYC*, *GSTM2* y *SIRT1*, junto con un aumento del gen *TP53* (**Figura 20A**). Tras comparar este grupo de ratas adultas obesas con sus homólogas jóvenes, los cambios descritos fueron significativos para los genes *SIRT1*, *TGFB1* y *TP53* (**Figura 20A**).



**Figura 20. Expresión hepática de genes relacionados con la carcinogénesis en ratas jóvenes y adultas.** (A) Niveles de expresión génica en muestras de hígado (ensayos realizados por triplicado). (B) Niveles de expresión de proteína en lisados de hígado (ensayos realizados por triplicado). Los datos se presentan como media  $\pm$  error estándar de la media (n=7-10 animales/grupo). La significación estadística se calculó mediante ANOVA y prueba *post-hoc* de Bonferroni y mediante prueba t de Student (expresión proteica). a, Diferencias estadísticamente significativas en comparación con el grupo de ratas homólogas delgadas ( $p < 0,05$ ). b, Diferencias estadísticamente significativas en comparación con el grupo de ratas jóvenes ( $p < 0,05$ ). u.a., unidades arbitrarias; KDa, kilodalton.

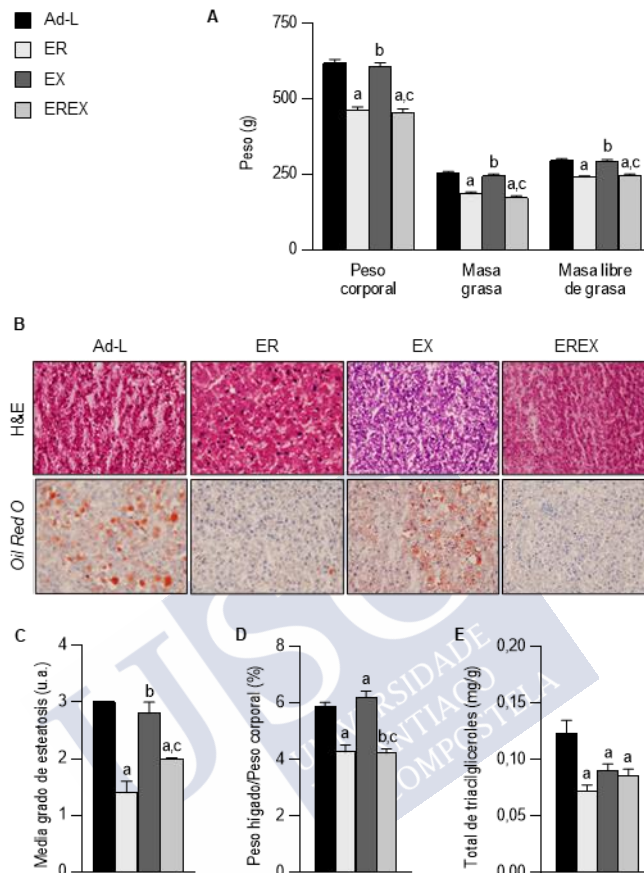
Las diferencias detectadas en los perfiles de expresión génica se reflejaron en los niveles de proteína medidos en las muestras de hígado, a excepción de TGFB1 (**Figura 20B**).

## 1.2. EFECTO DE LA PÉRDIDA PESO

### 1.2.1. Contenido de lípidos intrahepáticos tras pérdida de peso

Tras finalizar el periodo establecido (4 semanas) para las distintas intervenciones para pérdida de peso, el grupo de ratas bajo restricción energética (ER) y el grupo de ratas bajo restricción energética y ejercicio (EREX) exhibieron de media un 25% menos de peso corporal junto una menor cantidad de masa grasa y masa libre de grasa en comparación con el grupo de ratas obesas control (Ad-L), diferencias todas ellas estadísticamente significativas (**Figura 21A**). Sin embargo, el grupo de ratas con ejercicio (EX) no mostró diferencias en cuanto al peso y la composición corporal respecto al grupo control (Ad-L) (**Figura 21A**).

Cuando investigamos si estos cambios sobre el grado de adiposidad se manifestaban en cambios en el contenido de los lípidos en el hígado, observamos una disminución en el acúmulo lipídico hepático del grupo de ratas ER y EREX respecto del grupo control. Esta disminución estadísticamente significativa fue determinada en base a las imágenes de las tinciones histológicas *Oil Red O* (**Figura 21B**), a la cuantificación del grado de esteatosis (**Figura 21C**), al porcentaje de la ratio peso del hígado/peso corporal (**Figura 21D**) y al contenido hepático total de triacilgliceroles (**Figura 21E**). En el grupo de ratas EX no se observaron cambios estadísticamente significativos en ninguno de los parámetros observados respecto al grupo control (Ad-L) (**Figura 21B - E**).



**Figura 21.** Efecto de la intervención para pérdida de peso sobre el contenido de lípidos intrahepáticos relacionado con el grado de adiposidad en ratas adultas obesas. (A) Peso y composición corporal de los grupos experimentales de ratas obesas. (B) Imágenes representativas de secciones de hígado teñidas con hematoxilina y eosina y con *Oil Red O* (magnificación 40x). Las manchas rojas muestran pequeñas gotas de lípidos en los hepatocitos. (C) Grado de esteatosis. (D) Relación entre el peso del hígado y el peso corporal (%). (E) Contenido hepático total de triacilglicéoles. Los datos se presentan como media  $\pm$  error estándar de la media ( $n=7-10$  animales/grupo). La significación estadística se calculó mediante ANOVA y prueba *post-hoc* de Bonferroni. a, Diferencias estadísticamente significativas en comparación con el grupo de ratas Ad-L ( $p<0,05$ ). b, Diferencias estadísticamente significativas en comparación con el grupo de ratas ER ( $p<0,05$ ).c, Diferencias estadísticamente significativas en comparación con el grupo de ratas EX ( $p<0,05$ ). Ad-L, grupo de ratas obesas control *ad libitum*; ER, grupo de ratas restricción energética; EX, grupo de ratas ejercicio; EREX, grupo de ratas restricción energética y ejercicio; H&E, tinción hematoxilina y eosina; u.e., unidades arbitrarias.

### 1.2.2. Evaluación de marcadores de estrés oxidativo e inflamación tras pérdida de peso

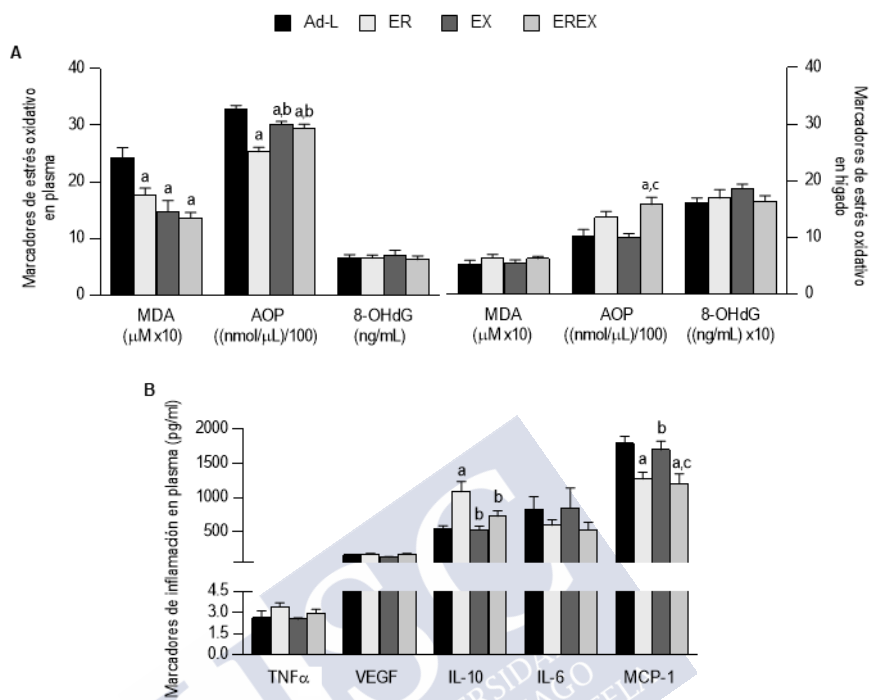
De manera concomitante a la disminución observada en el peso corporal, la masa grasa y el acúmulo de lípidos intrahepáticos, los tres grupos de ratas sometidos a pérdida de peso (ER, EX y EREX) mostraron diferencias en los marcadores de estrés oxidativo analizados.

En concreto, se observaron niveles plasmáticos de MDA más bajos y estadísticamente significativos respecto al grupo obeso control Ad-L, aunque sin diferencias detectadas en lisado de hígado (**Figura 22A**).

Así mismo, los niveles circulantes de AOP también disminuyeron de manera estadísticamente significativa tras pérdida de peso (específicamente en ER), mientras que los niveles observados en el lisado hepático fueron más altos en el grupo ER y EREX que en el grupo Ad-L (especialmente en EREX) (**Figura 22A**). En cambio, los niveles de 8-OHdG no mostraron diferencias entre los grupos de estudio, ni en plasma ni en lisado hepático (**Figura 22A**).

En cuanto a los marcadores de inflamación estudiados, en el grupo de ratas ER se observó un aumento estadísticamente significativo sobre los niveles circulantes de IL-10 en comparación con el grupo obeso control Ad-L y respecto a los otros grupos de pérdida de peso (**Figura 22B**).

Los niveles plasmáticos de MCP-1 se muestran más bajos en los grupos de ER y EREX en comparación el grupo Ad-L, ambos con significación estadística. No fueron detectados cambios significativos en los niveles circulantes de los marcadores TNF $\alpha$ , VEGF y IL-6 (**Figura 22B**).



**Figura 22.** Efecto de la intervención para pérdida de peso sobre los niveles de biomarcadores de estrés oxidativo e inflamación relacionado con el grado de adiposidad en ratas adultas obesas. **(A)** Niveles plasmáticos y tisulares de los marcadores de estrés oxidativo MDA, AOP y 8-OHdG. **(B)** Niveles plasmáticos de los marcadores de inflamación TNF $\alpha$ , VEGF, IL-10, IL-6 y MCP-1. Los datos se presentan como media  $\pm$  error estándar de la media (n=7-10 animales/grupo). La significación estadística se calculó mediante ANOVA y prueba *post-hoc* de Bonferroni. a, Diferencias estadísticamente significativas en comparación con el grupo de ratas Ad-L ( $p < 0,05$ ). b, Diferencias estadísticamente significativas en comparación con el grupo de ratas ER ( $p < 0,05$ ). c, Diferencias estadísticamente significativas en comparación con el grupo de ratas EX ( $p < 0,05$ ). Ad-L, grupo de ratas obesas control ad libitum; ER, grupo de ratas restricción energética; EX, grupo de ratas ejercicio; EREX, grupo de ratas restricción energética y ejercicio.

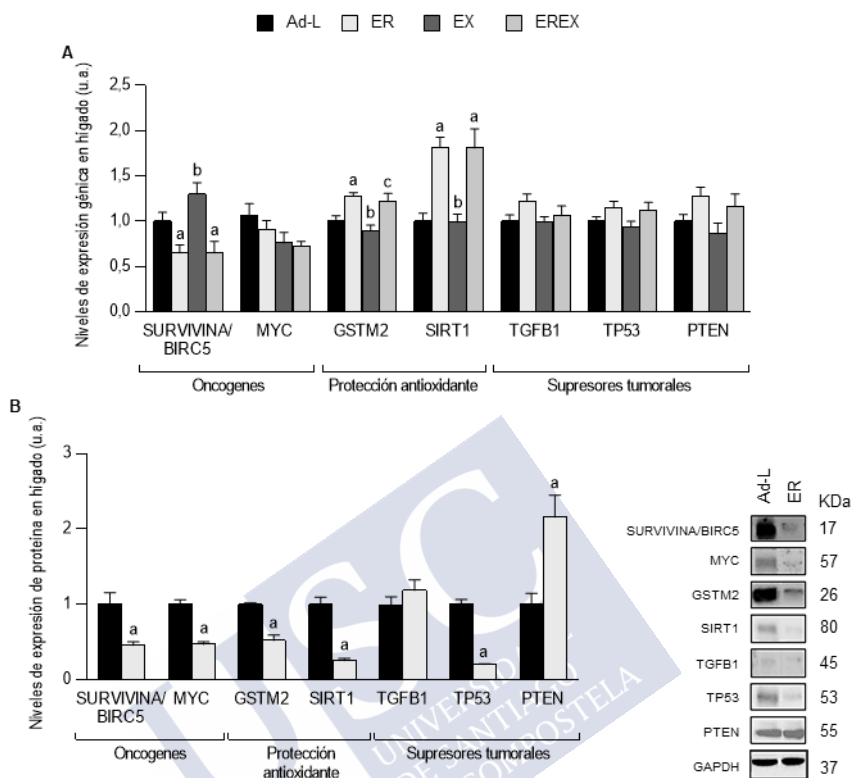
### 1.2.3. Cuantificación de la expresión de genes relacionados con la carcinogénesis hepática tras pérdida de peso

El grupo de ratas ER y el grupo de ratas EREX mostraron una disminución en la expresión del gen *SURVIVINA/BIRC5* junto con un incremento en la expresión de los genes *GSTM2* y *SIRT1*, cambios que fueron estadísticamente significativos en comparación al grupo control Ad-L (especialmente en ER). En ambos grupos, no se observaron diferencias estadísticas en la expresión de los genes *MYC*, *TGFB1*, *TP53* y *PTEN*, aunque sus perfiles presentaron una tendencia opuesta a la observada en el grupo Ad-L (**Figura 23A**).

El grupo de ratas EX no exhibió diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo Ad-L en los niveles de expresión de los genes relacionados con la carcinogénesis ensayados en este estudio, aunque si presentó diferencias respecto al grupo ER y EREX, particularmente en los genes *SURVIVINA/BIRC5*, *GSTM2* y *SIRT1* (**Figura 23A**).

En cuanto a los niveles de proteína medidos en el hígado del grupo de ratas ER en comparación con el grupo Ad-L, los resultados obtenidos fueron equivalentes a los niveles de expresión génica observados para *SURVIVINA/BIRC5*, *MYC*, *TGFB1* y *PTEN*. En cambio, el patrón de expresión de proteínas para *GSTM2*, *SIRT1* y *TP53* fue opuesto al medido a nivel transcripcional (**Figura 23B**).





**Figura 23. Efecto de la intervención para pérdida de peso sobre la expresión hepática de genes relacionados con la carcinogénesis en ratas adultas obesas. (A)** Niveles de expresión génica en muestras de hígado (ensayos realizados por triplicado). **(B)** Niveles de expresión de proteína en lisados de hígado (ensayos realizados por triplicado). Los datos se presentan como media  $\pm$  error estándar de la media ( $n=7-10$  animales/grupo). La significación estadística se calculó mediante ANOVA y prueba *post-hoc* de Bonferroni y mediante prueba t de Student (expresión proteica). a, Diferencias estadísticamente significativas en comparación con el grupo de ratas Ad-L ( $p<0,05$ ). b, Diferencias estadísticamente significativas en comparación con el grupo de ratas ER ( $p<0,05$ ).c, Diferencias estadísticamente significativas en comparación con el grupo de ratas EX ( $p<0,05$ ). Ad-L, grupo de ratas obesas control ad libitum; ER, grupo de ratas restricción energética; EX, grupo de ratas ejercicio; EREX, grupo de ratas restricción energética y ejercicio; u.a., unidades arbitrarias; KDa, kilodalton.



## 2. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN HEPÁTICA DE *SIRT6* EN ASOCIACIÓN AL ESTRÉS OXIDATIVO INDUCIDO POR EXCESO DE ADIPOSIDAD

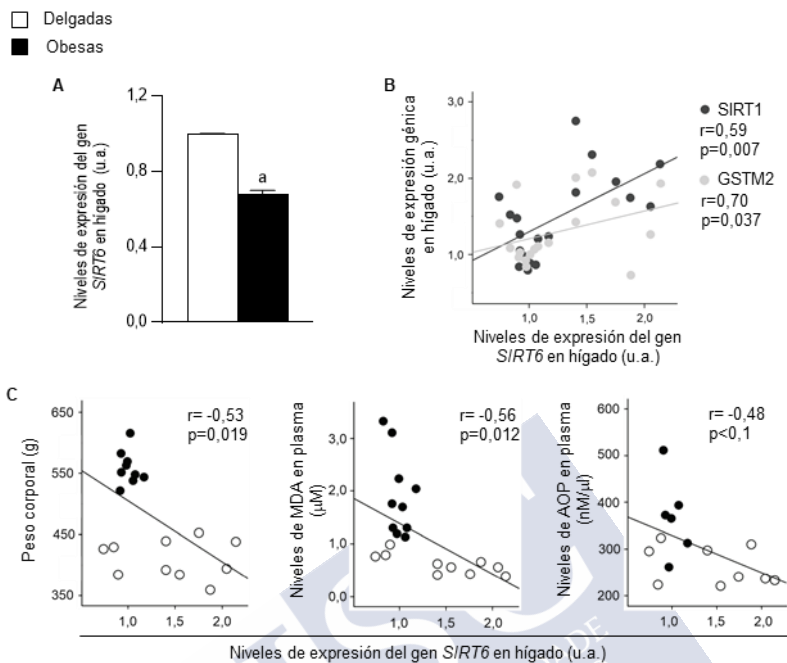
La *SIRT6* fue propuesta como un factor implicado en la obesidad y desórdenes metabólicos como la esteatosis hepática (366,555,556) y juega un papel importante en la regulación del estrés oxidativo y la carcinogénesis (368,557). Por tanto, en este estudio se analizaron los niveles transcripcionales de *SIRT6* en las muestras de hígado de los distintos grupos experimentales.

### 2.1. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE *SIRT6* EN OBESIDAD

En las ratas Zucker adultas (20 semanas de edad), observamos una disminución estadísticamente significativa en los niveles de expresión de *SIRT6* en comparación con el grupo de ratas delgadas control (**Figura 24A**).

De manera relevante, observamos una correlación positiva y estadísticamente significativa entre los niveles de expresión de *SIRT6* y los niveles de *GSTM2* y *SIRT1* (**Figura 24B**), dos genes relacionados con la protección antioxidante.

De hecho, cuando analizamos la correlación entre el perfil de expresión de *SIRT6* con el peso corporal y los marcadores de estrés oxidativo MDA y AOP cuantificados previamente, se observó también una correlación negativa y estadísticamente significativa entre los parámetros ensayados (**Figura 24C**).

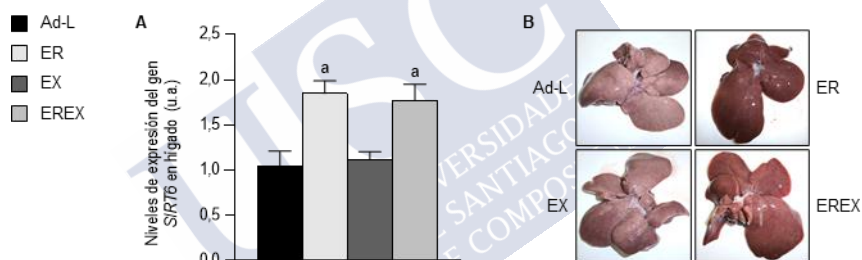


**Figura 24. Expresión hepática del gen *SIRT6* en relación con marcadores de estrés oxidativo en ratas adultas delgadas y obesas.** (A) Niveles de expresión génica de *SIRT6* en muestras de hígado (ensayos realizados por triplicado). (B) Asociación entre los niveles de expresión de *SIRT6* con los niveles de expresión de *SIRT1* y *GSTM2*, genes relacionados con la protección antioxidante (ensayos realizados por triplicado). (C) Asociación entre los niveles de expresión de *SIRT6* con el peso corporal y con niveles plasmáticos de los marcadores de estrés oxidativo MDA y AOP. Los datos se presentan como media  $\pm$  error estándar de la media ( $n=7-10$  animales/grupo). La significación estadística se calculó mediante prueba t de Student y mediante el coeficiente de correlación de Spearman ( $r$ ). a, Diferencias estadísticamente significativas en comparación con el grupo de ratas delgadas ( $p<0,05$ ). u.a., unidades arbitrarias.

## 2.2. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE *SIRT6* TRAS PÉRDIDA DE PESO

Con el fin de reforzar la asociación entre la expresión de *SIRT6* y el grado de adiposidad, se analizaron los niveles de expresión de este gen en las muestras hepáticas de los animales tras pérdida de peso. Tras el análisis, el grupo de ratas ER y EREX mostraron niveles más altos y estadísticamente significativos en comparación con el grupo de ratas obesas Ad-L control, aunque dichos cambios no fueron detectados en el grupo de ratas EX (**Figura 25A**).

Estos resultados fueron concomitantes al menor acúmulo de grasa intrahepática observada previamente en los hígados de las ratas de los grupos ER y EX en comparación a los grupos Ad-L y EX, reflejado en las imágenes representativas (**Figura 25B**).



**Figura 25.** Efecto de la intervención para pérdida de peso sobre la expresión hepática del gen *SIRT6* en ratas adultas obesas. (A) Niveles de expresión génica en muestras de hígado (ensayos realizados por triplicado). (B) Imágenes representativas de los hígados de los grupos experimentales de animales incluidos en el estudio. La significación estadística se calculó mediante ANOVA y prueba post-hoc de Bonferroni y mediante prueba t de Student (expresión proteica). a, Diferencias estadísticamente significativas en comparación con el grupo de ratas Ad-L ( $p < 0,05$ ). Ad-L, grupo de ratas obesas control ad libitum; ER, grupo de ratas restricción energética; EX, grupo de ratas ejercicio; EREX, grupo de ratas restricción energética y ejercicio; u.a., unidades arbitrarias.



### **3. ESTUDIO DEL PERFIL DE EXPRESIÓN DEL ONCOGEN *SURVIVINA/BIRC5* EN TEJIDO ADIPOSO EN RELACIÓN AL GRADO DE ADIPOSIDAD**

Dado que la expresión hepática de los genes relacionados con el inicio de la carcinogénesis se relacionaba con parámetros de adiposidad, nos planteamos evaluar el oncogen *SURVIVINA/BIRC5* en tejido adiposo en relación a diferentes grados de adiposidad.

Para ello empleamos diferentes modelos animales de obesidad y cohortes de pacientes con obesidad y tras pérdida de peso para estudiar su expresión génica en tejido adiposo y leucocitos de sangre periférica.

#### **3.1. PAPEL DE LA OBESIDAD Y LA PÉRDIDA DE PESO EN ANIMALES**

##### **3.1.1. Análisis de la expresión de *SURVIVINA/BIRC5* en el tejido adiposo de roedores obesos**

Los niveles transcripcionales de *SURVIVINA/BIRC5* se evaluaron en muestras procedentes de tejido adiposo subcutáneo (SAT) y visceral (VAT) de modelos animales de obesidad genética (Ratas Zuckers) y modelos animales de obesidad inducida por la dieta (DIO) (Ratas Sprague Dawley y ratones C57BL/6J). Las características de los grupos evaluados en este estudio se muestran en la **tabla 4**.

Tabla 4. Características de los grupos experimentales de animales según el tipo de modelo de obesidad.

Grupo	Ratas obesidad genética (Zucker)				
	Delgadas	Obesas	ER	EX	EREX
n	10	10	10	10	10
Edad (sem)	20	20	20	20	20
Peso corporal final (g)	428,4±20,2	617,7±46,3 <sup>a</sup>	462,2±38,5 <sup>b</sup>	606,3±44,8 <sup>a,c</sup>	455,3±37,6 <sup>b,d</sup>
SAT (g)	2,85±0,65	9,44±0,82 <sup>a</sup>	7,50±1,49 <sup>a,b</sup>	8,72±1,57 <sup>a</sup>	7,19±1,35 <sup>a,b</sup>
VAT (g)	3,60±0,63	10,34±0,99 <sup>a</sup>	8,42±1,62 <sup>a,b</sup>	9,85±1,99 <sup>a</sup>	7,99±1,34 <sup>a,b,d</sup>
Grupo	Ratas DIO (Sprague Dawley)		Ratones DIO (C57BL/6J)		
	Delgadas	Obesas	Delgados	Obesos	ER
n	12	14	4	8	8
Edad (sem)	16	16	38	38	38
Peso corporal final (g)	225,2±11,7	246,7±18,8 <sup>a</sup>	34,5±2,70	53,0±2,71 <sup>a,c</sup>	42,5±5,50 <sup>a,b</sup>
SAT (g)	2,25±0,18	2,79±0,29 <sup>a</sup>	0,35±0,10	1,87±0,33 <sup>a</sup>	1,25±0,30 <sup>a,b</sup>
VAT (g)	2,22±0,21	3,29±0,19 <sup>a</sup>	0,42±0,12	0,95±0,18 <sup>a</sup>	0,53±0,17 <sup>b</sup>

Los datos se muestran como media ± desviación estándar. La significación estadística se calculó mediante ANOVA y prueba post-hoc de Bonferroni y mediante prueba t de Student (ratas DIO). a, Diferencias estadísticamente significativas en comparación con el grupo de roedores delgados correspondiente a cada modelo ( $p < 0,05$ ). b, Diferencias estadísticamente significativas con el grupo de roedores obesos correspondiente a cada modelo ( $p < 0,05$ ). c, Diferencias estadísticamente significativas con el grupo de ratas ER ( $p < 0,05$ ). d, Diferencias estadísticamente significativas con el grupo de ratas EX ( $p < 0,05$ ).

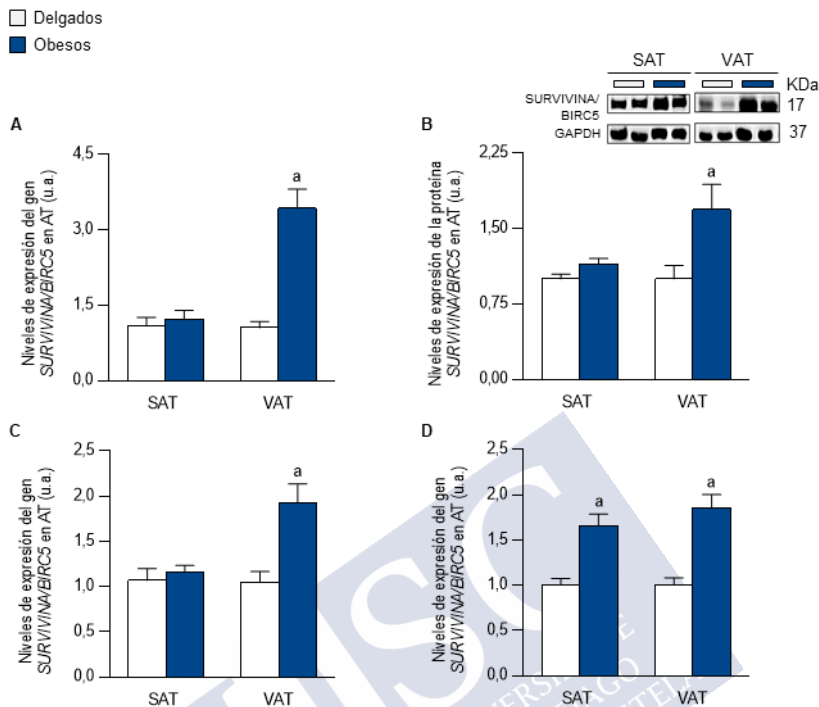
ER, restricción energética; EX, ejercicio; EREX, restricción energética y ejercicio; n, tamaño muestral; sem, semanas; SAT, tejido adiposo subcutáneo, VAT, tejido adiposo visceral; DIO, obesidad inducida por la dieta.



En las ratas Zucker (20 semanas de edad), el grupo de ratas obesas exhibió un incremento estadísticamente significativo en los niveles de expresión de *SURVIVINA/BIRC5* en muestras de VAT en comparación con el grupo de ratas delgadas control. Sin embargo, los niveles de expresión de *SURVIVINA/BIRC5* medidos en muestras de SAT no revelaron diferencias significativas entre ambos grupos (**Figura 26A**). Los cambios detectados a nivel de expresión génica fueron confirmados con los niveles de proteína ensayados sobre las mismas muestras de tejido (**Figura 26B**).

En las ratas DIO (Sprague Dawley, 16 semanas de edad), observamos resultados de expresión de *SURVIVINA/BIRC5* similares a los observados en las ratas Zucker. En concreto, el grupo de ratas obesas DIO exhibió niveles más altos y estadísticamente significados en VAT en comparación con el grupo de ratas delgadas control (**Figura 26C**), mientras que la expresión del gen en SAT no reveló diferencias entre grupos (**Figura 26C**).

En los ratones DIO (C57BL/6J, 38 semanas de edad), de nuevo observamos una mayor expresión del gen *SURVIVINA/BIRC5* en las muestras de VAT procedentes del grupo de ratones obesos respecto al grupo de ratones delgados control (**Figura 26D**). Curiosamente, en este modelo la expresión de *SURVIVINA/BIRC5* en muestras SAT también mostró un incremento estadísticamente significativo en el grupo de ratones obesos en comparación con los niveles observados en el grupo de ratones delgados (**Figura 26D**).



**Figura 26. Expresión del oncogen SURVIVINA/BIRC5 en tejido adiposo según el grado de adiposidad en roedores. (A)** Niveles de expresión génica en muestras de SAT y VAT de ratas Zucker delgadas y obesas (modelo de obesidad genética) (ensayos realizados por triplicado). **(B)** Niveles de expresión de proteína en muestras de SAT y VAT de ratas Zucker delgadas y obesas (modelo de obesidad genética) (ensayos realizados por triplicado). **(C)** Niveles de expresión génica en muestras de SAT y VAT de ratas Sprague Dawley delgadas y obesas (modelo DIO) (ensayos realizados por triplicado). **(D)** Niveles de expresión génica en muestras de SAT y VAT de ratones C57BL/6 delgadas y obesos (modelo DIO) (ensayos realizados por triplicado). Los datos se presentan como media  $\pm$  error estándar de la media (n=10 animales/grupo en ratas Zucker; n=12-14 animales/grupo en ratas Sprague Dawley; n=4-8 animales/grupo en ratones C57BL/6). La significación estadística se calculó mediante prueba t de Student. a, Diferencias estadísticamente significativas en comparación con el grupo de roedores delgados correspondiente a cada modelo ( $p < 0,05$ ). u.a., unidades arbitrarias; KDa, kilodalton.

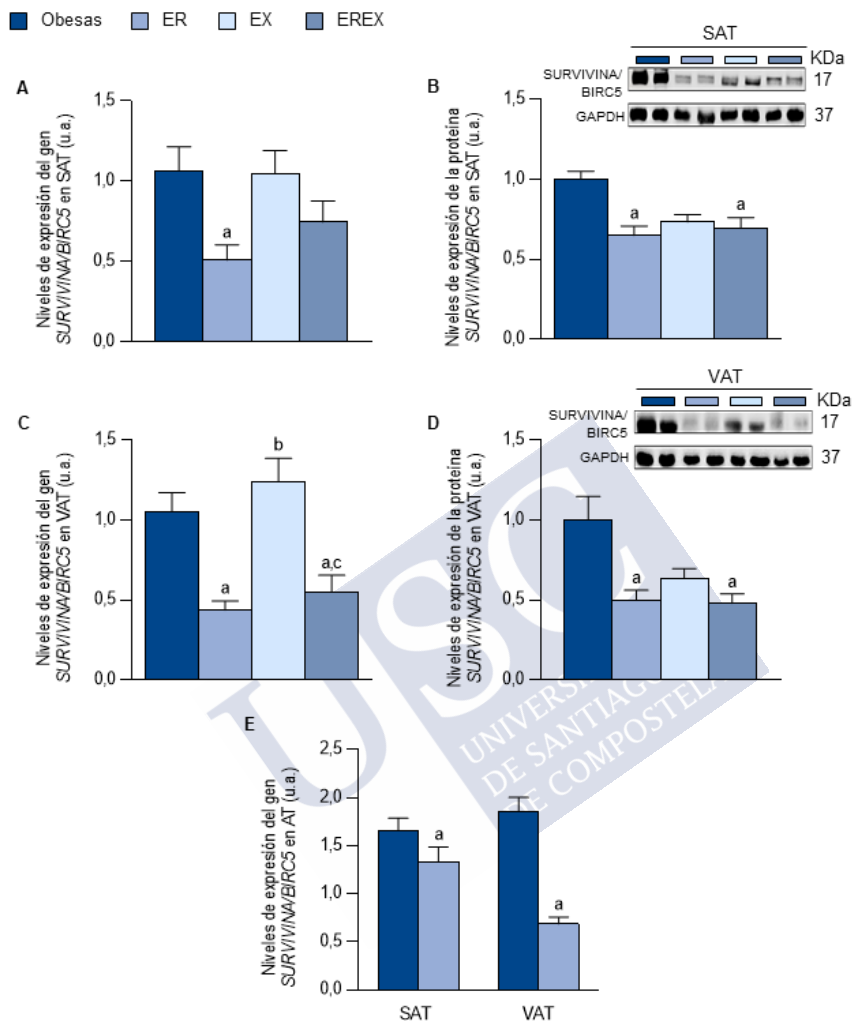
### 3.1.2. Análisis de la expresión de *SURVIVINA/BIRC5* en el tejido adiposo de roedores después de intervenciones para pérdida de peso

En el contexto de la pérdida de peso, las ratas Zucker obesas sometidas a intervenciones para pérdida de peso basadas en restricción energética y/o ejercicio mostraron cambios en los niveles de expresión del gen *SURVIVINA/BIRC5* (**Figura 27A-D**).

En el grupo de ratas ER y EREX se observaron niveles transcripcionales más bajos en comparación con el grupo de ratas obesas, los cuales fueron estadísticamente significativos para el grupo ER en muestras de SAT (**Figura 27A**) y para ambos grupos en muestras de VAT (**Figura 27C**). Dichos cambios, fueron reflejados en los niveles de proteína, tanto en muestras procedentes de SAT (**Figura 27B**) como VAT (**Figura 27D**), con significación estadística en ambos grupos de pérdida de peso.

Sin embargo, no se observaron diferencias significativas sobre los niveles de expresión génica y proteica entre los grupos de ratas EX y obesas (**Figura 27A-D**).

En los ratones DIO sometidos a restricción calórica para pérdida de peso, el grupo experimental de restricción exhibe una disminución de la expresión del gen *SURVIVINA/BIRC5* hasta niveles similares a los observados en el grupo de ratones delgados control, la cual fue estadísticamente significativa en las muestras de VAT (**Figura 27E**).



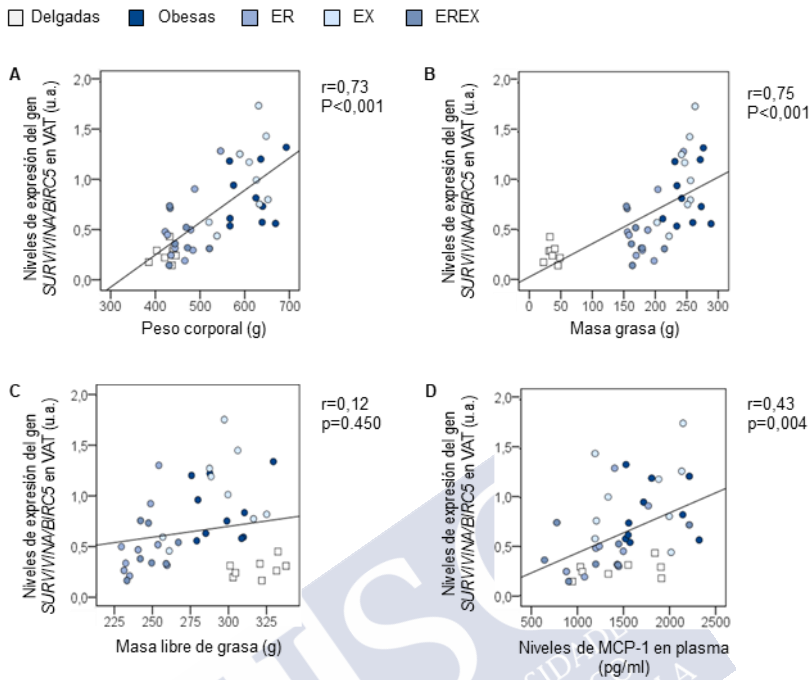
**Figura 27. Efecto de intervenciones para pérdida de peso sobre la expresión del oncogen SURVIVINA/BIRC5 en tejido adiposo según el grado de adiposidad en roedores.** Niveles de expresión génica (A) y proteica (B) en muestras de SAT de ratas Zucker obesas tras pérdida de peso (modelo de obesidad genética) (ensayos realizados por triplicado). Niveles de expresión génica (C) y proteica (D) en muestras de VAT de ratas Zucker obesas tras pérdida de peso (modelo de obesidad genética) (ensayos realizados por triplicado). (E) Niveles de expresión génica en muestras de SAT y VAT de ratones C57BL/6 obesos tras restricción calórica (modelo DIO) (ensayos realizados por triplicado).

Los datos se presentan como media  $\pm$  error estándar de la media (n=10 animales/grupo en ratas Zucker; n=8 animales/grupo en ratones C57BL/6). La significación estadística se calculó mediante ANOVA y prueba post-hoc de Bonferroni y mediante prueba t de Student (expresión modelo DIO). a, Diferencias estadísticamente significativas en comparación con el grupo de roedores obesos correspondiente a cada modelo ( $p < 0,05$ ). b, Diferencias estadísticamente significativas en comparación con el grupo de ratas ER ( $p < 0,05$ ). c, Diferencias estadísticamente significativas en comparación con el grupo de ratas EX ( $p < 0,05$ ). ER, restricción energética; EX, ratas ejercicio; EREX, ratas restricción energética y ejercicio; SAT, tejido adiposo subcutáneo; VAT, tejido adiposo visceral; u.a., unidades arbitrarias; kDa, kilodalton.

### 3.1.3. Asociación entre parámetros de adiposidad e inflamación y el perfil de expresión del oncogen *SURVIVINA/BIRC5*

Con el fin de estudiar más en profundidad la asociación entre la expresión de *SURVIVINA/BIRC5* y el exceso de grasa corporal, en el modelo animal de obesidad monogénica realizamos un análisis de correlación entre los niveles transcripcionales de *SURVIVINA/BIRC5* en tejido adiposo (SAT y VAT) y parámetros de composición corporal, tales como peso corporal, masa grasa, masa libre de grasa, y niveles plasmáticos de MCP-1 (**Figura 28**).

Los resultados del análisis revelaron una asociación positiva y estadísticamente significativa entre los niveles de expresión de *SURVIVINA/BIRC5* en VAT y el peso corporal (**Figura 28A**), la masa grasa (**Figura 28B**) y los niveles circulantes de MCP-1 (**Figura 28D**), pero no con la masa libre grasa (**Figura 28C**).



**Figura 28.** Asociación entre los niveles de expresión de *SURVIVINA/BIRC5* con parámetros de adiposidad e inflamación en ratas Zucker delgadas y obesas sometidas a intervenciones pérdida de peso. Asociación entre los niveles de expresión con el peso corporal (A), con la masa grasa (B), con la masa libre de grasa (C) y con los niveles plasmáticos del marcador de inflamación MCP-1 (D). Los datos se presentan como media  $\pm$  error estándar de la media ( $n=8-10$  animales/grupo). La significación estadística se calculó mediante el coeficiente de correlación de Spearman ( $r$ ), significativo para  $p<0,05$ . ER, restricción energética; EX, ejercicio; EREX, restricción energética y ejercicio; SAT, tejido adiposo subcutáneo; VAT, tejido adiposo visceral; u.a., unidades arbitrarias.

La misma correlación ensayada sobre los niveles de transcripción de *SURVIVINA/BIRC5* en SAT no reveló asociaciones significativas con ninguno de los parámetros estudiados (**Tabla 5**).

Tabla 5. Análisis de correlación con test estadístico rho de Spearman (r).

		Peso corporal (g)	Masa grasa (g)	Masa libre de grasa (g)	Niveles de MCP-1 en plasma (pg/ml)
Niveles de expresión del gen <i>SURVIVINA/BIRC5</i> en SAT (u.a.)	Coefficiente r	0,11	0,15	0,14	0,22
	p-valor	0,516	0,373	0,388	0,17

SAT, tejido adiposo subcutáneo; u.a., unidades arbitrarias.

Estos hallazgos determinan que la expresión de *SURVIVINA/BIRC5* asociada a la adiposidad es directamente proporcional al grado de inflamación vinculado a la disfunción del tejido adiposo visceral obeso.

### 3.2. PAPEL DE LA OBESIDAD Y LA PÉRDIDA DE PESO EN HUMANOS

#### 3.2.1. Análisis de la expresión de *SURVIVINA/BIRC5* en leucocitos sanguíneos de pacientes con obesidad

Tras demostrar los hallazgos del incremento de la expresión del oncogen *SURVIVINA/BIRC5* en modelos animales de obesidad, nos planteamos evaluar la capacidad de traslación de estos resultados a humanos. Para estudiar la expresión del gen en humanos, partimos de leucocitos de sangre periférica o PBMCs, dado que son muestras mínimamente invasivas y accesibles y se han definido como alternativa válida a las biopsias de tejidos diana como el tejido adiposo (427,558,559). Empleamos una cohorte transversal de pacientes normopeso y una cohorte longitudinal de pacientes con obesidad que siguieron un tratamiento de pérdida de peso basado en una VLCKD. Las características clínicas de dichas cohortes se muestran en la **tabla 6**.

Tabla 6. Características y parámetros antropométricos de los sujetos de estudio.

Grupo	Cohorte transversal		Cohorte longitudinal		
	Normopeso	Con Obesidad	Basal (0 Días)	Máxima cetosis (30 Días)	Punto final (180 Días)
n	29	22	25	25	25
Sexo (M/F)	10/19	10/12	10/15	10/15	10/15
Edad (años)	35,8±9,4	40,1±11,3	47,4±9,5	47,4±9,5	47,4±9,5
Peso corporal (kg)	62,0±8,8	110,5±25,7 <sup>a</sup>	92,4±10,5	83,3±9,3 <sup>a</sup>	72,1±9,1 <sup>a,b</sup>
Altura (m)	1,7±0,1	1,7±0,1	1,7±0,1	1,7±0,1	1,7±0,1
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	22,1±2,2	39,1±9,2 <sup>a</sup>	33,1±1,6	29,9±1,7 <sup>a</sup>	25,8±1,7 <sup>a,b</sup>
CC (cm)	82,6±11,6	116,8±17,2 <sup>a</sup>	109,4±8,1	101,0±7,4 <sup>a</sup>	88,2±6,5 <sup>a,b</sup>

Los datos se muestran como media  $\pm$  desviación estándar. La significación estadística se calculó mediante prueba t de Student (cohorte transversal) y mediante ANOVA de medidas repetidas y prueba post-hoc de Bonferroni (cohorte longitudinal). a, Diferencias estadísticamente significativas en comparación con el grupo normopeso/basal ( $p < 0,05$ ). b, Diferencias estadísticamente significativas en comparación con el grupo máxima cetosis ( $p < 0,05$ ).

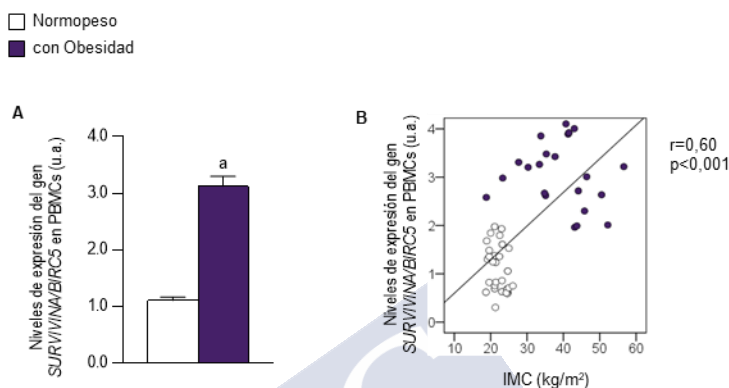
n, tamaño muestral; M, hombres; F, mujeres; IMC, índice de masa corporal; CC, circunferencia de cintura.

En la cohorte transversal, el análisis de la expresión del gen *SURVIVINA/BIRC5* en PBMCS reveló niveles más altos y estadísticamente significativos en los pacientes con obesidad en comparación con los pacientes normopeso (**Figura 29A**), reflejando los resultados observados en el VAT de los modelos animales.

Además, para reforzar estos hallazgos de asociación entre la expresión de *SURVIVINA/BIRC5* y el grado de adiposidad, se realizaron análisis de correlación entre los niveles transcripcionales de *SURVIVINA/BIRC5* y el IMC de los sujetos incluidos en el estudio.



Los resultados muestran una correlación positiva y estadísticamente significativa entre los perfiles de expresión de *SURVIVINA/BIRC5* en PBMCs y el IMC de los individuos (**Figura 29B**).

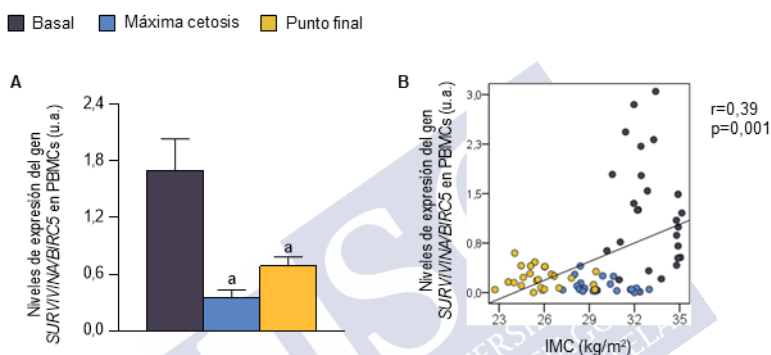


### 3.2.2. Análisis de la expresión de *SURVIVINA/BIRC5* en leucocitos sanguíneos de pacientes con obesidad que siguieron una intervención nutricional para pérdida de peso

En la cohorte longitudinal de pacientes con obesidad que siguieron una terapia de pérdida de peso basada en una VLCKD, mostraron una disminución estadísticamente significativa en el punto de máxima cetosis (media de 9 kg de pérdida de peso corporal tras 30 días de dieta) y en el punto final (media de 20 kg de pérdida de peso corporal tras 180 días de dieta) en comparación con los niveles de expresión en el punto

basal (0 días de dieta) (**Figura 30A**), resultados que corroboran los obtenidos en los modelos animales tras intervenciones para pérdida de peso.

Estos hallazgos se reforzaron en base a la correlación positiva y estadísticamente significativa analizada entre los perfiles de expresión de *SURVIVINA/BIRC5* en PBMCs y el IMC (**Figura 30B**).



**Figura 30.** Efecto de una terapia para pérdida de peso basada en una VLCKD sobre la expresión del oncogen *SURVIVINA/BIRC5* en leucocitos circulantes según el grado de adiposidad en pacientes con obesidad. (A) Niveles de expresión génica en muestras de PBMCs a los 0 (Basal), 30 (Máxima cetosis) y 180 días (Punto final) desde el inicio de la intervención (ensayos realizados por triplicado). (B) Asociación entre los niveles de expresión de *SURVIVINA/BIRC5* con el IMC de los pacientes. Los datos se presentan como media  $\pm$  error estándar de la media ( $n=25$  sujetos). La significación estadística se calculó mediante prueba ANOVA de medidas repetidas y prueba *post-hoc* de Bonferroni y mediante el coeficiente de correlación de Spearman ( $r$ ). a, Diferencias estadísticamente significativas en comparación con el punto Basal ( $p<0,05$ ). PBMCs, células mononucleares de sangre periférica; u.a., unidades arbitrarias; IMC, índice de masa corporal.

## **4. ESTUDIO DEL PERFIL DE EXPRESIÓN DE GENES RELACIONADOS CON LA CARCINOGENÉISIS EN UN MODELO *IN VITRO* DE ESTEATÓISIS HEPÁTICA**

### **4.1. INDUCCIÓN DE ESTEATOSIS EN UNA LÍNEA CELULAR DE HEPATOCITOS HUMANA MEDIANTE SECRETOMA Y SUERO DE PACIENTES CON OBESIDAD**

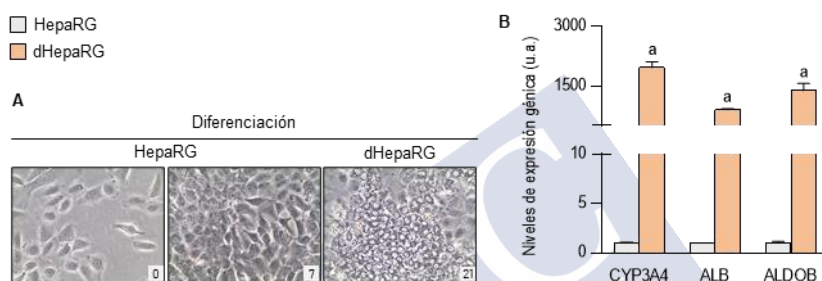
Se empleó un modelo previamente descrito de inducción de esteatosis vesicular *in vitro* en una línea celular de hepatocitos humana (HepaRG). El modelo seleccionado se desarrolla mediante un método eficaz para inducir la esteatosis en células HepaRG diferenciadas con DMSO mediante un tratamiento con oleato de sodio (138).

En este apartado se reflejan los resultados obtenidos durante la puesta a punto de la metodología de referencia y se compara con el efecto inducido por el tratamiento con el secretoma de tejido adiposo o suero sanguíneo procedente de pacientes con obesidad.

#### **4.1.1. Diferenciación de la línea celular HepaRG**

Antes de iniciar el proceso de inducción de esteatosis vesicular, se requiere que las células HepaRG estén diferenciadas. Para ello, tras 7 días en cultivo con medio de proliferación, las células alcanzaron la confluencia y fueron mantenidas con medio suplementado con DMSO al 2% (medio de diferenciación) durante 14 días. Finalizado el proceso, el día 21 las células HepaRG se han diferenciado y han formado colonias típicas de tipo hepatocito rodeadas por células de tipo epitelial biliar (**Figura 31A**).

Para confirmarlo, se analizó la expresión de marcadores hepatoespecíficos, en concreto los genes *ALB*, *CYP3A4* y *ALDOB*. Tras el análisis, observamos que los niveles de expresión de estos genes marcadores de hepatocito son más altos y estadísticamente significativos en las células HepaRG diferenciadas (dHepaRG) en comparación con las células en proliferación (**Figura 31B**). Dichos resultados demuestran que el tratamiento de diferenciación a hepatocito ha sido eficaz.

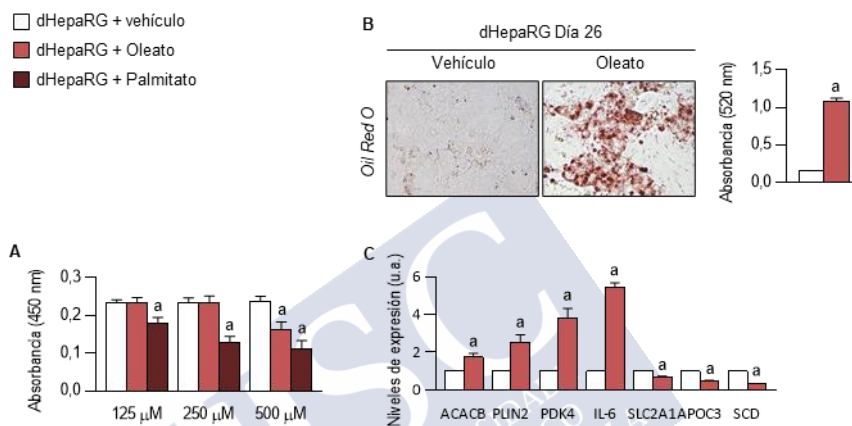


**Figura 31. Diferenciación de las células HepaRG.** (A) Imágenes representativas de las células en cultivo a día 0 (siembra), día 7 (confluencia) y día 21 (diferenciación) durante el proceso. (B) Niveles de expresión génica de marcadores hepatoespecíficos en lisados celulares (ensayos realizados por triplicado). Los datos se presentan como media ± error estándar de la media. La significación estadística se calculó mediante prueba t de Student. a, Diferencias estadísticamente significativas en comparación con las células control no diferenciadas (p<0,05). u.a., unidades arbitrarias.

#### 4.1.2. Inducción de esteatosis hepática en células dHepaRG mediante el tratamiento con oleato de sodio

La inducción de esteatosis hepática *in vitro* se basa en la adición de oleato de sodio a una concentración de 250  $\mu$ M durante 5 días. Para corroborar la reproducibilidad e idoneidad de las condiciones experimentales ensayadas de acuerdo al protocolo de referencia, se evaluó la viabilidad celular con un ensayo WST-1 sobre oleato de sodio y palmitato de sodio, compuestos ensayados por su capacidad para inducir esteatosis (560–562).

A las concentraciones de referencia ensayadas (125, 250 y 500  $\mu\text{M}$ ), los resultados en la línea dHepaRG reflejaron que el tratamiento con palmitato de sodio disminuía de manera significativa el número de células vivas en cultivo respecto al tratamiento con oleato de sodio, excepto a la concentración de 500  $\mu\text{M}$  (**Figura 32A**), datos que confirman la validez del método elegido.



**Figura 32. Tratamiento de las células dHepaRG con oleato de sodio para inducción de esteatosis vesicular *in vitro*.** (A) Evaluación de la viabilidad celular con ensayo WST-1 tras 5 días de tratamiento para inducir esteatosis. (B) Imágenes representativas de las células teñidas con *Oil Red O* (magnificación 40x) y medición de la absorbancia del colorante eluido desde las células. (C) Niveles de expresión de genes relacionados con el metabolismo de los lípidos e inflamación en lisados celulares (ensayos realizados por triplicado). Los datos se presentan como media  $\pm$  error estándar de la media. La significación estadística se calculó mediante prueba t de Student. a, Diferencias estadísticamente significativas en comparación con las células dHepaRG control tratadas con vehículo ( $p < 0,05$ ). u.a., unidades arbitrarias.

Tras el tratamiento con oleato de sodio, observamos que las células dHepaRG tratadas presentaban una acumulación de grasa en forma de pequeñas gotas de lípidos en el citoplasma visibles en el microscopio óptico y positivas para la tinción *Oil Red O* (**Figura 32B**), en comparación con las células dHepaRG control tratadas con vehículo. Además, la absorbancia del *Oil Red O* eluido de las células fue directamente proporcional y estadísticamente significativa a la acumulación de las gotas lipídicas citoplasmáticas (**Figura 32B**).

Dado que el tratamiento con oleato de sodio desencadena inflamación y provoca la desregulación del metabolismo de los lípidos, se evaluó la expresión de una serie de genes vinculada a dichos procesos en los lisados celulares.

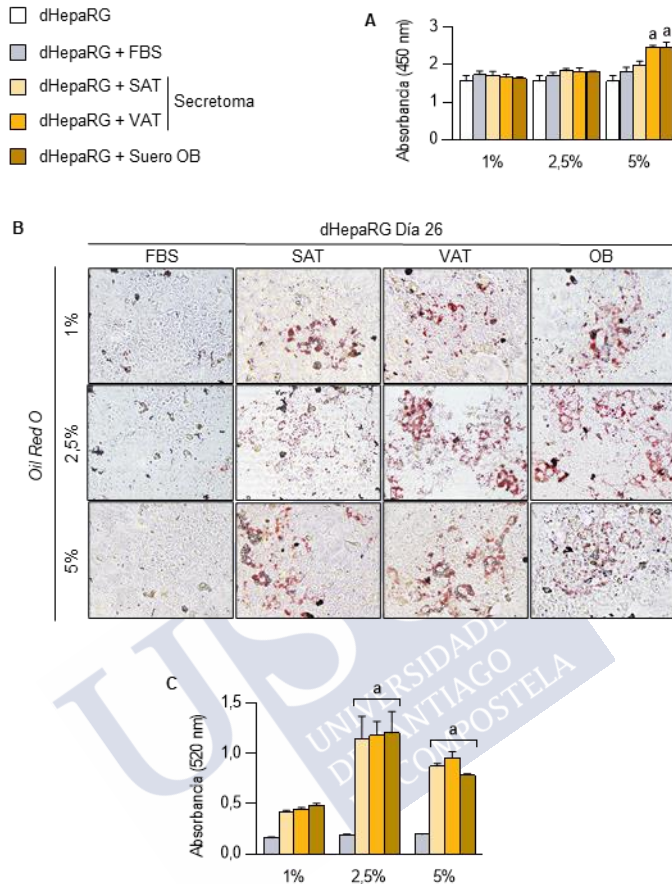
En las células dHepaRG tratadas con oleato observamos un incremento en los niveles de expresión de los genes *ACACB*, *PLIN2*, *PDK4* e *IL-6* junto con una disminución en los niveles de los genes *SLC2A1*, *APOC3* y *SCD*. Dichos cambios fueron estadísticamente significativos comparados con los niveles de las células dHepaRG control tratadas con vehículo (**Figura 32C**).

#### **4.1.3. Tratamiento de las células dHepaRG con secretoma de tejido adiposo y con suero de pacientes con obesidad**

Una vez confirmada la reproducibilidad del protocolo experimental de referencia, evaluamos si la inducción de esteatosis por oleato podía reproducirse mediante el tratamiento con secretoma de SAT y VAT o con suero OB procedentes de muestras de pacientes con obesidad severa obtenidas antes de someterse a cirugía bariátrica ( $52,0 \pm 3,5$  años,  $IMC=54,1 \pm 7,6$  kg/m<sup>2</sup>; n=6).

Las condiciones establecidas respecto a las concentraciones de los tratamientos (1, 2,5 y 5%) se seleccionaron en base a estudios similares previos del grupo (83) y el tiempo de exposición a los mismos según el protocolo de inducción de esteatosis hepática por oleato de sodio (138).

En primer lugar, se cuantificó la viabilidad celular con un ensayo WST-1. Los tratamientos realizados en las células dHepaRG no mostraron diferencias estadísticamente significativas respecto al porcentaje de células vivas cuando se compararon con las mismas células tratadas con FBS a las concentraciones ensayadas o en ausencia de tratamiento (mantenidas con medio de diferenciación), a excepción de las células tratadas con secretoma de VAT y suero OB al 5% donde se observa un incremento en la absorbancia vinculado a una mayor proliferación celular (**Figura 33A**).



**Figura 33. Tratamiento de las células dHepaRG con secretomas de tejido adiposo y suero de pacientes con obesidad. (A)** Evaluación de la viabilidad celular con ensayo WST-1 tras 5 días de tratamiento. **(B)** Imágenes representativas de las células teñidas con Oil Red O (magnificación 40x). **(C)** Medición de la absorbancia del colorante eluido desde las células. Los datos se presentan como media  $\pm$  error estándar de la media. La significación estadística se calculó mediante prueba t de Student. a, Diferencias estadísticamente significativas en comparación con las células dHepaRG control tratadas con FBS ( $p < 0,05$ ). FBS, suero bovino fetal; SAT, tejido adiposo subcutáneo; VAT, tejido adiposo visceral; OB, obesidad; u.a., unidades arbitrarias.

Transcurridos los 5 días de tratamiento, tanto las células dHepaRG tratadas con el secretoma de SAT y de VAT como a las que se les adicionó suero OB, mostraron un acúmulo de gotas lipídicas en el citoplasma semejante al observado en las células tratadas con oleato, como refleja la tinción *Oil Red O* positiva en comparación con las células dHepaRG control tratadas con FBS para todas las concentraciones ensayadas (**Figura 33B**).

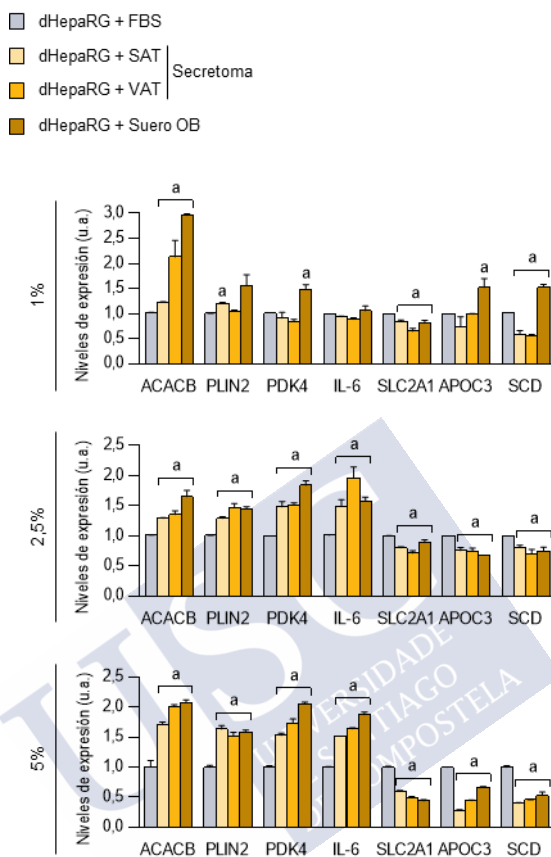
La medición de la absorbancia sobre el *Oil Red O* eluido fue directamente proporcional y estadísticamente significativa a esta acumulación de grasa detectada (**Figura 33C**).

Para determinar si estos tratamientos también podían ocasionar un efecto sobre los marcadores anteriormente estudiados asociados a inflamación y metabolismo de los lípidos, de nuevo se analizó su expresión génica.

En términos generales, todos los tratamientos y concentraciones ensayadas tuvieron un efecto sobre los niveles de expresión respecto a los medidos en las células control tratadas con FBS.

Se observó una regulación positiva de los genes *ACACB*, *PLIN2*, *PDK4* e *IL-6* junto con una regulación negativa de los genes *SLC2A1*, *APOC3* y *SCD*, cuya significación estadística fue mayoritaria en las concentraciones de 2,5 y 5%, aunque ello no refleja un efecto proporcional de dosis-respuesta (**Figura 34**).





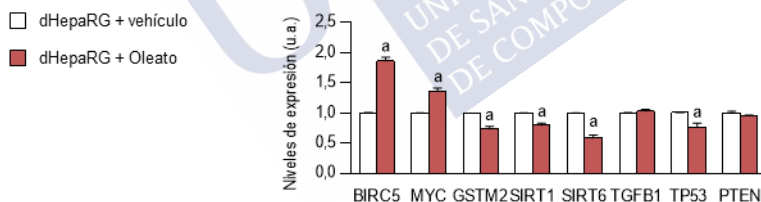
**Figura 34. Expresión génica tras tratamiento de las células dHepaRG con secretomas de tejido adiposo y suero de pacientes con obesidad al 1%, 2,5% y 5% de concentración.** Niveles de expresión de genes relacionados con el metabolismo de los lípidos e inflamación en lisados celulares (ensayos realizados por triplicado). Los datos se presentan como media  $\pm$  error estándar de la media. La significación estadística se calculó mediante prueba t de Student. a, Diferencias estadísticamente significativas en comparación con las células dHepaRG control tratadas con FBS ( $p < 0,05$ ). FBS, suero bovino fetal; SAT, tejido adiposo subcutáneo; VAT, tejido adiposo visceral; OB, obesidad; u.a., unidades arbitrarias.

#### 4.1.4. Perfil de expresión de genes relacionados con la carcinogénesis en células dHepaRG esteatóticas

En base a los hallazgos observados en el modelo animal sobre el papel de la obesidad en el desarrollo de un microambiente protumoral, analizamos los perfiles de expresión de los genes ya estudiados en relación con el inicio de la carcinogénesis en estos modelos de esteatosis *in vitro*.

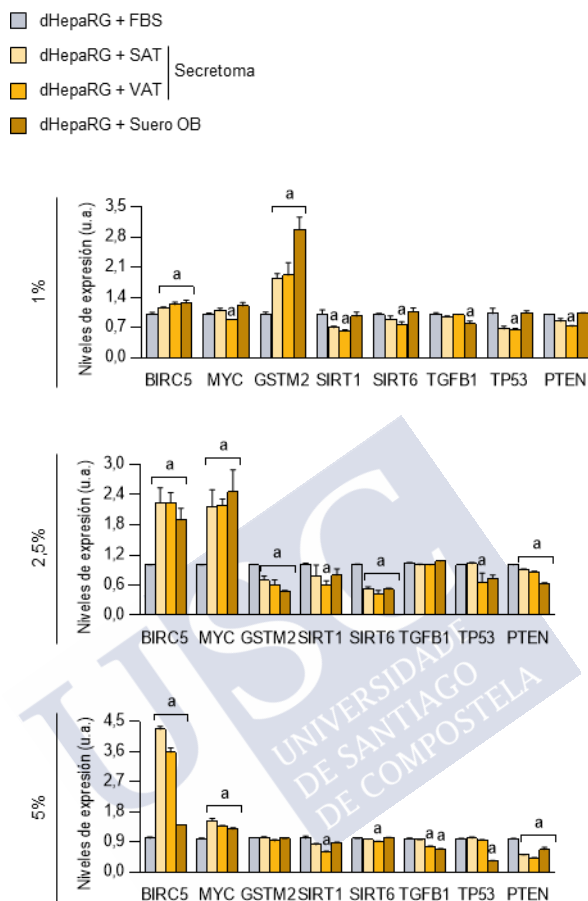
En el modelo de esteatosis inducida mediante tratamiento con oleato de sodio, observamos un patrón de expresión génica comparable al descrito en los modelos *in vivo* de obesidad previamente estudiados.

En concreto, se detecta un incremento en la expresión de los genes *SURVIVINA/BIRC5* y *MYC* acompañado de una disminución en la expresión de los genes *GSTM2*, *SIRT1*, *SIRT6* y *TP53*, en comparación con las células dHepaRG tratadas con vehículo (**Figura 35**). Estos cambios, estadísticamente significativos, no se reflejaron en los genes *TGFBI* y *PTEN* (**Figura 35**).



**Figura 35.** Expresión de genes relacionados con la carcinogénesis en células dHepaRG tras tratamiento para inducción de esteatosis vesicular *in vitro*. Niveles de expresión génica en células dHepaRG tratadas con oleato de sodio. a, Diferencias estadísticamente significativas en comparación con las células dHepaRG control tratadas con vehículo ( $p < 0,05$ ). u.a., unidades arbitrarias.

En el modelo de esteatosis inducida mediante tratamiento de las células dHepaRG con secretoma de SAT y VAT y con suero OB a distintas concentraciones, también detectamos cambios sobre los perfiles de expresión de los genes estudiados en relación con la carcinogénesis (**Figura 36**).



**Figura 36. Expresión de genes relacionados con la carcinogénesis en células dHepaRG tras tratamientos con secretomas de tejido adiposo y suero de pacientes con obesidad al 1%, 2,5% y 5% de concentración. Los datos se presentan como media  $\pm$  error estándar de la media (ensayos realizados por triplicado). La significación estadística se calculó mediante prueba t de Student. a, Diferencias estadísticamente significativas en comparación con las células dHepaRG control tratadas con FBS ( $p < 0,05$ ). FBS, suero bovino fetal; SAT, tejido adiposo subcutáneo; VAT, tejido adiposo visceral; OB, obesidad; u.a., unidades arbitrarias.**

En los tratamientos al 1%, a nivel global se observó una cierta modulación de la expresión génica respecto a las células dHepaRG tratadas con FBS, donde las mayores diferencias y estadísticamente significativas se encontraron en las células tratadas con secretoma de VAT, a excepción del gen *TGFBI* que no mostró cambios bajo este tratamiento (**Figura 36**). Curiosamente, se evidenció un incremento significativo sobre los niveles de expresión del gen *GSTM2* en los 3 tratamientos (**Figura 36**).

Los tratamientos al 2,5% reflejaron un patrón de expresión similar al observado en las células dHepaRG tratadas con oleato de sodio cuando se comparan con las células control tratadas con FBS. Dicho patrón estaba definido por niveles altos en *SURVIVINA/BIRC5* y *MYC*, niveles bajos en *GSTM2*, *SIRT1*, *SIRT6*, *TP53* y *PTEN* y ausencia de cambios en *TGFBI* (**Figura 36**), cuyas diferencias estadísticamente significativas respecto a las células control fueron más relevantes en los tratamientos con secretoma de VAT y suero OB (**Figura 36**).

Por último, se observaron cambios en la expresión de esta serie de genes en los tratamientos al 5%. A pesar de reflejar la tendencia observada en la condición anterior, mostraron unas diferencias estadísticamente significativas menores (**Figura 36**), aunque destacó el incremento en los niveles de expresión del gen *SURVIVINA/BIRC5* en las células tratadas con secretoma de SAT y VAT, significativo respecto al control con FBS, el cual parece evidenciar un efecto dosis-respuesta (**Figura 36**).

## 4.2. REVERSIÓN DE LA ESTEATOSIS EN UNA LÍNEA CELULAR DE HEPATOCITOS HUMANA MEDIANTE CUERPOS CETÓNICOS

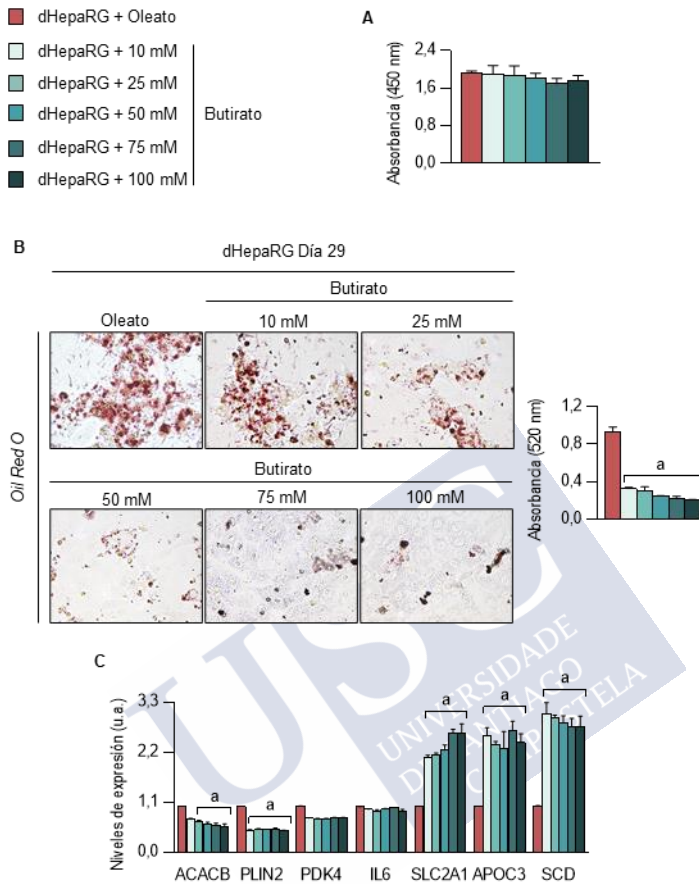
Dado que la suplementación con cuerpos cetónicos se ha asociado con una mejora del perfil metabólico y con una mejora del estado oxidativo celular (541–543) y dado que el tratamiento de la obesidad con una VLCKD reduce la masa grasa visceral preservando la masa y función muscular (63,563) así como reduce la esteatosis hepática (48,114), evaluamos el efecto de la adición de butirato sobre la esteatosis de las células dHepaRG inducida por el tratamiento con oleato.

### 4.2.1. Tratamiento con butirato de las células dHepaRG con esteatosis inducida por oleato

Se adicionó butirato de sodio a concentraciones crecientes de 10, 25, 50, 75 y 100 mM sobre las células dHepaRG previamente tratadas con 250  $\mu$ M de oleato de sodio. El tiempo de exposición al compuesto fue de 72 horas (3 días) y se administró tras los 5 días de tratamiento con oleato. Primeramente, se determinó la viabilidad celular con un ensayo WST-1, el cual no reflejó cambios estadísticamente significativos en comparación con las células dHepaRG tratadas solo con oleato (**Figura 37A**).

Tras la administración del butirato de sodio, se evidenció una disminución en la cantidad de grasa acumulada en las células dHepaRG tratadas con oleato, la cual fue observada por la detección al microscopio de un menor número de gotas lipídicas positivas en el citoplasma, proporcional a la concentración de *Oil Red O* en comparación con las células dHepaRG control tratadas con oleato (**Figura 37B**).

De manera relevante, el tratamiento con butirato fue capaz de revertir los niveles de expresión hallados en las células dHepaRG tratadas con oleato, siendo estadísticamente significativo en los genes *ACACB*, *PLIN2*, *SLC2A1*, *APOC3* y *SCD* y mostrando una tendencia hacia la significación en el gen *PDK4* (**Figura 37C**).

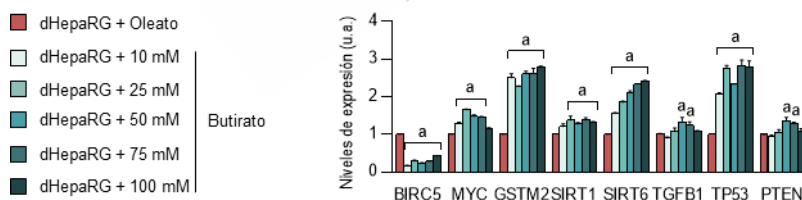


**Figura 37. Tratamiento con butirato de sodio en células dHepaRG tras inducción de esteatosis vesicular *in vitro* con oleato. (A) Evaluación de la viabilidad celular con ensayo WST-1 tras 72 horas de tratamiento. (B) Imágenes representativas de las células teñidas con *Oil Red O* (magnificación 40x) y medición de la absorbancia del colorante eluido desde las células. (C) Niveles de expresión de genes relacionados con el metabolismo de los lípidos e inflamación en lisados celulares (ensayos realizados por triplicado). Los datos se presentan como media  $\pm$  error estándar de la media. La significación estadística se calculó mediante ANOVA y prueba *post-hoc* de Bonferroni. a, Diferencias estadísticamente significativas en comparación con las células dHepaRG tratadas con oleato ( $p < 0,05$ ). u.a., unidades arbitrarias.**

#### 4.2.2. Efecto del tratamiento con butirato sobre el perfil de expresión de genes relacionados con la carcinogénesis en las células dHepaRG con esteatosis inducida por oleato

Concomitante a los resultados observados sobre el efecto del butirato en la atenuación de la esteatosis inducida por oleato, evidenciamos una regulación sobre el patrón de expresión de genes implicados en las primeras fases de desarrollo de la carcinogénesis. Tras 72 h de exposición al butirato, los mayores cambios estadísticamente significativos en comparación a los observados en las células dHepaRG tratadas con oleato se reflejan en el gen *SURVIVINA/BIRC5*, con niveles transcripcionales bajos, y en los genes *GSTM2*, *SIRT1*, *SIRT6* y *TP53*, con niveles más altos (**Figura 38**). Las diferencias observadas en los genes *TGFBI* y *PTEN* sólo alcanzaron significación estadística para las concentraciones de 50 y 75 mM (**Figura 38**). El gen *MYC*, a diferencia de lo esperado, mostró un incremento significativo de su expresión, a excepción de la concentración más alta ensayada de 100 mM (**Figura 38**).

De manera global, estos hallazgos son coincidentes a los resultados de expresión génica observados en los modelos de obesidad después de pérdida de peso.



**Figura 38.** Expresión de genes relacionados con la carcinogénesis tras tratamiento con butirato en células dHepaRG tratadas con oleato para inducción de esteatosis vesicular *in vitro*. Los datos se presentan como media  $\pm$  error estándar de la media (ensayos realizados por triplicado). La significación estadística se calculó mediante ANOVA y prueba *post-hoc* de Bonferroni. a, Diferencias estadísticamente significativas en comparación con las células dHepaRG tratadas con oleato ( $p < 0,05$ ). u.a., unidades arbitrarias.





## 5. ESTUDIO DEL PERFIL DE METILACIÓN DE LOS GENES ANALIZADOS EN RELACIÓN A ESTEATOSIS HEPÁTICA Y CARCINOGENÉISIS

Los cambios hallados en asociación con la esteatosis hepática y la promoción de la carcinogénesis, podrían estar regulados por mecanismos epigenéticos como la metilación del ADN. Para demostrarlo, se realizó un análisis de los perfiles de metilación de los genes evaluados a lo largo de la presente tesis doctoral en obesidad y pérdida de peso. Estos datos proceden de un análisis de metilación global del ADN en el genoma de pacientes con obesidad que siguieron un tratamiento de pérdida de peso basado en VLCKD (564) (**tabla 7**).

**Tabla 7. Características y parámetros antropométricos de los sujetos de estudio.**

	Normopeso	Basal	Máxima cetosis	Punto final
n	12	10	10	10
Tiempo (Días)	-	0	30	180
Sexo (M/F)	6/6	5/5	5/5	5/5
Edad (años)	50,3±6,2	48,8±9,2	48,8±9,2	48,8±9,2
Peso corporal (kg)	63,8±8,7	93,4±9,9 <sup>a</sup>	84,3±8,4	73,9±6,7 <sup>b</sup>
Altura (m)	1,67±0,1	1,68±0,1	1,68±0,1	1,68±0,1
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	22,7±1,5	32,9±1,4 <sup>a</sup>	29,8±1,7	26,1±1,8 <sup>b</sup>
CC (cm)	77,4±7,2	111,1±6,6 <sup>a</sup>	102,3±7,4	90,2±3,1 <sup>b</sup>

Los datos se muestran como media ± desviación estándar. La significación estadística se calculó mediante prueba t de Student y mediante ANOVA de medidas repetidas y post-hoc de Bonferroni. a, Diferencias con normopeso ( $p < 0,05$ ). b, Diferencias con basal ( $p < 0,05$ ).

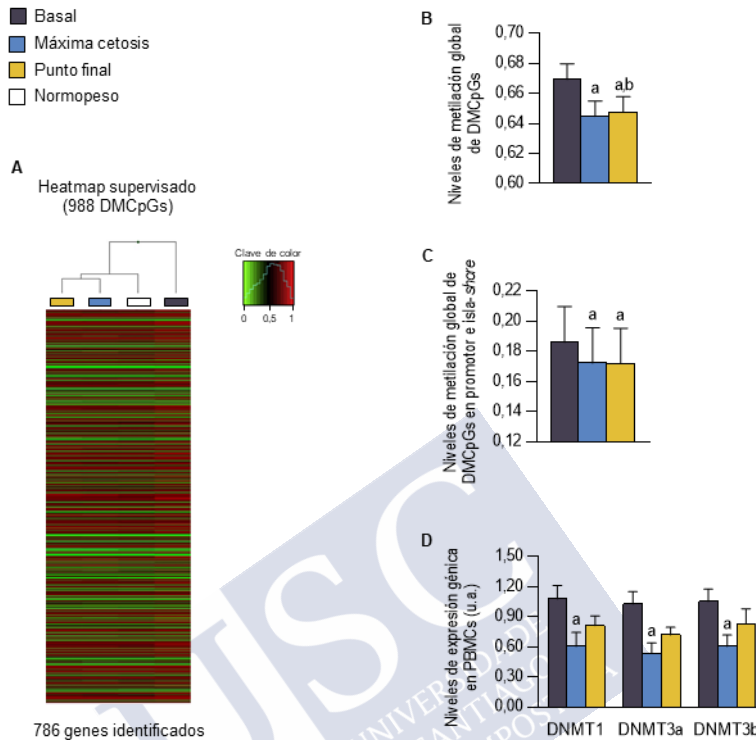
n, tamaño muestral; M, hombres; F, mujeres; IMC, índice de masa corporal; CC, circunferencia de cintura.

### 5.1. DESCRIPCIÓN GENERAL DEL METILOMA TRAS EL TRATAMIENTO CON UNA VLCKD Y COMPARACIÓN CON NORMOPESO

La metilación global del ADN se evaluó en PBMCs a partir de muestras procedentes de una cohorte de pacientes que siguieron una intervención nutricional basada en una VLCKD y una cohorte de voluntarios sanos normopeso. Tras la intervención con una VLCKD, el análisis reveló diferencias estadísticamente significativas en 988 sitios CpG de un total de 739.222 CpGs válidos, en comparación con los niveles de metilación global. Los sitios DMCPGs se localizaron en 786 genes únicos y fueron capaces de separar las muestras de acuerdo a los puntos de intervención analizados (basal, máxima cetosis y punto final) utilizando un enfoque de agrupamiento jerárquico (**Figura 39A**).

De manera relevante, los DMCPGs mostraron niveles de metilación similares a los observados en las muestras procedentes de voluntarios sanos normopeso, lo que determinó que fueran incluidos en el mismo nodo del agrupamiento (**Figura 39A**). Estos DMCPGs se caracterizaron principalmente por una disminución en los niveles de metilación, tanto en el punto de máxima cetosis como en el punto final de la intervención nutricional, reflejado en los DMCPGs totales (**Figura 39B**) y en los DMCPGs ubicados en la región del promotor e isla-*shore* (**Figura 39C**).

Además, esta disminución en los niveles de metilación global del ADN observada tras una VLCKD, se correlacionó con una menor expresión génica de las DNMTs, ya que se observó una disminución en los niveles de expresión de los genes *DNMT1*, *DNMT3A* y *DNMT3B*, que fue estadísticamente significativa ya desde el punto de máxima cetosis (**Figura 39D**).



**Figura 39. Perfil de metilación del ADN en leucocitos circulantes de pacientes con obesidad tras el seguimiento de una VLCKD.** (A) Agrupación supervisada de los 988 sitios CpG diferencialmente metilados entre los grupos de pacientes con obesidad y los voluntarios sanos normopeso. Los DMCpGs identificados mediante el análisis Infinium MethylationEPIC BeadChip se asignaron a 786 genes únicos. (B) Diferencias globales en los niveles de metilación de los 988 DMCpGs. (C) Diferencias globales en los niveles de metilación de los DMCpGs ubicados en el promotor e isla-*shore*. (D) Niveles de expresión génica en muestras de PBMCs de pacientes con obesidad tras una VLCKD. Los datos se presentan como media  $\pm$  error estándar de la media ( $n=10-12$  sujetos/grupo). La significación estadística se calculó mediante ANOVA de medidas repetidas y prueba *post-hoc* de Bonferroni. a, Diferencias estadísticamente significativas en comparación con el punto basal del grupo de pacientes con obesidad ( $p<0,05$ ). b, Diferencias estadísticamente significativas en comparación con el punto de máxima cetosis del grupo de pacientes con obesidad ( $p<0,05$ ). DMCpGs, sitios CpG diferencialmente metilados; PBMCs, células mononucleares de sangre periférica; u.a., unidades arbitrarias.

## 5.2. PERFIL DE METILACIÓN ESPECÍFICO DE LOS GENES IMPLICADOS EN LA ESTEATOSIS Y LA CARCINOGENÉISIS EN OBESIDAD Y TRAS PÉRDIDA DE PESO INDUCIDA POR UNA VLCKD

Para el análisis de metilación dirigido de los genes evaluados en esta tesis doctoral, se aislaron los datos de metilación de los sitios CpGs localizados en la región del promotor y en el promotor e isla, según el caso, del total de sitios CpGs correspondientes a cada gen estudiado.

Cuando se analizaron los perfiles de metilación del ADN de los genes diana en las PBMCs de pacientes con obesidad en comparación con voluntarios normopeso se observaron diferencias en gran parte de los sitios CpG analizados. En concreto, estas diferencias fueron estadísticamente significativas al menos en una de las cgs correspondientes a los genes estudiados (**Tabla 8**).

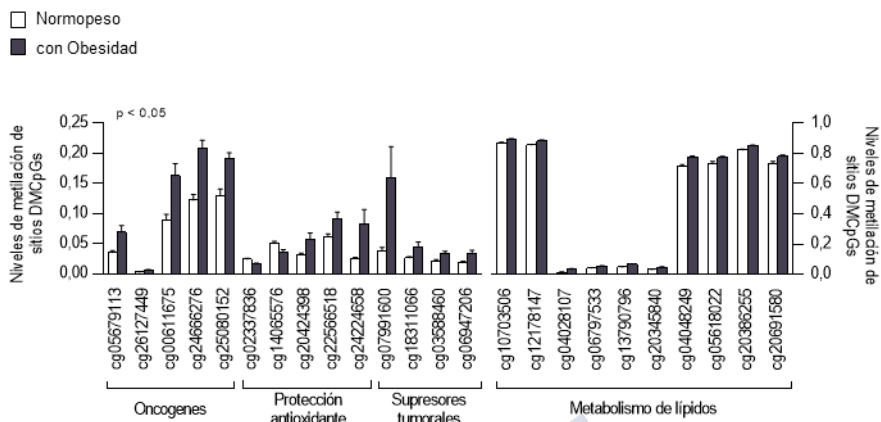
**Tabla 8.** Lista de DMCPGs estadísticamente significativos entre el grupo de pacientes con obesidad y el grupo de sujetos normopeso.

Gen	Sitio CpG	Normopeso	Con Obesidad	p-valor
<i>SURVIVINA/BIRC5</i>	cg05679113	0,035	0,069	0,0092
<i>SURVIVINA/BIRC5</i>	cg26127449	0,003	0,006	0,0276
<i>MYC</i>	cg00611675	0,089	0,163	0,0037
<i>MYC</i>	cg24666276	0,122	0,208	<0,0001
<i>MYC</i>	cg25080152	0,130	0,191	0,0005
<i>GSTM2</i>	cg02337836	0,024	0,016	0,0067
<i>GSTM2</i>	cg14065576	0,050	0,036	0,0224
<i>SIRT1</i>	cg10582690	0,015	0,026	0,0106
<i>SIRT6</i>	cg20424398	0,032	0,057	0,0379
<i>SIRT6</i>	cg22566518	0,061	0,092	0,0201
<i>SIRT6</i>	cg24224658	0,025	0,082	0,0350

Gen	Sitio CpG	Normopeso	Con Obesidad	p-valor
<i>TGFB1</i>	cg04547554	0,017	0,023	0,0209
<i>TP53</i>	cg07991600	0,038	0,159	0,0340
<i>TP53</i>	cg18311066	0,026	0,045	0,0430
<i>PTEN</i>	cg03588460	0,021	0,033	0,0305
<i>PTEN</i>	cg06947206	0,019	0,033	0,0243
<i>ACACB</i>	cg10703506	0,872	0,893	0,0129
<i>ACACB</i>	cg12178147	0,856	0,883	0,0066
<i>PLIN2</i>	cg04028107	0,012	0,030	0,0289
<i>PLIN2</i>	cg06797533	0,040	0,051	0,0372
<i>PDK4</i>	cg07372602	0,111	0,072	0,0469
<i>SCL2A1</i>	cg13790796	0,047	0,064	0,0157
<i>SCL2A1</i>	cg20345840	0,030	0,045	0,0191
<i>APOC3</i>	cg04048249	0,715	0,774	0,0034
<i>APOC3</i>	cg05618022	0,735	0,773	0,0367
<i>APOC3</i>	cg20386255	0,823	0,850	0,0152
<i>APOC3</i>	cg20691580	0,736	0,781	0,0103

Los datos se presentan como media (n=10-12 sujetos/grupo). La significación estadística se calculó mediante prueba t de Student ( $p < 0,05$ ).

En global, se observaron altos niveles de metilación en las muestras de pacientes con obesidad en comparación con las muestras de sujetos normopeso, específicamente en los genes que presentaron diferencias estadísticamente significativas en 2 o más sitios CpG (**Figura 40**).



**Figura 40.** Perfil de metilación del ADN de los genes estudiados en relación a la esteatosis y la carcinogénesis en leucocitos circulantes. Niveles de metilación de los sitios DMCpGs ubicados en el promotor y en el promotor-isla en PBMCs de pacientes con obesidad y sujetos normopeso. Los datos se presentan como media ± error estándar de la media (n=10-12 sujetos/grupo). La significación estadística se calculó mediante prueba t de Student ( $p < 0,05$ ). DMCpGs, sitios CpG diferencialmente metilados.

De manera relevante, cuando se evaluaron los perfiles de metilación de los genes diana en los pacientes con obesidad que siguieron una VLCKD, se evidenciaron cambios en los niveles de metilación de los sitios CpG seleccionados respecto a los niveles cuantificados en el punto basal, antes del inicio del tratamiento. Dichas diferencias fueron estadísticamente significativas al menos en una de las cgs correspondientes a la mayoría de los genes diana (**Tabla 9**).

**Tabla 9.** Lista de DMCpGs entre Basal - Máxima cetosis - Punto final en el grupo de pacientes con obesidad que siguieron una VLCKD.

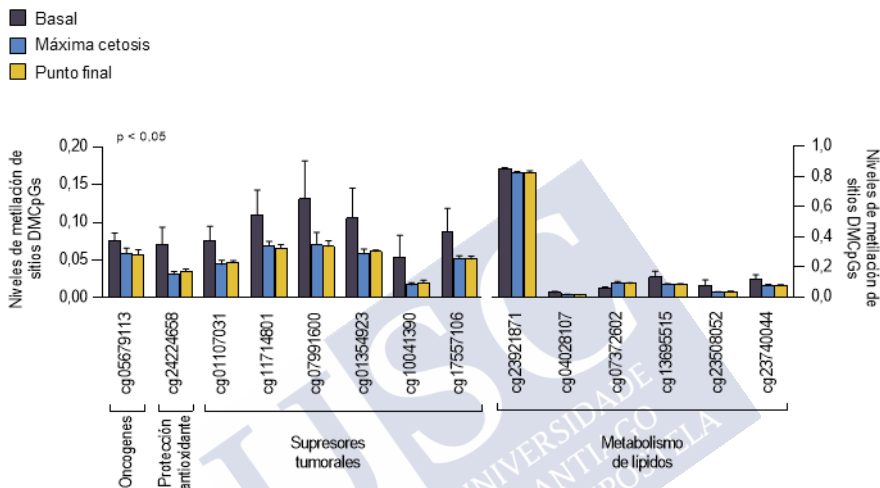
Gen	Sitio CpG	Basal	Máxima Cetosis	Punto final	p-valor (B-MC)	p-valor (B-PF)
<i>SURVIVINA/BIRC5</i>	cg05679113	0,076	0,059	0,058	0,0475	0,0353
<i>SURVIVINA/BIRC5</i>	cg23302638	0,027	0,009	0,014	0,0353	0,1551
<i>MYC</i>	cg03003858	0,065	0,026	0,025	0,0542	0,0456
<i>MYC</i>	cg10836034	0,106	0,072	0,064	0,1122	0,0326
<i>GSTM2</i>	cg14065576	0,036	0,051	0,037	0,0429	>0,9999

Gen	Sitio CpG	Basal	Máxima Cetosis	Punto final	p-valor (B-MC)	p-valor (B-PF)
<i>SIRT1</i>	cg03251249	0,082	0,058	0,055	0,0519	0,0262
<i>SIRT1</i>	cg25513531	0,140	0,134	0,103	>0,9999	0,0029
<i>SIRT6</i>	cg20424398	0,058	0,036	0,033	0,0806	0,047
<i>SIRT6</i>	cg22502319	0,062	0,038	0,039	0,0475	0,0629
<i>SIRT6</i>	cg24224658	0,070	0,031	0,035	0,0004	0,0014
<i>TGFB1</i>	cg01107031	0,076	0,044	0,047	0,0136	0,0264
<i>TGFB1</i>	cg11714801	0,109	0,070	0,067	0,0008	0,0003
<i>TP53</i>	cg07991600	0,132	0,071	0,068	0,0003	0,0002
<i>PTEN</i>	cg01354923	0,106	0,058	0,062	0,0015	0,0034
<i>PTEN</i>	cg10041390	0,054	0,017	0,020	0,0195	0,0359
<i>PTEN</i>	cg17557106	0,088	0,053	0,052	0,0324	0,0274
<i>ACACB</i>	cg23921871	0,853	0,826	0,830	0,016	0,0494
<i>PLIN2</i>	cg04028107	0,031	0,016	0,014	0,0039	0,0016
<i>PDK4</i>	cg07372602	0,062	0,094	0,090	0,0091	0,0257
<i>SCL2A1</i>	cg03106288	0,086	0,067	0,076	0,0341	0,4011
<i>APOC3</i>	cg04048249	0,774	0,734	0,754	0,0238	0,378
<i>APOC3</i>	cg05618022	0,776	0,736	0,744	0,0317	0,0317
<i>SCD</i>	cg13695515	0,135	0,085	0,086	0,0048	0,0058
<i>SCD</i>	cg23508052	0,077	0,035	0,038	0,0204	0,0342
<i>SCD</i>	cg23740044	0,119	0,080	0,080	0,0453	0,0455

Los datos se presentan como media (n=10 sujetos/grupo). La significación estadística se calculó mediante ANOVA de medidas repetidas y prueba post-hoc de Bonferroni ( $p < 0,05$ ).

B, basal; MC, máxima cetosis; PF, punto final.

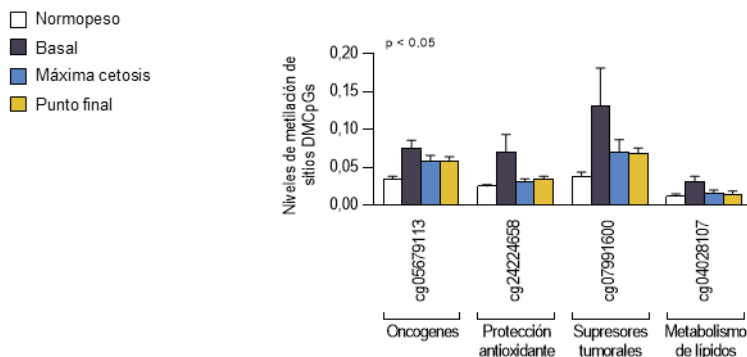
Así, tras el tratamiento con la VLCKD se observó una disminución de los niveles de metilación de los genes *SURVIVINA/BIRC5*, *SIRT6*, *TGFB1*, *TP53*, *PTEN*, *ACACB*, *PLIN2* y *SCD*, junto con un incremento en el gen *PDK4*, cuyas diferencias en los sitios CpG fueron estadísticamente significativas en ambos tiempos (30 y 180 días) respecto al basal (**Figura 41**).



**Figura 41.** Perfil de metilación del ADN de los genes estudiados en relación a la esteatosis y la carcinogénesis en leucocitos circulantes de pacientes con obesidad tras una VLCKD. Niveles de metilación de los sitios DMCpGs ubicados en el promotor y en el promotor-ísla en PBMCs de pacientes con obesidad a los 0 (basal), 30 (máxima cetosis) y 180 (punto final) días de seguimiento de una VLCKD. Los datos se presentan como media  $\pm$  error estándar de la media (n=10 sujetos/grupo). La significación estadística se calculó mediante ANOVA de medidas repetidas y prueba post-hoc de Bonferroni (p<0,05). DMCpGs, sitios CpG diferencialmente metilados.

Relevantemente, esta disminución en la metilación se aproxima a los perfiles de metilación medidos en la cohorte de sujetos sanos normopeso, que se evidencia de manera estadísticamente significativa sobre los mismos sitios CpG de los genes *SURVIVINA/BIRC5*, *SIRT6*, *TP53* y *PLIN2* (**Figura 42**).





Gen diana	Sitio CpG	Cr	Region del gen	Contexto CpG	Normopeso	Basal	Máxima cetosis	Punto final
<i>SURVIVINA/BIRC5</i>	cg05679113	17	TSS200;TSS200;TSS200	Isla	0,035	0,076	0,059	0,058
<i>SIRT6</i>	cg24224658	19	TSS200;TSS1500	Isla	0,025	0,070	0,031	0,035
<i>TP53</i>	cg07991600	17	5'UTR;TSS1500;TSS200; 5'UTR;5'UTR;5'UTR	Isla	0,038	0,132	0,071	0,068
<i>PLIN2</i>	cg04028107	9	TSS200;TSS200	Isla	0,012	0,031	0,016	0,014

**Figura 42. Perfil de metilación del ADN de los genes diana en relación a la esteatosis y la carcinogénesis en leucocitos circulantes.** Niveles de metilación de los mismos sitios DMCpGs ubicados en el promotor e isla en PBMCs de sujetos normopeso y pacientes con obesidad siguiendo una VLCKD. Los datos se presentan como media  $\pm$  error estándar de la media ( $n=10-12$  sujetos/grupo). La significación estadística se calculó mediante prueba t de Student (pacientes con obesidad vs sujetos normopeso) y mediante ANOVA de medidas repetidas y prueba post-hoc de Bonferroni (pacientes con obesidad a los 0 (basal), 30 (máxima cetosis) y 180 (punto final) ( $p<0,05$ )). DMCpGs, sitios CpG diferencialmente metilados; Cr, cromosoma.



# DISCUSIÓN





La NAFLD es la enfermedad hepática crónica más común en el mundo y la principal causa del incremento de la incidencia del HCC. Se estima que la prevalencia de HCC relacionado con NAFLD aumente concomitantemente con la creciente epidemia de obesidad (98,99,103). Cada vez son más las evidencias epidemiológicas que avalan la asociación entre la obesidad y el HCC (97,100,101), sin embargo, los mecanismos moleculares subyacentes todavía se desconocen. Ante esta necesidad por dilucidar las vías y los mecanismos responsables de la patogenia de la enfermedad, modelos animales desarrollados para imitar la enfermedad humana han supuesto una herramienta fiable, destacando el importante papel de las ratas como organismo modelo (565). En este contexto, las ratas Zucker obesas (fa/fa), modelo de obesidad genética con una mutación espontánea en el receptor de leptina, han sido muy utilizadas para el estudio de NAFLD (566). Estos animales desarrollan obesidad severa y se caracterizan por ser hiperleptinémicas, hiperfágicas, inactivas y resistentes a la insulina. Además de tener un peso corporal significativamente mayor, presentan esteatosis y acumulación de triglicéridos en el hígado (567,568), eventos relevantes dado que la característica histológica más importante de NAFLD es la esteatosis de los hepatocitos (569).

Hasta la fecha, no se han encontrado en la literatura trabajos sobre la asociación entre la obesidad y el HCC que se hayan centrado en estudiar si los mecanismos relacionados con las primeras fases del desarrollo tumoral podrían ser modificados hacia un estado procarcinogénico por efecto de la obesidad, antes de la manifestación de una masa tumoral detectable en el hígado. En consecuencia y basándonos en los hallazgos previos del grupo (80,83), nos planteamos que la inflamación y el estrés oxidativo desencadenados por el tejido adiposo disfuncional obeso podrían actuar como inductores en la generación de un microambiente favorable para el inicio de la carcinogénesis hepática.

En primer lugar, para determinar el efecto de la acumulación de lípidos en el hígado debida a un mayor grado de adiposidad corporal, evaluamos la expresión de genes relacionados con las primeras fases de la carcinogénesis en el hígado de ratas Zucker obesas jóvenes y adultas.

Este estudio reveló por primera vez que el exceso de adiposidad se asociaba con la desregulación de varios genes implicados en las fases iniciales del desarrollo del cáncer, como las relacionadas con la proliferación celular, la protección antioxidante y la supresión tumoral. Concretamente, en el hígado de las ratas Zucker obesas adultas se observó una sobreexpresión de los genes implicados en la proliferación y la reparación del ADN (*SURVIVINA/BIRC5* y *TP53*) y una regulación a la baja de los genes implicados en la defensa frente al estrés oxidativo celular (*GSTM2* y *SIRT1*). Dichas diferencias no fueron detectadas en las ratas Zucker obesas jóvenes.

De manera general, las ratas Zucker obesas exhibieron un mayor contenido de lípidos intrahepáticos en comparación a sus homólogas delgadas. Sin embargo y a diferencia de las ratas obesas adultas, las ratas obesas jóvenes no mostraron diferencias significativas en el peso corporal ni en la masa grasa en comparación con sus homólogas delgadas, lo que parece indicar que el pequeño acúmulo de lípidos observado en el hígado de estos animales ocurrió antes de que el aumento de los depósitos de grasa corporal fuera evidente. Estos hallazgos muestran que la predisposición genética a la obesidad en las ratas no está directamente involucrada en los resultados obtenidos, sino que una mayor exposición en el tiempo a la obesidad es la responsable del exceso de adiposidad, manifestada en el incremento significativo en la masa grasa y en el contenido de lípidos intrahepáticos en las ratas obesas adultas, la cual sería el desencadenante de esta desregulación génica ligada a la carcinogénesis. De hecho, durante la última década, los datos epidemiológicos han demostrado asociaciones entre el exceso de adiposidad corporal y el riesgo para muchos cánceres en adultos (570,571).

La alteración en la expresión de los genes implicados en la carcinogénesis observada en las ratas obesas adultas, debido al incremento en la adiposidad corporal que se tradujo en el desarrollo de esteatosis hepática (presencia de mayor contenido de lípidos intrahepáticos), se relacionó con los cambios detectados en los marcadores de estrés oxidativo e inflamación medidos en este estudio. Se sabe que, en la NAFLD, además de la acumulación de grasa en el

hígado, se produce inflamación y lesión de las células hepáticas, lo que da como resultado estrés oxidativo y regeneración compensatoria por proliferación celular, eventos fuertemente asociados con el aumento de la incidencia del HCC (93,572). En este sentido, varios ejemplos en la literatura sugieren la participación de ROS en la promoción de la hepatocarcinogénesis en animales (573,574) y en pacientes (575,576). En consecuencia, este estudio demostró que el aumento en marcadores de estrés oxidativo y en citocinas inflamatorias circulantes como MCP-1, asociado a un mayor contenido de lípidos intrahepáticos, ocurrió concomitantemente con la sobreexpresión de los genes *TP53* y *SURVIVINA/BIRC5* en el hígado de ratas obesas adultas en comparación con los niveles observados en sus homólogas delgadas.

Estos hallazgos sugieren que, ante procesos relacionados con estreses celulares, como la expresión de oncogenes, la proliferación celular y el daño del ADN, seguidamente se activan procesos que inician la reparación del ADN (374,577). Además, los genes *GSTM2* y *SIRT1*, implicados en la protección contra el estrés oxidativo celular (332,354), fueron regulados a la baja en el hígado de las ratas obesas adultas. Estos resultados son concordantes con la desregulación de la protección antioxidante y con la consiguiente promoción del estrés oxidativo característica de la obesidad (266). De hecho, las ratas obesas mostraron niveles circulantes más altos de peroxidación lipídica (578) acompañada de altos niveles de AOP (579), lo que sugiere una movilización de los antioxidantes solubles desde los tejidos al plasma para contrarrestar la falta de defensas enzimáticas antioxidantes y para restaurar el equilibrio oxidante/antioxidante y así prevenir más el daño del ADN (580). Esta asunción fue reforzada por los niveles circulantes de 8-OHdG (581) medidos en plasma. En cambio, los niveles tisulares hepáticos de 8-OHdG estaban incrementados en las ratas obesas adultas junto con niveles bajos de AOP, lo que justifica el aumento observado en la expresión del gen *TP53* en estos animales para contrarrestar el daño celular (577).

Estos resultados indican que los antioxidantes solubles son capaces de neutralizar la peroxidación lipídica a nivel circulante, pero son ineficaces en el hígado bajo la exposición constante a características

relacionadas con la obesidad, permitiendo que se desencadene el daño del ADN y, por consiguiente, una posible transformación tumoral.

En segundo lugar, para explorar la posibilidad de prevenir el efecto del fenotipo obeso sobre la esteatosis hepática y, por consiguiente, sobre los perfiles de expresión procarcinogénicos observados, evaluamos la capacidad de intervenciones para inducir pérdida de peso, basadas en restricción calórica de la dieta y/o ejercicio físico, como método potencial para este fin, ya que la dieta y el ejercicio han sido previamente estudiados en ratas Zucker como terapia en las enfermedades ligadas al síndrome metabólico (582,583). En este sentido, en los últimos años, varios estudios han evidenciado que una intervención en el estilo de vida puede ser eficaz en el tratamiento de pacientes con NAFLD (584), resultando en un menor riesgo de desarrollo de HCC. Se ha descrito que la pérdida de peso puede contribuir a la regresión de la enfermedad hepática, indicando que incluso una pérdida de peso moderada (>5%) también puede originar importantes beneficios (585). La actividad física y el ejercicio, asociados con una salud cardiometabólica, también han reportado resultados satisfactorios en la terapia de pacientes con NAFLD (110,586). Además, se ha consensado que la reducción del peso corporal lograda mediante la restricción calórica, con o sin aumento de la actividad física (120), conduce a una mejora en la grasa hepática, el grado de inflamación hepática y la fibrosis (587).

En este contexto, este estudio determinó que la pérdida de peso inducida por la restricción de energía por sí misma y en combinación con el ejercicio, fueron capaces de revertir los perfiles de expresión asociados a la obesidad de los genes implicados en la carcinogénesis. Esta reversión ocurrió paralelamente a la reversión de los parámetros asociados a la disfunción hepática. En concreto, concomitante a la disminución significativa en el peso corporal y en la masa grasa en las ratas ER y EREX, se evidenció una mejora de la esteatosis hepática debida a la reducción significativa del contenido de lípidos intrahepáticos, junto con cambios en los marcadores de estrés oxidativo e inflamación definidos por una disminución significativa en los niveles circulantes de MDA y MCP-1. Además de una subida relevante en los



niveles de IL-10 observada específicamente en las ratas ER. Esta citocina presenta propiedades antiinflamatorias y fue propuesta como objetivo para el tratamiento del daño tisular y el cáncer (588). De manera relevante, estos hallazgos observados sobre parámetros de disfunción hepática tras las intervenciones para pérdida de peso, se asociaron con una regulación a la baja de la expresión del gen *SURVIVINA/BIRC5*, promotor de la proliferación celular. Esta regulación se acompañó de una regulación al alza de los genes *GSTM2* y *SIRT1* implicados en la protección antioxidante. De hecho, el gen *SURVIVINA/BIRC5* ha suscitado un creciente interés como gen asociado a un mayor riesgo de neoplasias malignas y como potencial objetivo terapéutico del cáncer (308,589,590). La expresión de este gen en tejidos no tumorales es regulada por el desarrollo y se ha informado que es bajo en la mayoría de los tejidos diferenciados, mientras que en las células transformadas está fuertemente sobreexpresado (314,591). Este trabajo demostró que los resultados acerca del patrón de expresión de *SURVIVINA/BIRC5* en tejido hepático obeso no tumoral están asociados con el estrés oxidativo y que puede revertirse por efecto de la pérdida de peso, hallazgos relevantes dado que se ha descrito que juega un papel clave en la progresión tumoral (308,592).

Respecto a la *SIRT1*, varios estudios han demostrado que es un mediador crucial en la regulación de la función hepática, la homeostasis lipídica y que puede su acción puede ser importante en la prevención de las enfermedades metabólicas asociadas a la obesidad (593,594). La sobreexpresión del gen *SIRT1* en el hígado se ha asociado a una mejora en el estrés del retículo plasmático y la resistencia a la insulina (595). En consecuencia, en los últimos años se ha postulado a la *SIRT1* como potencial diana terapéutica para el tratamiento de NAFLD (358), por lo que los hallazgos observados en este estudio acerca de la modulación en la expresión hepática de *SIRT1* tras la pérdida de peso inducida a las ratas obesas aportan nuevo conocimiento sobre la relevancia de esta proteína en la disfunción hepática y el efecto de una terapia para perder peso sobre su modulación.

Cabe destacar que los resultados obtenidos tras la intervención con la restricción calórica de la dieta sugieren que la restricción de energía por

sí sola fue capaz de revertir el efecto cancerígeno de la obesidad sobre hígado, sin ser necesaria una combinación de esta intervención con el ejercicio físico. Estos resultados concuerdan con lo citado anteriormente en la literatura acerca de los beneficios observados con una restricción calórica sin aumento de la actividad física en el tratamiento de NAFLD (120), concretamente la mejora en la grasa hepática, el grado de inflamación hepática y la fibrosis (587). Sin embargo, en el presente estudio es difícil de discernir si el ejercicio no tuvo los efectos esperados sobre la expresión de los genes relacionados con la carcinogénesis y los marcadores de estrés oxidativo o si para poder detectar estos cambios se requiere de un protocolo de más tiempo. De hecho, el patrón de ejercicio llevado a cabo en este estudio fue capaz de inducir una reducción en el contenido total de triacilgliceroles hepáticos y una disminución en el estrés oxidativo (MDA), junto con la preservación de la masa libre de grasa tras el tratamiento. Este hallazgo concuerda con la reducción del contenido de grasa intrahepática y la supresión de la sobreproducción de ROS observados en un estudio previo tras un tratamiento eficaz de ejercicio regular como terapia para NAFLD (299).

Los genes evaluados presentaron la misma tendencia a nivel de proteína que los niveles transcripcionales en cuanto a la SURVIVIN/BIRC5, MYC y PTEN después de la pérdida de peso tratamiento con restricción calórica de la dieta, mientras que *GSTM2*, *SIRT1* y *TP53* los niveles de proteína presentaron una tendencia inversa en relación a sus niveles transcripcionales. La existencia de una dinámica temporal podría explicar estas diferencias entre la expresión génica y proteica (596) por efecto de la pérdida de peso, aunque se necesitan más estudios para dilucidar la razón de la falta de una correlación positiva global entre la expresión de los genes estudiados y sus niveles de proteína después de las intervenciones para pérdida de peso, a diferencia de la correlación positiva observada al comparar las ratas adultas obesas con sus homólogas delgadas.

En línea con los datos anteriormente presentados donde se observa que el estrés oxidativo asociado a la adiposidad está implicado en la modulación de los perfiles de expresión génica estudiada en relación a

procesos carcinogénicos, a continuación, nos planteamos analizar los niveles transcripcionales de *SIRT6*, considerada como la proteína de la longevidad, en las muestras de hígado de los distintos grupos experimentales de ratas Zucker adultas y su relación con el estrés oxidativo resultado del exceso de adiposidad. La *SIRT6* desempeña un papel clave como supresor de tumores y modulador crítico de la homeostasis metabólica (362,363). Participa en la iniciación y el desarrollo tumoral en el cáncer de hígado (365,597), en procesos como la formación del hígado graso (369) y el desarrollo de NASH (370), y como biomarcador pronóstico del HCC (371). Además, la *SIRT6* desempeña un papel fundamental en la protección del hígado ante una lesión hepática inducida por estrés oxidativo (598). Por tanto, el estudio realizado sobre la expresión hepática de *SIRT6* mostró que el estrés oxidativo inducido por el exceso de adiposidad estaba relacionado con una regulación a la baja de los niveles transcripcionales en el hígado de las ratas Zucker obesas. De manera relevante, después de la pérdida de peso inducida por la restricción energética sola o combinada con ejercicio, la expresión hepática del gen *SIRT6* aumentó, concomitantemente con la mejora en la esteatosis hepática y en el estrés oxidativo hallados en los estudios previos descritos anteriormente. Estos resultados están en línea con lo descrito en la literatura acerca de que la ausencia de *SIRT6* se ha relacionado con la captación hepática de ácidos grasos de cadena larga y con la reducción de la beta-oxidación, lo que conduce a la acumulación de triglicéridos, enfermedad del hígado graso y esteatosis hepática (367,369).

De acuerdo con una posible asociación entre la expresión de *SIRT6* con el estrés oxidativo, observamos una correlación positiva entre de los niveles transcripcionales de *SIRT6* y los de *SIRT1* y *GSTM2*, analizados anteriormente por su papel en la protección antioxidante contra el estrés oxidativo (599,600). Estos resultados sugieren una desregulación en las defensas antioxidantes que promueven el estrés oxidativo característico de la obesidad (266), datos que fueron reforzados y avalados por la correlación negativa observada entre los niveles de expresión de *SIRT6*, el peso corporal y los niveles circulantes de MDA y AOP, determinados en los estudios descritos previamente. La conexión entre el estrés oxidativo, la restricción energética y la actividad de *SIRT6* también se

ha demostrado en la literatura, indicando que una restricción prolongada da como resultado un aumento de la actividad de SIRT6 en cerebro, músculo, tejido adiposo blanco e hígado (556,601). En este sentido, los datos obtenidos en este estudio mostraron que la reducción en el contenido de grasa intrahepática asociada a la pérdida de peso corporal se vinculaba con un aumento de la expresión hepática de *SIRT6*. De nuevo, se observó que el ejercicio físico por sí mismo no tuvo efecto sobre la modulación de la expresión de SIRT6, lo que nos lleva a determinar la ausencia de efecto o la falta de tiempo para ejercerlo, en línea con lo que se argumentó anteriormente. En definitiva, nuestros resultados sugieren el papel clave de la SIRT6 en la protección frente al daño por estrés oxidativo, postulándola como potencial diana terapéutica en enfermedades asociadas a la obesidad como el NAFLD con el objetivo de actuar contra el estrés oxidativo y así prevenir la futura progresión hacia un HCC.

Seguidamente, tras haber observado el potencial efecto del grado de adiposidad sobre la regulación de la expresión hepática de *SURVIVINA/BIRC5*, oncogen implicado en el inicio de la carcinogénesis y asociado a la obesidad (308,315,321), nos planteamos evaluar si la expresión de *SURVIVINA/BIRC5* también puede ser modulada en relación al grado de adiposidad en diferentes depósitos de tejido adiposo, concretamente en SAT y VAT de animales, y su reflejo en los leucocitos circulantes de sangre periférica de pacientes. En ambos estudios *in vivo* se determinó la expresión de *SURVIVINA/BIRC5* en presencia de obesidad y tras intervenciones para pérdida de peso, siguiendo la tendencia analizada en los anteriores estudios. Este estudio demostró que la expresión de *SURVIVINA/BIRC5* en obesidad estaba elevada en VAT en comparación con los niveles observados en SAT, la cual fue reflejada en la expresión analizada sobre los leucocitos circulantes de pacientes con obesidad. Además, interesantemente la sobreexpresión de *SURVIVINA/BIRC5* asociada a la obesidad fue revertida en condiciones de restricción de calórica de la dieta sola y combinada con ejercicio físico, hallazgos que también se demostraron en los leucocitos sanguíneos de pacientes con obesidad tras el seguimiento de una intervención nutricional para pérdida de peso con una VLCKD.

Primeramente, se retomó el modelo de obesidad genética con ratas Zucker junto con modelos animales de obesidad inducida por la dieta, específicamente ratas Sprague Dawley y ratones C57BL/6J. Los resultados evidenciaron una significativa regulación al alza del gen *SURVIVINA/BIRC5* en el VAT de los animales obesos de ambos modelos. Estudios previos han revelado que los niveles de leptina inductores de carcinogénesis podrían estar mediados en parte por *SURVIVINA/BIRC5* (315,602). Sin embargo, nuestros resultados sugieren que la expresión del gen *SURVIVINA/BIRC5* observados en obesidad podrían ser independientes de la acción de la leptina, ya que la sobreexpresión medida en el VAT de las ratas Zucker, animales con una mutación para el receptor de la leptina (150), también fue observada en los animales DIO. Curiosamente, cuando se evaluó la expresión de *SURVIVINA/BIRC5* en los ratones alimentados con una dieta alta en grasas durante un tiempo prolongado, también se observó el incremento en la expresión de *SURVIVINA/BIRC5* en el SAT de estos animales en relación a la obesidad. Estos resultados podrían sugerir que la exposición a un estado de obesidad durante un largo período de tiempo también desencadenaría perturbaciones sobre la funcionalidad del SAT y que, al igual que ocurre con la disfuncionalidad del tejido adiposo obeso visceral (252,256), estos eventos originen inflamación y en consecuencia mayor susceptibilidad al desarrollo tumoral. En línea con esta hipótesis, se haya un estudio en el que se ha determinado que la expresión de genes proinflamatorios críticos es sustancialmente mayor en SAT que en VAT en individuos con obesidad severa (603).

Tras las intervenciones para pérdida de peso, relevantemente se observó una clara disminución en los niveles de *SURVIVINA/BIRC5*, detectada tanto en VAT como en SAT, evidenciando en ambos depósitos una reducción de casi el 50% tras el tratamiento de restricción energética. Estos resultados sugieren que la expresión *SURVIVINA/BIRC5* se asocia con características de adiposidad, hecho que fue corroborado con las correlaciones positivas observadas con el peso corporal y la masa grasa en el modelo animal de ratas Zucker. Además, una correlación positiva entre los niveles transcripcionales de *SURVIVINA/BIRC5* en el VAT de estos animales también fue observada con los niveles

plasmáticos de MCP-1, un marcador relevante de inflamación relacionada con la obesidad (604,605). En este sentido, se ha evidenciado que terapias para pérdida de peso reducen considerablemente estas patologías intrínsecas del tejido adiposo obeso, como la generación de inflamación de bajo grado, suponiendo un potencial beneficio para la salud (30,606).

Con el fin de trasladar estos resultados a un entorno clínico, se evaluó la expresión de *SURVIVINA/BIRC5* en PBMCs de pacientes con obesidad en comparación con sujetos normopeso y en pacientes con obesidad sometidos a una intervención nutricional para pérdida de peso con una VLCKD. Los resultados generales obtenidos fueron similares a los observados en el VAT de los modelos animales, indicando la capacidad de replicación de los leucocitos en el reflejo de los niveles transcripcionales del oncogen *SURVIVINA/BIRC5*. Estos hallazgos corroboran la potencial herramienta que supone el uso de leucocitos sanguíneos en la práctica clínica, muestras de fácil recolección y mínimamente invasivas, que permiten la monitorización molecular del tejido adiposo tanto en estados fisiológicos como patológicos (427,607).

Por tanto, este estudio sobre la expresión del oncogen *SURVIVINA/BIRC5* en relación al grado de adiposidad reveló un aumento de las vías antiapoptóticas, especialmente en el VAT y su reflejo en PBMCs, en condiciones de obesidad, patrón que fue capaz de revertirse tras la pérdida de peso. Además, su correlación con el grado de inflamación sistémica en ratas Zucker destacó su posible participación en la asociación entre la obesidad y el cáncer. Estos hallazgos ponen de manifiesto el potencial uso de *SURVIVINA/BIRC5* como biomarcador para la identificación de un microambiente procarcinogénico en la obesidad, el cual se podría prevenir mediante el seguimiento de terapias para pérdida de peso.

En conjunto, estos resultados evaluados en modelos animales y reflejados en leucocitos circulantes en pacientes con obesidad indican que el exceso de adiposidad y los factores secretados por el tejido adiposo disfuncional en obesidad podrían ser el vínculo promotor más probable en el riesgo de esteatosis hepática relacionado con la obesidad

y su futura progresión a HCC y estrategias terapéuticas para reducir dicha adiposidad podría prevenir este efecto.

Con el fin de demostrar dicha hipótesis más en profundidad, llevamos a cabo estudios *in vitro* empleando la línea HepaRG de hepatocitos humana. Esta línea celular presenta capacidad para desarrollar esteatosis tras tratamientos con diferentes compuestos (137,138,141,608) y ampliamente usada en estudios metabólicos (140,142). En primer lugar, se sometió a las células dHepaRG a un tratamiento con oleato de sodio, ácido graso insaturado empleado como estímulo desencadenante de NAFLD (609), para inducir esteatosis vesicular *in vitro* y así analizar los perfiles de expresión de los genes implicados en las primeras fases del desarrollo tumoral estudiados a lo largo del presente trabajo en relación al grado de adiposidad. Este estudio demostró que el acúmulo de grasa, en forma de pequeñas gotas lipídicas en el citoplasma de los hepatocitos tras el tratamiento con el oleato se asoció con cambios significativos sobre los niveles de expresión de los genes estudiados, específicamente regulando al alza los oncogenes implicados en la proliferación celular, junto con la regulación a la baja de los relacionados con la protección antioxidante y reparación del daño al ADN. Estos resultados corroboran los niveles de expresión de los genes implicados en la carcinogénesis anteriormente observados en los modelos *in vivo* de obesidad. Por tanto, estos hallazgos evidencian una vez más el potencial efecto de la adiposidad intrahepática sobre el desarrollo de NAFLD y progresión hacia HCC (106). Además, el tratamiento con oleato de sodio también evidenció una modulación sobre los genes relacionados con el metabolismo de los lípidos, que se interpretó como una consecuencia directa de la esteatosis inducida en las células HepaRG.

Efectos similares al observado tras el tratamiento con oleato se encontraron cuando se adicionó a las células dHepaRG secretoma de SAT y VAT o suero OB procedentes de muestras de pacientes con obesidad severa. Este estudio evidenció que los tratamientos con secretoma y suero de pacientes con obesidad fueron capaces de inducir esteatosis en los hepatocitos y, que, en asociación al incremento en el acúmulo de grasa, se produjeron cambios en los perfiles de los genes

ensayados en relación al inicio del desarrollo tumoral. Concretamente, los tratamientos adicionados a una concentración del 2,5% mostraron una modulación global de los perfiles de expresión, que se asemejó de manera relevante a los perfiles transcripcionales observados en los anteriores estudios realizados en obesidad *in vivo*.

Estos hallazgos demuestran la hipótesis generada a raíz de los hallazgos previos en los modelos animales de obesidad y concuerdan con lo descrito en la literatura acerca de que el primer paso en el desarrollo de NAFLD/NASH está representado por la acumulación de grasa en el hígado asociada a la obesidad (102) y con que la obesidad incrementa el riesgo de NAFLD (107,108) y por tanto su progresión hacia HCC (99,103).

Dado que los resultados en modelos animales evidenciaron la capacidad de un tratamiento con restricción calórica para inducir pérdida de peso sobre la reversión de los parámetros de disfunción hepática y expresión de genes relacionados con la carcinogénesis, evaluamos el efecto del tratamiento con cuerpos cetónicos sobre las células dHeparRG con inducción de esteatosis por oleato de sodio sobre los perfiles de expresión de los genes implicados en la carcinogénesis hepática. El planteamiento de este estudio se basó en el efecto conocido de las VLCKD sobre la reducción de adiposidad (62) y sobre la esteatosis hepática (114). Para ello, se adicionó butirato de sodio, es una sustancia conocida por su efectividad para atenuar NAFLD y la inflamación (610–612), a concentraciones crecientes. Este estudio reveló cambios significativos sobre los niveles transcripcionales de los genes relacionados con las primeras fases del desarrollo tumoral, concomitante a la disminución significativa en el acúmulo lipídico de los hepatocitos tratados.

De manera relevante, se evidenció una regulación al alza de GSTM2, SIRT1, SIRT6 y TP53, genes anteriormente estudiados por su papel en la protección antioxidante (332,354,363) y reparación del daño al ADN (374) que fueron significativamente modulados tras las intervenciones de pérdida de peso ensayadas, junto con una regulación a la baja de oncogen SURVIVINA/BIRC5, estudiado por su papel en la inhibición



de la apoptosis y proliferación celular (308) que también había sido fuertemente regulado por pérdida de peso en los estudios *in vivo*. Estos resultados refuerzan lo descrito anteriormente en otros estudios acerca de que NAFLD puede revertirse en las primeras fases de la esteatosis hepática mediante intervenciones para pérdida de peso basadas en la dieta (110,111), donde las VLCKD se han puesto de manifiesto como una alternativa terapéutica eficaz (114). En este sentido, la suplementación con cuerpos cetónicos se ha asociado con una mejora del perfil metabólico y con una mejora del estado oxidativo celular (541–543). Además, el tratamiento de la obesidad con una VLCKD reduce la masa grasa visceral preservando la masa y función muscular (63,563) así como la esteatosis hepática (48).

Estudios previos de nuestro grupo han evidenciado que el efecto del microambiente inducido por la disfunción del tejido adiposo en obesidad podría estar mediado por mecanismos epigenéticos (613). De hecho, se ha demostrado la existencia de un perfil de metilación específico de cáncer de mama (526) y cáncer de colon asociado a la obesidad (91). Además, se han observado patrones de metilación diferenciales en la obesidad (500), resistencia a la insulina (520) y NAFLD (503). Dichos patrones de metilación pueden ser revertidos tras un tratamiento para perder peso como es la intervención nutricional con una VLCKD (564). Por tanto, en este trabajo nos propusimos evaluar el perfil de metilación de los genes evaluados en relación al metabolismo lipídico y la carcinogénesis asociada a la obesidad y tras un tratamiento de pérdida de peso basado en una VLCKD (564). Dicho análisis mostró diferencias significativas en los perfiles de metilación de los genes implicados en la carcinogénesis y en la esteatosis hepática en los leucocitos circulantes de pacientes con obesidad en comparación con voluntarios sanos normopesos. Específicamente, se observó una tendencia general al alza de los niveles de metilación de los genes relacionados con la proliferación celular, la protección antioxidante, la supresión tumoral y el metabolismo de los lípidos en los pacientes con obesidad.

El seguimiento de la intervención nutricional con la VLCKD en los pacientes con obesidad también evidenció cambios significativos.

Concretamente, tras la pérdida de peso inducida por la VLCKD, el patrón de metilación observado en los pacientes con obesidad fue capaz de revertirse y curiosamente esta disminución general en los niveles de metilación se asemejó a los niveles observados en los sujetos normopeso. Estos resultados concuerdan con el agrupamiento jerárquico de las DMCPGs y la expresión génica de las DNMTs (564). Concretamente, los niveles de metilación de los sitios CpGs cg05679113, cg24224658, cg07991600 y cg04028107 fueron significativamente más bajos tras la pérdida de peso, coincidiendo con la bajada en la metilación detectada de estos sitios CpGs en los sujetos normopeso en comparación a los pacientes con obesidad. Estos sitios CpGs están contenidos en la secuencia de los genes *SURVIVINA/BIRC5*, *SIRT6*, *TP53* y *PLIN2*, respectivamente, evidenciando una posible regulación epigenética en los resultados observados y su potencial papel como biomarcadores de NAFLD y HCC en obesidad.

En los últimos años, se han descrito conexiones sobre las intervenciones para pérdida de peso y las alteraciones epigenéticas. Varios estudios han demostrado el efecto que ejerce una determinada dieta, suplemento dietético o intervención nutricional sobre el epigenotipo en la obesidad (511,531–533) y enfermedades asociadas (75,534–536). En este sentido, nuestros hallazgos acerca de la capacidad de la VLCKD para modular cambios en la metilación del ADN (564), junto a los actuales beneficios reportados para este tipo de dietas cetogénicas (62–64), nos llevan a determinar que una intervención nutricional basada en una VLCKD puede ser considerada como potencial herramienta terapéutica para el tratamiento del NAFLD asociada a la obesidad y como estrategia clave en la prevención del HCC.

En síntesis, el trabajo realizado en la presente tesis doctoral ha evidenciado que un exceso de adiposidad, vinculado a la manifestación de estrés oxidativo e inflamación, se asocia con la desregulación de genes implicados en las primeras fases de la carcinogénesis, en el hígado y en el tejido adiposo de animales obesos y reflejado en los leucocitos circulantes de sangre periférica de pacientes con obesidad. De manera relevante, se ha observado que la pérdida de peso inducida

en los estudios *in vivo* fue capaz de revertir el patrón de expresión de los genes implicados en el inicio del desarrollo tumoral, ya que la disminución en el peso corporal detectada tras las intervenciones fue concomitante a la reducción en la adiposidad, y se asoció a una mejora de la esteatosis hepática y de la protección antioxidante. Estos resultados fueron reforzados con los datos obtenidos en una línea celular de hepatocitos humana, que recreó la desregulación génica relacionada con la carcinogénesis en los tratamientos con secretoma de tejido adiposo y suero de pacientes con obesidad severa, los cuales fueron capaces de reproducir el fenotipo de esteatosis hepática definido en los ensayos de las células hepáticas tratadas con oleato de sodio. Además, el tratamiento con cuerpos cetónicos en las células esteatóticas tratadas con oleato fue capaz de revertir el patrón de expresión génica ligado a la carcinogénesis, concomitante a la reducción en el acúmulo de gotas lipídicas citoplasmáticas observada en las células tras el tratamiento con el butirato de sodio, cuyos resultados se asemejan a los obtenidos en los estudios *in vivo* tras la pérdida de peso. Nuestros hallazgos acerca de la asociación entre la adiposidad y la desregulación de los genes implicados en el inicio de la carcinogénesis indican que la expresión de los genes estudiados podría estar modulada por mecanismos epigenéticos, ya que el análisis de los perfiles de metilación del ADN de los genes diana estudiados en los leucocitos circulantes de pacientes con obesidad reveló cambios significativos en comparación a los perfiles observados en voluntarios sanos normopeso y tras la intervención nutricional de estos pacientes siguiendo una VLCKD.



# CONCLUSIONES





El presente trabajo de investigación ha permitido establecer las siguientes conclusiones:

1. La obesidad por sí misma y su microambiente asociado, estrés oxidativo e inflamación, son capaces de inducir la expresión diferencial de genes comúnmente asociados con la fase inicial de la carcinogénesis en el hígado de ratas obesas.
2. Las intervenciones para inducir pérdida de peso, que incluyen restricción calórica de la dieta y/o ejercicio físico, son capaces de revertir los parámetros relacionados con la disfunción hepática y la expresión de los genes relacionados con la carcinogénesis observado en ratas con obesidad.
3. La expresión hepática de SIRT6 está asociada al estrés oxidativo inducido por el exceso de adiposidad de ratas obesas y está modulada por intervenciones para pérdida de peso.
4. El oncogen SURVIVINA/BIRC5 está sobreexpresado en el VAT de animales obesos y en el SAT de animales expuestos a la obesidad durante más tiempo. Esta sobreexpresión está asociada con parámetros de adiposidad e inflamación y es revertida después de la pérdida de peso.
5. Los leucocitos circulantes de pacientes con obesidad antes y después del seguimiento de una terapia nutricional para adelgazar reflejan la expresión de SURVIVINA/BIRC5 observada en los animales obesos y tras pérdida de peso.
6. EL secretoma de tejido adiposo y el suero sanguíneo, obtenidos desde pacientes con obesidad severa, induce la expresión diferencial de genes relacionados con la esteatosis y la carcinogénesis hepática en células dHepaRG.
7. El tratamiento con cuerpos cetónicos sobre las células dHepaRG con esteatosis revierte los patrones de expresión implicados en el inicio de la carcinogénesis hepática.
8. Los niveles de metilación de los genes relacionados con la esteatosis y la carcinogénesis hepática están modulados en los leucocitos circulantes de pacientes con obesidad tras una VLCKD.

Por tanto, el exceso de adiposidad característico de la obesidad es capaz de desencadenar una respuesta procarcinogénica en el hígado antes de la manifestación de una masa tumoral, inducida por estrés oxidativo e inflamación, y regulada por mecanismos epigenéticos como la metilación del ADN. Así mismo, la pérdida de peso juega un papel clave para contrarrestar las características del fenotipo obeso y, por consiguiente, la promoción de la carcinogénesis, indicando que una reducción en el grado de adiposidad es fundamental para prevenir la progresión hacia el HCC relacionado con la NAFLD causada por la obesidad.





# **BIBLIOGRAFÍA**





1. Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation. World Health Organ Tech Rep Ser. 2000;894:i–xii, 1–253.
2. Upadhyay J, Farr O, Perakakis N, Ghaly W, Mantzoros C. Obesity as a Disease. *Med Clin North Am*. 2018;102(1):13–33.
3. De Lorenzo A, Gratteri S, Gualtieri P, Cammarano A, Bertucci P, Di Renzo L. Why primary obesity is a disease? *J Transl Med*. 2019;17(1):169.
4. Kaila B, Raman M. Obesity: a review of pathogenesis and management strategies. *Can J Gastroenterol*. 2008;22(1):61–8.
5. Oussaada SM, van Galen KA, Coومان MI, Kleinendorst L, Hazebroek EJ, van Haelst MM, et al. The pathogenesis of obesity. *Metabolism*. 2019;92:26–36.
6. Rohde K, Keller M, la Cour Poulsen L, Blüher M, Kovacs P, Böttcher Y. Genetics and epigenetics in obesity. *Metabolism*. 2019;92:37–50.
7. Rangel-Huerta OD, Pastor-Villaescusa B, Gil A. Are we close to defining a metabolomic signature of human obesity? A systematic review of metabolomics studies. Vol. 15, *Metabolomics*. Springer New York LLC; 2019.
8. Lu Z, Meng L, Sun Z, Shi X, Shao W, Zheng Y, et al. Differentially Expressed Genes and Enriched Signaling Pathways in the Adipose Tissue of Obese People. *Front Genet*. 2021;12.
9. Catenacci VA, Hill JO, Wyatt HR. The obesity epidemic. *Clin Chest Med*. 2009;30(3):415–44, vii.
10. Frühbeck G, Kiortsis DN, Catalán V. Precision medicine: diagnosis and management of obesity. *lancet Diabetes Endocrinol*. 2018;6(3):164–6.

11. Gadde KM, Martin CK, Berthoud H-R, Heymsfield SB. Obesity: Pathophysiology and Management. *J Am Coll Cardiol*. 2018;71(1):69–84.
12. Williams EP, Mesidor M, Winters K, Dubbert PM, Wyatt SB. Overweight and Obesity: Prevalence, Consequences, and Causes of a Growing Public Health Problem. *Curr Obes Rep*. 2015;4(3):363–70.
13. GBD 2015 Obesity Collaborators, Afshin A, Forouzanfar MH, Reitsma MB, Sur P, Estep K, et al. Health Effects of Overweight and Obesity in 195 Countries over 25 Years. *N Engl J Med*. 2017;377(1):13–27.
14. NCD Risk Factor Collaboration (NCD-RisC). Worldwide trends in body-mass index, underweight, overweight, and obesity from 1975 to 2016: a pooled analysis of 2416 population-based measurement studies in 128·9 million children, adolescents, and adults. *Lancet (London, England)*. 2017;390(10113):2627–42.
15. Apovian CM. The Obesity Epidemic--Understanding the Disease and the Treatment. *N Engl J Med*. 2016;374(2):177–9.
16. Andersen CJ, Murphy KE, Fernandez ML. Impact of Obesity and Metabolic Syndrome on Immunity. *Adv Nutr*. 2016;7(1):66–75.
17. Yang Y, Kang B, Lee EY, Yang HK, Kim H-S, Lim S-Y, et al. Effect of an obesity prevention program focused on motivating environments in childhood: a school-based prospective study. *Int J Obes (Lond)*. 2017;41(7):1027–34.
18. Yang Y, Shields GS, Guo C, Liu Y. Executive function performance in obesity and overweight individuals: A meta-analysis and review. *Neurosci Biobehav Rev*. 2018;84:225–44.
19. Sung H, Siegel RL, Torre LA, Pearson-Stuttard J, Islami F, Fedewa SA, et al. Global patterns in excess body weight and the associated cancer burden. *CA Cancer J Clin*. 2019;69(2):88–112.

20. Tomiyama AJ. Stress and Obesity. *Annu Rev Psychol.* 2019;70:703–18.
21. Nimptsch K, Konigorski S, Pischon T. Diagnosis of obesity and use of obesity biomarkers in science and clinical medicine. *Metabolism.* 2019;92:61–70.
22. Antonopoulos AS, Oikonomou EK, Antoniadis C, Tousoulis D. From the BMI paradox to the obesity paradox: the obesity-mortality association in coronary heart disease. *Obes Rev.* 2016;17(10):989–1000.
23. Hebebrand J, Holm J-C, Woodward E, Baker JL, Blaak E, Durrer Schutz D, et al. A Proposal of the European Association for the Study of Obesity to Improve the ICD-11 Diagnostic Criteria for Obesity Based on the Three Dimensions Etiology, Degree of Adiposity and Health Risk. *Obes Facts.* 2017;10(4):284–307.
24. Prospective Studies Collaboration, Whitlock G, Lewington S, Sherliker P, Clarke R, Emberson J, et al. Body-mass index and cause-specific mortality in 900 000 adults: collaborative analyses of 57 prospective studies. *Lancet (London, England).* 2009;373(9669):1083–96.
25. Ross R, Neeland IJ, Yamashita S, Shai I, Seidell J, Magni P, et al. Waist circumference as a vital sign in clinical practice: a Consensus Statement from the IAS and ICCR Working Group on Visceral Obesity. *Nat Rev Endocrinol.* 2020;16(3):177–89.
26. Green JA, Baker BI, Kawauchi H. The effect of rearing rainbow trout on black or white backgrounds on their secretion of melanin-concentrating hormone and their sensitivity to stress. *J Endocrinol.* 1991;128(2):267–74.
27. Flegal KM, Shepherd JA, Looker AC, Graubard BI, Borrud LG, Ogden CL, et al. Comparisons of percentage body fat, body mass index, waist circumference, and waist-stature ratio in adults. *Am J*

- Clin Nutr. 2009;89(2):500–8.
28. Casanueva FF, Moreno B, Rodríguez-Azaredo R, Massien C, Conthe P, Formiguera X, et al. Relationship of abdominal obesity with cardiovascular disease, diabetes and hyperlipidaemia in Spain. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2010;73(1):35–40.
  29. Wyatt HR. Update on treatment strategies for obesity. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013;98(4):1299–306.
  30. Wirth A, Wabitsch M, Hauner H. The prevention and treatment of obesity. *Dtsch Arztebl Int*. 2014;111(42):705–13.
  31. Wadden TA, Webb VL, Moran CH, Bailer BA. Lifestyle modification for obesity: new developments in diet, physical activity, and behavior therapy. *Circulation*. 2012;125(9):1157–70.
  32. Solas M, Milagro FI, Martínez-Urbistondo D, Ramirez MJ, Martínez JA. Precision Obesity Treatments Including Pharmacogenetic and Nutrigenetic Approaches. *Trends Pharmacol Sci*. 2016;37(7):575–93.
  33. Dong Z, Shariful Islam SM, Simms-Walker E, Wang C. Precision Surgery for Obesity. *Am J Ther*. 27(5):e491–4.
  34. Fock KM, Khoo J. Diet and exercise in management of obesity and overweight. *J Gastroenterol Hepatol*. 2013;28 Suppl 4:59–63.
  35. Catenacci VA, Wyatt HR. The role of physical activity in producing and maintaining weight loss. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*. 2007;3(7):518–29.
  36. Ramage S, Farmer A, Eccles KA, McCargar L. Healthy strategies for successful weight loss and weight maintenance: a systematic review. *Appl Physiol Nutr Metab*. 2014;39(1):1–20.
  37. Swift DL, McGee JE, Earnest CP, Carlisle E, Nygard M, Johannsen NM. The Effects of Exercise and Physical Activity on

- Weight Loss and Maintenance. *Prog Cardiovasc Dis.* 61(2):206–13.
38. Strychar I. Diet in the management of weight loss. *CMAJ.* 2006;174(1):56–63.
  39. Nordmann AJ, Nordmann A, Briel M, Keller U, Yancy WS, Brehm BJ, et al. Effects of low-carbohydrate vs low-fat diets on weight loss and cardiovascular risk factors: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Arch Intern Med.* 2006;166(3):285–93.
  40. Sacks FM, Bray GA, Carey VJ, Smith SR, Ryan DH, Anton SD, et al. Comparison of weight-loss diets with different compositions of fat, protein, and carbohydrates. *N Engl J Med.* 2009;360(9):859–73.
  41. Moreno B, Bellido D, Sajoux I, Goday A, Saavedra D, Crujeiras AB, et al. Comparison of a very low-calorie-ketogenic diet with a standard low-calorie diet in the treatment of obesity. *Endocrine.* 2014;47(3):793–805.
  42. Kushner RF. Weight loss strategies for treatment of obesity. *Prog Cardiovasc Dis.* 56(4):465–72.
  43. Harvey-Berino J. Calorie restriction is more effective for obesity treatment than dietary fat restriction. *Ann Behav Med.* 1999;21(1):35–9.
  44. Franz MJ, VanWormer JJ, Crain AL, Boucher JL, Histon T, Caplan W, et al. Weight-loss outcomes: a systematic review and meta-analysis of weight-loss clinical trials with a minimum 1-year follow-up. *J Am Diet Assoc.* 2007;107(10):1755–67.
  45. Flechtner-Mors M, Ditschuneit HH, Johnson TD, Suchard MA, Adler G. Metabolic and weight loss effects of long-term dietary intervention in obese patients: four-year results. *Obes Res.* 2000;8(5):399–402.

46. Casanueva FF, Castellana M, Bellido D, Trimboli P, Castro AI, Sajoux I, et al. Ketogenic diets as treatment of obesity and type 2 diabetes mellitus. Vol. 21, *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*. Springer; 2020. p. 381–97.
47. Muscogiuri G, El Ghoch M, Colao A, Hassapidou M, Yumuk V, Busetto L, et al. European Guidelines for Obesity Management in Adults with a Very Low-Calorie Ketogenic Diet: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Obes Facts*. 2021;14(2):222–45.
48. Caprio M, Infante M, Moriconi E, Armani A, Fabbri A, Mantovani G, et al. Very-low-calorie ketogenic diet (VLCKD) in the management of metabolic diseases: systematic review and consensus statement from the Italian Society of Endocrinology (SIE). *J Endocrinol Invest*. 2019;42(11):1365–86.
49. Abbasi J. Interest in the Ketogenic Diet Grows for Weight Loss and Type 2 Diabetes. *JAMA*. 2018;319(3):215–7.
50. Merra G, Gratteri S, De Lorenzo A, Barrucco S, Perrone MA, Avolio E, et al. Effects of very-low-calorie diet on body composition, metabolic state, and genes expression: a randomized double-blind placebo-controlled trial. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2017;21(2):329–45.
51. Merra G, Miranda R, Barrucco S, Gualtieri P, Mazza M, Moriconi E, et al. Very-low-calorie ketogenic diet with aminoacid supplement versus very low restricted-calorie diet for preserving muscle mass during weight loss: a pilot double-blind study. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2016;20(12):2613–21.
52. Cicero AFG, Benelli M, Brancaleoni M, Dainelli G, Merlini D, Negri R. Middle and Long-Term Impact of a Very Low-Carbohydrate Ketogenic Diet on Cardiometabolic Factors: A Multi-Center, Cross-Sectional, Clinical Study. *High Blood Press Cardiovasc Prev*. 2015;22(4):389–94.



53. Paoli A. Ketogenic diet for obesity: Friend or foe? Vol. 11, International Journal of Environmental Research and Public Health. Int J Environ Res Public Health; 2014. p. 2092–107.
54. Fukao T, Lopaschuk GD, Mitchell GA. Pathways and control of ketone body metabolism: on the fringe of lipid biochemistry. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids. 2004;70(3):243–51.
55. Mitchell GA, Kassovska-Bratinova S, Boukaftane Y, Robert MF, Wang SP, Ashmarina L, et al. Medical aspects of ketone body metabolism. Clin Invest Med. 1995;18(3):193–216.
56. Grabacka M, Pierzchalska M, Dean M, Reiss K. Regulation of Ketone Body Metabolism and the Role of PPAR $\alpha$ . Int J Mol Sci. 2016;17(12).
57. Ketone bodies: a review of physiology, pathophysiology and application of monitoring to diabetes - PubMed.
58. McPherson PAC, McEneny J. The biochemistry of ketogenesis and its role in weight management, neurological disease and oxidative stress. J Physiol Biochem. 2012;68(1):141–51.
59. Castellana M, Conte E, Cignarelli A, Perrini S, Giustina A, Giovannella L, et al. Efficacy and safety of very low calorie ketogenic diet (VLCKD) in patients with overweight and obesity: A systematic review and meta-analysis. Rev Endocr Metab Disord. 2019;
60. Gomez-Arbelaez D, Crujeiras AB, Castro AI, Goday A, Mas-Lorenzo A, Bellon A, et al. Acid–base safety during the course of a very low-calorie-ketogenic diet. Endocrine. 2017;58(1):81–90.
61. Handelsman Y, Henry RR, Bloomgarden ZT, Dagogo-Jack S, DeFronzo RA, Einhorn D, et al. American Association of Clinical Endocrinologists and American College of Endocrinology position statement on the association of SGLT-2 inhibitors and diabetic ketoacidosis. Endocr Pract. 2016;22(6):753–62.

62. Moreno B, Crujeiras AB, Bellido D, Sajoux I, Casanueva FF. Obesity treatment by very low-calorie-ketogenic diet at two years: reduction in visceral fat and on the burden of disease. *Endocrine*. 2016;54(3):681–90.
63. Gomez-Arbelaez D, Bellido D, Castro AI, Ordonez-Mayan L, Carreira J, Galban C, et al. Body composition changes after very-low-calorie ketogenic diet in obesity evaluated by 3 standardized methods. *J Clin Endocrinol Metab*. 2017;102(2):488–98.
64. Gomez-Arbelaez D, Crujeiras AB, Castro AI, Martinez-Olmos MA, Canton A, Ordoñez-Mayan L, et al. Resting metabolic rate of obese patients under very low calorie ketogenic diet. *Nutr Metab (Lond)*. 2018;15(1):18.
65. Castro AI, Gomez-Arbelaez D, Crujeiras AB, Granero R, Aguera Z, Jimenez-Murcia S, et al. Effect of A Very Low-Calorie Ketogenic Diet on Food and Alcohol Cravings, Physical and Sexual Activity, Sleep Disturbances, and Quality of Life in Obese Patients. *Nutrients*. 2018;10(10):1348.
66. Bruci A, Tuccinardi D, Tozzi R, Balena A, Santucci S, Frontani R, et al. Very low-calorie ketogenic diet: A safe and effective tool for weight loss in patients with obesity and mild kidney failure. *Nutrients*. 2020;12(2).
67. Muscogiuri G, Barrea L, Laudisio D, Pugliese G, Salzano C, Savastano S, et al. The management of very low-calorie ketogenic diet in obesity outpatient clinic: A practical guide. Vol. 17, *Journal of Translational Medicine*. BioMed Central Ltd.; 2019. p. 356.
68. Bergström A, Pisani P, Tenet V, Wolk A, Adami HO. Overweight as an avoidable cause of cancer in Europe. *Int J cancer*. 2001;91(3):421–30.
69. Friedenreich CM, Ryder-Burbidge C, McNeil J. Physical activity,

- obesity and sedentary behavior in cancer etiology: epidemiologic evidence and biologic mechanisms. *Mol Oncol*. 2021;15(3):790–800.
70. Lauby-Secretan B, Scoccianti C, Loomis D, Grosse Y, Bianchini F, Straif K, et al. Body Fatness and Cancer--Viewpoint of the IARC Working Group. *N Engl J Med*. 2016;375(8):794–8.
  71. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*. 2021;71(3):209–49.
  72. Ligibel JA, Alfano CM, Courneya KS, Demark-Wahnefried W, Burger RA, Chlebowski RT, et al. American Society of Clinical Oncology position statement on obesity and cancer. *J Clin Oncol*. 2014;32(31):3568–74.
  73. Kerr J, Anderson C, Lippman SM. Physical activity, sedentary behaviour, diet, and cancer: an update and emerging new evidence. *Lancet Oncol*. 2017;18(8):e457–71.
  74. McTiernan A, Friedenreich CM, Katzmarzyk PT, Powell KE, Macko R, Buchner D, et al. Physical Activity in Cancer Prevention and Survival: A Systematic Review. *Med Sci Sports Exerc*. 2019;51(6):1252–61.
  75. Bandera-Merchan B, Boughanem H, Crujeiras AB, Macias-Gonzalez M, Tinahones FJ. Ketotherapy as an epigenetic modifier in cancer. *Rev Endocr Metab Disord*. 2020;
  76. Perasso R, Baroin A, Qu LH, Bachellerie JP, Adoutte A. Origin of the algae. *Nature*. 1989;339(6220):142–4.
  77. Rutledge L, Demark-Wahnefried W. Weight Management and Exercise for Cancer Survivors. *Clin J Oncol Nurs*. 2016;20(2):129–32.

78. De Pergola G, Silvestris F. Obesity as a Major Risk Factor for Cancer. *J Obes*. 2013;2013:1–11.
79. Kolb R, Sutterwala FS, Zhang W. Obesity and cancer: inflammation bridges the two. *Curr Opin Pharmacol*. 2016;29:77–89.
80. Cabia B, Andrade S, Carreira MC, Casanueva FF, Crujeiras AB. A role for novel adipose tissue-secreted factors in obesity-related carcinogenesis. *Obes Rev*. 2016;17(4):361–76.
81. Booth A, Magnuson A, Fouts J, Foster M. Adipose tissue, obesity and adipokines: role in cancer promotion. *Horm Mol Biol Clin Investig*. 2015;21(1):57–74.
82. Crujeiras AB, Díaz-Lagares A, Carreira MC, Amil M, Casanueva FF. Oxidative stress associated to dysfunctional adipose tissue: a potential link between obesity, type 2 diabetes mellitus and breast cancer. *Free Radic Res*. 2013;47(4):243–56.
83. Crujeiras AB, Cabia B, Carreira MC, Amil M, Cueva J, Andrade S, et al. Secreted factors derived from obese visceral adipose tissue regulate the expression of breast malignant transformation genes. *Int J Obes (Lond)*. 2016;40(3):514–23.
84. Crujeiras AB, Cueva J, Vieito M, Curiel T, López-López R, Pollán M, et al. Association of breast cancer and obesity in a homogeneous population from Spain. *J Endocrinol Invest*. 2012;35(7):681–5.
85. Healy LA, Ryan AM, Rowley S, Boyle T, Connolly E, Kennedy MJ, et al. Obesity increases the risk of postmenopausal breast cancer and is associated with more advanced stage at presentation but no impact on survival. *Breast J*. 16(1):95–7.
86. Lorincz AM, Sukumar S. Molecular links between obesity and breast cancer. Vol. 13, *Endocrine-Related Cancer*. 2006. p. 279–92.

87. Gilbert CA, Slingerland JM. Cytokines, obesity, and cancer: new insights on mechanisms linking obesity to cancer risk and progression. *Annu Rev Med.* 2013;64:45–57.
88. Jochem C, Leitzmann M. Obesity and Colorectal Cancer. *Recent Results Cancer Res.* 208:17–41.
89. Martinez-Useros J, Garcia-Foncillas J. Obesity and colorectal cancer: molecular features of adipose tissue. *J Transl Med.* 2016;14:21.
90. Shirakami Y, Ohnishi M, Sakai H, Tanaka T, Shimizu M. Prevention of Colorectal Cancer by Targeting Obesity-Related Disorders and Inflammation. *Int J Mol Sci.* 2017;18(5).
91. Crujeiras AB, Morcillo S, Diaz-Lagares A, Sandoval J, Castellano-Castillo D, Torres E, et al. Identification of an epesignature of human colorectal cancer associated with obesity by genome-wide DNA methylation analysis. *Int J Obes (Lond).* 2019;43(1):176–88.
92. Marengo A, Rosso C, Bugianesi E. Liver Cancer: Connections with Obesity, Fatty Liver, and Cirrhosis. *Annu Rev Med.* 2016;67:103–17.
93. Sun B, Karin M. Obesity, inflammation, and liver cancer. *J Hepatol.* 2012;56(3):704–13.
94. Saitta C, Pollicino T, Raimondo G. Obesity and liver cancer. *Ann Hepatol.* 18(6):810–5.
95. Dhanasekaran R, Felsher DW. A Tale of Two Complications of Obesity: NASH and Hepatocellular Carcinoma. *Hepatology.* 2019;70(3):1056–8.
96. Gupta A, Das A, Majumder K, Arora N, Mayo HG, Singh PP, et al. Obesity is Independently Associated With Increased Risk of Hepatocellular Cancer-related Mortality: A Systematic Review

- and Meta-Analysis. *Am J Clin Oncol*. 2018;41(9):874–81.
97. Caldwell SH, Crespo DM, Kang HS, Al-Osaimi AMS. Obesity and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*. 2004;127(5 Suppl 1):S97-103.
  98. Huang DQ, El-Serag HB, Loomba R. Global epidemiology of NAFLD-related HCC: trends, predictions, risk factors and prevention. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2021;18(4):223–38.
  99. Geh D, Anstee QM, Reeves HL. NAFLD-Associated HCC: Progress and Opportunities. *J Hepatocell carcinoma*. 2021;8:223–39.
  100. Kew MC. Obesity as a cause of hepatocellular carcinoma. *Ann Hepatol*. 2015;14(3):299–303.
  101. Xu W, Yu J. Obesity and Hepatocellular Carcinoma. In: *Liver Pathophysiology*. Elsevier; 2017. p. 267–77.
  102. 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.
  103. Dhamija E, Paul SB, Kedia S. Non-alcoholic fatty liver disease associated with hepatocellular carcinoma: An increasing concern. *Indian J Med Res*. 2019;149(1):9–17.
  104. Margini C, Dufour JF. The story of HCC in NAFLD: from epidemiology, across pathogenesis, to prevention and treatment. *Liver Int*. 2016;36(3):317–24.
  105. Sayiner M, Koenig A, Henry L, Younossi ZM. Epidemiology of Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Nonalcoholic Steatohepatitis in the United States and the Rest of the World. *Clin Liver Dis*. 2016;20(2):205–14.

106. Pierantonelli I, Svegliati-Baroni G. Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Basic Pathogenetic Mechanisms in the Progression From NAFLD to NASH. *Transplantation*. 2019;103(1):e1–13.
107. Vernon G, Baranova A, Younossi ZM. Systematic review: the epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis in adults. *Aliment Pharmacol Ther*. 2011;34(3):274–85.
108. Younossi Z, Anstee QM, Marietti M, Hardy T, Henry L, Eslam M, et al. Global burden of NAFLD and NASH: trends, predictions, risk factors and prevention. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2018;15(1):11–20.
109. Younossi Z, Tacke F, Arrese M, Chander Sharma B, Mostafa I, Bugianesi E, et al. Global Perspectives on Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Nonalcoholic Steatohepatitis. *Hepatology*. 2019;69(6):2672–82.
110. Romero-Gómez M, Zelber-Sagi S, Trenell M. Treatment of NAFLD with diet, physical activity and exercise. *J Hepatol*. 2017;67(4):829–46.
111. Marchesini G, Petta S, Grave RD. Diet, Weight Loss, and Liver Health in Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Pathophysiology, Evidence, and Practice. 2016;63(6):2032–43.
112. Nseir W, Hellou E, Assy N. Role of diet and lifestyle changes in nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol*. 2014;20(28):9338–44.
113. Fan J-G, Cao H-X. Role of diet and nutritional management in non-alcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol Hepatol*. 2013;28 Suppl 4:81–7.
114. Cunha GM, Guzman G, Correa De Mello LL, Trein B, Spina L, Bussade I, et al. Efficacy of a 2-Month Very Low-Calorie Ketogenic Diet (VLCKD) Compared to a Standard Low-Calorie

- Diet in Reducing Visceral and Liver Fat Accumulation in Patients With Obesity. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2020;11:607.
115. Marra F, Svegliati-Baroni G. Lipotoxicity and the gut-liver axis in NASH pathogenesis. *J Hepatol*. 2018;68(2):280–95.
  116. Donnelly KL, Smith CI, Schwarzenberg SJ, Jessurun J, Boldt MD, Parks EJ. Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Invest*. 2005;115(5):1343–51.
  117. Dulai PS, Singh S, Patel J, Soni M, Prokop LJ, Younossi Z, et al. Increased risk of mortality by fibrosis stage in nonalcoholic fatty liver disease: Systematic review and meta-analysis. *Hepatology*. 2017;65(5):1557–65.
  118. Charlton M. Nonalcoholic fatty liver disease: a review of current understanding and future impact. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2004;2(12):1048–58.
  119. Severson TJ, Besur S, Bonkovsky HL. Genetic factors that affect nonalcoholic fatty liver disease: A systematic clinical review. *World J Gastroenterol*. 2016;22(29):6742–56.
  120. European Association for the Study of the Liver (EASL), European Association for the Study of Diabetes (EASD), European Association for the Study of Obesity (EASO). EASL-EASD-EASO Clinical Practice Guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol*. 2016;64(6):1388–402.
  121. Tomic D, Kemp WW, Roberts SK. Nonalcoholic fatty liver disease: current concepts, epidemiology and management strategies. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2018;30(10):1103–15.
  122. Samuel VT, Shulman GI. Mechanisms for insulin resistance: common threads and missing links. *Cell*. 2012;148(5):852–71.
  123. Finelli C, Tarantino G. Is visceral fat reduction necessary to



- favour metabolic changes in the liver? *J Gastrointestin Liver Dis.* 2012;21(2):205–8.
124. Azzu V, Vacca M, Virtue S, Allison M, Vidal-Puig A. Adipose Tissue-Liver Cross Talk in the Control of Whole-Body Metabolism: Implications in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology.* 2020;158(7):1899–912.
  125. Wasilewska N, Lebensztejn DM. Non-alcoholic fatty liver disease and lipotoxicity. *Clin Exp Hepatol.* 2021;7(1):1–6.
  126. Alves-Bezerra M, Cohen DE. Triglyceride Metabolism in the Liver. *Compr Physiol.* 2017;8(1):1–8.
  127. Buzzetti E, Pinzani M, Tsochatzis EA. The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Metabolism.* 2016;65(8):1038–48.
  128. Friedman SL, Neuschwander-Tetri BA, Rinella M, Sanyal AJ. Mechanisms of NAFLD development and therapeutic strategies. *Nat Med.* 2018;24(7):908–22.
  129. Feaver RE, Cole BK, Lawson MJ, Hoang SA, Marukian S, Blackman BR, et al. Development of an in vitro human liver system for interrogating nonalcoholic steatohepatitis. *JCI insight.* 2016;1(20):e90954.
  130. Müller FA, Sturla SJ. Human in vitro models of nonalcoholic fatty liver disease. *Curr Opin Toxicol.* 2019;16:9–16.
  131. Godoy P, Hewitt NJ, Albrecht U, Andersen ME, Ansari N, Bhattacharya S, et al. Recent advances in 2D and 3D in vitro systems using primary hepatocytes, alternative hepatocyte sources and non-parenchymal liver cells and their use in investigating mechanisms of hepatotoxicity, cell signaling and ADME. *Arch Toxicol.* 2013;87(8):1315–530.
  132. Gerets HHJ, Tilmant K, Gerin B, Chanteux H, Depelchin BO,

- Dhalluin S, et al. Characterization of primary human hepatocytes, HepG2 cells, and HepaRG cells at the mRNA level and CYP activity in response to inducers and their predictivity for the detection of human hepatotoxins. *Cell Biol Toxicol.* 2012;28(2):69–87.
133. Donato MT, Tolosa L, Gómez-Lechón MJ. Culture and Functional Characterization of Human Hepatoma HepG2 Cells. *Methods Mol Biol.* 2015;1250:77–93.
134. Cui W, Chen SL, Hu K-Q. Quantification and mechanisms of oleic acid-induced steatosis in HepG2 cells. *Am J Transl Res.* 2010;2(1):95–104.
135. Gómez-Lechón MJ, Donato MT, Martínez-Romero A, Jiménez N, Castell JV, O'Connor J-E. A human hepatocellular in vitro model to investigate steatosis. *Chem Biol Interact.* 2007;165(2):106–16.
136. Anthérieu S, Rogue A, Fromenty B, Guillouzo A, Robin M-A. Induction of vesicular steatosis by amiodarone and tetracycline is associated with up-regulation of lipogenic genes in HepaRG cells. *Hepatology.* 2011;53(6):1895–905.
137. Allard J, Bucher S, Massart J, Ferron P-J, Le Guillou D, Loyant R, et al. Drug-induced hepatic steatosis in absence of severe mitochondrial dysfunction in HepaRG cells: proof of multiple mechanism-based toxicity. *Cell Biol Toxicol.* 2021;37(2):151–75.
138. Di Cocco S, Belloni L, Nunn ADG, Salerno D, Piconese S, Levrero M, et al. Inducing and Characterizing Vesicular Steatosis in Differentiated HepaRG Cells. *J Vis Exp.* 2019;(149).
139. Lübberstedt M, Müller-Vieira U, Mayer M, Biemel KM, Knöspel F, Knobloch D, et al. HepaRG human hepatic cell line utility as a surrogate for primary human hepatocytes in drug metabolism assessment in vitro. *J Pharmacol Toxicol Methods.*

- 2011;63(1):59–68.
140. Andersson TB, Kanebratt KP, Kenna JG. The HepaRG cell line: a unique in vitro tool for understanding drug metabolism and toxicology in human. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2012;8(7):909–20.
  141. Tolosa L, Gómez-Lechón MJ, Jiménez N, Hervás D, Jover R, Donato MT. Advantageous use of HepaRG cells for the screening and mechanistic study of drug-induced steatosis. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2016;302:1–9.
  142. Guillouzo A, Corlu A, Aninat C, Glaise D, Morel F, Guguen-Guillouzo C. The human hepatoma HepaRG cells: a highly differentiated model for studies of liver metabolism and toxicity of xenobiotics. *Chem Biol Interact*. 2007;168(1):66–73.
  143. Santhekadur PK, Kumar DP, Sanyal AJ. Preclinical models of non-alcoholic fatty liver disease. Vol. 68, *Journal of Hepatology*. 2018. p. 230–7.
  144. Tsuchida T, Lee YA, Fujiwara N, Ybanez M, Allen B, Martins S, et al. A simple diet- and chemical-induced murine NASH model with rapid progression of steatohepatitis, fibrosis and liver cancer. *J Hepatol*. 2018;69(2):385–95.
  145. Matsumoto M, Hada N, Sakamaki Y, Uno A, Shiga T, Tanaka C, et al. An improved mouse model that rapidly develops fibrosis in non-alcoholic steatohepatitis. *Int J Exp Pathol*. 2013;94(2):93–103.
  146. Clapper JR, Hendricks MD, Gu G, Wittmer C, Dolman CS, Herich J, et al. Diet-induced mouse model of fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis reflecting clinical disease progression and methods of assessment. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2013;305(7):G483-95.
  147. Zou Y, Li J, Lu C, Wang J, Ge J, Huang Y, et al. High-fat

- emulsion-induced rat model of nonalcoholic steatohepatitis. *Life Sci.* 2006;79(11):1100–7.
148. Lieber CS, Leo MA, Mak KM, Xu Y, Cao Q, Ren C, et al. Model of nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Clin Nutr.* 2004;79(3):502–9.
149. Charlton M, Krishnan A, Viker K, Sanderson S, Cazanave S, McConico A, et al. Fast food diet mouse: novel small animal model of NASH with ballooning, progressive fibrosis, and high physiological fidelity to the human condition. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2011;301(5):G825–34.
150. Fellmann L, Nascimento AR, Tibiriça E, Bousquet P. Murine models for pharmacological studies of the metabolic syndrome. *Pharmacol Ther.* 2013;137(3):331–40.
151. Godbole V, York DA. Lipogenesis in situ in the genetically obese Zucker fatty rat (fa/fa): role of hyperphagia and hyperinsulinaemia. *Diabetologia.* 1978;14(3):191–7.
152. Oana F, Takeda H, Hayakawa K, Matsuzawa A, Akahane S, Isaji M, et al. Physiological difference between obese (fa/fa) Zucker rats and lean Zucker rats concerning adiponectin. *Metabolism.* 2005;54(8):995–1001.
153. Kurtz TW, Morris RC, Pershadsingh HA. The Zucker fatty rat as a genetic model of obesity and hypertension. *Hypertens (Dallas, Tex 1979).* 1989;13(6 Pt 2):896–901.
154. Liao W, Angelin B, Rudling M. Lipoprotein metabolism in the fat Zucker rat: reduced basal expression but normal regulation of hepatic low density lipoprotein receptors. *Endocrinology.* 1997;138(8):3276–82.
155. Carmiel-Haggai M, Cederbaum AI, Nieto N. A high-fat diet leads to the progression of non-alcoholic fatty liver disease in obese rats. *FASEB J.* 2005;19(1):136–8.

156. Kakuma T, Lee Y, Higa M, Wang Z w, Pan W, Shimomura I, et al. Leptin, troglitazone, and the expression of sterol regulatory element binding proteins in liver and pancreatic islets. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(15):8536–41.
157. Yang SQ, Lin HZ, Lane MD, Clemens M, Diehl AM. Obesity increases sensitivity to endotoxin liver injury: implications for the pathogenesis of steatohepatitis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(6):2557–62.
158. Soltys K, Dikdan G, Koneru B. Oxidative stress in fatty livers of obese Zucker rats: rapid amelioration and improved tolerance to warm ischemia with tocopherol. *Hepatology*. 2001;34(1):13–8.
159. McGarry JD, Mannaerts GP, Foster DW. A possible role for malonyl-CoA in the regulation of hepatic fatty acid oxidation and ketogenesis. *J Clin Invest*. 1977;60(1):265–70.
160. Brownsey RW, Zhande R, Boone AN. Isoforms of acetyl-CoA carboxylase: structures, regulatory properties and metabolic functions. *Biochem Soc Trans*. 1997;25(4):1232–8.
161. Abu-Elheiga L, Brinkley WR, Zhong L, Chirala SS, Woldegiorgis G, Wakil SJ. The subcellular localization of acetyl-CoA carboxylase 2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(4):1444–9.
162. Oh S-Y, Park S-K, Kim J-W, Ahn Y-H, Park S-W, Kim K-S. Acetyl-CoA carboxylase beta gene is regulated by sterol regulatory element-binding protein-1 in liver. *J Biol Chem*. 2003;278(31):28410–7.
163. Kim C-W, Addy C, Kusunoki J, Anderson NN, Deja S, Fu X, et al. Acetyl CoA Carboxylase Inhibition Reduces Hepatic Steatosis but Elevates Plasma Triglycerides in Mice and Humans: A Bedside to Bench Investigation. *Cell Metab*. 2017;26(2):394-406.e6.
164. Savage DB, Choi CS, Samuel VT, Liu Z-X, Zhang D, Wang A, et

- al. Reversal of diet-induced hepatic steatosis and hepatic insulin resistance by antisense oligonucleotide inhibitors of acetyl-CoA carboxylases 1 and 2. *J Clin Invest*. 2006;116(3):817–24.
165. Goedeke L, Bates J, Vatner DF, Perry RJ, Wang T, Ramirez R, et al. Acetyl-CoA Carboxylase Inhibition Reverses NAFLD and Hepatic Insulin Resistance but Promotes Hypertriglyceridemia in Rodents. *Hepatology*. 2018;68(6):2197–211.
166. Stiede K, Miao W, Blanchette HS, Beysen C, Harriman G, Harwood HJ, et al. Acetyl-coenzyme A carboxylase inhibition reduces de novo lipogenesis in overweight male subjects: A randomized, double-blind, crossover study. *Hepatology*. 2017;66(2):324–34.
167. Bhattacharjee K, Nath M, Choudhury Y. Fatty acid synthesis and cancer: Aberrant expression of the ACACA and ACACB genes increases the risk for cancer. *Meta Gene*. 2020;26:100798.
168. Harris RA, Bowker-Kinley MM, Huang B, Wu P. Regulation of the activity of the pyruvate dehydrogenase complex. *Adv Enzyme Regul*. 2002;42:249–59.
169. Connaughton S, Chowdhury F, Attia RR, Song S, Zhang Y, Elam MB, et al. Regulation of pyruvate dehydrogenase kinase isoform 4 (PDK4) gene expression by glucocorticoids and insulin. *Mol Cell Endocrinol*. 2010;315(1–2):159–67.
170. Liu X, Zuo R, Bao Y, Qu X, Sun K, Ying H. Down-regulation of PDK4 is Critical for the Switch of Carbohydrate Catabolism during Syncytialization of Human Placental Trophoblasts. *Sci Rep*. 2017;7(1):8474.
171. Pettersen IK, Tusubira D, Ashrafi H, Dyrstad SE, Hansen L, Liu X-Z, et al. Upregulated PDK4 expression is a sensitive marker of increased fatty acid oxidation. *Mitochondrion*. 2019;49:97–110.
172. Jeon J-H, Thoudam T, Choi EJ, Kim M-J, Harris RA, Lee I-K.

- Loss of metabolic flexibility as a result of overexpression of pyruvate dehydrogenase kinases in muscle, liver and the immune system: Therapeutic targets in metabolic diseases. *J Diabetes Investig.* 2021;12(1):21–31.
173. Zhang M, Zhao Y, Li Z, Wang C. Pyruvate dehydrogenase kinase 4 mediates lipogenesis and contributes to the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2018;495(1):582–6.
174. Zhao Y, Tran M, Wang L, Shin D-J, Wu J. PDK4-Deficiency Reprograms Intrahepatic Glucose and Lipid Metabolism to Facilitate Liver Regeneration in Mice. *Hepatology Commun.* 2020;4(4):504–17.
175. Okumura T. Role of lipid droplet proteins in liver steatosis. *J Physiol Biochem.* 2011;67(4):629–36.
176. Graffmann N, Ring S, Kawala M-A, Wruck W, Ncube A, Trompeter H-I, et al. Modeling Nonalcoholic Fatty Liver Disease with Human Pluripotent Stem Cell-Derived Immature Hepatocyte-Like Cells Reveals Activation of PLIN2 and Confirms Regulatory Functions of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Alpha. *Stem Cells Dev.* 2016;25(15):1119–33.
177. Najt CP, Lwande JS, McIntosh AL, Senthivinayagam S, Gupta S, Kuhn LA, et al. Structural and functional assessment of perilipin 2 lipid binding domain(s). *Biochemistry.* 2014;53(45):7051–66.
178. Carr RM, Peralta G, Yin X, Ahima RS. Absence of perilipin 2 prevents hepatic steatosis, glucose intolerance and ceramide accumulation in alcohol-fed mice. *PLoS One.* 2014;9(5):e97118.
179. McManaman JL, Bales ES, Orlicky DJ, Jackman M, MacLean PS, Cain S, et al. Perilipin-2-null mice are protected against diet-induced obesity, adipose inflammation, and fatty liver disease. *J*

- Lipid Res. 2013;54(5):1346–59.
180. Najt CP, Senthivinayagam S, Aljazi MB, Fader KA, Olenic SD, Brock JRL, et al. Liver-specific loss of Perilipin 2 alleviates diet-induced hepatic steatosis, inflammation, and fibrosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2016;310(9):G726–38.
  181. Imai Y, Varela GM, Jackson MB, Graham MJ, Crooke RM, Ahima RS. Reduction of hepatosteatosis and lipid levels by an adipose differentiation-related protein antisense oligonucleotide. *Gastroenterology*. 2007;132(5):1947–54.
  182. Schmidt-Arras D, Rose-John S. IL-6 pathway in the liver: From physiopathology to therapy. *J Hepatol*. 2016;64(6):1403–15.
  183. Kishimoto T. IL-6: from its discovery to clinical applications. *Int Immunol*. 2010;22(5):347–52.
  184. Gudowska-Sawczuk M, Wrona A, Gruszevska E, Cylwik B, Panasiuk A, Flisiak R, et al. Serum level of interleukin-6 (IL-6) and N-terminal propeptide of procollagen type I (PINP) in patients with liver diseases. *Scand J Clin Lab Invest*. 78(1–2):125–30.
  185. Widjaja AA, Chothani SP, Cook SA. Different roles of interleukin 6 and interleukin 11 in the liver: implications for therapy. *Hum Vaccin Immunother*. 2020;16(10):2357–62.
  186. Yamaguchi K, Itoh Y, Yokomizo C, Nishimura T, Niimi T, Fujii H, et al. Blockade of interleukin-6 signaling enhances hepatic steatosis but improves liver injury in methionine choline-deficient diet-fed mice. *Lab Invest*. 2010;90(8):1169–78.
  187. Wang X, Yan Z, Ye Q. Interleukin-6 gene polymorphisms and susceptibility to liver diseases: A meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*. 2019;98(50):e18408.
  188. Shao Y-Y, Lin H, Li Y-S, Lee Y-H, Chen H-M, Cheng A-L, et al.



- High plasma interleukin-6 levels associated with poor prognosis of patients with advanced hepatocellular carcinoma. *Jpn J Clin Oncol.* 2017;47(10):949–53.
189. Cali AMG, Caprio S. Obesity in children and adolescents. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008;93(11 Suppl 1):S31-6.
190. Pradhan AD, Manson JE, Rifai N, Buring JE, Ridker PM. C-reactive protein, interleukin 6, and risk of developing type 2 diabetes mellitus. *JAMA.* 2001;286(3):327–34.
191. Chadt A, Al-Hasani H. Glucose transporters in adipose tissue, liver, and skeletal muscle in metabolic health and disease. *Pflugers Arch.* 2020;472(9):1273–98.
192. Redden DT, Allison DB. Nonreplication in genetic association studies of obesity and diabetes research. *J Nutr.* 2003;133(11):3323–6.
193. Vazquez-Chantada M, Gonzalez-Lahera A, Martinez-Arranz I, Garcia-Monzon C, Regueiro MM, Garcia-Rodriguez JL, et al. Solute carrier family 2 member 1 is involved in the development of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology.* 2013;57(2):505–14.
194. Anderson N, Borlak J. Molecular mechanisms and therapeutic targets in steatosis and steatohepatitis. *Pharmacol Rev.* 2008;60(3):311–57.
195. Speliotes EK, Yerges-Armstrong LM, Wu J, Hernaez R, Kim LJ, Palmer CD, et al. Genome-wide association analysis identifies variants associated with nonalcoholic fatty liver disease that have distinct effects on metabolic traits. *PLoS Genet.* 2011;7(3):e1001324.
196. van Dijk KW, Rensen PCN, Voshol PJ, Havekes LM. The role and mode of action of apolipoproteins CIII and AV: synergistic actors in triglyceride metabolism? *Curr Opin Lipidol.*

- 2004;15(3):239–46.
197. Kozlitina J, Boerwinkle E, Cohen JC, Hobbs HH. Dissociation between APOC3 variants, hepatic triglyceride content and insulin resistance. *Hepatology*. 2011;53(2):467–74.
  198. West G, Rodia C, Li D, Johnson Z, Dong H, Kohan AB. Key differences between apoC-III regulation and expression in intestine and liver. *Biochem Biophys Res Commun*. 2017;491(3):747–53.
  199. Talmud PJ, Humphries SE. Apolipoprotein C-III gene variation and dyslipidaemia. *Curr Opin Lipidol*. 1997;8(3):154–8.
  200. Norata GD, Tsimikas S, Pirillo A, Catapano AL. Apolipoprotein C-III: From Pathophysiology to Pharmacology. *Trends Pharmacol Sci*. 2015;36(10):675–87.
  201. Zhang R-N, Zheng R-D, Mi Y-Q, Zhou D, Shen F, Chen G-Y, et al. APOC3 rs2070666 Is Associated with the Hepatic Steatosis Independently of PNPLA3 rs738409 in Chinese Han Patients with Nonalcoholic Fatty Liver Diseases. *Dig Dis Sci*. 2016;61(8):2284–93.
  202. Sentinelli F, Romeo S, Maglio C, Incani M, Burza MA, Scano F, et al. Lack of effect of apolipoprotein C3 polymorphisms on indices of liver steatosis, lipid profile and insulin resistance in obese Southern Europeans. *Lipids Health Dis*. 2011;10:93.
  203. Petersen KF, Dufour S, Hariri A, Nelson-Williams C, Foo JN, Zhang X-M, et al. Apolipoprotein C3 gene variants in nonalcoholic fatty liver disease. *N Engl J Med*. 2010;362(12):1082–9.
  204. Ntambi JM, Miyazaki M. Regulation of stearyl-CoA desaturases and role in metabolism. *Prog Lipid Res*. 2004;43(2):91–104.
  205. Fernández Gianotti T, Burgueño A, Gonzales Mansilla N, Pirola

- CJ, Sookoian S. Fatty liver is associated with transcriptional downregulation of stearoyl-CoA desaturase and impaired protein dimerization. *PLoS One*. 2013;8(9):e76912.
206. Cohen P, Ntambi JM, Friedman JM. Stearoyl-CoA desaturase-1 and the metabolic syndrome. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord*. 2003;3(4):271–80.
207. Dobrzyn A, Ntambi JM. The role of stearoyl-CoA desaturase in body weight regulation. *Trends Cardiovasc Med*. 2004;14(2):77–81.
208. Gutiérrez-Juárez R, Pocai A, Mulas C, Ono H, Bhanot S, Monia BP, et al. Critical role of stearoyl-CoA desaturase-1 (SCD1) in the onset of diet-induced hepatic insulin resistance. *J Clin Invest*. 2006;116(6):1686–95.
209. Li ZZ, Berk M, McIntyre TM, Feldstein AE. Hepatic lipid partitioning and liver damage in nonalcoholic fatty liver disease: role of stearoyl-CoA desaturase. *J Biol Chem*. 2009;284(9):5637–44.
210. Stefan N, Peter A, Cegan A, Staiger H, Machann J, Schick F, et al. Low hepatic stearoyl-CoA desaturase 1 activity is associated with fatty liver and insulin resistance in obese humans. *Diabetologia*. 2008;51(4):648–56.
211. Ferhat M, Funai K, Boudina S. Autophagy in Adipose Tissue Physiology and Pathophysiology. *Antioxid Redox Signal*. 2019;31(6):487–501.
212. Giralt M, Villarroya F. White, brown, beige/brite: different adipose cells for different functions? *Endocrinology*. 2013;154(9):2992–3000.
213. Cinti S. The adipose organ: morphological perspectives of adipose tissues. *Proc Nutr Soc*. 2001;60(3):319–28.

214. Bielczyk-Maczynska E. White Adipocyte Plasticity in Physiology and Disease. *Cells*. 2019;8(12).
215. Unamuno X, Gómez-Ambrosi J, Rodríguez A, Becerril S, Frühbeck G, Catalán V. Adipokine dysregulation and adipose tissue inflammation in human obesity. *Eur J Clin Invest*. 2018;48(9):e12997.
216. Rosen ED, Spiegelman BM. Adipocytes as regulators of energy balance and glucose homeostasis. *Nature*. 2006;444(7121):847–53.
217. Kwok KHM, Lam KSL, Xu A. Heterogeneity of white adipose tissue: Molecular basis and clinical implications. Vol. 48, *Experimental and Molecular Medicine*. Nature Publishing Group; 2016.
218. Rodríguez A, Catalán V, Gómez-Ambrosi J, Frühbeck G. Visceral and subcutaneous adiposity: are both potential therapeutic targets for tackling the metabolic syndrome? *Curr Pharm Des*. 2007;13(21):2169–75.
219. Ibrahim MM. Subcutaneous and visceral adipose tissue: structural and functional differences. *Obes Rev*. 2010;11(1):11–8.
220. Wajchenberg BL. Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome. *Endocr Rev*. 2000;21(6):697–738.
221. Karpe F, Pinnick KE. Biology of upper-body and lower-body adipose tissue--link to whole-body phenotypes. *Nat Rev Endocrinol*. 2015;11(2):90–100.
222. Porter SA, Massaro JM, Hoffmann U, Vasan RS, O'Donnel CJ, Fox CS. Abdominal subcutaneous adipose tissue: a protective fat depot? *Diabetes Care*. 2009;32(6):1068–75.
223. Jensen MD. Role of body fat distribution and the metabolic

- complications of obesity. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008;93(11 Suppl 1):S57-63.
224. Scherer PE. Adipose tissue: from lipid storage compartment to endocrine organ. *Diabetes.* 2006;55(6):1537–45.
225. Galic S, Oakhill JS, Steinberg GR. Adipose tissue as an endocrine organ. *Mol Cell Endocrinol.* 2010;316(2):129–39.
226. Kershaw EE, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89(6):2548–56.
227. Halberg N, Wernstedt-Asterholm I, Scherer PE. The adipocyte as an endocrine cell. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2008;37(3):753–68, x–xi.
228. Deng Y, Scherer PE. Adipokines as novel biomarkers and regulators of the metabolic syndrome. *Ann N Y Acad Sci.* 2010;1212:E1–19.
229. Hauner H. Secretory factors from human adipose tissue and their functional role. *Proc Nutr Soc.* 2005;64(2):163–9.
230. Ahima RS, Flier JS. Leptin. *Annu Rev Physiol.* 2000;62:413–37.
231. Hukshorn CJ, Lindeman JHN, Toet KH, Saris WHM, Eilers PHC, Westerterp-Plantenga MS, et al. Leptin and the proinflammatory state associated with human obesity. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89(4):1773–8.
232. Myers MG, Leibel RL, Seeley RJ, Schwartz MW. Obesity and leptin resistance: distinguishing cause from effect. *Trends Endocrinol Metab.* 2010;21(11):643–51.
233. Izquierdo AG, Crujeiras AB, Casanueva FF, Carreira MC. Leptin, Obesity, and Leptin Resistance: Where Are We 25 Years Later? *Nutrients.* 2019;11(11).

234. Idriss HT, Naismith JH. TNF alpha and the TNF receptor superfamily: structure-function relationship(s). *Microsc Res Tech.* 2000;50(3):184–95.
235. Popa C, Netea MG, van Riel PLCM, van der Meer JWM, Stalenhoef AFH. The role of TNF-alpha in chronic inflammatory conditions, intermediary metabolism, and cardiovascular risk. *J Lipid Res.* 2007;48(4):751–62.
236. Gwozdziwiczová S, Lichnovská R, Ben Yahia R, Chlup R, Hřebíček J. TNF-alpha in the development of insulin resistance and other disorders in metabolic syndrome. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2005;149(1):109–17.
237. Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science.* 1993;259(5091):87–91.
238. Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. IL-6 in inflammation, immunity, and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2014;6(10):a016295.
239. Testa R, Olivieri F, Bonfigli AR, Sirolla C, Boemi M, Marchegiani F, et al. Interleukin-6-174 G > C polymorphism affects the association between IL-6 plasma levels and insulin resistance in type 2 diabetic patients. *Diabetes Res Clin Pract.* 2006;71(3):299–305.
240. Patsalos O, Dalton B, Himmerich H. Effects of IL-6 Signaling Pathway Inhibition on Weight and BMI: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Int J Mol Sci.* 2020;21(17).
241. Kadowaki T, Yamauchi T. Adiponectin and adiponectin receptors. *Endocr Rev.* 2005;26(3):439–51.
242. Díez JJ, Iglesias P. The role of the novel adipocyte-derived hormone adiponectin in human disease. *Eur J Endocrinol.* 2003;148(3):293–300.

243. Miescher PA. Nomifensine-induced allergic reactions. *Lancet* (London, England). 1985;2(8454):551–2.
244. Kondo H, Shimomura I, Matsukawa Y, Kumada M, Takahashi M, Matsuda M, et al. Association of adiponectin mutation with type 2 diabetes: a candidate gene for the insulin resistance syndrome. *Diabetes*. 2002;51(7):2325–8.
245. Li J, Shen X. Oxidative stress and adipokine levels were significantly correlated in diabetic patients with hyperglycemic crises. *Diabetol Metab Syndr*. 2019;11:13.
246. Manna P, Jain SK. Obesity, Oxidative Stress, Adipose Tissue Dysfunction, and the Associated Health Risks: Causes and Therapeutic Strategies. *Metab Syndr Relat Disord*. 2015;13(10):423–44.
247. Maslov LN, Naryzhnaya N V, Boshchenko AA, Popov S V, Ivanov V V, Oeltgen PR. Is oxidative stress of adipocytes a cause or a consequence of the metabolic syndrome? *J Clin Transl Endocrinol*. 2019;15:1–5.
248. M. P, M. SM, Sachan A, Y. LA, P. V. L. N. SR. Role of adipokines, oxidative stress, and endotoxins in the pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease in patients with type 2 diabetes mellitus. *Int J Res Med Sci*. 2019;7(5):1644.
249. Choe SS, Huh JY, Hwang IJ, Kim JI, Kim JB. Adipose tissue remodeling: Its role in energy metabolism and metabolic disorders. Vol. 7, *Frontiers in Endocrinology*. Frontiers Media S.A.; 2016. p. 1.
250. Apovian CM. Obesity: definition, comorbidities, causes, and burden. *Am J Manag Care*. 2016;22(7 Suppl):s176-85.
251. Carobbio S, Pellegrinelli V, Vidal-Puig A. Adipose Tissue Function and Expandability as Determinants of Lipotoxicity and the Metabolic Syndrome. *Adv Exp Med Biol*. 2017;960:161–96.

252. Pellegrinelli V, Carobbio S, Vidal-Puig A. Adipose tissue plasticity: how fat depots respond differently to pathophysiological cues. *Diabetologia*. 2016;59(6):1075–88.
253. Ferrante AW. Macrophages, fat, and the emergence of immunometabolism. *J Clin Invest*. 2013;123(12):4992–3.
254. Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest*. 2003;112(12):1796–808.
255. Sun K, Tordjman J, Clément K, Scherer PE. Fibrosis and adipose tissue dysfunction. *Cell Metab*. 2013;18(4):470–7.
256. Crewe C, An YA, Scherer PE. The ominous triad of adipose tissue dysfunction: inflammation, fibrosis, and impaired angiogenesis. *J Clin Invest*. 2017;127(1):74–82.
257. Huh JY, Park YJ, Ham M, Kim JB. Crosstalk between adipocytes and immune cells in adipose tissue inflammation and metabolic dysregulation in obesity. *Mol Cells*. 2014;37(5):365–71.
258. Kim SM, Lun M, Wang M, Senyo SE, Guillermier C, Patwari P, et al. Loss of white adipose hyperplastic potential is associated with enhanced susceptibility to insulin resistance. *Cell Metab*. 2014;20(6):1049–58.
259. Virtue S, Vidal-Puig A. Adipose tissue expandability, lipotoxicity and the Metabolic Syndrome--an allostatic perspective. *Biochim Biophys Acta*. 2010;1801(3):338–49.
260. Carobbio S, Rodriguez-Cuenca S, Vidal-Puig A. Origins of metabolic complications in obesity: ectopic fat accumulation. The importance of the qualitative aspect of lipotoxicity. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2011;14(6):520–6.
261. Svegliati-Baroni G, Pierantonelli I, Torquato P, Marinelli R,



- Ferreri C, Chatgililoglu C, et al. Lipidomic biomarkers and mechanisms of lipotoxicity in non-alcoholic fatty liver disease. *Free Radic Biol Med.* 2019;144:293–309.
262. Navarro-Yepes J, Burns M, Anandhan A, Khalimonchuk O, del Razo LM, Quintanilla-Vega B, et al. Oxidative stress, redox signaling, and autophagy: cell death versus survival. *Antioxid Redox Signal.* 2014;21(1):66–85.
263. Yu BP. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev.* 1994;74(1):139–62.
264. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007;39(1):44–84.
265. Halliwell B, Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol.* 2004;142(2):231–55.
266. Vincent HK, Taylor AG. Biomarkers and potential mechanisms of obesity-induced oxidant stress in humans. *Int J Obes (Lond).* 2006;30(3):400–18.
267. Marseglia L, Manti S, D'Angelo G, Nicotera A, Parisi E, Di Rosa G, et al. Oxidative stress in obesity: a critical component in human diseases. *Int J Mol Sci.* 2014;16(1):378–400.
268. Savini I, Catani MV, Evangelista D, Gasperi V, Avigliano L. Obesity-associated oxidative stress: strategies finalized to improve redox state. *Int J Mol Sci.* 2013;14(5):10497–538.
269. Bełtowski J, Wójcicka G, Górný D, Marciniak A. The effect of dietary-induced obesity on lipid peroxidation, antioxidant enzymes and total plasma antioxidant capacity. *J Physiol Pharmacol.* 2000;51(4 Pt 2):883–96.

270. Bouloumie A, Marumo T, Lafontan M, Busse R. Leptin induces oxidative stress in human endothelial cells. *FASEB J*. 1999;13(10):1231–8.
271. Martínez JA. Mitochondrial oxidative stress and inflammation: an slalom to obesity and insulin resistance. *J Physiol Biochem*. 2006;62(4):303–6.
272. Fernández-Sánchez A, Madrigal-Santillán E, Bautista M, Esquivel-Soto J, Morales-González A, Esquivel-Chirino C, et al. Inflammation, oxidative stress, and obesity. *Int J Mol Sci*. 2011;12(5):3117–32.
273. Jung RT. Obesity as a disease. *Br Med Bull*. 1997;53(2):307–21.
274. Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, Iwaki M, Yamada Y, Nakajima Y, et al. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest*. 2004;114(12):1752–61.
275. Lee H, Lee YJ, Choi H, Ko EH, Kim J-W. Reactive oxygen species facilitate adipocyte differentiation by accelerating mitotic clonal expansion. *J Biol Chem*. 2009;284(16):10601–9.
276. Horvath TL, Andrews ZB, Diano S. Fuel utilization by hypothalamic neurons: roles for ROS. *Trends Endocrinol Metab*. 2009;20(2):78–87.
277. German AJ, Ryan VH, German AC, Wood IS, Trayhurn P. Obesity, its associated disorders and the role of inflammatory adipokines in companion animals. *Vet J*. 2010;185(1):4–9.
278. Stolarczyk E. Adipose tissue inflammation in obesity: a metabolic or immune response? *Curr Opin Pharmacol*. 2017;37:35–40.
279. Monteiro R, Azevedo I. Chronic inflammation in obesity and the metabolic syndrome. *Mediators Inflamm*. 2010;2010.

280. Longo M, Zatterale F, Naderi J, Parrillo L, Formisano P, Raciti GA, et al. Adipose Tissue Dysfunction as Determinant of Obesity-Associated Metabolic Complications. *Int J Mol Sci.* 2019;20(9).
281. Jernås M, Palming J, Sjöholm K, Jennische E, Svensson P-A, Gabrielsson BG, et al. Separation of human adipocytes by size: hypertrophic fat cells display distinct gene expression. *FASEB J.* 2006;20(9):1540–2.
282. Leal V de O, Mafra D. Adipokines in obesity. *Clin Chim Acta.* 2013;419:87–94.
283. 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):333–6.
284. Mancuso P. The role of adipokines in chronic inflammation. *ImmunoTargets Ther.* 2016;5:47–56.
285. Rasouli N. Adipose tissue hypoxia and insulin resistance. *J Investig Med.* 2016;64(4):830–2.
286. Lee YS, Kim J-W, Osborne O, Oh DY, Sasik R, Schenk S, et al. Increased adipocyte O<sub>2</sub> consumption triggers HIF-1 $\alpha$ , causing inflammation and insulin resistance in obesity. *Cell.* 2014;157(6):1339–52.
287. Hammarstedt A, Gogg S, Hedjazifar S, Nerstedt A, Smith U. Impaired Adipogenesis and Dysfunctional Adipose Tissue in Human Hypertrophic Obesity. *Physiol Rev.* 2018;98(4):1911–41.
288. Samad F, Yamamoto K, Pandey M, Loskutoff DJ. Elevated expression of transforming growth factor-beta in adipose tissue from obese mice. *Mol Med.* 1997;3(1):37–48.
289. Cox AJ, West NP, Cripps AW. Obesity, inflammation, and the gut microbiota. *lancet Diabetes Endocrinol.* 2015;3(3):207–15.

290. Kuroda M, Sakaue H. Adipocyte Death and Chronic Inflammation in Obesity. *J Med Invest*. 2017;64(3.4):193–6.
291. Wueest S, Rapold RA, Rytka JM, Schoenle EJ, Konrad D. Basal lipolysis, not the degree of insulin resistance, differentiates large from small isolated adipocytes in high-fat fed mice. *Diabetologia*. 2009;52(3):541–6.
292. Slawik M, Vidal-Puig AJ. Lipotoxicity, overnutrition and energy metabolism in aging. *Ageing Res Rev*. 2006;5(2):144–64.
293. Ballantyne CM, Nambi V. Markers of inflammation and their clinical significance. *Atheroscler Suppl*. 2005;6(2):21–9.
294. Germolec DR, Shipkowski KA, Frawley RP, Evans E. Markers of Inflammation. *Methods Mol Biol*. 2018;1803:57–79.
295. Provatoriv SI, Aref'eva TI, Kukhtina NB, Liukova TK, Aref'eva AM, Krasnikova TL. [Markers of inflammation--monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) and C-reactive protein--in blood of patients with unstable angina pectoris and stable effort angina]. *Ter Arkh*. 2006;78(6):66–9.
296. Wolin KY, Carson K, Colditz GA. Obesity and cancer. *Oncologist*. 2010;15(6):556–65.
297. Deng T, Lyon CJ, Bergin S, Caligiuri MA, Hsueh WA. Obesity, Inflammation, and Cancer. *Annu Rev Pathol*. 2016;11:421–49.
298. Iyengar NM, Gucalp A, Dannenberg AJ, Hudis CA. Obesity and Cancer Mechanisms: Tumor Microenvironment and Inflammation. *J Clin Oncol*. 2016;34(35):4270–6.
299. Farzanegi P, Dana A, Ebrahimipoor Z, Asadi M, Azarbayjani MA. Mechanisms of beneficial effects of exercise training on non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD): Roles of oxidative stress and inflammation. *Eur J Sport Sci*. 2019;19(7):994–1003.

300. Berenblum I, Shubik P. An experimental study of the initiating state of carcinogenesis, and a re-examination of the somatic cell mutation theory of cancer. *Br J Cancer*. 1949;3(1):109–18.
301. Weiss RA. Multistage carcinogenesis. *Br J Cancer*. 2004;91(12):1981–2.
302. Peters JM, Gonzalez FJ. The Evolution of Carcinogenesis. *Toxicol Sci*. 2018;165(2):272–6.
303. Patterson AD, Gonzalez FJ, Perdue GH, Peters JM. Molecular Regulation of Carcinogenesis: Friend and Foe. *Toxicol Sci*. 2018;165(2):277–83.
304. Hussain SP, Harris CC. Inflammation and cancer: an ancient link with novel potentials. *Int J cancer*. 2007;121(11):2373–80.
305. Kawanishi S, Ohnishi S, Ma N, Hiraku Y, Murata M. Crosstalk between DNA Damage and Inflammation in the Multiple Steps of Carcinogenesis. *Int J Mol Sci*. 2017;18(8).
306. Multhoff G, Molls M, Radons J. Chronic inflammation in cancer development. *Front Immunol*. 2011;2:98.
307. Ambrosini G, Adida C, Altieri DC. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat Med*. 1997;3(8):917–21.
308. Duffy MJ, O'Donovan N, Brennan DJ, Gallagher WM, Ryan BM. Survivin: a promising tumor biomarker. *Cancer Lett*. 2007;249(1):49–60.
309. Mita AC, Mita MM, Nawrocki ST, Giles FJ. Survivin: Key Regulator of Mitosis and Apoptosis and Novel Target for Cancer Therapeutics. *Clin Cancer Res*. 2008;14(16):5000–5.
310. Nachmias B, Ashhab Y, Ben-Yehuda D. The inhibitor of apoptosis protein family (IAPs): an emerging therapeutic target in

- cancer. *Semin Cancer Biol.* 2004;14(4):231–43.
311. Als AB, Dyrskjøt L, von der Maase H, Koed K, Mansilla F, Toldbod HE, et al. Emmprin and survivin predict response and survival following cisplatin-containing chemotherapy in patients with advanced bladder cancer. *Clin Cancer Res.* 2007;13(15 Pt 1):4407–14.
  312. Derin D, Soydinç HO, Guney N, Tas F, Camlica H, Duranyildiz D, et al. Serum levels of apoptosis biomarkers, survivin and TNF-alpha in nonsmall cell lung cancer. *Lung Cancer.* 2008;59(2):240–5.
  313. Zaffaroni N, Daidone MG. Survivin expression and resistance to anticancer treatments: perspectives for new therapeutic interventions. *Drug Resist Updat.* 2002;5(2):65–72.
  314. Fukuda S, Pelus LM. Survivin, a cancer target with an emerging role in normal adult tissues. *Mol Cancer Ther.* 2006;5(5):1087–98.
  315. Ejarque M, Ceperuelo-Mallafre V, Serena C, Pachón G, Núñez-Álvarez Y, Terrón-Puig M, et al. Survivin, a key player in cancer progression, increases in obesity and protects adipose tissue stem cells from apoptosis. *Cell Death Dis.* 2017;8(5):e2802.
  316. Ju L, Zhang X, Deng Y, Han J, Yang J, Chen S, et al. Enhanced expression of Survivin has distinct roles in adipocyte homeostasis. *Cell Death Dis.* 2017;8(1):e2533.
  317. Peroukides S, Bravou V, Alexopoulos A, Varakis J, Kalofonos H, Papadaki H. Survivin overexpression in HCC and liver cirrhosis differentially correlates with p-STAT3 and E-cadherin. *Histol Histopathol.* 2010;25(3):299–307.
  318. Chen W, Dong W, Wang J, Wen Z, Hao X. Elevated Expressions of Survivin and Endoglin in Patients with Hepatic Carcinoma. *Cancer Biother Radiopharm.* 2019;34(1):7–12.

319. Kapiris I, Nastos K, Karakatsanis A, Theodosopoulos T, Karandrea D, Kondi Pafiti A, et al. Survivin expression in hepatocellular carcinoma. Correlation with clinicopathological characteristics and overall survival. *J BUON*. 24(5):1934–42.
320. Akpınar MY, Simsek GG, Aksoy EK, Sapmaz FP, Kantarci S, Uzman M, et al. Survivin expression starts before hepatocellular cancer development in the liver of chronic hepatitis B patients: a pilot, cross-sectional study. *Prz Gastroenterol*. 2020;15(2):138–43.
321. Benaiges E, Ceperuelo-Mallafre V, Madeira A, Bosch R, Núñez-Roa C, Ejarque M, et al. Survivin drives tumor-associated macrophage reprogramming: a novel mechanism with potential impact for obesity. *Cell Oncol (Dordr)*. 2021;
322. Dang C V, O'Donnell KA, Zeller KI, Nguyen T, Osthus RC, Li F. The c-Myc target gene network. *Semin Cancer Biol*. 2006;16(4):253–64.
323. Meyer N, Penn LZ. Reflecting on 25 years with MYC. *Nat Rev Cancer*. 2008;8(12):976–90.
324. Chen H, Liu H, Qing G. Targeting oncogenic Myc as a strategy for cancer treatment. *Signal Transduct Target Ther*. 3:5.
325. Adhikary S, Eilers M. Transcriptional regulation and transformation by Myc proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2005;6(8):635–45.
326. Bretones G, Delgado MD, León J. Myc and cell cycle control. *Biochim Biophys Acta*. 2015;1849(5):506–16.
327. Arvanitis C, Felsher DW. Conditional transgenic models define how MYC initiates and maintains tumorigenesis. *Semin Cancer Biol*. 2006;16(4):313–7.
328. Jia J, Che L, Cigliano A, Wang X, Peitta G, Tao J, et al. Pivotal

- Role of Fatty Acid Synthase in c-MYC Driven Hepatocarcinogenesis. *Int J Mol Sci.* 2020;21(22).
329. Cao Z, Fan-Minogue H, Bellovin DI, Yevtodiyenko A, Arzeno J, Yang Q, et al. MYC phosphorylation, activation, and tumorigenic potential in hepatocellular carcinoma are regulated by HMG-CoA reductase. *Cancer Res.* 2011;71(6):2286–97.
330. Zheng K, Cubero FJ, Nevzorova YA. c-MYC-Making Liver Sick: Role of c-MYC in Hepatic Cell Function, Homeostasis and Disease. *Genes (Basel).* 2017;8(4).
331. Wang H, Wang P, Xu M, Song X, Wu H, Evert M, et al. Distinct functions of transforming growth factor- $\beta$  signaling in c-MYC driven hepatocellular carcinoma initiation and progression. *Cell Death Dis.* 2021;12(2):200.
332. Strange RC, Spiteri MA, Ramachandran S, Fryer AA. Glutathione-S-transferase family of enzymes. *Mutat Res.* 2001;482(1–2):21–6.
333. Dasari S, Ganjaji MS, Yellanurkonda P, Basha S, Meriga B. Role of glutathione S-transferases in detoxification of a polycyclic aromatic hydrocarbon, methylcholanthrene. *Chem Biol Interact.* 2018;294:81–90.
334. Gritz DC, McDonnell PJ, Lee TY, Tang-Liu D, Hubbard BB, Gwon A. Topical ofloxacin in the treatment of *Pseudomonas* keratitis in a rabbit model. *Cornea.* 1992;11(2):143–7.
335. Oakley A. Glutathione transferases: a structural perspective. *Drug Metab Rev.* 2011;43(2):138–51.
336. Anttila S, Hirvonen A, Vainio H, Husgafvel-Pursiainen K, Hayes JD, Ketterer B. Immunohistochemical localization of glutathione S-transferases in human lung. *Cancer Res.* 1993;53(23):5643–8.
337. Huang J, Xiong Y, Deng C, Zuo B, Xu D, Lei M, et al. Cloning,



- sequence analysis and identification of a nonsense mutation-mediated mRNA decay of porcine GSTM2 gene. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2007;39(8):560–6.
338. Tang S-C, Sheu G-T, Wong R-H, Huang C-Y, Weng M-W, Lee L-W, et al. Expression of glutathione S-transferase M2 in stage I/II non-small cell lung cancer and alleviation of DNA damage exposure to benzo[a]pyrene. *Toxicol Lett*. 2010;192(3):316–23.
339. Tang S-C, Wu M-F, Wong R-H, Liu Y-F, Tang L-C, Lai C-H, et al. Epigenetic mechanisms for silencing glutathione S-transferase m2 expression by hypermethylated specificity protein 1 binding in lung cancer. *Cancer*. 2011;117(14):3209–21.
340. Tang S-C, Wu C-H, Lai C-H, Sung W-W, Yang W-J, Tang L-C, et al. Glutathione S-transferase mu2 suppresses cancer cell metastasis in non-small cell lung cancer. *Mol Cancer Res*. 2013;11(5):518–29.
341. McIlwain CC, Townsend DM, Tew KD. Glutathione S-transferase polymorphisms: cancer incidence and therapy. *Oncogene*. 2006;25(11):1639–48.
342. Guo E, Wei H, Liao X, Wu L, Zeng X. Clinical significance and biological mechanisms of glutathione S-transferase mu gene family in colon adenocarcinoma. *BMC Med Genet*. 2020;21(1):130.
343. Giera S, Braeuning A, Köhle C, Bursch W, Metzger U, Buchmann A, et al. Wnt/beta-catenin signaling activates and determines hepatic zonal expression of glutathione S-transferases in mouse liver. *Toxicol Sci*. 2010;115(1):22–33.
344. Ashour N, Angulo JC, Andrés G, Alelú R, González-Corpas A, Toledo M V, et al. A DNA hypermethylation profile reveals new potential biomarkers for prostate cancer diagnosis and prognosis. *Prostate*. 2014;74(12):1171–82.

345. Michishita E, Park JY, Burneskis JM, Barrett JC, Horikawa I. Evolutionarily conserved and nonconserved cellular localizations and functions of human SIRT proteins. *Mol Biol Cell*. 2005;16(10):4623–35.
346. Michan S, Sinclair D. Sirtuins in mammals: insights into their biological function. *Biochem J*. 2007;404(1):1–13.
347. Ağaoğlu NB, Varol N, Yıldız SH, Karaosmanoğlu C, Duman R, Özdemir Erdoğan M, et al. Relationship between SIRT1 gene expression level and disease in age-related cataract cases. *Turkish J Med Sci*. 2019;49(4):1068–72.
348. Cohen HY, Miller C, Bitterman KJ, Wall NR, Hekking B, Kessler B, et al. Calorie restriction promotes mammalian cell survival by inducing the SIRT1 deacetylase. *Science*. 2004;305(5682):390–2.
349. Tang BL, Chua CEL. SIRT1 and neuronal diseases. *Mol Aspects Med*. 2008;29(3):187–200.
350. Vachharajani VT, Liu T, Wang X, Hoth JJ, Yoza BK, McCall CE. Sirtuins Link Inflammation and Metabolism. *J Immunol Res*. 2016;2016:1–10.
351. Singh CK, Chhabra G, Ndiaye MA, Garcia-Peterson LM, Mack NJ, Ahmad N. The Role of Sirtuins in Antioxidant and Redox Signaling. *Antioxid Redox Signal*. 2018;28(8):643–61.
352. Brunet A, Sweeney LB, Sturgill JF, Chua KF, Greer PL, Lin Y, et al. Stress-dependent regulation of FOXO transcription factors by the SIRT1 deacetylase. *Science*. 2004;303(5666):2011–5.
353. Yuan Z, Zhang X, Sengupta N, Lane WS, Seto E. SIRT1 regulates the function of the Nijmegen breakage syndrome protein. *Mol Cell*. 2007;27(1):149–62.
354. Ding R-B, Bao J, Deng C-X. Emerging roles of SIRT1 in fatty liver diseases. *Int J Biol Sci*. 2017;13(7):852–67.

355. Borji M, Nourbakhsh M, Shafiee SM, Owji AA, Abdolvahabi Z, Hesari Z, et al. Down-Regulation of SIRT1 Expression by mir-23b Contributes to Lipid Accumulation in HepG2 Cells. *Biochem Genet.* 2019;57(4):507–21.
356. Xu F, Gao Z, Zhang J, Rivera CA, Yin J, Weng J, et al. Lack of SIRT1 (Mammalian Sirtuin 1) activity leads to liver steatosis in the SIRT1<sup>+/-</sup> mice: a role of lipid mobilization and inflammation. *Endocrinology.* 2010;151(6):2504–14.
357. Chang H-C, Guarente L. SIRT1 and other sirtuins in metabolism. *Trends Endocrinol Metab.* 2014;25(3):138–45.
358. Colak Y, Ozturk O, Senates E, Tuncer I, Yorulmaz E, Adali G, et al. SIRT1 as a potential therapeutic target for treatment of nonalcoholic fatty liver disease. *Med Sci Monit.* 2011;17(5):HY5-9.
359. Pan PW, Feldman JL, Devries MK, Dong A, Edwards AM, Denu JM. Structure and biochemical functions of SIRT6. *J Biol Chem.* 2011;286(16):14575–87.
360. Mao Z, Hine C, Tian X, Van Meter M, Au M, Vaidya A, et al. SIRT6 promotes DNA repair under stress by activating PARP1. *Science.* 2011;332(6036):1443–6.
361. Zhong L, D'Urso A, Toiber D, Sebastian C, Henry RE, Vadysirisack DD, et al. The histone deacetylase Sirt6 regulates glucose homeostasis via Hif1 $\alpha$ . *Cell.* 2010;140(2):280–93.
362. Kanfi Y, Naiman S, Amir G, Peshti V, Zinman G, Nahum L, et al. The sirtuin SIRT6 regulates lifespan in male mice. *Nature.* 2012;483(7388):218–21.
363. Sebastián C, Zwaans BMM, Silberman DM, Gymrek M, Goren A, Zhong L, et al. The histone deacetylase SIRT6 is a tumor suppressor that controls cancer metabolism. *Cell.* 2012;151(6):1185–99.

364. Kanfi Y, Naiman S, Amir G, Peshti V, Zinman G, Nahum L, et al. The sirtuin SIRT6 regulates lifespan in male mice. *Nature*. 2012;483(7388):218–21.
365. de Céu Teixeira M, Sanchez-Lopez E, Espina M, Garcia ML, Durazzo A, Lucarini M, et al. Sirtuins and SIRT6 in Carcinogenesis and in Diet. *Int J Mol Sci*. 2019;20(19).
366. Raj S, Dsouza LA, Singh SP, Kanwal A. Sirt6 Deacetylase: A Potential Key Regulator in the Prevention of Obesity, Diabetes and Neurodegenerative Disease. *Front Pharmacol*. 2020;11:598326.
367. Kuang J, Chen L, Tang Q, Zhang J, Li Y, He J. The Role of Sirt6 in Obesity and Diabetes. *Front Physiol*. 2018;9:135.
368. Liu G, Chen H, Liu H, Zhang W, Zhou J. Emerging roles of SIRT6 in human diseases and its modulators. *Med Res Rev*. 2021;41(2):1089–137.
369. Kim HS, Xiao C, Wang RH, Lahusen T, Xu X, Vassilopoulos A, et al. Hepatic-specific disruption of SIRT6 in mice results in fatty liver formation due to enhanced glycolysis and triglyceride synthesis. *Cell Metab*. 2010;12(3):224–36.
370. Zhong X, Huang M, Kim H-G, Zhang Y, Chowdhury K, Cai W, et al. SIRT6 Protects Against Liver Fibrosis by Deacetylation and Suppression of SMAD3 in Hepatic Stellate Cells. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*. 2020;10(2):341–64.
371. Min L, Ji Y, Bakiri L, Qiu Z, Cen J, Chen X, et al. Liver cancer initiation is controlled by AP-1 through SIRT6-dependent inhibition of survivin. *Nat Cell Biol*. 2012;14(11):1203–11.
372. Naiman S, Huynh FK, Gil R, Glick Y, Shahar Y, Touitou N, et al. SIRT6 Promotes Hepatic Beta-Oxidation via Activation of PPAR $\alpha$ . *Cell Rep*. 2019;29(12):4127-4143.e8.

373. Chang AR, Ferrer CM, Mostoslavsky R. SIRT6, a Mammalian Deacetylase with Multitasking Abilities. *Physiol Rev.* 2020;100(1):145–69.
374. Aubrey BJ, Strasser A, Kelly GL. Tumor-Suppressor Functions of the TP53 Pathway. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2016;6(5).
375. Vousden KH, Lane DP. p53 in health and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007;8(4):275–83.
376. Levine AJ. p53: 800 million years of evolution and 40 years of discovery. *Nat Rev Cancer.* 2020;20(8):471–80.
377. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011;144(5):646–74.
378. Olivier M, Hollstein M, Hainaut P. TP53 mutations in human cancers: origins, consequences, and clinical use. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2010;2(1):a001008.
379. Vogelstein B, Lane D, Levine AJ. Surfing the p53 network. *Nature.* 2000;408(6810):307–10.
380. Petitjean A, Mathe E, Kato S, Ishioka C, Tavtigian S V, Hainaut P, et al. Impact of mutant p53 functional properties on TP53 mutation patterns and tumor phenotype: lessons from recent developments in the IARC TP53 database. *Hum Mutat.* 2007;28(6):622–9.
381. Vassilev LT. p53 Activation by small molecules: application in oncology. *J Med Chem.* 2005;48(14):4491–9.
382. Brown CJ, Lain S, Verma CS, Fersht AR, Lane DP. Awakening guardian angels: drugging the p53 pathway. *Nat Rev Cancer.* 2009;9(12):862–73.
383. Kruse J-P, Gu W. Modes of p53 regulation. *Cell.* 2009;137(4):609–22.

384. Lacroix M, Riscal R, Arena G, Linares LK, Le Cam L. Metabolic functions of the tumor suppressor p53: Implications in normal physiology, metabolic disorders, and cancer. *Mol Metab.* 2020;33:2–22.
385. Ortega FJ, Moreno-Navarrete JM, Mayas D, Serino M, Rodriguez-Hermosa JI, Ricart W, et al. Inflammation and insulin resistance exert dual effects on adipose tissue tumor protein 53 expression. *Int J Obes (Lond).* 2014;38(5):737–45.
386. Minamino T, Orimo M, Shimizu I, Kunieda T, Yokoyama M, Ito T, et al. A crucial role for adipose tissue p53 in the regulation of insulin resistance. *Nat Med.* 2009;15(9):1082–7.
387. Yahagi N, Shimano H, Matsuzaka T, Sekiya M, Najima Y, Okazaki S, et al. p53 involvement in the pathogenesis of fatty liver disease. *J Biol Chem.* 2004;279(20):20571–5.
388. Homayounfar R, Jeddi-Tehrani M, Cheraghpour M, Ghorbani A, Zand H. Relationship of p53 accumulation in peripheral tissues of high-fat diet-induced obese rats with decrease in metabolic and oncogenic signaling of insulin. *Gen Comp Endocrinol.* 2015;214:134–9.
389. Li DM, Sun H. TEP1, encoded by a candidate tumor suppressor locus, is a novel protein tyrosine phosphatase regulated by transforming growth factor beta. *Cancer Res.* 1997;57(11):2124–9.
390. Worby CA, Dixon JE. PTEN. *Annu Rev Biochem.* 2014;83:641–69.
391. Hopkins BD, Hodakoski C, Barrows D, Mense SM, Parsons RE. PTEN function: the long and the short of it. *Trends Biochem Sci.* 2014;39(4):183–90.
392. Chen C-Y, Chen J, He L, Stiles BL. PTEN: Tumor Suppressor and Metabolic Regulator. *Front Endocrinol (Lausanne).*

- 2018;9:338.
393. Knobbe CB, Lapin V, Suzuki A, Mak TW. The roles of PTEN in development, physiology and tumorigenesis in mouse models: a tissue-by-tissue survey. *Oncogene*. 2008;27(41):5398–415.
  394. Stiles BL. Phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10: extending its PTENTacles. *Int J Biochem Cell Biol*. 2009;41(4):757–61.
  395. Milella M, Falcone I, Conciatori F, Cesta Incani U, Del Curatolo A, Inzerilli N, et al. PTEN: Multiple Functions in Human Malignant Tumors. *Front Oncol*. 2015;5:24.
  396. Masson GR, Williams RL. Structural Mechanisms of PTEN Regulation. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2020;10(3).
  397. Hlobilková A, Knillová J, Bártek J, Lukás J, Kolár Z. The mechanism of action of the tumour suppressor gene PTEN. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*. 2003;147(1):19–25.
  398. Álvarez-García V, Tawil Y, Wise HM, Leslie NR. Mechanisms of PTEN loss in cancer: It's all about diversity. *Semin Cancer Biol*. 2019;59:66–79.
  399. Carnero A, Blanco-Aparicio C, Renner O, Link W, Leal JFM. The PTEN/PI3K/AKT signalling pathway in cancer, therapeutic implications. *Curr Cancer Drug Targets*. 2008;8(3):187–98.
  400. Li A, Qiu M, Zhou H, Wang T, Guo W. PTEN, Insulin Resistance and Cancer. *Curr Pharm Des*. 2017;23(25).
  401. Kim KK, Sheppard D, Chapman HA. TGF- $\beta$ 1 Signaling and Tissue Fibrosis. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2018;10(4).
  402. Piek E, Heldin CH, Ten Dijke P. Specificity, diversity, and regulation in TGF-beta superfamily signaling. *FASEB J*.

- 1999;13(15):2105–24.
403. Roberts AB. Molecular and cell biology of TGF-beta. *Miner Electrolyte Metab.* 1998;24(2–3):111–9.
404. Massagué J, Blain SW, Lo RS. TGFbeta signaling in growth control, cancer, and heritable disorders. *Cell.* 2000;103(2):295–309.
405. Massagué J. TGFbeta in Cancer. *Cell.* 2008;134(2):215–30.
406. Roberts AB, Wakefield LM. The two faces of transforming growth factor beta in carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(15):8621–3.
407. Wakefield LM, Roberts AB. TGF-beta signaling: positive and negative effects on tumorigenesis. *Curr Opin Genet Dev.* 2002;12(1):22–9.
408. Bierie B, Moses HL. Tumour microenvironment: TGFbeta: the molecular Jekyll and Hyde of cancer. *Nat Rev Cancer.* 2006;6(7):506–20.
409. Shevchenko OP, Kurabekova RM, Tsirulnikova OM. The role of transforming growth factor beta 1 under diseases of liver. *Klin Lab Diagn.* 2017;62(3):161–4.
410. Koeck ES, Iordanskaia T, Sevilla S, Ferrante SC, Hubal MJ, Freishtat RJ, et al. Adipocyte exosomes induce transforming growth factor beta pathway dysregulation in hepatocytes: a novel paradigm for obesity-related liver disease. *J Surg Res.* 2014;192(2):268–75.
411. Nair B, Nath LR. Inevitable role of TGF- $\beta$ 1 in progression of nonalcoholic fatty liver disease. *J Recept Signal Transduct Res.* 2020;40(3):195–200.
412. Fain JN, Tichansky DS, Madan AK. Transforming growth factor



- beta1 release by human adipose tissue is enhanced in obesity. *Metabolism*. 2005;54(11):1546–51.
413. Long J-R, Liu P-Y, Liu Y-J, Lu Y, Xiong D-H, Elze L, et al. APOE and TGF-beta1 genes are associated with obesity phenotypes. *J Med Genet*. 2003;40(12):918–24.
414. Silva VRR, Katashima CK, Lenhare L, Silva CGB, Morari J, Camargo RL, et al. Chronic exercise reduces hypothalamic transforming growth factor- $\beta$ 1 in middle-aged obese mice. *Aging (Albany NY)*. 2017;9(8):1926–40.
415. Reik W. Stability and flexibility of epigenetic gene regulation in mammalian development. *Nature*. 2007;447(7143):425–32.
416. Kanwal R, Gupta K, Gupta S. Cancer epigenetics: an introduction. *Methods Mol Biol*. 2015;1238:3–25.
417. Tiwari S. Recent Advancement in Methodology for Understanding Epigenetic Modifications. *J Clin Epigenetics*. 2017;03(03).
418. Izquierdo AG, Crujeiras AB. Role of epigenomic mechanisms in the onset and management of insulin resistance. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*. Springer New York LLC; 2019.
419. Izquierdo AG, Crujeiras AB. Obesity-Related Epigenetic Changes After Bariatric Surgery. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2019;10.
420. Dawson MA, Kouzarides T. Cancer epigenetics: from mechanism to therapy. *Cell*. 2012;150(1):12–27.
421. Nebbioso A, Tambaro FP, Dell'Aversana C, Altucci L. Cancer epigenetics: Moving forward. *PLoS Genet*. 2018;14(6):e1007362.
422. Skvortsova K, Stirzaker C, Taberlay P. The DNA methylation landscape in cancer. *Essays Biochem*. 2019;63(6):797–811.

423. Waddington CH. Towards a theoretical biology. *Nature*. 1968;218(5141):525–7.
424. Egger G, Liang G, Aparicio A, Jones P a. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature*. 2004;429(6990):457–63.
425. Crujeiras AB, Diaz-Lagares A. DNA Methylation in Obesity and Associated Diseases [Internet]. *Epigenetic Biomarkers and Diagnostics*. Elsevier Inc.; 2016. 313–329 p.
426. Wu Ct, Morris JR. Genes, genetics, and epigenetics: a correspondence. *Science*. 2001;293(5532):1103–5.
427. Crujeiras AB, Diaz-Lagares A, Sandoval J, Milagro FI, Navas-Carretero S, Carreira MC, et al. DNA methylation map in circulating leukocytes mirrors subcutaneous adipose tissue methylation pattern: a genome-wide analysis from non-obese and obese patients. *Sci Rep*. 2017;7:41903.
428. Izquierdo AG, Crujeiras AB. Epigenetic biomarkers in metabolic syndrome and obesity. In: *Prognostic Epigenetics*. Elsevier; 2019. p. 269–87.
429. Skinner MK, Manikkam M, Guerrero-Bosagna C. Epigenetic transgenerational actions of environmental factors in disease etiology. *Trends Endocrinol Metab*. 2010;21(4):214–22.
430. Portela A, Esteller M. Epigenetic modifications and human disease. *Nat Biotechnol*. 2010;28(10):1057–68.
431. Skvortsova K, Iovino N, Bogdanović O. Functions and mechanisms of epigenetic inheritance in animals. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2018;19(12):774–90.
432. Allis CD, Jenuwein T. The molecular hallmarks of epigenetic control. *Nat Rev Genet*. 2016;17(8):487–500.

433. Kronfol MM, Dozmorov MG, Huang R, Slattum PW, McClay JL. The role of epigenomics in personalized medicine. *Expert Rev Precis Med drug Dev.* 2017;2(1):33–45.
434. Dupont C, Armant DR, Brenner CA. Epigenetics: definition, mechanisms and clinical perspective. *Semin Reprod Med.* 2009;27(5):351–7.
435. Hamidi T, Singh AK, Chen T. Genetic alterations of DNA methylation machinery in human diseases. *Epigenomics.* 2015;7(2):247–65.
436. Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev.* 2002;16(1):6–21.
437. Kim M, Costello J. DNA methylation: an epigenetic mark of cellular memory. *Exp Mol Med.* 2017;49(4):e322–e322.
438. Yong W-S, Hsu F-M, Chen P-Y. Profiling genome-wide DNA methylation. *Epigenetics Chromatin.* 2016;9(1):26.
439. Robertson KD. DNA methylation and human disease. *Nat Rev Genet.* 2005;6(8):597–610.
440. Smith ZD, Meissner A. DNA methylation: roles in mammalian development. *Nat Rev Genet.* 2013;14(3):204–20.
441. Robertson KD. DNA methylation, methyltransferases, and cancer. *Oncogene.* 2001;20(24):3139–55.
442. Okano M, Bell DW, Haber DA, Li E. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell.* 1999;99(3):247–57.
443. Jones PA, Takai D. The role of DNA methylation in mammalian epigenetics. *Science.* 2001;293(5532):1068–70.
444. Tirado-Magallanes R, Rebbani K, Lim R, Pradhan S, Benoukraf

- T. Whole genome DNA methylation: beyond genes silencing. *Oncotarget*. 2017;8(3):5629–37.
445. Saxonov S, Berg P, Brutlag DL. A genome-wide analysis of CpG dinucleotides in the human genome distinguishes two distinct classes of promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(5):1412–7.
446. Weber M, Hellmann I, Stadler MB, Ramos L, Pääbo S, Rebhan M, et al. Distribution, silencing potential and evolutionary impact of promoter DNA methylation in the human genome. *Nat Genet*. 2007;39(4):457–66.
447. Jones PA. Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nat Rev Genet*. 2012;13(7):484–92.
448. Deaton AM, Bird A. CpG islands and the regulation of transcription. *Genes Dev*. 2011;25(10):1010–22.
449. Suzuki H, Yamamoto E, Maruyama R, Niinuma T, Kai M. Biological significance of the CpG island methylator phenotype. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014;455(1–2):35–42.
450. Yang X, Han H, De Carvalho DD, Lay FD, Jones PA, Liang G. Gene body methylation can alter gene expression and is a therapeutic target in cancer. *Cancer Cell*. 2014;26(4):577–90.
451. Lai SR, Phipps SMO, Liu L, Andrews LG, Tollefsbol TO. Epigenetic control of telomerase and modes of telomere maintenance in aging and abnormal systems. *Front Biosci*. 2005;10:1779–96.
452. Ball MP, Li JB, Gao Y, Lee J-H, LeProust EM, Park I-H, et al. Targeted and genome-scale strategies reveal gene-body methylation signatures in human cells. *Nat Biotechnol*. 2009;27(4):361–8.
453. Varley KE, Gertz J, Bowling KM, Parker SL, Reddy TE, Pauli-

- Behn F, et al. Dynamic DNA methylation across diverse human cell lines and tissues. *Genome Res.* 2013;23(3):555–67.
454. Shen L, Zhu J, Robert Li S-Y, Fan X. Detect differentially methylated regions using non-homogeneous hidden Markov model for methylation array data. *Bioinformatics.* 2017;33(23):3701–8.
455. Ziller MJ, Gu H, Müller F, Donaghey J, Tsai LT-Y, Kohlbacher O, et al. Charting a dynamic DNA methylation landscape of the human genome. *Nature.* 2013;500(7463):477–81.
456. Zhang Y, Liu H, Lv J, Xiao X, Zhu J, Liu X, et al. QDMR: a quantitative method for identification of differentially methylated regions by entropy. *Nucleic Acids Res.* 2011;39(9):e58.
457. Bell JT, Tsai P-C, Yang T-P, Pidsley R, Nisbet J, Glass D, et al. Epigenome-wide scans identify differentially methylated regions for age and age-related phenotypes in a healthy ageing population. *PLoS Genet.* 2012;8(4):e1002629.
458. Fan H, Zhao H, Pang L, Liu L, Zhang G, Yu F, et al. Systematically Prioritizing Functional Differentially Methylated Regions (fDMRs) by Integrating Multi-omics Data in Colorectal Cancer. *Sci Rep.* 2015;5:12789.
459. Wilson GA, Dhimi P, Feber A, Cortázar D, Suzuki Y, Schulz R, et al. Resources for methylome analysis suitable for gene knockout studies of potential epigenome modifiers. *Gigascience.* 2012;1(1):3.
460. Mikeska T, Craig JM. DNA methylation biomarkers: cancer and beyond. *Genes (Basel).* 2014;5(3):821–64.
461. Jiang Y-H, Bressler J, Beaudet AL. Epigenetics and human disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2004;5:479–510.
462. Jin Z, Liu Y. DNA methylation in human diseases. *Genes Dis.*

- 2018;5(1):1–8.
463. Önder Ö, Sidoli S, Carroll M, Garcia BA. Progress in epigenetic histone modification analysis by mass spectrometry for clinical investigations. *Expert Rev Proteomics*. 2015;12(5):499–517.
464. Eom GH, Kook H. Posttranslational modifications of histone deacetylases: Implications for cardiovascular diseases. *Pharmacol Ther*. 2014;143(2):168–80.
465. Fan J, Krautkramer KA, Feldman JL, Denu JM. Metabolic Regulation of Histone Post-Translational Modifications. *ACS Chem Biol*. 2015;10(1):95–108.
466. Kim M-Y, Bae J-S, Kim T-H, Park J-M, Ahn YH. Role of Transcription Factor Modifications in the Pathogenesis of Insulin Resistance. *Exp Diabetes Res*. 2012;2012:1–16.
467. Steger DJ, Grant GR, Schupp M, Tomaru T, Lefterova MI, Schug J, et al. Propagation of adipogenic signals through an epigenomic transition state. *Genes Dev*. 2010;24(10):1035–44.
468. Okuno Y, Ohtake F, Igarashi K, Kanno J, Matsumoto T, Takada I, et al. Epigenetic regulation of adipogenesis by PHF2 histone demethylase. *Diabetes*. 2013;62(5):1426–34.
469. Abu-Farha M, Tiss A, Abubaker J, Khadir A, Al-Ghimlas F, Al-Khairi I, et al. Proteomics analysis of human obesity reveals the epigenetic factor HDAC4 as a potential target for obesity. *PLoS One*. 2013;8(9):e75342.
470. Nie L, Shuai L, Zhu M, Liu P, Xie Z-F, Jiang S, et al. The Landscape of Histone Modifications in a High-Fat Diet-Induced Obese (DIO) Mouse Model. *Mol Cell Proteomics*. 2017;16(7):1324–34.
471. Yang H, Yang K, Gu H, Sun C. Dynamic post-translational modifications in obesity. *J Cell Mol Med*. 2020;24(3):2384–7.

472. Chatterjee B, Thakur SS. Investigation of post-translational modifications in type 2 diabetes. *Clin Proteomics*. 2018;15:32.
473. Dunne JL, Overbergh L, Purcell AW, Mathieu C. Posttranslational modifications of proteins in type 1 diabetes: the next step in finding the cure? *Diabetes*. 2012;61(8):1907–14.
474. Meller VH, Joshi SS, Deshpande N. Modulation of Chromatin by Noncoding RNA. *Annu Rev Genet*. 2015;49:673–95.
475. Acharya S, Hartmann M, Erhardt S. Chromatin-associated noncoding RNAs in development and inheritance. *Wiley Interdiscip Rev RNA*. 2017;8(6).
476. McMahon M, Samali A, Chevet E. Regulation of the unfolded protein response by noncoding RNA. *Am J Physiol Physiol*. 2017;313(3):C243–54.
477. Taft RJ, Pang KC, Mercer TR, Dinger M, Mattick JS. Non-coding RNAs: regulators of disease. *J Pathol*. 2010;220(2):126–39.
478. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. 2004;116(2):281–97.
479. MacFarlane L-A, R. Murphy P. MicroRNA: Biogenesis, Function and Role in Cancer. *Curr Genomics*. 2010;11(7):537–61.
480. Peng Y, Yu S, Li H, Xiang H, Peng J, Jiang S. MicroRNAs: emerging roles in adipogenesis and obesity. *Cell Signal*. 2014;26(9):1888–96.
481. Zaiou M, El Amri H, Bakillah A. The clinical potential of adipogenesis and obesity-related microRNAs. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2018;28(2):91–111.
482. Krützfeldt J, Stoffel M. MicroRNAs: a new class of regulatory genes affecting metabolism. *Cell Metab*. 2006;4(1):9–12.

483. Derghal A, Djelloul M, Trouslard J, Mounien L. An Emerging Role of micro-RNA in the Effect of the Endocrine Disruptors. *Front Neurosci.* 2016;10:318.
484. Dumortier O, Hinault C, Van Obberghen E. MicroRNAs and metabolism crosstalk in energy homeostasis. *Cell Metab.* 2013;18(3):312–24.
485. Landrier J-F, Derghal A, Mounien L. MicroRNAs in Obesity and Related Metabolic Disorders. *Cells.* 2019;8(8).
486. Poy MN, Eliasson L, Krutzfeldt J, Kuwajima S, Ma X, Macdonald PE, et al. A pancreatic islet-specific microRNA regulates insulin secretion. *Nature.* 2004;432(7014):226–30.
487. Zhou Y, Gu P, Shi W, Li J, Hao Q, Cao X, et al. MicroRNA-29a induces insulin resistance by targeting PPAR $\delta$  in skeletal muscle cells. *Int J Mol Med.* 2016;37(4):931–8.
488. Fang Y, Fullwood MJ. Roles, Functions, and Mechanisms of Long Non-coding RNAs in Cancer. *Genomics Proteomics Bioinformatics.* 2016;14(1):42–54.
489. Wei S, Du M, Jiang Z, Hausman GJ, Zhang L, Dodson M V. Long noncoding RNAs in regulating adipogenesis: new RNAs shed lights on obesity. *Cell Mol Life Sci.* 2016;73(10):2079–87.
490. Gao H, Kerr A, Jiao H, Hon C-C, Rydén M, Dahlman I, et al. Long Non-Coding RNAs Associated with Metabolic Traits in Human White Adipose Tissue. *EBioMedicine.* 2018;30:248–60.
491. Xu B, Gerin I, Miao H, Vu-Phan D, Johnson CN, Xu R, et al. Multiple roles for the non-coding RNA SRA in regulation of adipogenesis and insulin sensitivity. *PLoS One.* 2010;5(12):e14199.
492. Latorre J, Fernández-Real JM. LncRNAs in Adipose Tissue from Obese and Insulin-Resistant Subjects: New Targets for Therapy?



- EBioMedicine. 2018;30:10–1.
493. Qiu L, Tang Q, Li G, Chen K. Long non-coding RNAs as biomarkers and therapeutic targets: Recent insights into hepatocellular carcinoma. *Life Sci.* 2017;191:273–82.
  494. Ling C, Rönn T. Epigenetics in Human Obesity and Type 2 Diabetes. *Cell Metab.* 2019;29(5):1028–44.
  495. Costa-Pinheiro P, Montezuma D, Henrique R, Jerónimo C. Diagnostic and prognostic epigenetic biomarkers in cancer. *Epigenomics.* 2015;7(6):1003–15.
  496. Berdasco M, Esteller M. Aberrant Epigenetic Landscape in Cancer: How Cellular Identity Goes Awry. *Dev Cell.* 2010;19(5):698–711.
  497. Smolarek I, Wyszko E, Barciszewska AM, Nowak S, Gawronska I, Jablecka A, et al. Global DNA methylation changes in blood of patients with essential hypertension. *Med Sci Monit.* 2010;16(3):CR149-155.
  498. Kim M, Long TI, Arakawa K, Wang R, Yu MC, Laird PW. DNA Methylation as a Biomarker for Cardiovascular Disease Risk. Bader JS, editor. *PLoS One.* 2010;5(3):e9692.
  499. Ballestar E. Epigenetic alterations in autoimmune rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumatol.* 2011;7(5):263–71.
  500. Campi3n J, Milagro F, Mart3n3ez JA. Epigenetics and Obesity. In: *Progress in molecular biology and translational science.* 2010. p. 291–347.
  501. Toperoff G, Aran D, Kark JD, Rosenberg M, Dubnikov T, Nissan B, et al. Genome-wide survey reveals predisposing diabetes type 2-related DNA methylation variations in human peripheral blood. *Hum Mol Genet.* 2012;21(2):371–83.

502. DelCurto H, Wu G, Satterfield MC. Nutrition and reproduction. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2013;16(4):385–91.
503. Bayoumi A, Grønbæk H, George J, Eslam M. The Epigenetic Drug Discovery Landscape for Metabolic-associated Fatty Liver Disease. *Trends Genet*. 2020;36(6):429–41.
504. Girardot M, Feil R, Llères D. Epigenetic deregulation of genomic imprinting in humans: causal mechanisms and clinical implications. *Epigenomics*. 2013;5(6):715–28.
505. Hamamoto R, Komatsu M, Takasawa K, Asada K, Kaneko S. Epigenetics Analysis and Integrated Analysis of Multiomics Data, Including Epigenetic Data, Using Artificial Intelligence in the Era of Precision Medicine. *Biomolecules*. 2019;10(1).
506. Hur SSJ, Cropley JE, Suter CM. Paternal epigenetic programming: evolving metabolic disease risk. *J Mol Endocrinol*. 2017;58(3):R159–68.
507. Cheng Z, Zheng L, Almeida FA. Epigenetic reprogramming in metabolic disorders: nutritional factors and beyond. *J Nutr Biochem*. 2018;54:1–10.
508. van Dijk SJ, Tellam RL, Morrison JL, Muhlhausler BS, Molloy PL. Recent developments on the role of epigenetics in obesity and metabolic disease. *Clin Epigenetics*. 2015;7(July):66.
509. Barres R, Zierath JR. DNA methylation in metabolic disorders. *Am J Clin Nutr*. 2011;93(4):897S-900S.
510. Coolen MW, Statham AL, Qu W, Campbell MJ, Henders AK, Montgomery GW, et al. Impact of the genome on the epigenome is manifested in DNA methylation patterns of imprinted regions in monozygotic and dizygotic twins. *PLoS One*. 2011;6(10):e25590.
511. Milagro FI, Mansego ML, De Miguel C, Martínez JA. Dietary

- factors, epigenetic modifications and obesity outcomes: Progresses and perspectives. *Mol Aspects Med.* 2013;34(4):782–812.
512. O’Connell TM, Markunas CA. DNA Methylation and MicroRNA-Based Biomarkers for Risk of Type 2 Diabetes. *Curr Diabetes Rev.* 2016;12(1):20–9.
513. Ladd-Acosta C. Epigenetic Signatures as Biomarkers of Exposure. *Curr Environ Heal reports.* 2015;2(2):117–25.
514. Castellano-Castillo D, Ramos-Molina B, Cardona F, Queipo-Ortuño MI. Epigenetic regulation of white adipose tissue in the onset of obesity and metabolic diseases. *Obes Rev.* 2020;21(11):e13054.
515. de Toro-Martín J, Guénard F, Tchernof A, Hould F-S, Lebel S, Julien F, et al. Body mass index is associated with epigenetic age acceleration in the visceral adipose tissue of subjects with severe obesity. *Clin Epigenetics.* 2019;11(1):172.
516. Wu R, Wang X. Epigenetic regulation of adipose tissue expansion and adipogenesis by N<sup>6</sup>-methyladenosine. *Obes Rev.* 2021;22(2):e13124.
517. Arpón A, Milagro FI, Ramos-Lopez O, Mansego ML, Riezu-Boj J-I, Martínez JA, et al. Methylome-Wide Association Study in Peripheral White Blood Cells Focusing on Central Obesity and Inflammation. *Genes (Basel).* 2019;10(6).
518. Nishitani S, Parets SE, Haas BW, Smith AK. DNA methylation analysis from saliva samples for epidemiological studies. *Epigenetics.* 2018;13(4):352–62.
519. Silva DSBS, Antunes J, Balamurugan K, Duncan G, Alho CS, McCord B. Developmental validation studies of epigenetic DNA methylation markers for the detection of blood, semen and saliva samples. *Forensic Sci Int Genet.* 2016;23:55–63.

520. Crujeiras AB, Diaz-Lagares A, Moreno-Navarrete JM, Sandoval J, Hervas D, Gomez A, et al. Genome-wide DNA methylation pattern in visceral adipose tissue differentiates insulin-resistant from insulin-sensitive obese subjects. *Transl Res.* 2016;178:13-24.e5.
521. Ramos-Lopez O, Samblas M, Milagro FI, Riezu-Boj JI, Crujeiras AB, Martinez JA, et al. Circadian gene methylation profiles are associated with obesity, metabolic disturbances and carbohydrate intake. *Chronobiol Int.* 2018;35(7):969–81.
522. Arner P, Sahlqvist AS, Sinha I, Xu H, Yao X, Waterworth D, et al. The epigenetic signature of systemic insulin resistance in obese women. *Diabetologia.* 2016;59(11):2393–405.
523. Barajas-Olmos F, Centeno-Cruz F, Zerrweck C, Imaz-Rosshandler I, Martínez-Hernández A, Cordova EJ, et al. Altered DNA methylation in liver and adipose tissues derived from individuals with obesity and type 2 diabetes. *BMC Med Genet.* 2018;19(1):28.
524. Hyun J, Jung Y. DNA Methylation in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Int J Mol Sci.* 2020;21(21).
525. Hotta K, Kitamoto T, Kitamoto A, Ogawa Y, Honda Y, Kessoku T, et al. Identification of the genomic region under epigenetic regulation during non-alcoholic fatty liver disease progression. *Hepatol Res.* 2018;48(3):E320–34.
526. Crujeiras AB, Diaz-Lagares A, Stefansson OA, Macias-Gonzalez M, Sandoval J, Cueva J, et al. Obesity and menopause modify the epigenomic profile of breast cancer. *Endocr Relat Cancer.* 2017;24(7):351–63.
527. Dong L, Ma L, Ma GH, Ren H. Genome-wide Analysis Reveals DNA Methylation Alterations in Obesity Associated with High Risk of Colorectal Cancer. *Sci Rep.* 2019;9(1):5100.

528. Nicoletti CF, Pinhel MAS, Diaz-Lagares A, Casanueva FF, Jácome A, Pinhanelli VC, et al. DNA methylation screening after roux-en Y gastric bypass reveals the epigenetic signature stems from genes related to the surgery per se. *BMC Med Genomics*. 2019;12(1):72.
529. Nicoletti CF, Nonino CB, de Oliveira BAP, Pinhel MA de S, Mansego ML, Milagro FI, et al. DNA Methylation and Hydroxymethylation Levels in Relation to Two Weight Loss Strategies: Energy-Restricted Diet or Bariatric Surgery. *Obes Surg*. 2016;26(3):603–11.
530. Fraszczyk E, Luijten M, Spijkerman AMW, Snieder H, Wackers PFK, Bloks VW, et al. The effects of bariatric surgery on clinical profile, DNA methylation, and ageing in severely obese patients. *Clin Epigenetics*. 2020;12(1):14.
531. Crujeiras AB, Izquierdo AG, Primo D, Milagro FI, Sajoux I, Jácome A, et al. Epigenetic landscape in blood leukocytes following ketosis and weight loss induced by a very low calorie ketogenic diet (VLCKD) in patients with obesity. *Clin Nutr*. 2021;40(6):3959–72.
532. Cuevas-Sierra A, Ramos-Lopez O, Riezu-Boj JI, Milagro FI, Martinez JA. Diet, Gut Microbiota, and Obesity: Links with Host Genetics and Epigenetics and Potential Applications. *Adv Nutr*. 2019;10(suppl\_1):S17–30.
533. Nicoletti CF, Cortes-Oliveira C, Noronha NY, Pinhel MAS, Dantas WS, Jácome A, et al. DNA methylation pattern changes following a short-term hypocaloric diet in women with obesity. *Eur J Clin Nutr*. 2020;74(9):1345–53.
534. Campisano S, La Colla A, Echarte SM, Chisari AN. Interplay between early-life malnutrition, epigenetic modulation of the immune function and liver diseases. *Nutr Res Rev*. 2019;32(1):128–45.

535. Ramos-Lopez O, Milagro FI, Allayee H, Chmurzynska A, Choi MS, Curi R, et al. Guide for current nutrigenetic, nutrigenomic, and nutriepigenetic approaches for precision nutrition involving the prevention and management of chronic diseases associated with obesity. *J Nutrigenet Nutrigenomics*. 2017;10(1–2):43–62.
536. Lorenzo PM, Izquierdo AG, Diaz-Lagares A, Carreira MC, Macias-Gonzalez M, Sandoval J, et al. ZNF577 Methylation Levels in Leukocytes From Women With Breast Cancer Is Modulated by Adiposity, Menopausal State, and the Mediterranean Diet. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2020;11:245.
537. Kasiske BL, O'Donnell MP, Keane WF. The Zucker rat model of obesity, insulin resistance, hyperlipidemia, and renal injury. *Hypertens (Dallas, Tex 1979)*. 1992;19(1 Suppl):I110-5.
538. Gripon P, Rumin S, Urban S, Le Seyec J, Glaise D, Canie I, et al. Infection of a human hepatoma cell line by hepatitis B virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(24):15655–60.
539. Cerec V, Glaise D, Garnier D, Morosan S, Turlin B, Drenou B, et al. Transdifferentiation of hepatocyte-like cells from the human hepatoma HepaRG cell line through bipotent progenitor. *Hepatology*. 2007;45(4):957–67.
540. Marion M-J, Hantz O, Durantel D. The HepaRG cell line: biological properties and relevance as a tool for cell biology, drug metabolism, and virology studies. *Methods Mol Biol*. 2010;640:261–72.
541. Chriett S, Dąbek A, Wojtala M, Vidal H, Balcerzyk A, Pirola L. Prominent action of butyrate over  $\beta$ -hydroxybutyrate as histone deacetylase inhibitor, transcriptional modulator and anti-inflammatory molecule. *Sci Rep*. 2019;9(1):742.
542. Puchalska P, Crawford PA. Multi-dimensional Roles of Ketone Bodies in Fuel Metabolism, Signaling, and Therapeutics. *Cell*

- Metab. 2017;25(2):262–84.
543. Mollica MP, Mattace Raso G, Cavaliere G, Trinchese G, De Filippo C, Aceto S, et al. Butyrate Regulates Liver Mitochondrial Function, Efficiency, and Dynamics in Insulin-Resistant Obese Mice. *Diabetes*. 2017;66(5):1405–18.
  544. Maldonado R, Talana CA, Song C, Dixon A, Uehara K, Weichhaus M.  $\beta$ -hydroxybutyrate does not alter the effects of glucose deprivation on breast cancer cells. *Oncol Lett*. 2021;21(1):65.
  545. Wang Q, Zhou Y, Rychahou P, Fan TW-M, Lane AN, Weiss HL, et al. Ketogenesis contributes to intestinal cell differentiation. *Cell Death Differ*. 2017;24(3):458–68.
  546. Benito A, Hajji N, O'Neill K, Keun HC, Syed N.  $\beta$ -Hydroxybutyrate Oxidation Promotes the Accumulation of Immunometabolites in Activated Microglia Cells. *Metabolites*. 2020;10(9).
  547. Deutsch MJ, Schriever SC, Roscher AA, Ensenaer R. Digital image analysis approach for lipid droplet size quantitation of Oil Red O-stained cultured cells. *Anal Biochem*. 2014;445:87–9.
  548. Wang Y, Goulart RA, Pantanowitz L. Oil red O staining in cytopathology. *Diagn Cytopathol*. 2011;39(4):272–3.
  549. Esterbauer H, Cheeseman KH. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol*. 1990;186:407–21.
  550. Benzie IF, Strain JJ. Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods Enzymol*. 1999;299:15–27.

551. Shigenaga MK, Ames BN. Assays for 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine: a biomarker of in vivo oxidative DNA damage. *Free Radic Biol Med.* 1991;10(3-4):211-6.
552. Feghali CA, Wright TM. Cytokines in acute and chronic inflammation. *Front Biosci.* 1997;2:d12-26.
553. Moran S, Arribas C, Esteller M. Validation of a DNA methylation microarray for 850,000 CpG sites of the human genome enriched in enhancer sequences. *Epigenomics.* 2016;8(3):389-99.
554. Sandoval J, Heyn H, Moran S, Serra-Musach J, Pujana MA, Bibikova M, et al. Validation of a DNA methylation microarray for 450,000 CpG sites in the human genome. *Epigenetics.* 2011;6(6):692-702.
555. Kanfi Y, Peshti V, Gil R, Naiman S, Nahum L, Levin E, et al. SIRT6 protects against pathological damage caused by diet-induced obesity. *Aging Cell.* 2010;9(2):162-73.
556. Kuang J, Zhang Y, Liu Q, Shen J, Pu S, Cheng S, et al. Fat-Specific Sirt6 Ablation Sensitizes Mice to High-Fat Diet-Induced Obesity and Insulin Resistance by Inhibiting Lipolysis. *Diabetes.* 2017;66(5):1159-71.
557. Fiorentino F, Carafa V, Favale G, Altucci L, Mai A, Rotili D. The Two-Faced Role of SIRT6 in Cancer. *Cancers (Basel).* 2021;13(5).
558. Reynés B, Priego T, Cifre M, Oliver P, Palou A. Peripheral Blood Cells, a Transcriptomic Tool in Nutrigenomic and Obesity Studies: Current State of the Art. *Compr Rev food Sci food Saf.* 2018;17(4):1006-20.
559. de Mello VDF, Kolehmanien M, Schwab U, Pulkkinen L, Uusitupa M. Gene expression of peripheral blood mononuclear cells as a tool in dietary intervention studies: What do we know so far? *Mol Nutr Food Res.* 2012;56(7):1160-72.



560. Moravcová A, Červinková Z, Kučera O, Mezera V, Rychtrmoc D, Lotková H. The effect of oleic and palmitic acid on induction of steatosis and cytotoxicity on rat hepatocytes in primary culture. *Physiol Res.* 2015;64(Suppl 5):S627-36.
561. Mei S, Ni H-M, Manley S, Bockus A, Kassel KM, Luyendyk JP, et al. Differential roles of unsaturated and saturated fatty acids on autophagy and apoptosis in hepatocytes. *J Pharmacol Exp Ther.* 2011;339(2):487–98.
562. Ricchi M, Odoardi MR, Carulli L, Anzivino C, Ballestri S, Pinetti A, et al. Differential effect of oleic and palmitic acid on lipid accumulation and apoptosis in cultured hepatocytes. *J Gastroenterol Hepatol.* 2009;24(5):830–40.
563. Sajoux I, Lorenzo PM, Gomez-Arbelaez D, Zulet MA, Abete I, Castro AI, et al. Effect of a Very-Low-Calorie Ketogenic Diet on Circulating Myokine Levels Compared with the Effect of Bariatric Surgery or a Low-Calorie Diet in Patients with Obesity. *Nutrients.* 2019;11(10):2368.
564. Crujeiras AB, Izquierdo AG, Primo D, Milagro FI, Sajoux I, Jácome A, et al. Epigenetic landscape in blood leukocytes following ketosis and weight loss induced by a very low calorie ketogenic diet (VLCKD) in patients with obesity. *Clin Nutr.* 2021;40(6):3959–72.
565. Shimoyama M, Laulederkind SJF, De Pons J, Nigam R, Smith JR, Tutaj M, et al. Exploring human disease using the Rat Genome Database. *Dis Model Mech.* 2016;9(10):1089–95.
566. Carreres L, Jílková ZM, Vial G, Marche PN, Decaens T, Lerat H. Modeling Diet-Induced NAFLD and NASH in Rats: A Comprehensive Review. *Biomedicines.* 2021;9(4).
567. Sanches SCL, Ramalho LNZ, Augusto MJ, da Silva DM, Ramalho FS. Nonalcoholic Steatohepatitis: A Search for Factual

- Animal Models. *Biomed Res Int.* 2015;2015:574832.
568. Kucera O, Cervinkova Z. Experimental models of non-alcoholic fatty liver disease in rats. *World J Gastroenterol.* 2014;20(26):8364–76.
569. Brown GT, Kleiner DE. Histopathology of nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis. *Metabolism.* 2016;65(8):1080–6.
570. Renehan AG, Zwahlen M, Egger M. Adiposity and cancer risk: new mechanistic insights from epidemiology. *Nat Rev Cancer.* 2015;15(8):484–98.
571. Parra-Soto S, Cowley ES, Rezende LFM, Ferreccio C, Mathers JC, Pell JP, et al. Associations of six adiposity-related markers with incidence and mortality from 24 cancers-findings from the UK Biobank prospective cohort study. *BMC Med.* 2021;19(1):7.
572. Park EJ, Lee JH, Yu G-Y, He G, Ali SR, Holzer RG, et al. Dietary and genetic obesity promote liver inflammation and tumorigenesis by enhancing IL-6 and TNF expression. *Cell.* 2010;140(2):197–208.
573. Tien Kuo M, Savaraj N. Roles of reactive oxygen species in hepatocarcinogenesis and drug resistance gene expression in liver cancers. *Mol Carcinog.* 2006;45(9):701–9.
574. Sánchez-Pérez Y, Carrasco-Legleu C, García-Cuellar C, Pérez-Carreón J, Hernández-García S, Salcido-Neyoy M, et al. Oxidative stress in carcinogenesis. Correlation between lipid peroxidation and induction of preneoplastic lesions in rat hepatocarcinogenesis. *Cancer Lett.* 2005;217(1):25–32.
575. Yuan X, Wang B, Yang L, Zhang Y. The role of ROS-induced autophagy in hepatocellular carcinoma. *Clin Res Hepatol Gastroenterol.* 2018;42(4):306–12.

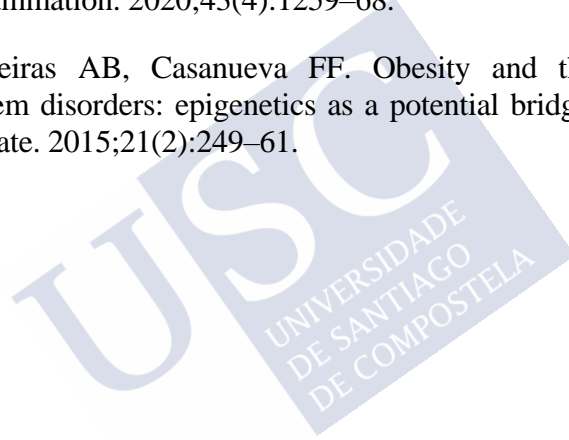
576. Ma-On C, Sanpavat A, Whongsiri P, Suwannasin S, Hirankarn N, Tangkijvanich P, et al. Oxidative stress indicated by elevated expression of Nrf2 and 8-OHdG promotes hepatocellular carcinoma progression. *Med Oncol.* 2017;34(4):57.
577. Krstic J, Galhuber M, Schulz TJ, Schupp M, Prokesch A. p53 as a Dichotomous Regulator of Liver Disease: The Dose Makes the Medicine. *Int J Mol Sci.* 2018;19(3).
578. Gawęł S, Wardas M, Niedworok E, Wardas P. [Malondialdehyde (MDA) as a lipid peroxidation marker]. *Wiad Lek.* 2004;57(9–10):453–5.
579. Pellegrini N, Vitaglione P, Granato D, Fogliano V. Twenty-five years of total antioxidant capacity measurement of foods and biological fluids: merits and limitations. *J Sci Food Agric.* 2020;100(14):5064–78.
580. Gutteridge JMC, Halliwell B. Mini-Review: Oxidative stress, redox stress or redox success? *Biochem Biophys Res Commun.* 2018;502(2):183–6.
581. Valavanidis A, Vlachogianni T, Fiotakis C. 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG): A critical biomarker of oxidative stress and carcinogenesis. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev.* 2009;27(2):120–39.
582. Martínez R, Kapravelou G, Donaire A, Lopez-Chaves C, Arrebola F, Galisteo M, et al. Effects of a combined intervention with a lentil protein hydrolysate and a mixed training protocol on the lipid metabolism and hepatic markers of NAFLD in Zucker rats. *Food Funct.* 2018;9(2):830–50.
583. Kapravelou G, Martínez R, Nebot E, López-Jurado M, Aranda P, Arrebola F, et al. The Combined Intervention with Germinated *Vigna radiata* and Aerobic Interval Training Protocol Is an Effective Strategy for the Treatment of Non-Alcoholic Fatty Liver

- Disease (NAFLD) and Other Alterations Related to the Metabolic Syndrome in Zucker Rats. *Nutrients*. 2017;9(7).
584. Moctezuma-Velázquez C. Current treatment for non-alcoholic fatty liver disease. *Rev Gastroenterol Mex*. 83(2):125–33.
585. Barrera F, George J. The role of diet and nutritional intervention for the management of patients with NAFLD. *Clin Liver Dis*. 2014;18(1):91–112.
586. Zelber-Sagi S, Ratziu V, Oren R. Nutrition and physical activity in NAFLD: an overview of the epidemiological evidence. *World J Gastroenterol*. 2011;17(29):3377–89.
587. Vilar-Gomez E, Martinez-Perez Y, Calzadilla-Bertot L, Torres-Gonzalez A, Gra-Oramas B, Gonzalez-Fabian L, et al. Weight Loss Through Lifestyle Modification Significantly Reduces Features of Nonalcoholic Steatohepatitis. *Gastroenterology*. 2015;149(2):367-78.e5; quiz e14-5.
588. Wang X, Wong K, Ouyang W, Rutz S. Targeting IL-10 Family Cytokines for the Treatment of Human Diseases. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2019;11(2).
589. Altieri DC. Survivin, cancer networks and pathway-directed drug discovery. *Nat Rev Cancer*. 2008;8(1):61–70.
590. Pennati M, Folini M, Zaffaroni N. Targeting survivin in cancer therapy. *Expert Opin Ther Targets*. 2008;12(4):463–76.
591. Shojaei F, Yazdani-Nafchi F, Banitalebi-Dehkordi M, Chehelgerdi M, Khorramian-Ghahfarokhi M. Trace of survivin in cancer. *Eur J Cancer Prev*. 2019;28(4):365–72.
592. Jaiswal PK, Goel A, Mittal RD. Survivin: A molecular biomarker in cancer. *Indian J Med Res*. 2015;141(4):389–97.
593. Purushotham A, Schug TT, Xu Q, Surapureddi S, Guo X, Li X.

- Hepatocyte-specific deletion of SIRT1 alters fatty acid metabolism and results in hepatic steatosis and inflammation. *Cell Metab.* 2009;9(4):327–38.
594. Yan T, Huang J, Nisar MF, Wan C, Huang W. The Beneficial Roles of SIRT1 in Drug-Induced Liver Injury. *Oxid Med Cell Longev.* 2019;2019:8506195.
595. Li Y, Xu S, Giles A, Nakamura K, Lee JW, Hou X, et al. Hepatic overexpression of SIRT1 in mice attenuates endoplasmic reticulum stress and insulin resistance in the liver. *FASEB J.* 2011;25(5):1664–79.
596. Liu Y, Beyer A, Aebersold R. On the Dependency of Cellular Protein Levels on mRNA Abundance. *Cell.* 2016;165(3):535–50.
597. Dong Z, Lei Q, Liu L, Cui H. [Function of SIRT6 in tumor initiation and progression]. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao.* 2016;32(7):870–9.
598. Kim HG, Huang M, Xin Y, Zhang Y, Zhang X, Wang G, et al. The epigenetic regulator SIRT6 protects the liver from alcohol-induced tissue injury by reducing oxidative stress in mice. *J Hepatol.* 2019;71(5):960–9.
599. Crujeiras AB, Parra D, Goyenechea E, Martínez JA. Sirtuin gene expression in human mononuclear cells is modulated by caloric restriction. *Eur J Clin Invest.* 2008;38(9):672–8.
600. Crujeiras AB, Parra D, Goyenechea E, Abete I, Martínez JA. Tachyphylaxis effects on postprandial oxidative stress and mitochondrial-related gene expression in overweight subjects after a period of energy restriction. *Eur J Nutr.* 2009;48(6):341–7.
601. Kanfi Y, Shalman R, Peshti V, Pilosof SN, Gozlan YM, Pearson KJ, et al. Regulation of SIRT6 protein levels by nutrient availability. *FEBS Lett.* 2008;582(5):543–8.

602. Véquaud E, Desplanques G, Jézéquel P, Juin P, Barillé-Nion S. Survivin contributes to DNA repair by homologous recombination in breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat.* 2016;155(1):53–63.
603. Spoto B, Di Betta E, Mattace-Raso F, Sijbrands E, Vilardi A, Parlongo RM, et al. Pro- and anti-inflammatory cytokine gene expression in subcutaneous and visceral fat in severe obesity. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2014;24(10):1137–43.
604. Ohman MK, Eitzman DT. Targeting MCP-1 to reduce vascular complications of obesity. *Recent Pat Cardiovasc Drug Discov.* 2009;4(3):164–76.
605. Amano SU, Cohen JL, Vangala P, Tencerova M, Nicoloso SM, Yawe JC, et al. Local proliferation of macrophages contributes to obesity-associated adipose tissue inflammation. *Cell Metab.* 2014;19(1):162–71.
606. Corrêa TAF, Quintanilha BJ, Norde MM, Pinhel MA de S, Nonino CB, Rogero MM. Nutritional genomics, inflammation and obesity. *Arch Endocrinol Metab.* 64(3):205–22.
607. Huang Y-T, Chu S, Loucks EB, Lin C-L, Eaton CB, Buka SL, et al. Epigenome-wide profiling of DNA methylation in paired samples of adipose tissue and blood. *Epigenetics.* 2016;11(3):227–36.
608. Cuykx M, Claes L, Rodrigues RM, Vanhaecke T, Covaci A. Metabolomics profiling of steatosis progression in HepaRG® cells using sodium valproate. *Toxicol Lett.* 2018;286:22–30.
609. Gentile CL, Pagliassotti MJ. The role of fatty acids in the development and progression of nonalcoholic fatty liver disease. *J Nutr Biochem.* 2008;19(9):567–76.
610. Zhou D, Pan Q, Xin F-Z, Zhang R-N, He C-X, Chen G-Y, et al. Sodium butyrate attenuates high-fat diet-induced steatohepatitis in

- mice by improving gut microbiota and gastrointestinal barrier. *World J Gastroenterol.* 2017;23(1):60–75.
611. Zhao T, Gu J, Zhang H, Wang Z, Zhang W, Zhao Y, et al. Sodium Butyrate-Modulated Mitochondrial Function in High-Insulin Induced HepG2 Cell Dysfunction. *Oxid Med Cell Longev.* 2020;2020:1904609.
612. de Lazari MGT, Pereira LX, Orellano LAA, Scheuermann K, Machado CT, Vasconcelos AC, et al. Sodium Butyrate Downregulates Implant-Induced Inflammation in Mice. *Inflammation.* 2020;43(4):1259–68.
613. Crujeiras AB, Casanueva FF. Obesity and the reproductive system disorders: epigenetics as a potential bridge. *Hum Reprod Update.* 2015;21(2):249–61.









# **ANEXOS**





**XUNTA DE GALICIA**  
 DELEGACIÓN TERRITORIAL  
 DA CORUÑA  
 Xefatura Territorial da Consellería do  
 Medio Rural e do Mar

Edificio Administrativo Monelos  
 Vicente Ferrer, 2  
 15071 A Coruña



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

Data: 28/12/2015 09:59:38

SAÍDA 174511 / RX 1755490



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

#### NOTIFICACIÓN DE RESOLUCIÓN DE AUTORIZACIÓN DE PROXECTOS DE EXPERIMENTACIÓN ANIMAL

**Expediente núm.:** 15005/2015/003

**Data de inicio:** xaneiro de 2016

**Interesado:** Felipe Casanueva Breijo

**Forma de inicio:** solicitude do interesado

**Procedemento:** resolución de autorización

Notifícolle que con data 23 de decembro de 2015, o xefe territorial da Consellería do Medio Rural emitiu unha resolución de autorización do proxecto de experimentación animal, cuxo texto íntegro é o seguinte:

#### ANTECEDENTES

O interesado, como representante do centro da Facultade de Medicina da Universidade de Santiago de Compostela presentou, con data 14.7.2015 e rexistro de entrada 83463 RX 1343433, unha solicitude para a realización do proxecto de experimentación animal, cuxos datos se detallan a continuación:

**Denominación do proxecto:** Modelos experimentais para o estudo da obesidade

**Nome do centro usuario:** Animalario da Facultade de Medicina

**Persoa responsable do proxecto:** Felipe Casanueva Freijo

**Establecemento onde se realizarán os procedementos do proxecto (ou lugar xeográfico no caso de traballos de campo):** Departamento de Fisioloxía da Facultade de Medicina da Universidade de Santiago de Compostela

**Clasificación do proxecto:** Tipo I  Tipo II  Tipo III

#### CONSIDERACIÓNS LEGAIS E TÉCNICAS

1. O Real decreto 53/2013, de 1 de febreiro (BOE núm. 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 89 da Lei 30/1992, de 26 de novembro, do réxime xurídico das administracións públicas e do procedemento administrativo común (BOE núm. 285, 27 de novembro de 1992), modificada pola Lei 4/1999, de 14 de xaneiro, establece que a resolución que poña fin o procedemento decidirá todas as cuestións expostas polos interesados e aquelas outras derivadas deste.





**MÓDULOS FUNDAMENTAIS OU TRONCAIS E ESPECÍFICOS CORRESPONDENTES Á  
CATEGORÍA "B" EUTANASIA DOS ANIMAIS – ORDE ECC/566/2015, DE 20 DE MARZO**

**MÓDULOS FUNDAMENTAIS OU TRONCAIS**

- 1.- *Legislación nacional (1 hora).*
- 2.- *Ética, benestar animal e as "tres erres", nivel 1 (2 horas).*
- 3.- *Bioloxía básica e adecuada, nivel 1 (3 horas).*
- 4.- *Coidado, saúde e manexo dos animais, nivel 1 (5 horas).*
- 5.- *Recoñecemento do dolor, o sufrimento e a angustia (3 horas).*
- 6.- *Métodos incruentos de sacrificio, nivel 1 (2 horas)*

**MÓDULOS ESPECÍFICOS DA CATEGORÍA "B"**

- 1.- *Bioloxía básica e adecuada, nivel 2 (3 horas)*
- 2.- *Métodos incruentos de sacrificio, nivel 2 (3 horas)*

.....

**MÓDULOS FUNDAMENTALES O TRONCALES**

- 1.- *Legislación nacional (1 hora).*
- 2.- *Ética, bienestar animal y las "tres erres", nivel 1 (2 horas).*
- 3.- *Biología básica y adecuada, nivel 1 (3 horas).*
- 4.- *Cuidado, salud y manejo de los animales, nivel 1 (5 horas).*
- 5.- *Reconocimiento del dolor, el sufrimiento y la angustia (3 horas).*
- 6.- *Métodos incruentos de sacrificio, nivel 1 (2 horas)*

**MÓDULOS ESPECÍFICOS DE LA CATEGORÍA "B"**

- 1.- *Biología básica y adecuada, nivel 2 (3 horas)*
- 2.- *Métodos incruentos de sacrificio, nivel 2 (3 horas)*





**Certificado de capacitación en materia de protección de animais utilizados, criados ou subministrados con fins de experimentación e outros fins científicos, incluíndo a docencia conforme coa Orde ECC/566/2015 de 20 de marzo.**

*Certificado de capacitación en materia de protección de animales utilizados, criados o suministrados con fines de experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia conforme con la Orden ECC/566/2015 de 20 de marzo.*

<b>1. IDENTIFICACIÓN</b>		
1.1. Apelidos / Apellidos / Surname: <b>GONZÁLEZ IZQUIERDO</b>		
1.2. Nome / Nombre / First names: <b>ANDREA</b>		DNI / DNI / Identity card number: <b>44463491Y</b>
1.3. Categoría / Categoría / Category: <b>"b"</b>	1.4. Especies / Especies / Species: <b>ROEDORES</b>	1.5. Válido ata / válido hasta / expires: <b>5/11/2028</b>
<b>2. Nº DO CERTIFICADO / Nº DEL CERTIFICADO / CERTIFICATE NUMBER</b>		
<b>B522</b>		
<b>3. ORGANISMO QUE EXPIDE O CERTIFICADO / ORGANISMO QUE EXPIDE EL CERTIFICADO / BODY ISSUING THE CERTIFICATE:</b>		
3.1. Nome e enderezo do organismo que expide o certificado / Nombre y dirección del organismo que expide el certificado / Name and address of the body issuing the certificate: <b>CONSELLERÍA DO MEDIO RURAL – XUNTA DE GALICIA</b> <b>AXENCIA GALEGA DA CALIDADE ALIMENTARIA</b> Avda. Do Camiño Francés, 10 baixo 15781 Santiago de Compostela A Coruña (España)		
3.2. Teléfono / Teléfono / Telephone: 981 546 654	3.3. Fax / Fax / Fax: 981 546 651	3.4. Correo electrónico / Correo electrónico / Email: formacion.cmrmm@xunta.es
3.5. Data / Fecha / Date: 23/02/2021	3.6. Lugar / Lugar / Place: <b>Santiago de Compostela</b>	
3.7. Nome e sinatura / Nombre y firma / Name and signature 3.8. Selo / Sello / Stamp  <b>Asdo.: Xiana María Perales Arroyo</b> <b>Xefe do Departamento de Formación</b> <b>(asinado dixitalmente)</b>		

Adscrito por: PERALES ARROYO, XIANA MARIA  
 Cargo: Xefatura Servicio  
 Data e hora: 23/02/2021 09:27:56

CVE: EG5C06hMY1  
 Verificación: https://sede.xunta.gal/cve



## **MÓDULOS FUNDAMENTAIS OU TRONCAIS E ESPECÍFICOS CORRESPONDENTES Á CATEGORÍA "C" REALIZACIÓN DOS PROCEDIMENTOS – ORDE ECC/566/2015, DE 20 DE MARZO**

### **MÓDULOS FUNDAMENTAIS OU TRONCAIS**

- 1.- *Legislación nacional (1 hora).*
- 2.- *Ética, benestar animal e as "tres erres", nivel 1 (2 horas).*
- 3.- *Bioloxía básica e adecuada, nivel 1 (3 horas).*
- 4.- *Coidado, saúde e manexo dos animais, nivel 1 (5 horas).*
- 5.- *Recoñecemento do dolor, o sufrimento e a angustia (3 horas).*
- 6.- *Métodos incruentos de sacrificio, nivel 1 (2 horas)*

### **MÓDULOS ESPECÍFICOS DA CATEGORÍA "C"**

- 1.- *Biología básica e adecuada, nivel 2 (3 horas)*
- 2.- *Procedementos minimamente invasores sen anestesia, nivel 1 (5 horas)*
- 3.- *Procedementos minimamente invasores sen anestesia, nivel 2 (10 horas)*
- 4.- *Anestesia para procedementos menores (5 horas)*
- 5.- *Anestesia avanzada para intervencións cirúrxicas ou procedementos prolongados (8 horas)*
- 6.- *Principios de cirurxía (5 horas)*

### **MÓDULOS FUNDAMENTALES O TRONCALES**

- 1.- *Legislación nacional (1 hora).*
- 2.- *Ética, bienestar animal y las "tres erres", nivel 1 (2 horas).*
- 3.- *Biología básica y adecuada, nivel 1 (3 horas).*
- 4.- *Cuidado, salud y manejo de los animales, nivel 1 (5 horas).*
- 5.- *Reconocimiento del dolor, el sufrimento y la angustia (3 horas).*
- 6.- *Métodos incruentos de sacrificio, nivel 1 (2 horas)*

### **MÓDULOS ESPECÍFICOS DE LA CATEGORÍA "C"**

- 1.- *Biología básica y adecuada, nivel 2 (3 horas)*
- 2.- *Procedimientos mínimamente invasivos sin anestesia, nivel 1 (5 horas)*
- 3.- *Procedimientos mínimamente invasivos sin anestesia, nivel 2 (10 horas)*
- 4.- *Anestesia para procedimientos menores (5 horas)*
- 5.- *Anestesia avanzada para intervenciones quirúrgicas o procedimientos prolongados (8 horas)*
- 6.- *Principios de cirugía (5 horas)*



**Certificado de capacitación en materia de protección de animais utilizados, criados ou subministrados con fins de experimentación e outros fins científicos, incluíndo a docencia conforme coa Orde ECC/566/2015 de 20 de marzo.**

*Certificado de capacitación en materia de protección de animales utilizados, criados o suministrados con fines de experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia conforme con la Orden ECC/566/2015 de 20 de marzo.*

1. IDENTIFICACIÓN		
1.1. Apellidos / Apelliós / Surname: <b>GONZÁLEZ IZQUIERDO</b>		
1.2. Nome / Nombre / First names: <b>ANDREA</b>		DNI / DNI / Identity card number: <b>44463491Y</b>
1.3. Categoría / Categoría / Category: <b>"C"</b>	1.4. Especies / Especies / Species: <b>ROEDORES</b>	1.5. Válido ata / válido hasta / expires: <b>21/12/2028</b>
2. Nº DO CERTIFICADO / Nº DEL CERTIFICADO / CERTIFICATE NUMBER		
<b>C560</b>		
3. ORGANISMO QUE EXPIDE O CERTIFICADO / ORGANISMO QUE EXPIDE EL CERTIFICADO / BODY ISSUING THE CERTIFICATE:		
3.1. Nome e enderezo do organismo que expide o certificado / Nombre y dirección del organismo que expide el certificado / Name and address of the body issuing the certificate:  <b>CONSELLERÍA DO MEDIO RURAL – XUNTA DE GALICIA AXENCIA GALEGA DA CALIDADE ALIMENTARIA Avda. Do Camiño Francés, 10 baixo 15781 Santiago de Compostela A Coruña (España)</b>		
3.2. Teléfono / Teléfono / Telephone: <b>981 546 654</b>	3.3. Fax / Fax / Fax: <b>981 546 651</b>	3.4. Correo electrónico / Correo electrónico / Email: <b>formacion.cmrmm@xunta.es</b>
3.5. Data / Fecha / Date: <b>16/02/2021</b>	3.6. Lugar / Lugar / Place: <b>Santiago de Compostela</b>	
3.7. Nome e sinatura / Nombre y firma / Name and signature  <b>Asdo.: Xiana María Perales Arroyo Xefe do Departamento de Formación (asinado dixitalmente)</b>		





**MÓDULOS FUNDAMENTAIS OU TRONCAIS E ESPECÍFICOS CORRESPONDENTES Á  
CATEGORÍA "D" DESEÑO DOS PROXECTOS E PROCEDEMENTOS – ORDE ECC/566/2015, DE  
20 DE MARZO****MÓDULOS FUNDAMENTAIS OU TRONCAIS**

- 1.- *Lexislación nacional (1 hora).*
- 2.- *Ética, benestar animal e as "tres erres", nivel 1 (2 horas).*
- 3.- *Bioloxía básica e adecuada, nivel 1 (3 horas).*
- 4.- *Coidado, saúde e manexo dos animais, nivel 1 (5 horas).*
- 5.- *Recoñecemento do dolor, o sufrimento e a angustia (3 horas).*
- 6.- *Métodos incruentos de sacrificio, nivel 1 (2 horas)*

**MÓDULOS ESPECÍFICOS DA CATEGORÍA "D"**

- 1.- *Ética, benestar animal e as "tres erres", nivel 2 (10 horas)*
- 2.- *Fundamentos de bioloxía e fisioloxía animal (20 horas)*
- 3.- *Procedementos minimamente invasores sen anestesia, nivel 1 (5 horas)*
- 4.- *Deseño de proxectos e procedementos, nivel 1 (5 horas)*
- 5.- *Deseño de proxectos e procedementos, nivel 2 (10 horas)*

**MÓDULOS FUNDAMENTALES O TRONCALES**

- 1.- *Legislación nacional (1 hora).*
- 2.- *Ética, bienestar animal y las "tres erres", nivel 1 (2 horas).*
- 3.- *Biología básica y adecuada, nivel 1 (3 horas).*
- 4.- *Cuidado, salud y manejo de los animales, nivel 1 (5 horas).*
- 5.- *Reconocimiento del dolor, el sufrimiento y la angustia (3 horas).*
- 6.- *Métodos incruentos de sacrificio, nivel 1 (2 horas)*

**MÓDULOS ESPECÍFICOS DE LA CATEGORÍA "D"**

- 1.- *Ética, bienestar animal y las "tres erres", nivel 2 (10 horas)*
- 2.- *Fundamentos de biología y fisiología animal (20 horas)*
- 3.- *Procedimientos minimamente invasores sin anestesia, nivel 1 (5 horas)*
- 4.- *Diseño de proyectos y procedimientos, nivel 1 (5 horas)*
- 5.- *Diseño de proyectos y procedimientos, nivel 2 (10 horas)*



**Certificado de capacitación en materia de protección de animais utilizados, criados ou suministrados con fins de experimentación e outros fins científicos, incluíndo a docencia conforme coa Orde ECC/566/2015 de 20 de marzo.**

*Certificado de capacitación en materia de protección de animales utilizados, criados o suministrados con fines de experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia conforme con la Orden ECC/566/2015 de 20 de marzo.*

<b>1. IDENTIFICACIÓN</b>		
1.1. Apelidos / Apellidos / Surname: <b>GONZÁLEZ IZQUIERDO</b>		
1.2. Nome / Nombre / First names: <b>ANDREA</b>		DNI / DNI / Identity card number: <b>44463491Y</b>
1.3. Categoría / Categoría / Category: <b>"d"</b>	1.4. Especies / Especies / Species: <b>TODAS</b>	1.5. Válido ata / válido hasta / expires: <b>18/05/2028</b>
<b>2. Nº DO CERTIFICADO / Nº DEL CERTIFICADO / CERTIFICATE NUMBER</b>		
<b>d316</b>		
<b>3. ORGANISMO QUE EXPIDE O CERTIFICADO / ORGANISMO QUE EXPIDE EL CERTIFICADO / BODY ISSUING THE CERTIFICATE:</b>		
3.1. Nome e endereço do organismo que expide o certificado / Nombre y dirección del organismo que expide el certificado / Name and address of the body issuing the certificate:  <b>CONSELLERÍA DO MEDIO RURAL – XUNTA DE GALICIA AXENCIA GALEGA DA CALIDADE ALIMENTARIA Avda. Do Camiño Francés, 10 baixo 15781 Santiago de Compostela A Coruña (España)</b>		
3.2. Teléfono / Teléfono / Telephone: <b>981 546 654</b>	3.3. Fax / Fax / Fax: <b>981 546 651</b>	3.4. Correo electrónico / Correo electrónico / Email: <b>formacion.cmr@xunta.es</b>
3.5. Data / Fecha / Date: <b>16/02/2021</b>	3.6. Lugar / Lugar / Place: <b>Santiago de Compostela</b>	
3.7. Nome e sinatura / Nombre y firma / Name and signature 3.8. Selo / Sello / Stamp  <b>Asdo.: Xiana María Perales Arroyo Xefa fo Departamento de Formación (asinado dixitalmente)</b>		





CONSEJERÍA DE MEDIO AMBIENTE,  
ADMINISTRACIÓN LOCAL  
Y ORDENACIÓN DEL TERRITORIO

## Comunidad de Madrid

**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 **ANA BELÉN CRUJEIRAS MARTÍNEZ**, con N.I.F. **52935842P**, ha obtenido el reconocimiento de la capacitación para realizar, sin limitación de especie, las funciones de:

REALIZACIÓN DE LOS PROCEDIMIENTOS

DISEÑO DE LOS PROYECTOS Y PROCEDIMIENTOS

**Nº de certificado: CAP-T-1244-16**

### 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

**3 de junio de 2016**

### Sello



### Nombre y firma

EL DIRECTOR GENERAL DE AGRICULTURA Y GANADERÍA

(P.D.F. Resolución 2 de noviembre de 2015)

EL SUBDIRECTOR GENERAL DE RECURSOS AGRARIOS

Fdo: Jesús Carpiñero Hervás



## 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 ANA BELÉN CRUJEIRAS MARTÍNEZ, con N.I.F. 52935842P, para obtener el reconocimiento de la capacitación para realizar las funciones de REALIZACIÓN DE LOS PROCEDIMIENTOS, DISEÑO DE LOS PROYECTOS Y 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 ANA BELÉN CRUJEIRAS MARTÍNEZ, con N.I.F. 52935842P, para realizar, sin limitación de especie, las funciones de REALIZACIÓN DE LOS PROCEDIMIENTOS, DISEÑO DE LOS PROYECTOS Y 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, 07 de junio de 2016

EL DIRECTOR GENERAL DE AGRICULTURA Y GANADERÍA

(P.D.F. Resolución 2 de noviembre de 2015)

EL SUBDIRECTOR GENERAL DE RECURSOS AGRARIOS



Fdo.: Jesús Carpintero Hervás



CONSEJERÍA DE MEDIO AMBIENTE,  
ADMINISTRACIÓN LOCAL  
Y ORDENACIÓN DEL TERRITORIO

Comunidad de Madrid

Ref.: CAP-T-1244-16

D./D.ª ANA BELÉN CRUJEIRAS  
MARTÍNEZ  
C/ MANUEL LUSTRES RIVAS, 3 - 1º  
15706 RIVEIRA (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 ANA BELÉN CRUJEIRAS MARTÍNEZ, con N.I.F. 52935842P, para obtener el reconocimiento de la capacitación para realizar las funciones de REALIZACIÓN DE LOS PROCEDIMIENTOS, DISEÑO DE LOS PROYECTOS Y 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 ANA BELÉN CRUJEIRAS MARTÍNEZ, con N.I.F. 52935842P, para realizar, sin limitación de especie, las funciones de REALIZACIÓN DE LOS PROCEDIMIENTOS, DISEÑO DE LOS PROYECTOS Y 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, 07 de junio de 2016  
ÁREA DE PROTECCIÓN ANIMAL  
LA JEFA DE SECCIÓN TÉCNICA I

Fdo.: Sonia García Gómez

REGISTRO DE SALIDA  
Ref.: 10/125507\_9/16 Fecha: 10/06/2016 11:43  
Cons. Medio Amb. Adm. Local y O.  
Reg. C. Medio Amb. Local y Ord. T. (ALC)  
Dest. lno: Da. ANA BELÉN CRUJEIRAS MARTÍNEZ





Comité Ético de Investigación Clínica de Galicia  
Edificio Administrativo de San Lázaro  
15781 SANTIAGO DE COMPOSTELA  
Tlf: 881 546425 Fax: 881 541804  
ceic@sergas.es



## DICTAMEN DEL COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA DE GALICIA

Paula M. López Vázquez, Secretaria del Comité Ético de Investigación Clínica de Galicia

### CERTIFICA:

Que este Comité evaluó en su reunión del día 26/03/2013, la enmienda del estudio:

**Título:** Avaliación dos efectos diferenciais do tecido adiposo de doantes con fenotipo obeso e normal sobre a carcinoxénese

**Versión Enmienda:** modificación del proyecto enero 2013

**Promotor:** Felipe Casanueva Freijo

**Código de Registro CEIC de Galicia:** 2009/076

Y que este Comité acepta de conformidad con sus procedimientos normalizados de trabajo y tomando en cuenta los requisitos éticos, metodológicos y legales exigibles a los estudios de investigación con seres humanos, sus muestras o registros, que dicha enmienda sea incorporada al estudio de investigación que se está realizando en los centros aprobados.

En Santiago de Compostela a 10 de abril de 2013

La Secretaria

Paula M. López Vázquez





## INFORME DEL COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA

D. FLORENTINO PINACHO PELAEZ, Secretario del Comité Ético de Investigación Clínica del Centro Hospitalario: Hospital Universitario del Río Hortega de Valladolid,

### CERTIFICA:

Que este Comité ha evaluado, en su reunión del día 10 de Abril de 2013, el Estudio de Intervención con alimentos titulado: **“Estudio para evaluar el efecto del DHA en los mediadores involucrados en la resolución de la inflamación en pacientes obesos sometidos a un programa de adelgazamiento”**. C.P.: PNK-DHA-2013-01. Versión 4.0 de 22 de Marzo de 2013 Promotor: Protein Supplies S.L. Hoja de información al paciente y consentimiento informado Versión 4 del 26 de Marzo de 2013 y considera que:

Se cumplen los requisitos necesarios de idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio y están justificados los riesgos y molestias previsibles para el sujeto.

La capacidad del investigador y los medios disponibles son apropiados para llevar a cabo el estudio.

Y que este Comité acepta que dicho Estudio sea realizado en el Hospital Universitario del Río-Hortega de Valladolid por el **Dr. D. de Luis Román** como Investigador Principal.

Lo que firmo en Valladolid, a 11 de Abril de 2013

Fdo. D Florentino Pinacho Peláez  
Secretario CEIC







## PUBLICACIONES INCLUIDAS EN LA TESIS

Dña. **Andrea González Izquierdo**

En condición de: **Doctoranda**

Título de la tesis: **ADIPOSIDAD Y CARCINOGENESIS HEPÁTICA:  
UNA APROXIMACIÓN EPIGENÉTICA**

INFORMA:

Que la presente tesis reproduce parcialmente la relación de publicaciones que se detallan a continuación, en las que la participación de la doctoranda fue decisiva para su elaboración, cuya contribución es como primer autor.

En Santiago de Compostela, 16 de Septiembre de 2021

**Firma electrónica**

## Relación de publicaciones

<b>Título de la Publicación</b>
Oxidative Stress Induced by Excess of Adiposity Is Related to a Downregulation of Hepatic SIRT6 Expression in Obese Individuals
<b>Autores</b>
Marcos C Carreira*, <u>Andrea G Izquierdo*</u> , Maria Amil, Felipe F Casanueva, Ana B Crujeiras. *Marcos C Carreira y Andrea G Izquierdo contribuyeron equitativamente en este trabajo y deben ser considerados como autores co-primeros.
<b>Fecha de la publicación</b>
20 diciembre 2018
<b>Revista</b>
Oxidative Medicine and Cellular Longevity. Hindawi. ISSN: 1942-0994
<b>Índice de impacto</b>
6,543
<b>Contribución autor</b>
Andrea G Izquierdo contribuyó en el diseño y realización de los experimentos, análisis de los datos y redacción del manuscrito.
<b>Contenido incluido en</b>
RESULTADOS: 2. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN HEPÁTICA DE SIRT6 EN ASOCIACIÓN AL ESTRÉS OXIDATIVO INDUCIDO POR EXCESO DE ADIPOSIDAD (pág. 163-165)
<b>ID del artículo</b>
DOI: 10.1155/2018/6256052
<b>Enlace a la publicación (Open Access)</b>
<a href="https://www.hindawi.com/journals/omcl/2018/6256052/">https://www.hindawi.com/journals/omcl/2018/6256052/</a>

<b>Título de la Publicación</b>
An energy restriction-based weight loss intervention is able to reverse the effects of obesity on the expression of liver tumor-promoting genes
<b>Autores</b>
Andrea G. Izquierdo, Marcos C. Carreira, María Amil, Carlos S. Mosteiro, Tomas Garcia-Caballero, Alfredo Fernandez-Quintela, María P. Portillo, Felipe F. Casanueva, Ana B. Crujeiras.
<b>Fecha de la publicación</b>
16 diciembre 2019
<b>Revista</b>
The FASEB Journal. ISSN:1530-6860
<b>Índice de impacto</b>
5,191
<b>Contribución autor</b>
Andrea G Izquierdo contribuyó en el diseño y realización de los experimentos, análisis de los datos y redacción del manuscrito.
<b>Contenido incluido en</b>
RESULTADOS: 1. ESTUDIO DEL PERFIL DE EXPRESIÓN DE GENES RELACIONADOS CON LA CARCINOGENÉISIS LIGADA A LA ESTEATÓISIS HEPÁTICA EN RATAS ZUCKER (pág. 151-161)
<b>ID del artículo</b>
DOI: 10.1096/fj.201901147RR
<b>Enlace a la publicación (Open Access)</b>
<a href="https://faseb.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1096/fj.201901147RR">https://faseb.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1096/fj.201901147RR</a>

<b>Título de la Publicación</b>
Weight loss normalizes enhanced expression of the oncogene survivin in visceral adipose tissue and blood leukocytes from individuals with obesity
<b>Autores</b>
Andrea G. Izquierdo, Marcos C. Carreira, Gemma Rodriguez-Carnero, Alfredo Fernandez-Quintela, Aurelio M. Sueiro, Miguel A. Martinez-Olmos, German Guzman, Daniel De Luis, Marcela A. S. Pinhel, Carolina F. Nicoletti, Carla B. Nonino, Francisco J. Ortega, Maria P. Portillo, Jose M. Fernandez-Real, Felipe F. Casanueva, Ana B. Crujeiras.
<b>Fecha de la publicación</b>
16 junio 2020
<b>Revista</b>
International Journal of Obesity. ISSN: 1476-5497
<b>Índice de impacto</b>
5,804
<b>Contribución autor</b>
Andrea G Izquierdo contribuyó en el diseño y realización de los experimentos, análisis de los datos y redacción del manuscrito.
<b>Contenido incluido en</b>
RESULTADOS: 3. ESTUDIO DEL PERFIL DE EXPRESIÓN DEL ONCOGEN SURVIVINA/BIRC5 EN TEJIDO ADIPOSO EN RELACIÓN AL GRADO DE ADIPOSIDAD (pág. 167-178)
<b>ID del artículo</b>
DOI: 10.1038/s41366-020-0630-7
<b>Enlace a la publicación (Open Access)</b>
<a href="https://www.nature.com/articles/s41366-020-0630-7">https://www.nature.com/articles/s41366-020-0630-7</a>

<b>Título de la Publicación</b>
Epigenetic landscape in blood leukocytes following ketosis and weight loss induced by a very low calorie ketogenic diet (VLCKD) in patients with obesity
<b>Autores</b>
Ana B. Crujeiras*, <a href="#">Andrea G. Izquierdo</a> *, David Primo, Fermin I. Milagro, Ignacio Sajoux, Amalia Jácome, Alfredo Fernandez-Quintela, María P. Portillo, J.Alfredo Martínez, Miguel A. Martinez-Olmos, Daniel de Luis, Felipe F. Casanueva. *Ana B. Crujeiras y Andrea G Izquierdo contribuyeron equitativamente en este trabajo y deben ser considerados como autores co-primeros.
<b>Fecha de la publicación</b>
20 mayo 2021
<b>Revista</b>
Clinical Nutrition Journal. ISSN: 0261-5614.
<b>Índice de impacto</b>
7,324
<b>Contribución autor</b>
Andrea G Izquierdo contribuyó en el diseño y realización de los experimentos, análisis de los datos y redacción del manuscrito.
<b>Contenido incluido en</b>
RESULTADOS: 5. ESTUDIO DEL PERFIL DE METILACIÓN DE LOS GENES ANALIZADOS EN RELACIÓN A ESTEATOSIS HEPÁTICA Y CARCINOGENESIS (pág. 193-201)
<b>ID del artículo</b>
DOI: 10.1016/j.clnu.2021.05.010
<b>Enlace a la publicación (Open Access)</b>
<a href="https://www.clinicalnutritionjournal.com/article/S0261-5614(21)00260-0/fulltext">https://www.clinicalnutritionjournal.com/article/S0261-5614(21)00260-0/fulltext</a>



# An energy restriction-based weight loss intervention is able to reverse the effects of obesity on the expression of liver tumor-promoting genes

Andrea G. Izquierdo<sup>1,2</sup> | Marcos C. Carreira<sup>2,3</sup> | María Amil<sup>2,3</sup> | Carlos S. Mosteiro<sup>3</sup> | Tomas Garcia-Caballero<sup>4</sup> | Alfredo Fernandez-Quintela<sup>2,5</sup> | María P. Portillo<sup>2,5</sup> | Felipe F. Casanueva<sup>2,3</sup> | Ana B. Crujeiras<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Epigenomics in Endocrinology and Nutrition, Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago de Compostela (IDIS), Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela (CHUS/SERGAS), Santiago de Compostela, Spain

<sup>2</sup>CIBER Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición (CIBERObn), Madrid, Spain

<sup>3</sup>Laboratory of Molecular and Cellular Endocrinology, Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago de Compostela (IDIS), Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela (CHUS) and Santiago de Compostela University (USC), Santiago de Compostela, Spain

<sup>4</sup>Department of Morphological Sciences, School of Medicine, University of Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, Spain

<sup>5</sup>Nutrition and Obesity Group, Department of Nutrition and Food Science, University of the Basque Country (UPV/EHU), Lucio Lascaray Research Institute and Health Research Institute BIOARABA, Vitoria, Spain

## Correspondence

Ana B. Crujeiras, Epigenomics Unit, Instituto de Investigación Sanitaria, Complejo Hospitalario de Santiago (CHUS), C/Choupana, s/n. 15706 Santiago de Compostela, Spain.  
Email: anabelenrujeiras@hotmail.com

## Funding information

MINECO | Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Grant/Award Number: PI17/01287, CP17/00088 and CIBERObn

## Abstract

The epidemiological evidence regarding the association of obesity with liver disease and possibly hepatocellular carcinoma highlights the need for investigations of whether obesity itself could induce the differential expression of genes commonly associated with the initial phase of liver tumorigenesis, and whether such phenomenon could be reversed after a weight loss intervention. In this study, obese Zucker rats were found to have dysregulated cell proliferation, antioxidative defenses, and tumor suppressor gene expression in association with liver dysfunction parameters, as well as oxidative stress and inflammation. Importantly, after a 4-week weight loss protocol of energy restriction and/or exercise, this effect on the liver carcinogenesis-related genes was reversed concomitantly with reductions in the fat mass, hepatic lipid content, oxidative stress, and inflammation. The findings indicate that

**Abbreviations:** 8-OHdG, 8-hydroxy-2'-desoxyguanosine; Ad-L, ad libitum group; ANOVA, analysis of variance; AOP, total antioxidant power; BW, body weight; ER, energy restriction group; EREX, energy restriction plus exercise group; EX, exercise group; FFM, fat-free mass; FM, fat mass; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; GST, glutathione-S-transferases; H&E, hematoxylin and eosin; HCC, hepatocellular carcinoma; IL-10, interleukin 10; IL-6, interleukin 6; MCP-1, monocyte chemoattractant protein 1; MDA, malondialdehyde; MgCl<sub>2</sub>, magnesium chloride; MYC, MYC proto-oncogene; NaCl, sodium chloride; NAFLD, nonalcoholic fatty liver disease; NASH, nonalcoholic steatohepatitis; NMR, nuclear magnetic resonance; PTEN, phosphatase and tensin homologue; RIPA buffer, radioimmunoprecipitation assay buffer; RNS, reactive nitrogen species; ROS, reactive oxygen species; RTqPCR, real-time quantitative polymerase chain reaction; SDS, sodium dodecyl sulfate; SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate polyacrylamide; SEM, standard error of the mean; SIRT1, sirtuin 1; Survivin/BIRC5, survivin; TG, triacylglycerol; TGFB, transforming growth factor-beta; TNF- $\alpha$ , tumor necrosis factor-alpha; TP53, tumor protein p53; Tris HCl, tris hydrochloride; Triton X-100, polyethylene glycol tertoctylphenyl ether; VEGF, vascular endothelial growth factor.

Felipe F. Casanueva and Ana B. Crujeiras contributed equally to this work.

the oxidative stress and inflammation associated with excess adiposity promote dysregulation of the genes involved in liver tumorigenesis. This is clinically relevant because these effects were detectable in the liver without evidence of a tumoral mass and were reversed after weight loss. Consequently, this study reveals the susceptibility of obese individuals to the initiation of a hepatocarcinogenic process, and how this can be prevented by achieving a healthy body weight.

**KEYWORDS**

adipose tissue dysfunction, carcinogenesis, inflammation, NAFLD, NASH, oxidative stress

## 1 | INTRODUCTION

The upward trend of obesity worldwide<sup>1</sup> has made this metabolic disturbance a priority risk factor in the implementation of healthy control strategies.<sup>2</sup> This is because, in addition to the widely known relationship between obesity and cardiovascular disease and insulin resistance,<sup>3</sup> obesity itself is considered the second leading avoidable cause of cancer, after smoking. Approximately 5% of cancers may be attributable to excess weight,<sup>4</sup> and 15%-20% of all cancer-related deaths in patients aged 50 years and over might be attributable to obesity.<sup>5</sup> However, despite the numerous epidemiological lines of evidence, the mechanisms underlying obesity-associated cancer remain largely unknown. In this regard, adipose tissue is emerging as a relevant factor in the association between obesity and cancer because of the role it can play in the promotion of inflammation and oxidative stress.<sup>6,7</sup>

Over the past few years, accumulating evidence has shown that obesity induces oxidative stress in humans, and this induced stress was suggested to be the link between obesity and its comorbidities.<sup>8</sup> Reactive oxygen species (ROS) are an endogenous class of carcinogens that trigger mutation of the cells,<sup>9</sup> although paradoxically, ROS and reactive nitrogen species can cause apoptotic or necrotic cell death.<sup>10</sup> High levels of oxidative stress can be cytotoxic, inhibiting cell proliferation and leading to apoptotic/necrotic cell death, whereas low or intermediate level of oxidative stress are most effective in damaging DNA, causing mutations and inflammatory reactions and promoting cell proliferation. Ultimately, the initiation of these oxidative stress effects induces carcinogenesis, which progresses to cancer development.<sup>9,11</sup> Therefore, we hypothesized that by creating a microenvironment that permits malignant transformation, obesity-related factors may regulate the expression of representative genes that are involved in cell proliferation and known to be altered in tumorigenesis, as well as genes that protect against oxidative stress, DNA damage, and tumor suppression.<sup>6</sup> This hypothesis has been previously demonstrated by our research group through studies on obesity-related breast cancer risk in both rats and humans.<sup>12</sup> Similarly, other researchers have investigated the

mechanisms by which obesity promotes hepatocarcinogenesis.<sup>13</sup> Diet-induced obesity and genetically inherited obesity were proposed to be potent liver tumor promoters in mice through their induction of a chronic inflammatory response.<sup>14</sup> However, most of these studies were performed using animal models of hepatocellular carcinoma (HCC) and followed a high-fat diet before the administration of a chemical carcinogen,<sup>15</sup> whereas few studies had evaluated the potential of weight loss in preventing the carcinogenic risk associated with obesity.<sup>16,17</sup> Weight loss therapies are effective in improving most of the obesity-associated phenotypes, such as body fat mass, lipid and glucose metabolism, and biomarkers of inflammation and oxidative stress.<sup>18-24</sup> However, whether these beneficial effects can reduce the risk of the liver injury that leads to hepatocarcinogenesis remains an open question.

The current study was aimed at investigating whether obesity itself could induce the differential expression of genes commonly associated with the initial phase of liver tumorigenesis, and whether the obesity-related microenvironment (eg, oxidative stress and inflammation) is associated with the regulation of carcinogenic gene induction in the liver of obese rats, which were used to model human obesity at physiological conditions. Furthermore, we explored whether the observed molecular changes in the rat model of obesity could be reversed after a weight loss intervention (ie, energy restriction or exercise or both combined) to counteract the obesity phenotype.

## 2 | METHODS

### 2.1 | Animals and experimental design

The present study was conducted on male obese Zucker rats (*fa/fa*,  $n = 50$ ) and their control counterparts, lean Zucker rats (*Fa/-*,  $n = 20$ ), which were purchased from Charles River Laboratories (Barcelona, Spain). For the first experiment, 20 young rats (obese and lean;  $n = 10$ /group) were obtained at 5 weeks of age and euthanized 1 week later. For the second experiment, 50 adult rats (obese,  $n = 40$ ; lean,  $n = 10$ )



were obtained at 8 weeks of age and euthanized 12 weeks later. This set of adult rats were fed a chow diet ad libitum for 8 weeks, following which 30 of the animals in the obese group were subjected to a weight loss protocol based on energy restriction and/or exercise for 4 weeks. The remaining obese rats (the control group designated as ad libitum group [Ad-L]) were maintained on an ad libitum diet.

The animals were kept according to protocols approved by the Animal Care Committee of Santiago de Compostela University (Ref. 15005/2015/003) in accordance with our institutional guidelines and the European Union standards for the care and use of experimental animals. The rats were housed in air-conditioned rooms (22–24°C) under a controlled (12:12 hours) light-dark cycle with free access to food and water.

In the experimental weight loss protocol, obese rats ( $n = 30$ ) were randomly divided into three subgroups: an energy restriction group (ER;  $n = 10$ ), an exercise group (EX;  $n = 10$ ), and an energy restriction plus exercise group (EREX;  $n = 10$ ). These obese rats were first housed individually for 1 week, and their individual food intake was weighed and recorded. Then, the rats in the ER and EREX groups were fed a diet of 30% less quantity than their individual food intake (based on the food weight) for 4 weeks. The animals from the EX and EREX groups were then familiarized with running on a rodent treadmill (Treadmill system 303401-R-04/C, TSE-Systems, Inc, Chesterfield, MO, USA) for 10 minutes each day, with the initial speed of 10 m/min being increased to 20 m/min over the course of a week (with 0° incline). After that period, the animals ran on the treadmill at a speed of 20 m/min (with 0° incline) for 30 minutes each day for 4 weeks, considered a moderate exercise.<sup>25</sup> To encourage the rats to stay on the treadmill, a slight electrical stimulus was applied from behind (minor intensity up to 3 mA).

For all animals, the weekly food intake was recorded and the body weight (BW) and composition were assessed by nuclear magnetic resonance using an EchoMRI-700 system (Echo Medical Systems, Houston, TX, USA). The animals were euthanized by decapitation, and their trunk blood was collected and immediately centrifuged. The plasma was stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  for the biochemical measurements. The liver was excised, immediately frozen on dry ice, and then stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until assay.

## 2.2 | Histological grading of hepatic steatosis and the triacylglycerol content

For the histological examinations, 5- $\mu\text{m}$  slices of liver were stained with hematoxylin and eosin (H&E) and Oil Red O (Sigma-Aldrich; Merck KGaA, Darmstadt, Germany). The sections were examined blindly by a certified pathologist,

and the steatosis was graded by averaging the grade scores across 10 high-power (200 $\times$ ) magnification fields. The scores used were as follows: 0: no obese hepatocytes; (a) obese hepatocytes occupying less than 33% of the hepatic parenchyma, (b) obese hepatocytes occupying 34%–66% of the hepatic parenchyma, and (c) obese hepatocytes occupying more than 66% of the hepatic parenchyma. The content of total liver triacylglycerol was measured using a commercial kit (Spinreact, Barcelona, Spain).

## 2.3 | Analysis of oxidative stress and inflammation in plasma and tissue lysates

The levels of malondialdehyde (MDA) and total antioxidant power (AOP) in the tissue homogenates and plasma were evaluated using colorimetric assay kits (OXIS International, Portland, OR, USA). An enzyme immunoassay kit was used for the quantification of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG; Japan Institute for the Control of Aging (JaICA), Fukuroi, Japan) in the plasma and tissue lysates.

A multiplex cytokine/chemokine panel was used to assess the plasma levels of inflammatory markers. The Bio-Plex Pro Rat Cytokine, Chemokine, and Growth Factor Assay Kit (Bio-Rad Laboratories, Marnes-la-Coquette, France) was used to measure the expression of five cytokines and chemokines in the trunk blood plasma; namely, tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), vascular endothelial growth factor (VEGF), interleukin (IL)-10, IL-6, and monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1; also known as chemokine (C-C motif) ligand 2).

## 2.4 | Gene expression assessment

Total RNA was isolated from the liver homogenates using the TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's recommendations. The extracted total RNA was purified by DNase treatment with a DNA-free kit (Ambion, Austin, TX, USA) and then used as a template to generate first-strand cDNA, using the High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RT-qPCR) was performed using a Step OnePlus Real-Time PCR system (Applied Biosystems) together with a sequence detection system (Applied Biosystems) and specific TaqMan RT-qPCR primers and probes. The gene expression levels were normalized by using beta-actin as an internal control, and were expressed as the average value for the control group.<sup>26</sup> The RT-qPCR experiments were performed in compliance with the guidelines of Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments (<http://www.rdm1.org/miqe>).

## 2.5 | Protein extraction and western blot analysis

Cells were homogenized in cold RIPA buffer containing 200 mmol/L Tris HCl (pH 7.4), 130 mmol/L NaCl, 10% (v/v) glycerol, 0.1% (v/v) sodium dodecyl sulfate (SDS), 1% (v/v) Triton X-100, and 10 mol/L MgCl<sub>2</sub> with an anti-protease and anti-phosphatase cocktail (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). The tissue lysates were centrifuged 3 times at 13 000 *g*, for 30 minutes each time, in a microfuge at 4°C. The total protein lysates from the cells (20 µg) were separated on a 10% SDS polyacrylamide gel, and the bands were then electroblotted onto a nitrocellulose membrane. The membranes were blocked for 1 hour in 5% bovine serum albumin (Sigma-Aldrich, USA) and then successively probed with the primary antibodies at 4°C overnight. For protein detection, horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies were added to the membranes for 1 hour at room temperature. Specific antigen-antibody binding was visualized using reactive chemiluminescence detection (Clarity Western ECL Substrate; Bio-Rad Laboratories) on the ChemiDoc MP Imaging System (Bio-Rad Laboratories), according to the manufacturer's instructions. ImageJ software (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) was used to quantify the volumes of the specific bands. The data are expressed as percentages corrected for glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (arbitrary units).

The primary monoclonal (mAb) and polyclonal (pAb) antibodies used were as follows: mouse anti-survivin mAb (dilution 1:500; catalog number sc-17779, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany), rabbit anti-MYC proto-oncogene (c-Myc) mAb (dilution 1:1,000; catalog number ab32072, Abcam Spain), rabbit anti-glutathione-S-transferase (GST-M2) pAb (dilution 1:1,000; catalog number ab175282, Abcam), mouse anti-sirtuin 1 (SIRT1) mAb (dilution 1:500; catalog number sc-74465, Santa Cruz Biotechnology), rabbit anti-transforming growth factor-beta (TGFB) pAb (dilution 1:1,000; catalog number 3711, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA), goat anti-tumor protein p53 (TP53) pAb (dilution 1:1,000; catalog number AF1355, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), mouse anti-phosphatase and tensin homolog (PTEN) mAb (dilution 1:500; catalog number sc-7974, Santa Cruz Biotechnology), and anti-GAPDH mAb (dilution 1:2,000; catalog number AM4300, Life Technologies Ltd, Northumberland, UK). The secondary antibodies used were goat anti-mouse secondary antibodies (dilution 1:10 000; catalog number 31430, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) for survivin, SIRT1, TP53, PTEN, and GAPDH; and goat anti-rabbit secondary antibodies (dilution 1:10 000; catalog number 31460, Thermo Fisher Scientific) for c-Myc, GST-M2, and TGFB.

## 2.6 | Statistical analysis

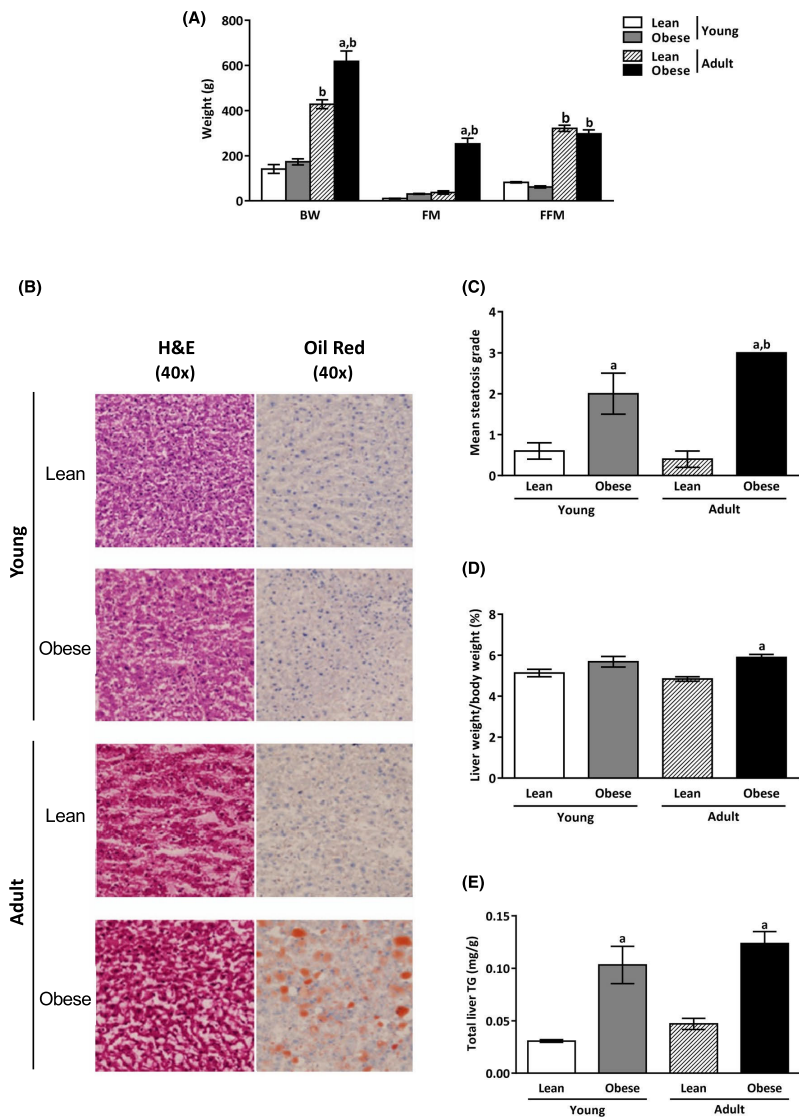
The normal distribution was explored with the Kolmogorov-Smirnov test and the Shapiro-Wilk test. One-way and two-way analysis of variance followed by the Bonferroni multiple comparison test were used to determine statistical differences between the experimental groups, young and adult rats, and subsets of adult rats following the weight loss intervention. The Mann-Whitney U test was applied when the data were not normally distributed. The fold change in gene expression was calculated using the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  relative quantification method according to the manufacturer's guidelines (Applied Biosystems), and the data are reported as the geometric mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM). All other data are expressed as the mean  $\pm$  SEM. All differences were considered statistically significant at a *P* value of <.05, whereas a *P* value of  $\leq 1$  was considered to indicate a trend for significance. The potential association between the oxidative stress biomarkers and gene expression levels was evaluated using the Spearman rank correlation coefficient. Statistical analysis was performed using SPSS 21.0 software (SPSS Inc, Chicago, IL, USA) for Windows XP (Microsoft, Redmond, WA, USA) and GraphPad Prism 6.01 software (GraphPad Software Inc, La Jolla, CA, USA).

## 3 | RESULTS

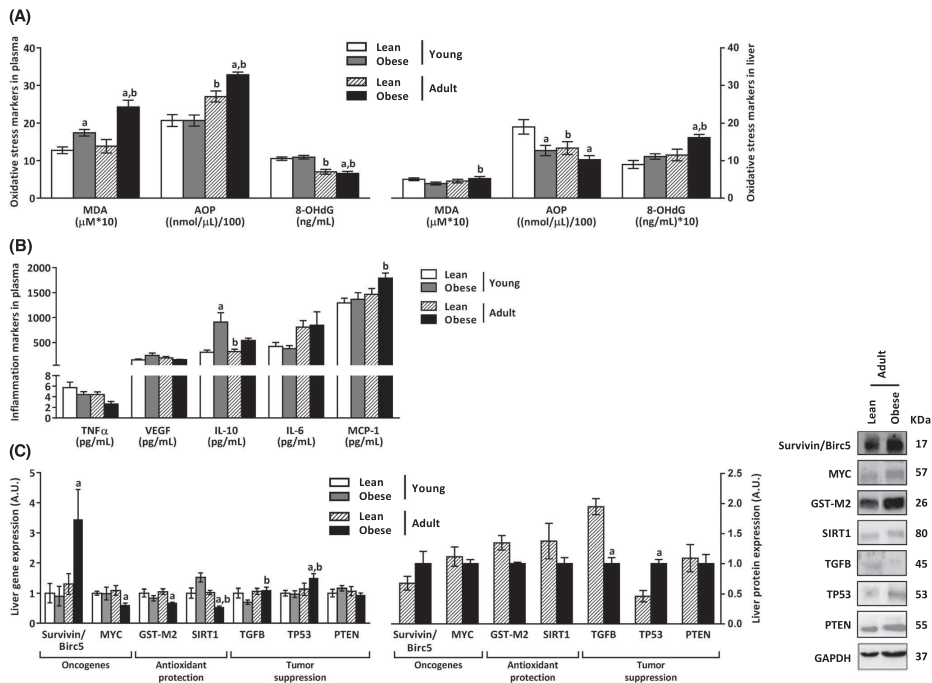
### 3.1 | Association between adiposity-related oxidative stress, inflammation, lipid content, and carcinogenesis-related gene expression

As expected, no statistically significant differences were observed between the young obese and lean rats (6 weeks old) in terms of BW, fat mass, and fat-free mass (Figure 1A). By contrast, liver lipid content was found in the obese rats but not in their lean counterparts (Figure 1C-E). With regard to the adult rats (20 weeks old), the obese animals presented higher BW and fat mass values than their lean counterparts and the young obese rats (Figure 1A). Oil Red O staining of the liver tissue revealed higher lipid accumulation (Figure 1B) in the obese rats, which translated into a higher steatosis grade (Figure 1C) and liver weight/BW ratio (Figure 1D), as well as total triacylglycerol content (Figure 1E). These parameters were statistically significant higher in the adult obese rats than in the young obese animals (Figure 1B,C).

In agreement with the observed fat mass and hepatic steatosis levels, the obese rats showed higher circulating levels of MDA than the lean rats, with the values being statistically significant higher in the adult obese rats than in the young animals (Figure 2A). In the liver lysates, there were



**FIGURE 1** Assessment of the obesity-related liver lipid contents in young and adult rats. A, Body weight and body composition in lean and obese rats. B, Representative images from liver sections stained with hematoxylin & eosin and with Oil Red O (magnification 40x). The red blots demonstrate lipid droplets in hepatocytes. C-E, Steatosis grade, liver-to-body weight ratio (%), and total liver triacylglycerol content, respectively. Data are presented as the mean  $\pm$  SEM (n = 7-10 animals/group). <sup>a</sup>Statistically significant differences compared with control lean counterparts ( $P < .05$ ). <sup>b</sup>Statistically significant differences compared with the young group ( $P < .05$ ). BW, body weight; FFM, fat-free mass; FM, fat mass; H&E, hematoxylin & eosin; TG, triacylglycerol



**FIGURE 2** Plasma and tissue levels of oxidative stress biomarkers (A), plasma levels of inflammatory biomarkers (B), and hepatic expression of carcinogenesis-related genes and their protein levels in young and adult rats (C). Data are presented as the mean  $\pm$  SEM ( $n = 7-10$  animals/group, and  $n = 3$  for expression levels). <sup>a</sup>Statistically significant differences compared with control lean counterparts ( $P < .05$ ). <sup>b</sup>Statistically significant differences compared with the young group ( $P < .05$ ). 8-OHdG, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine; AOP, total antioxidant power; *BIRC5*, survivin; *c-Myc*, MYC proto-oncogene; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; *GST-M2*, glutathione-S-transferase; IL-6, interleukin-6; IL-10, interleukin-10; MCP-1, monocyte chemoattractant protein-1; *PTEN*, phosphatase and tensin homolog; *SIRT1*, sirtuin 1; *TGF $\beta$* , transforming growth factor-beta; *TP53*, tumor protein p53; TNF- $\alpha$ , tumor necrosis factor-alpha; VEGF, vascular endothelial growth factor

no differences in the MDA concentrations between the lean and obese groups, whereas the levels were higher in the adult obese rats than in the young obese individuals (Figure 2A). The circulating levels of AOP were also higher in the adult rats, together with lower levels of 8-OHdG, as compared with the levels in the young rats (Figure 2A). Likewise, compared with that in the adult lean rats, the circulating AOP levels were higher in the adult obese rats, together with lower levels of 8-OHdG (Figure 2A). However, the measured levels of both AOP and 8-OHdG in the liver lysates were opposite to the findings in the plasma samples (Figure 2A). With regard to the circulating levels of inflammatory markers, the adult obese rats showed higher levels of IL-10 and MCP-1 than the adult lean rats, whereas no statistically significant differences were observed in the TNF- $\alpha$ , IL-6, and VEGF levels (Figure 2B).

Remarkably, when the hepatic expression levels of the selected carcinogenesis-related genes were compared between the obese and lean rats (Figure 2C), it was observed that *BIRC5*, the gene coding for baculoviral IAP repeat-containing 5 (also known as survivin), which is involved in cell proliferation and the inhibition of apoptosis, was upregulated in the adult obese rats. The transcript levels of *GST-M2* and *SIRT1* (coding for proteins involved in antioxidative defense), as well as those of the oncogene *c-Myc*, were significantly decreased in the adult obese rats. Moreover, the gene coding for TP53, which is involved in DNA damage repair, was upregulated in the liver of adult obese rats. By contrast, no differences were observed in the expression levels of these hepatic genes in the young rats, except for *SIRT1* expression, which was higher in the young obese rats than in their lean counterparts (Figure 2C). Compared with the young obese rats, the adult

obese rats showed differential expression of *SIRT1*, *TGFB*, and *TP53* (Figure 2C). The statistically significant differences in gene expression between the adult obese rats and their control lean counterparts were confirmed by the corresponding protein levels measured in the liver (Figure 2C).

To further analyze the association between oxidative stress and the regulation of carcinogenesis-related genes, a correlation analysis was performed. The graphs showed that the plasma levels of MDA were inversely correlated with the transcript levels of hepatic *SIRT1* (Figure 3A), and positively associated with the transcript levels of hepatic *TP53* (Figure 3B) and *Survivin/BIRC5* (Figure 3C).

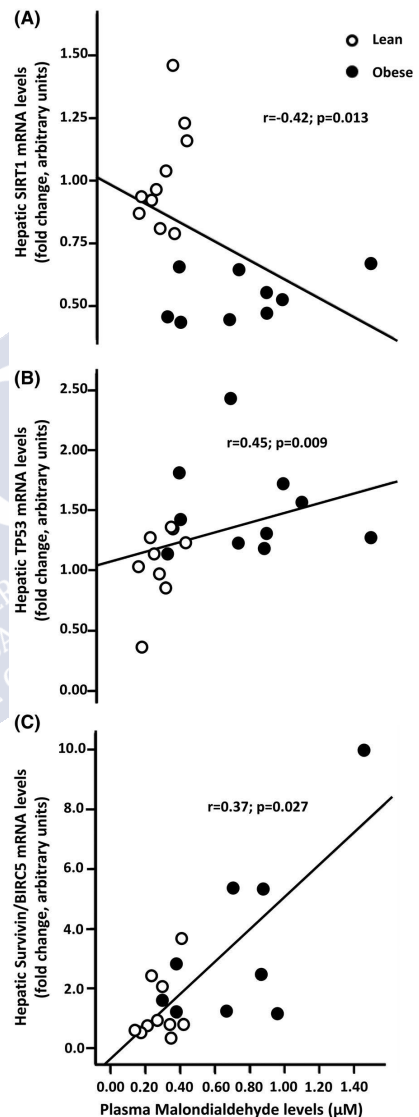
### 3.2 | Effects of weight loss on oxidative stress, hepatic steatosis, and the expression of carcinogenesis-related genes in the liver of obese rats

At the beginning of the intervention study, no differences were observed in body composition among the four experimental groups (Table 1). The time course of changes in the BW and body composition is presented in Figure S1. After the 4 weeks of weight loss, the ER and EREX groups exhibited 26% less BW concomitantly with less body fat and less body fat-free mass than the Ad-L control group (Figure 4A;  $P < .01$ ). No differences were observed between the EX and Ad-L groups in terms of BW and body composition (Figures 4A and S1). Importantly, at week 4 after the weight loss intervention, the EREX group exhibited a lower percentage of body fat mass (Figure S1B,D,F) together with a higher body fat-free mass (Figure S1C,E,F) than the other groups. These differences reached statistical significance when compared with week 3.

In the investigation of the effects of the weight loss interventions on hepatic steatosis, the Oil Red O staining of liver sections revealed that the lipid content was significantly lower in the rats from the ER and EREX groups than in those from the Ad-L group. This effect was not observed in the EX group (Figure 4B-E). Together with the decreases in BW and body fat as well as hepatic lipid accumulation, the three groups of rats with weight loss also showed lower MDA levels than the Ad-L group. These differences were statistically significant in the plasma. In the ER group specifically, circulating levels of AOP decreased after the weight loss protocol compared with the Ad-L group levels. By contrast, the AOP levels observed in the liver lysate were higher than those in the Ad-L group, especially in the EREX group. There were no statistically significant differences in the plasma or liver lysate 8-OHdG levels among the study groups (Figure 5A).

With regard to the inflammatory markers in the weight loss groups, although no statistically significant differences were observed in the circulating levels of TNF- $\alpha$ , IL-6, and VEGF, a decrease in the inflammatory cytokine MCP-1 was observed

**FIGURE 3** Association between oxidative stress and transcript levels of carcinogenesis-related genes in adults rats.  $n = 10$  animals/group. *BIRC5*, survivin; *SIRT1*, sirtuin 1; *TP53*, tumor protein p53



together with a significant increase in the anti-inflammatory cytokine IL-10 after energy restriction intervention, compared with the levels in the Ad-L group (Figure 5B). Importantly, the

**TABLE 1** Characteristics of experimental groups (Zucker rats)

	Adults							
	Young				Obese			
	Lean (n = 10)	Obese (n = 10)	Lean (n = 10)	Ad-L (n = 10)	ER (n = 10)	EX (n = 10)	EREX (n = 10)	
Age (weeks)	6	6	20	20	20	20	20	20
Body weight (g)								
To	119.0 ± 11.1	135.8 ± 8.4	212.1 ± 17.9	276.4 ± 25.2	280.9 ± 20.6	276.6 ± 20.1	280.8 ± 24.9	
Tf	140.9 ± 19.3*	172.5 ± 13.6**	428.4 ± 20.2***	617.7 ± 46.3***	462.2 ± 38.5***	606.3 ± 44.8***	455.3 ± 37.6***	*****
Fat mass (g)								
To	-	-	20.6 ± 3.6	117.7 ± 9.8	123.3 ± 11.7	120.4 ± 16.0	117.1 ± 6.6	
Tf	9.9 ± 1.7	30.7 ± 2.0**	36.7 ± 7.36*	252.2 ± 24.8***	184.5 ± 26.3***	245.3 ± 18.0***	173.6 ± 19.1***	*****
Lean mass (g)								
To	-	-	191.9 ± 32.8	191.0 ± 18.2	197.5 ± 10.1	186.3 ± 21.8	185.1 ± 14.0	
Tf	81.9 ± 2.7	61.3 ± 4.8**	321.2 ± 13.6 <sup>b</sup>	296.5 ± 17.7***	241.1 ± 12.0***	292.9 ± 21.6***	246.0 ± 18.5***	*****
Body weight gain (% respect to To)	18.3 ± 10.5	27.2 ± 10.3	103.0 ± 15.4	124.2 ± 15.7	64.9 ± 13.1***	119.5 ± 13.3***	62.5 ± 11.0***	*****
Fat mass gain (% respect to To)	-	-	79.0 ± 25.2	115.8 ± 30.1**	50.0 ± 18.2***	106.3 ± 26.6***	48.9 ± 20.9***	*****
RPAT (g)	0.81 ± 0.32	2.27 ± 0.13	3.60 ± 0.63	10.34 ± 0.99	8.42 ± 1.62	9.85 ± 1.99	7.99 ± 1.34	
BAT (g)	0.37 ± 0.11	0.58 ± 0.18	0.75 ± 0.16	0.90 ± 0.39	0.92 ± 0.33	1.13 ± 0.57	0.80 ± 0.18	
Liver (g)	7.32 ± 1.16	9.71 ± 1.08	20.46 ± 1.19	35.86 ± 5.26	18.97 ± 2.29	36.78 ± 2.18	19.24 ± 2.09	
Spleen (g)	0.43 ± 0.13	0.36 ± 0.07	0.66 ± 0.05	0.89 ± 0.10	0.51 ± 0.09	0.94 ± 0.08	0.57 ± 0.07	
Kidney (g)	1.47 ± 0.24	1.59 ± 0.20	3.14 ± 0.30	3.68 ± 0.47	2.68 ± 0.36	3.57 ± 0.53	2.79 ± 0.47	

Note: Data shown are mean ± SD (standard deviation).

Abbreviations: Ad-L, ad libitum group; BAT, brown adipose tissue; EREX, energy restriction plus exercise group; EX, exercise group; RPAT, retroperitoneal adipose tissue; To, time at baseline; Tf, time at sacrifice.

\*Statistically significant differences compared with initial time (To) of group ( $P < .05$ ).

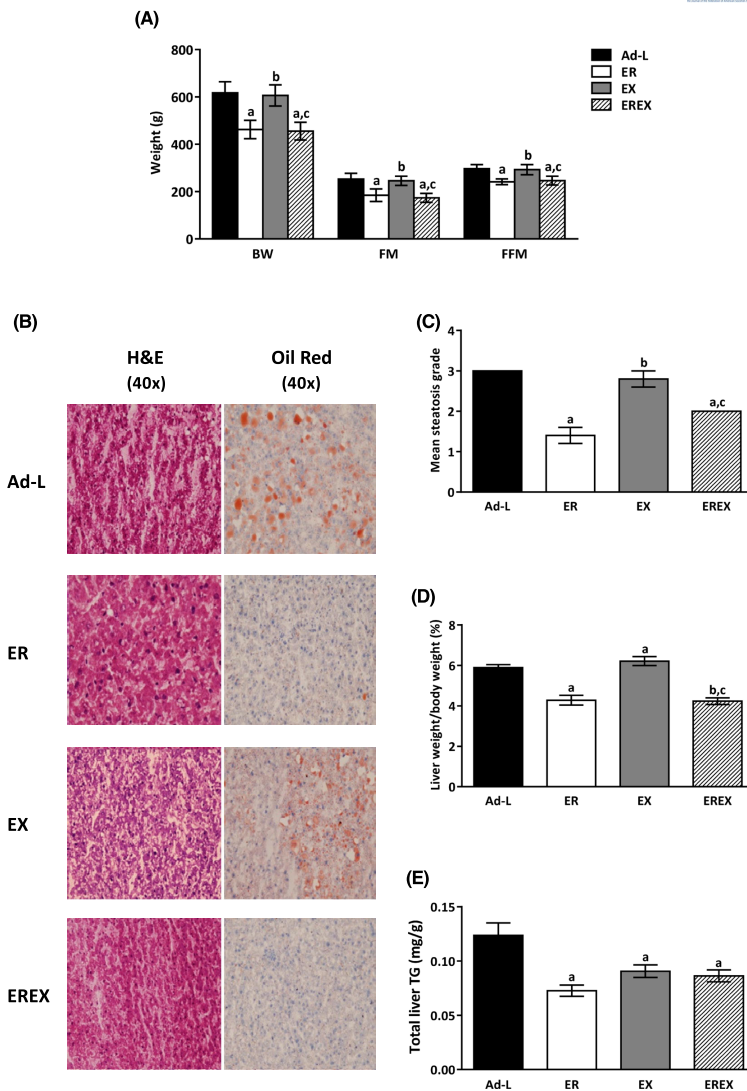
\*\*Statistically significant differences compared with control-lean counterparts ( $P < .05$ ).

\*\*\*Statistically significant differences compared with the young group ( $P < .05$ ).

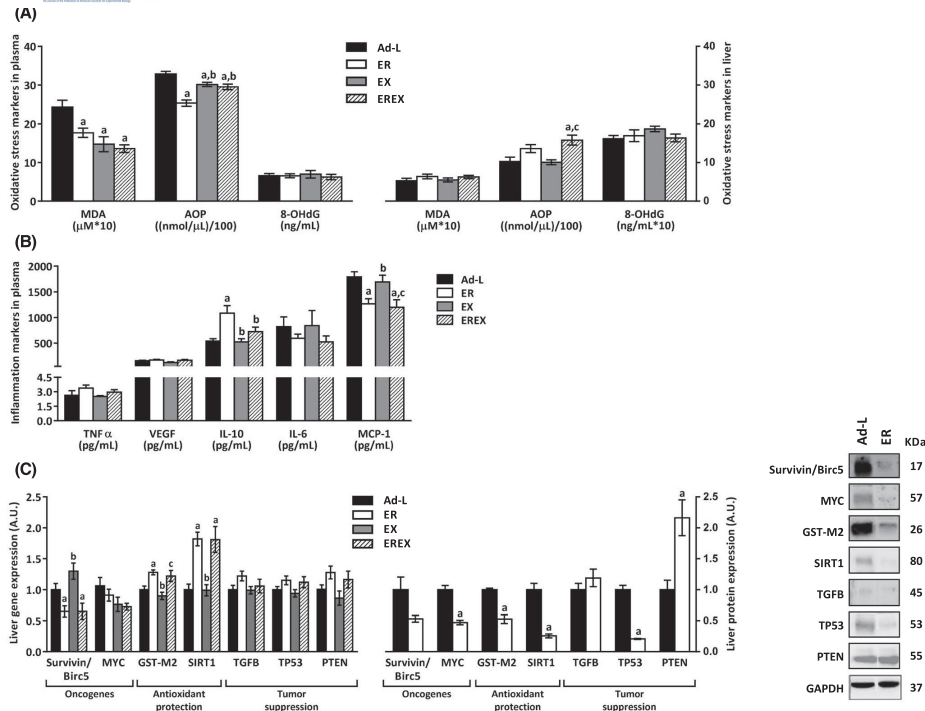
\*\*\*\*Statistically significant differences compared with control Ad-L counterparts ( $P < .05$ ).

\*\*\*\*\*Statistically significant differences compared with the ER group ( $P < .05$ ).

\*\*\*\*\*Statistically significant differences compared with the EX group ( $P < .05$ ).



**FIGURE 4** Effects of weight loss interventions on the obesity-related liver lipid contents in adult obese rats. A, Body weight and body composition of the four experimental groups of obese rats. B, Representative images from liver sections stained with hematoxylin & eosin and with Oil Red O (magnification 40x) from the four experimental groups. The red blots demonstrate lipid droplets in hepatocytes. C-E, Steatosis grade, liver-to-body weight ratio (%), and total liver triacylglycerol content, respectively. Data are presented as the mean  $\pm$  SEM (n = 7-10 animals/group). <sup>a</sup>Statistically significant differences compared with control Ad-L counterparts ( $P < .05$ ). <sup>b</sup>Statistically significant differences compared with the ER group ( $P < .05$ ). <sup>c</sup>Statistically significant differences compared with the EX group ( $P < .05$ ). Ad-L, ad libitum group; BW, body weight; ER, energy restriction group; EX, exercise group; EREX, energy restriction plus exercise group; FM, fat mass; FFM, fat-free mass; H&E, hematoxylin & eosin; TG, triacylglycerol



**FIGURE 5** Effects of weight loss interventions on the plasma and tissue levels of oxidative stress biomarkers (A), plasma levels of inflammatory biomarkers (B), and hepatic expression of carcinogenesis-related genes and their protein levels in adult obese rats (C). Data are presented as the mean  $\pm$  SEM (n = 7-10 animals/group, and n = 3 for expression levels). <sup>a</sup>Statistically significant differences compared with control Ad-L counterparts ( $P < .05$ ). <sup>b</sup>Statistically significant differences compared with the ER group ( $P < .05$ ). <sup>c</sup>Statistically significant differences compared with the EX group ( $P < .05$ ). 8-OHdG, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine; Ad-L, ad libitum group; AOP, total antioxidative power; *BIRC5*, survivin; *c-Myc*, MYC proto-oncogene; ER, energy restriction group; EREX, energy restriction plus exercise group; EX, exercise group; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; *GST-M2*, glutathione-S-transferase; IL-6, interleukin-6; IL-10, interleukin-10; MCP-1, monocyte chemoattractant protein-1; MDA, malondialdehyde; PTEN, phosphatase and tensin homolog; *SIRT1*, sirtuin 1; *TGFB*, transforming growth factor-beta; *TP53*, tumor protein p53; TNF- $\alpha$ , tumor necrosis factor-alpha; VEGF, vascular endothelial growth factor

expression of the carcinogenesis-related genes was also modulated in the liver of the obese rats (Figure 5C). Compared with the Ad-L group, the ER group exhibited significantly lower expression of *Survivin/BIRC5* ( $P = .027$ ) and higher expression of *GST-M2* ( $P = .003$ ) and *SIRT1* ( $P = .001$ ), whereas no differences were observed in the *TGFB* and *TP53* expression levels. Similarly, in the EREX group, low levels of *Survivin/BIRC5* ( $P = .043$ ) and high levels of *GST-M2* ( $P = .033$ ) and *SIRT1* expression ( $P = .001$ ) were observed, without differences in the *TGFB* and *TP53* levels. No statistically significant differences were observed between the EX and control groups as well as between the ER and EREX groups in the expression of the carcinogenesis-related genes.

The liver protein levels measured in the ER group were equivalent to those obtained in the gene expression measurements, especially for survivin/BIRC5, c-Myc, and PTEN, which are important for the prevention of oncogenesis in the liver. By contrast, the protein expression patterns of GST-M2, SIRT1, and TP53 in the ER group were opposite to those measured for the transcripts (Figure 5C).

#### 4 | DISCUSSION

This study revealed the dysregulation of several genes involved in cancer development pathways, such as those



related to cell proliferation, antioxidative protection, and tumor suppression, in the liver of obese Zucker rats. The overexpression of genes involved in DNA repair and cell proliferation and the downregulation of genes implicated in the protection against cellular oxidative stress were found in the liver of the obese rats. These results were observed only in the adult animals. Age is a risk factor for cellular malignant transformation, and obesity increases aging of the liver tissue.<sup>27</sup> However, the young obese rats showed no differences in BW and body fat mass relative to their lean littermates, and only a slight increase in the liver lipid content that occurred before the increase in body adipose tissue depots was evident. Therefore, the genetic predisposition to obesity or the age of these animal models is not involved in the outcomes. Outstandingly, the weight loss induced by energy restriction was able to reverse the obesity-related phenotype by improving the liver steatosis, inflammatory, and oxidative stress markers, as well as the hepatic expression of carcinogenesis-related genes. Therefore, it appears that the features related to excess adiposity are the most probable mechanistic link to the risk for obesity-related liver steatosis and consequently cancer, and this risk can be prevented by reducing the adiposity.

Several epidemiological studies have highlighted the strong contribution of obesity to the overall HCC burden, mainly because of the underlying presence of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) and nonalcoholic steatohepatitis.<sup>28</sup> NAFLD contributes to 13%–38.2% of HCCs unrelated to viruses and alcohol.<sup>29,30</sup> Therefore, because of the extent of obesity worldwide, there is an urgent need to delineate the molecular mechanisms behind the hepatocarcinogenic risk associated with obesity and NAFLD, in order to predict the susceptibility to HCC and to develop counteractive and preventive strategies.<sup>30</sup>

Zucker rats show an earlier development of obesity, which is accompanied by many of the features of the human metabolic syndrome and liver steatosis.<sup>31,32</sup> This liver disease causes a sustained hepatic inflammation that results in parenchymal damage, oxidative stress, and compensatory regeneration/proliferation events that are strongly associated with the increased incidence of HCC.<sup>14,33</sup>

Several examples in the literature suggest the participation of ROS in hepatocarcinogenesis in rats.<sup>34</sup> In addition, it was observed that genes related to oxidative stress regulation as well as cell proliferation and DNA repair, such as *TP53* and *GST*, respectively, were overexpressed in the early stages of HCC.<sup>35</sup> Accordingly, the present study has demonstrated that increases in the lipid liver content, oxidative stress markers, and circulating inflammatory cytokines such as MCP-1 occurred concomitantly with the overexpression of *TP53* and *Survivin/BIRC5* in the liver of obese rats compared with the levels in their lean counterparts. These findings suggest the initiation of DNA damage, which is followed by DNA repair

and replication.<sup>35,36</sup> Moreover, *SIRT1* and *GST-M2*, genes implicated in the protection against cellular oxidative stress,<sup>21,37</sup> were downregulated in the liver of the obese rats. These results are concordant with dysregulation of the antioxidative defenses, with consequent promotion of the oxidative stress characteristic of obesity.<sup>38</sup> In fact, the obese rats showed higher circulating levels of lipid peroxidation, which was accompanied by high levels of AOP, suggesting a mobilization of the soluble antioxidants from the tissues to the plasma to counteract the lack of antioxidative enzyme defenses and to restore the oxidant/antioxidant status and prevent further DNA damage.<sup>39</sup> This assumption was reinforced by the findings of the circulating 8-OHdG levels and by the association of the plasma MDA and AOP levels with the *SIRT1* and *GST-M2* expression levels. However, in the obese liver tissue, high levels of 8-OHdG were observed together with low levels of AOP, justifying the increase of *TP53* expression to counteract the cellular damage. These results indicate that the soluble antioxidants are able to neutralize lipid peroxidation within the tissue, but become ineffective under the constant exposure to the obesity-related features, whereupon DNA damage occurs and possible tumoral transformation ensues.

Remarkably, after weight loss intervention by energy restriction, the findings observed in the obese animals were reversed; that is, the expression of *Survivin/BIRC5* and *TP53* was downregulated and that of *GST-M2* and *SIRT1* was upregulated, and the lipid content and circulating oxidative stress and inflammatory biomarkers were decreased. In this regard, *SIRT1* plays a vital role in the regulation of hepatic lipid homeostasis and it may be important for the prevention of obesity-associated metabolic diseases.<sup>40</sup> Overexpression of the *SIRT1* gene in the liver was shown to attenuate endoplasmic reticulum stress and insulin resistance.<sup>41</sup>

*Survivin/BIRC5*, a cell proliferation-related gene, is indispensable for several steps in cell division; furthermore, it has generated considerable interest as a risk-associated gene in various malignancies as well as a cancer therapeutic target.<sup>42</sup> The expression of this gene in nontumorous tissues is developmentally regulated and has been reported to be low in most terminally differentiated tissues, whereas it is strongly upregulated in transformed cells.<sup>43</sup> The early dysregulation of the *survivin/BIRC5* networks may be required to initiate the process of malignant transformation and later to maintain the malignant phenotype of established tumors.<sup>44</sup> To the best of our knowledge, this is the first study to show that the upregulation of *survivin/BIRC5* in nontumorous obese liver tissue is associated with obesity-related oxidative stress, and that it can be reversed after weight loss.

The effects of weight loss interventions were evaluated in the ER and EREX groups of rats, with no differences observed between the TWO groups, whereas the EX group showed similar patterns to those of the control group. These results suggest that energy restriction alone per se is able

to reverse the carcinogenic effect of obesity rather than in combination with physical activity. However, a limitation of our study was the lack of evidence on the effect of exercise on hepatic pathogenesis, because it was difficult to discern if exercise did indeed have no effects on the expression of the carcinogenesis-related genes and oxidative stress markers or whether more time was necessary to detect these effects. Nonetheless, exercise was able to induce a higher loss of fat mass and preserve the fat-free mass after ER treatment.

Another limitation of this study was the lack of a positive correlation between the expression of the studied genes and their protein levels after the intervention, whereas a positive correlation was observed when comparing the obese animals with their control lean counterparts. The same trend was observed between the transcripts and protein levels of *Survivin/BIRC5*, *c-Myc*, and *PTEN* after the weight loss treatment. However, the transcript and protein expression patterns for *GST-M2*, *SIRT1*, and *TP53* were negatively correlated. These results suggest that a temporal dynamic occurs between the gene expression and protein abundance profiles,<sup>45</sup> as mediated by the effect of the weight loss intervention. Further studies are needed to elucidate this molecular timekeeping mechanism that regulates the expression of these genes in the liver in association with changes in the adiposity state.

In conclusion, although the mechanistic link between obesity and cancer risk is still unknown, several hypotheses have pointed to the dysfunctional adipose tissue generated in an excessive BW setting.<sup>6,12,46,47</sup> The tumor-promoting effects of obesity can occur at the local level, as well as systemically via the circulating inflammatory, growth factor, and metabolic mediators associated with adipose tissue inflammation as well as paracrine and autocrine effects.<sup>48</sup> Importantly, this hypothesis was corroborated by the results of the current study. The regulation of carcinogenesis-related genes in the liver was directly dependent on the adiposity status and its effects on systemic inflammation and oxidative stress. These findings demonstrate that the molecular events involved in the early process of liver carcinogenesis are activated under the excess adiposity induced by obesity-related oxidative stress. At a premalignant state, both oncogenic promoter and suppressor factors are activated in obesity, suggesting that if the obesity-related pro-tumorous microenvironment remains for a long time, then the tumor suppressor defenses could become saturated and malignant transformation of the hepatocytes could arise even without additional oncogenic insults. These obesity-induced carcinogenic mechanisms can be detected before the manifestation of a detectable tumor mass and are reversed by weight loss. Consequently, this study provides evidence of the susceptibility of obese individuals to the initiation of a hepatocarcinogenic process, and that this risk can be prevented by promoting a healthy BW.

## ACKNOWLEDGMENTS

The Authors thank Maribel Rendo from the Department of Molecular and Cellular Endocrinology of IDIS for her support with research data management, and María Otero from the Morphological and Immunohistochemical Platform of IDIS for her technical support in developing the H&E and Oil Red O staining. This study was supported by Centro de Investigación Biomedica en Red de Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición (CIBERObn) and grants from the Instituto de Salud Carlos III-ISCIII (PI17/01287) and Ana B Crujeiras is funded by a “Miguel Servet” research contract (CP17/00088) from the ISCIII, co-financed by the European Regional Development Fund (FEDER).

## CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

A.B. Crujeiras and A.G. Izquierdo performed the experiments, analyzed the data, and wrote the manuscript; M.C. Carreira, M. Amil, and C.S. Moreir helped with the experiments and data analysis; T. Garcia-Caballero performed the histological examination and steatosis grading; A. Fernandez-Quintela and M.P. Portillo contributed to the interpretation of the data and discussion; and F.F. Casanueva and A.B. Crujeiras obtained funding, and designed and coordinated the research. A.G. Izquierdo, F.F. Casanueva, and A.B. Crujeiras are the guarantors of this work and, as such, had full access to all the data in the study and take responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis. All authors have reviewed and approved the article and have read the journal's authorship agreement.

## REFERENCES

1. NCD Risk Factor Collaboration (NCD-RisC). Worldwide trends in body-mass index, underweight, overweight, and obesity from 1975 to 2016: a pooled analysis of 2416 population-based measurement studies in 128.9 million children, adolescents, and adults. *Lancet*. 2017;390:2627-2642.
2. Upadhyay J, Farr O, Perakakis N, Ghaly W, Mantzoros C. Obesity as a disease. *Med Clin North Am*. 2018;102:13-33.
3. Casanueva FF, Moreno B, Rodriguez-Azaredo R, et al. Relationship of abdominal obesity with cardiovascular disease, diabetes and hyperlipidaemia in Spain. *Clin Endocrinol*. 2010;73:35-40.
4. Bergstrom A, Pisani P, Tenet V, Wolk A, Adami HO. Overweight as an avoidable cause of cancer in Europe. *Int J Cancer*. 2001;91:421-430.
5. Calle EE, Rodriguez C, Walker-Thurmond K, Thun MJ. Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults. *N Engl J Med*. 2003;348:1625-1638.
6. Cabia B, Andrade S, Carreira MC, Casanueva FF, Crujeiras AB. A role for novel adipose tissue-secreted factors in obesity-related carcinogenesis. *Obes Rev*. 2016;17:361-376.

7. Morgan MM, Arendt LM, Alarid ET, Beebe DJ, Johnson BP. Mammary adipose stromal cells derived from obese women reduce sensitivity to the aromatase inhibitor anastrozole in an organotypic breast model. *FASEB J*. 2019;33:8623-8633.
8. Vincent HK, Innes KE, Vincent KR. Oxidative stress and potential interventions to reduce oxidative stress in overweight and obesity. *Diabetes Obes Metab*. 2007;9:813-839.
9. Fang J, Seki T, Maeda H. Therapeutic strategies by modulating oxygen stress in cancer and inflammation. *Adv Drug Deliv Rev*. 2009;61:290-302.
10. Kundu JK, Surh YJ. Emerging avenues linking inflammation and cancer. *Free Radic Biol Med*. 2012;52:2013-2037.
11. Boutari C, Mantzoros CS. Inflammation: a key player linking obesity with malignancies. *Metabolism*. 2018;81:A3-A6.
12. Crujeiras AB, Cabia B, Carreira MC, et al. Secreted factors derived from obese visceral adipose tissue regulate the expression of breast malignant transformation genes. *Int J Obes*. 2016;40:514-523.
13. Sun B, Karin M. Obesity, inflammation, and liver cancer. *J Hepatol*. 2012;56:704-713.
14. Park EJ, Lee JH, Yu GY, et al. Dietary and genetic obesity promote liver inflammation and tumorigenesis by enhancing IL-6 and TNF expression. *Cell*. 2010;140:197-208.
15. Gan L, Liu Z, Sun C. Obesity linking to hepatocellular carcinoma: a global view. *Biochim Biophys Acta*. 2018;1869:97-102.
16. Bultman SJ. A reversible epigenetic link between obesity and cancer risk. *Trends Endocrinol Metab*. 2018;29:529-531.
17. Li R, Grimm SA, Mav D, et al. Transcriptome and DNA methylation analysis in a mouse model of diet-induced obesity predicts increased risk of colorectal cancer. *Cell Rep*. 2018;22:624-637.
18. Carmiel-Haggai M, Cederbaum AI, Nieto N. A high-fat diet leads to the progression of non-alcoholic fatty liver disease in obese rats. *FASEB J*. 2005;19:136-138.
19. Clement K, Viguier N, Poitou C, et al. Weight loss regulates inflammation-related genes in white adipose tissue of obese subjects. *FASEB J*. 2004;18:1657-1669.
20. Crujeiras AB, Gomez-Arbelaez D, Zulet MA, et al. Plasma FGF21 levels in obese patients undergoing energy-restricted diets or bariatric surgery: a marker of metabolic stress? *Int J Obes*. 2017;41:1570-1578.
21. Crujeiras AB, Parra D, Goyenechea E, Abete I, Martinez JA. Tachyphylaxis effects on postprandial oxidative stress and mitochondrial-related gene expression in overweight subjects after a period of energy restriction. *Eur J Nutr*. 2009;48:341-347.
22. Crujeiras AB, Parra D, Milagro FI, et al. Differential expression of oxidative stress and inflammation related genes in peripheral blood mononuclear cells in response to a low-calorie diet: a nutrigenomics study. *OMICS*. 2008;12:251-261.
23. Crujeiras AB, Zulet MA, Abete I, et al. Interplay of atherogenic factors, protein intake and betatrophin levels in obese-metabolic syndrome patients treated with hypocaloric diets. *Int J Obes*. 2016;40:403-410.
24. Gomez-Arbelaez D, Bellido D, Castro AI, et al. Body composition changes after very-low-calorie ketogenic diet in obesity evaluated by 3 standardized methods. *J Clin Endocrinol Metab*. 2017;102:488-498.
25. Mi C, Qin X, Hou Z, Gao F. Moderate-intensity exercise allows enhanced protection against oxidative stress-induced cardiac dysfunction in spontaneously hypertensive rats. *Braz J Med Biol Res*. 2019;52:e8009.
26. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods*. 2001;25:402-408.
27. Horvath S, Erhart W, Brosch M, et al. Obesity accelerates epigenetic aging of human liver. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2014;111:15538-15543.
28. Marengo A, Rosso C, Bugianesi E. Liver cancer: connections with obesity, fatty liver, and cirrhosis. *Annu Rev Med*. 2016;67:103-117.
29. Marrero JA, Fontana RJ, Su GL, Conjeevaram HS, Emick DM, Lok AS. NAFLD may be a common underlying liver disease in patients with hepatocellular carcinoma in the United States. *Hepatology*. 2002;36:1349-1354.
30. Said A, Ghufran A. Epidemic of non-alcoholic fatty liver disease and hepatocellular carcinoma. *World J Clin Oncol*. 2017;8:429-436.
31. Garces-Rimon M, Gonzalez C, Vera G, et al. Pepsin egg white hydrolysate improves glucose metabolism complications related to metabolic syndrome in Zucker fatty rats. *Nutrients*. 2018;10:441.
32. Gomez-Zorita S, Fernandez-Quintela A, Macarulla MT, et al. Resveratrol attenuates steatosis in obese Zucker rats by decreasing fatty acid availability and reducing oxidative stress. *Br J Nutr*. 2012;107:202-210.
33. Stauffer JK, Scazzello AJ, Jiang Q, Wiltrout RH. Chronic inflammation, immune escape, and oncogenesis in the liver: a unique neighborhood for novel intersections. *Hepatology*. 2012;56:1567-1574.
34. Sanchez-Perez Y, Carrasco-Legleu C, Garcia-Cuellar C, et al. Oxidative stress in carcinogenesis. Correlation between lipid peroxidation and induction of preneoplastic lesions in rat hepatocarcinogenesis. *Cancer Lett*. 2005;217:25-32.
35. Beltran-Ramirez O, Sokol S, Le-Berre V, Francois JM, Villatrevino S. An approach to the study of gene expression in hepatocarcinogenesis initiation. *Transl Oncol*. 2010;3:142-148.
36. Krstic J, Galhuber M, Schulz TJ, Schupp M, Prokesch A. p53 as a dichotomous regulator of liver disease: the dose makes the medicine. *Int J Mol Sci*. 2018;19:921.
37. Crujeiras AB, Parra D, Goyenechea E, Martinez JA. Sirtuin gene expression in human mononuclear cells is modulated by caloric restriction. *Eur J Clin Invest*. 2008;38:672-678.
38. Vincent HK, Taylor AG. Biomarkers and potential mechanisms of obesity-induced oxidant stress in humans. *Int J Obes*. 2006;30:400-418.
39. Halliwell B, Gutteridge J. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford: Clarendon Press; 2007.
40. Purushotham A, Schug TT, Xu Q, Surapureddi S, Guo X, Li X. Hepatocyte-specific deletion of SIRT1 alters fatty acid metabolism and results in hepatic steatosis and inflammation. *Cell Metab*. 2009;9:327-338.
41. Li Y, Xu S, Giles A, et al. Hepatic overexpression of SIRT1 in mice attenuates endoplasmic reticulum stress and insulin resistance in the liver. *FASEB J*. 2011;25:1664-1679.
42. Altieri DC. New wirings in the survivin networks. *Oncogene*. 2008;27:6276-6284.
43. Fukuda S, Pelus LM. Survivin, a cancer target with an emerging role in normal adult tissues. *Mol Cancer Ther*. 2006;5:1087-1098.
44. Altieri DC. Survivin, cancer networks and pathway-directed drug discovery. *Nat Rev Cancer*. 2008;8:61-70.

45. Abraham PE, Yin H, Borland AM, et al. Transcript, protein and metabolite temporal dynamics in the CAM plant Agave. *Nat Plants*. 2016;2:16178.
46. Calle EE, Kaaks R. Overweight, obesity and cancer: epidemiological evidence and proposed mechanisms. *Nat Rev Cancer*. 2004;4:579-591.
47. Khandekar MJ, Cohen P, Spiegelman BM. Molecular mechanisms of cancer development in obesity. *Nat Rev Cancer*. 2011;11:886-895.
48. O'Sullivan J, Lysaght J, Donohoe CL, Reynolds JV. Obesity and gastrointestinal cancer: the interrelationship of adipose and tumour microenvironments. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2018;15:699-714.

**SUPPORTING INFORMATION**

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section.

**How to cite this article:** Izquierdo AG, Carreira MC, Amil M, et al. An energy restriction-based weight loss intervention is able to reverse the effects of obesity on the expression of liver tumor-promoting genes. *The FASEB Journal*. 2019;00:1–14. <https://doi.org/10.1096/fj.201901147RR>



## Research Article

# Oxidative Stress Induced by Excess of Adiposity Is Related to a Downregulation of Hepatic SIRT6 Expression in Obese Individuals

Marcos C. Carreira <sup>1,2</sup>, Andrea G. Izquierdo <sup>2,3</sup>, Maria Amil <sup>1,2</sup>,  
 Felipe F. Casanueva <sup>1,2,4</sup> and Ana B. Crujeiras <sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Molecular and Cellular Endocrinology, Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago (IDIS), Complejo Hospitalario Universitario de Santiago (CHUS), Santiago de Compostela, Spain

<sup>2</sup>CIBER de Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición (CIBERObn), Instituto Salud Carlos III, Madrid, Spain

<sup>3</sup>Laboratory of Epigenomics in Endocrinology and Nutrition, Epigenomics Unit, Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago (IDIS), Complejo Hospitalario Universitario de Santiago (CHUS/SERGAS), Santiago de Compostela, Spain

<sup>4</sup>Universidad de Santiago de Compostela (USC), Santiago de Compostela, Spain

Correspondence should be addressed to Felipe F. Casanueva; [endocrine@usc.es](mailto:endocrine@usc.es) and Ana B. Crujeiras; [anabelencrujeiras@hotmail.com](mailto:anabelencrujeiras@hotmail.com)

Received 29 May 2018; Revised 11 October 2018; Accepted 16 October 2018; Published 20 December 2018

Academic Editor: Giulio Ceolotto

Copyright © 2018 Marcos C. Carreira et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Sirt6 is a member of the sirtuin family involved in physiological and pathological processes including aging, cancer, obesity, diabetes, and energy metabolism. This study is aimed at evaluating the relationship between liver *SIRT6* gene expression and the oxidative stress network depending on adiposity levels in Zucker rats, an animal model of metabolic syndrome. We observed that liver-specific *SIRT6* expression is reduced in an in vivo model of spontaneous obesity and metabolic syndrome. We also observed that *SIRT6* expression in the liver is positively associated with *SIRT1* and *GST-M2* expressions, two proteins involved in antioxidant protection pathways and inversely related to body weight and plasmatic oxidative status. Interestingly, the *SIRT6* expression is upregulated after energy restriction-induced weight loss concomitantly with an improvement in oxidative stress markers. These results suggest that *SIRT6* may be a potential therapeutic target for the treatment of obesity and associated metabolic disorders, such as liver disease.

## 1. Introduction

During the last years, numerous evidences suggested the oxidative stress as a key factor involved in the development of obesity and its comorbidities [1]. The oxidative stress in obesity is induced by an excessive generation and accumulation of reactive oxygen species (ROS) in different cellular structures due to the expansion of the adipose tissue and inefficiency in the energy metabolism leading to cellular damage [2, 3]. The metabolic syndrome associated with obesity identifies subjects who have an increase in morbidity and mortality and is correlated with the development of several pathologies that affect different organs such as the liver and

the progression from steatosis to nonalcoholic steatohepatitis and hepatocarcinogenesis in which oxidative stress appears to be involved [4].

Sirtuins are a family of NAD<sup>+</sup>-dependent protein deacetylases and ADP-ribosyltransferases with an important role in regulating the life span, aging, and cancer as well as energy metabolism and obesity and its metabolic associated disorders [5] and have therefore been proposed as a possible target for future therapies against these diseases.

Seven highly conserved family members of sirtuins have been identified (Sirt1-Sirt7) in mammals [6]. A number of studies revealed that Sirt1 has several beneficial effects on metabolic cell control and enhances the ability of cells to cope

with oxidative stress [7, 8]. However, relatively little is known about the other sirtuins Sirt2 to Sirt7 being suggested that seven sirtuins may have redundant or similar cellular functions with Sirt1 [9]. In this regard, the nucleus-specific Sirt6 level is involved in obesity and diabetes [10, 11]. Aging and overnutrition lead to decreased Sirt6 level resulting in alterations of glucose and lipid metabolism [10]. Deletion of Sirt6 in mice resulted in lethal hypoglycemia [9, 12, 13]. On the other hand, overexpression of Sirt6 improves blood lipid profiles in animals fed with high-fat diets [12]. Liver expression of Sirt6 is induced by caloric restriction and suppressed in diseases associated with lipid accumulation in the liver [12]. Hepatic-specific deletion of Sirt6 resulted to triglyceride accumulation and liver steatosis [14]. In addition, adipose tissue-specific ablation of Sirt6 resulted in increased blood glucose, hepatic steatosis, and diet-induced obesity [10, 13]. Sirt6 levels are reduced in the adipose tissue of murine models of obesity and increased in the adipose tissue of humans with weight loss [15, 16].

Therefore, the aim of this study was to evaluate the hepatic gene expression of *SIRT6* and its relationship with the oxidative stress network depending on adiposity levels in Zucker rats, an animal model of metabolic syndrome.

## 2. Experimental Procedures

**2.1. Animals.** Male lean (Fa/fa;  $n = 10$ ) and obese (fa/fa;  $n = 10$ ) rats of the Zucker strain, 8 weeks old purchased from Charles River Laboratories (Barcelona, Spain), were maintained in controlled conditions of temperature, humidity, and illumination (12 h controlled photoperiod). They were allowed to acclimatize for 1 week on arrival. All rats had free access to water and standard laboratory diet (SAFE; Panlab, Spain), with 5.5% lipid, 23% protein, and 70% carbohydrate content. Body weight and food and water intake were measured during the experimental period. Finally (22 weeks), animals were euthanized and decapitated, and the livers and blood were obtained, immediately frozen on dry ice, and kept at  $-80^{\circ}\text{C}$  until analysis. All animal experiments and procedures involved in this study were approved by the Ethical Committee at the University of Santiago de Compostela, in accordance with the European Union Normative for the use of experimental animals.

In the experimental weight loss protocol, fatty rats ( $n = 30$ ) were randomly divided into three subgroups: an energy-restriction group (ER;  $n = 10$ ), an exercise group (EX;  $n = 10$ ), and an energy restriction plus exercise group (EREX;  $n = 10$ ). These fatty rats were individually housed for 1 week, and their individual food intake was weighed and recorded. Then, the rats in the ER and the EREX groups were fed a diet 30% less in quantity than their individual food intake during 4 weeks (based on the weight of food).

Animals from the EX and the EREX groups were placed on a monitored rodent treadmill (Treadmill system 303401-R-04/C, TSE-Systems, Inc., Chesterfield, MO, USA) for 10 min/day and increased progressively in intensity from 10 m/min to 20 m/min during 1 week for familiarization. After that, animals were placed on the treadmill for 30 min/day at 20 m/min, 7 days per week for 4 weeks.

**2.2. Body Composition.** Body composition studies were performed every 2 weeks using a nuclear magnetic resonance imaging (MRI) system (Whole Body Composition Analyser, EchoMRI, Echo Medical Systems, USA).

**2.3. RNA Extraction and Quantitative RT-PCR.** Total RNA extraction from the liver was performed using Trizol (Invitrogen) according to the manufacturer's recommendations. The RNA (500 ng) was retrotranscribed into cDNA using the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, USA). The expression of the genes of interest was studied using TaqMan real-time PCR in Step One Plus system (Applied Biosystems, USA) using specific primers and probes obtained from inventoried TaqMan Gene Expression Assays (Applied Biosystems, USA) for *SIRT6*, *SIRT1*, and *GST-M2* genes. All reactions were performed using the following cycling parameters:  $50^{\circ}\text{C}$  for 2 min,  $95^{\circ}\text{C}$  for 10 min, followed by 40 cycles of  $95^{\circ}\text{C}$  for 15 s,  $60^{\circ}\text{C}$  for 1 minute. For data analysis, the RNA level of the gene of interest was normalized using the  $\beta$ -actin values, according to the  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  method.

**2.4. Oxidative Stress Blood Analysis.** Plasmatic malondialdehyde (MDA) and total antioxidant capacity (TAC) were evaluated using commercially available colorimetric assay kits (OXIS International, Portland, OR, USA).

**2.5. Statistical Analysis.** The normal distribution was explored with the Kolmogorov-Smirnov test and the Shapiro-Wilk test. Because oxidative stress markers and gene expression levels were not normally distributed, the Mann-Whitney  $U$  test was applied to study the differences between obese and lean rats. The fold change in gene expression was calculated using the  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  relative quantitation method according to the manufacturer's guidelines (Applied Biosystems, USA) and reporting the data as the geometric mean (standard error of the mean, SEM). A  $p$  value  $< 0.05$  was considered to be statistically significant, and a  $p$  value  $\leq 0.1$  was considered to be a trend for significance. The potential association between oxidative stress biomarkers and gene expression levels was evaluated using the Spearman rank correlation coefficient. Statistical analysis was performed by SPSS 15.0 software (SPSS Inc., USA) for Windows XP (Microsoft, USA) and GraphPad Prism 6.01 software (GraphPad Software Inc., USA).

## 3. Results

**3.1. Characteristics of the Experimental Animal at 22 Weeks Old.** We fed rats a standard diet while monitoring body weight gain and body composition. At the end of the experiment, the obese rats (fa/fa) showed higher body weight and consequently higher fat mass ( $9\times$ ) as well as lower free fat mass than their lean littermates (Fa/fa) (Table 1). In addition, plasma levels of oxidative stress biomarkers as MDA and TAC at the end of the experimental period were lower in lean than in obese phenotype (Table 1).

**3.2. Hepatic Gene Expression of *SIRT6*, *SIRT1*, and *GST-M2*.** Obese rats showed a marked decrease in the hepatic gene

TABLE 1: Characteristics of the experimental animal at 22 weeks old.

	Obese ( <i>n</i> = 10)	Lean ( <i>n</i> = 10)	<i>p</i> value
Body weight (g)	559 ± 28	410 ± 30	<0.001
Fat mass (g)	213 ± 11	24 ± 6	<0.001
Free fat mass (g)	261 ± 49	303 ± 19	0.021
MDA (μM)	1.75 ± 0.64	0.61 ± 0.19	0.001
TAC (mM Trolox)	436 ± 191	265 ± 40	0.020

Data are represented as the mean ± standard error of the mean (SEM). *P* value shows statistically significant differences compared with the control-lean group. MDA: malondialdehyde; TAC: total antioxidant capacity.

expression of *SIRT6* (30%) and *SIRT1* (50%). These results in *SIRT6* and *SIRT1* gene expressions were also observed in an animal model of diet-induced obesity (DIO; Supplementary Figure 1). In addition, the hepatic gene expression of *GST-M2*, the antioxidant enzyme glutathione-S-transferase Mu2, was also reduced (30%) (Figure 1(a)).

Because *SIRT1* and *GST-M2* are two proteins with proven involvement in the antioxidant protection pathway, we performed an association study between *SIRT6* expression and *SIRT1* and *GST-M2* expression in livers from all rats taken together. Interestingly, the hepatic *SIRT6* mRNA levels were positively associated with the gene expression of *SIRT 1* ( $r = 0.59$ ;  $p = 0.007$ ) and *GST-M2* ( $r = 0.70$ ;  $p = 0.037$ ) (Figure 1(b)).

**3.3. Association of *SIRT6* Gene Expression with Body Weight, MDA, and TAC.** In accordance with the involvement of *SIRT6* in the regulation of oxidative stress process [10] and its association with *SIRT1* and *GST-M2* expression levels, we reasoned that the gene expression of *SIRT6* at the hepatic level should be correlated with body weight as well as with systemic markers of oxidative stress. In fact, increased hepatic *SIRT6* expression was associated with lower body weight (Figure 2(a)), lower plasma MDA levels (Figure 2(b)), and lower plasma TAC (Figure 2(c)).

**3.4. Weight Loss, Systemic Oxidative Stress, and Hepatic Gene Expression.** After the 4 weeks of weight loss treatments, the ER and EREX groups exhibited 26% less body weight (Figure 3(a)) than the Ad-L control group and similar to the lean control animals. No differences were observed between both groups or between the EX and the Ad-L group in body weight. According to the body weight loss data, the ER and EREX groups showed a significant reduction in the circulating levels of MDA and TAC (Figure 3(b)). Interestingly, in the EX group, despite not producing a reduction in body weight, it showed a reduction in the circulating levels of MAD and TAC similar to the effects observed for the EREX group (Figure 3(b)). Then, we investigated the effect of the weight loss interventions on hepatic gene expression of sirtuins and *GST-M2*. According to the body weight loss data, the ER and EREX groups but not the EX group showed a significant increase in *SIRT6* and *SIRT1* gene expressions

(Figure 3(c)). However, the expression of *GST-M2* showed no significant variations after the interventions (Figure 3(c)).

## 4. Discussion

This work shows that the oxidative stress induced by excess of adiposity is related to a downregulation of hepatic *SIRT6* expression in obese individuals. After weight loss induced by energy restriction, the hepatic *SIRT6* expression increases, concomitantly with an improvement in oxidative stress markers. Therefore, these results suggest that the potential role of *SIRT6* in the protection against oxidative stress damage could be a therapeutic target to treat the damage caused by the association between obesity and oxidative stress.

Sirtuins play an important regulatory role in energy metabolism and they may be a potential therapeutic target for obesity and associated pathologies [5]. Among the sirtuin family members, *sirt1* is the most well-studied sirtuin and it has been implicated in the protection against cellular oxidative stress, and it plays an important role in metabolic pathway regulation, specifically acting in adipocytes as an inhibitor of adipogenesis. Additionally, the expression of *SIRT1* is modulated by energy restriction in association with improvements in oxidative stress [7]. In this line, *SIRT6* was recently discovered as a relevant player in the predisposition to age-associated diseases [17]. The activity of *SIRT6* is reduced in obesity and diabetes and its hepatic-specific ablation increases liver steatosis onset [10]. However, the study of *SIRT6* is still very fresh [10]. In this work, we showed a downregulation of *SIRT6* in the liver of obese rats compared with their lean littermates.

The liver is a key metabolic organ controlling the overall lipid metabolism in response to hormonal and nutritional stimuli received and one of the organs most affected by excessive intake of carbohydrates or fat leading to metabolic pathologies associated with obesity. Several studies highlighted that obesity strongly contributes to the transition of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) to nonalcoholic steatohepatitis (NASH) and hepatocellular carcinoma (HCC) [18, 19]. The absence of *SIRT6* increases the expression of genes responsible for hepatic long-chain fatty acid uptake and reduced expression of genes for  $\beta$ -oxidation leading to accumulation of triglycerides and fatty liver disease and hepatic steatosis [10]. Additionally, the participation of ROS in liver disease has been suggested [20]. Moreover, it was observed that genes related to oxidative stress regulation are overexpressed in early stages of HCC [21]. In this regard, obesity produces various metabolic alterations that contribute very actively to the general oxidative balance, creating the basis for the development of diseases such as diabetes, hypertension, cardiovascular disease, and cancer, among others. According to the literature, the major contributors to systemic oxidative stress in obesity are hyperglycemia, increased muscle activity to support weight gain, high lipid levels in different tissues, chronic inflammation, low antioxidant defenses, endothelial ROS production, and hyperleptinemia [1]. Oxidative stress in obesity is a systematic problem that can be reduced by improving antioxidant defenses through fat reduction, physical activity or exercise,

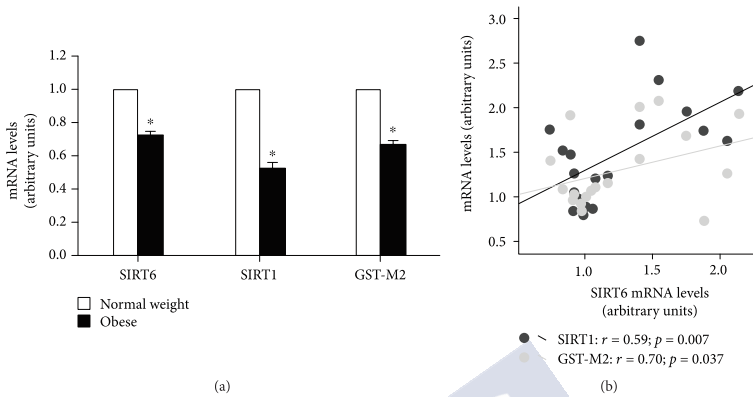


FIGURE 1: Liver expression of SIRT6, SIRT1, and GST-M2 genes in lean or obese rats (a). Data are represented as the mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM). Statistically significant differences compared with control-lean counterparts \* $p < 0.05$  vs. normal weight group. Association between SIRT6 mRNA levels with SIRT1 or GST-M2 genes in all animal taking together (b). SIRT1 ( $r = 0.59$ ;  $p = 0.007$ ), GST-M2 ( $r = 0.70$ ;  $p = 0.037$ ).

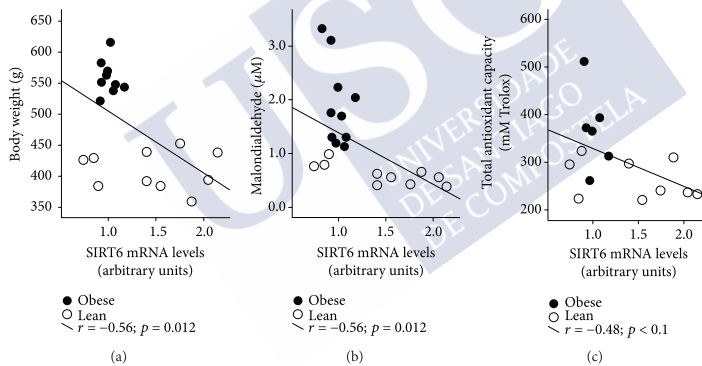


FIGURE 2: Association of SIRT6 gene expression with body weight (a), MDA (b), and TAC (c).

dietary restriction, surgical intervention, or antioxidant therapies which, based on the results showed in this work, may include *SIRT6*.

In accordance with a potential association between the expression of *SIRT6* with oxidative stress, we observed a correlation between *SIRT1* and *GST-M2*, both genes that codify proteins involved in the protection against oxidative stress [7, 22], which were also downregulated in the liver of obese fa/fa rats. These results suggest a dysregulation in the antioxidant defenses that promote the oxidative stress characteristic of obesity [23] which was confirmed by the high circulating levels of MDA and TAC.

The connection between oxidative stress, energy restriction, and sirtuin activity has been shown in the literature. The energy restriction reduces the cellular levels of NADH

by increasing the NAD<sup>+</sup>/NADH ratio and causing an increase in Sirt2 activity [24]. As in the case of Sirt2, Sirt6 activity is also influenced by energy restriction. Prolonged restriction results in increased activity of Sirt6 at the brain, muscle, white adipose tissue, and liver levels [12, 13]. In addition, Sirt6 is also a mediator of the effects induced by energy restriction. *SIRT6* suppression decreases life extension activated by energy restriction, and *SIRT6* overexpression shows reduced body weight, increased metabolism, and reduced serum levels of insulin, glucose, cholesterol, and several adipokines [13, 25].

In this sense, the data obtained in this study show that body weight loss is associated with an increase in hepatic *SIRT6* expression and a reduction in systematic oxidative stress biomarkers in a similar way to the well-studied *SIRT1*.



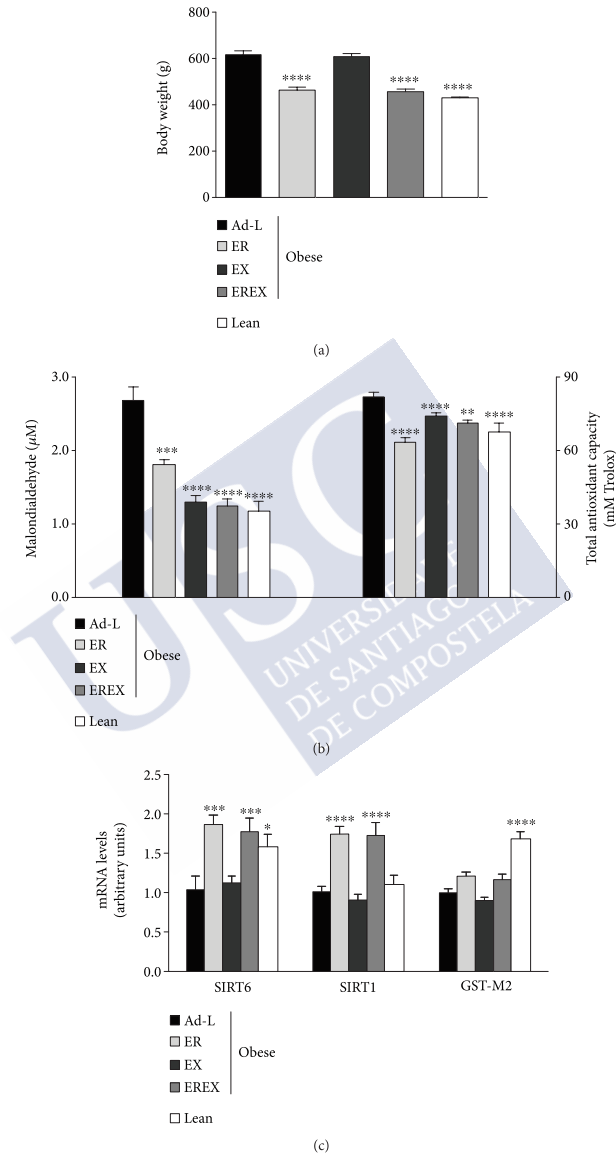


FIGURE 3: Effect of 4 weeks of weight loss interventions on body weight (a), serum oxidative stress biomarkers (b), and hepatic gene expression (c). Data are represented as mean and SEM,  $n = 6 - 10$  animals/group. \* $p < 0.05$  vs. the Ad-L group, \*\* $p < 0.01$  vs. the Ad-L group, \*\*\* $p < 0.001$  vs. the Ad-L group, \*\*\*\* $p < 0.0001$  vs. the Ad-L group. Ad-L: ad libitum group; ER: energy-restriction group; EX: exercise group; EREX: energy restriction plus exercise group.

According to the important role of Sirt6 in the liver related to lipidic and glucose metabolism [10], these effects are observed in models of caloric restriction; however, physical exercise does not seem to have any influence on hepatic SIRT6 expression, although exercise has a potent reducing effect of oxidative stress at the systemic level. This suggests that the exercise model produces a decrease in systemic oxidative stress similar to the energy restriction model but probably through a different mechanism in which the skeletal muscle may be involved. All these data suggest that *SIRT6* acts similarly to *SIRT1* and may play a key role in regulating energy metabolism and defense against oxidative stress.

In conclusion, the results of the current work evidenced that *SIRT6* gene expression shows similar pattern of *SIRT1* gene expression, the most-studied sirtuin member, in the context of relationship with excess body weight and the regulation of oxidative stress. It supports the idea of a prominent role for *SIRT6* as a potential therapeutic target for the treatment of obesity and associated disease, particularly liver disease.

### Abbreviations

ANOVA:	Analysis of variance
HCC:	Hepatocellular carcinoma
HFD:	High-fat diet
GST-M2:	Glutathione-S-transferase Mu2
MDA:	Plasmatic malondialdehyde
MRI:	Magnetic resonance imaging
NAFLD:	Nonalcoholic fatty liver disease
NASH:	Nonalcoholic steatohepatitis
ROS:	Reactive oxygen species
SIRT:	Sirtuin
TAC:	Total antioxidant capacity.

### Data Availability

The data used to support the findings of this study are available from the corresponding author upon request.

### Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest.

### Authors' Contributions

MCC and AGI designed and performed experiments and wrote the manuscript; MA helped with experiments and contributed to the discussion; ABC and FFC obtained funding, designed experiments, and wrote the manuscript. MCC, AGI, ABC, and FFC are the guarantors of this work and, as such, had full access to all the data in the study and take responsibility for the integrity of the data and accuracy of the data analysis. All authors have reviewed and approved the article and have read the journal's authorship agreement. Marcos C Carreira and Andrea G Izquierdo contributed equally to this work and should be considered co-first authors. Felipe F Casanueva and Ana

B. Crujeiras contributed equally to this work and should be considered co-main authors.

### Acknowledgments

Authors thank Maribel Rendo from the Department of Molecular and Cellular Endocrinology of Instituto de Investigacion Sanitaria de Santiago (IDIS) for her support of research data management. This study was supported by Centro de Investigacion Biomedica en Red de Fisiopatologia de la Obesidad y Nutricion (CIBERObn) and grants from the Instituto de Salud Carlos III (PI17/01287) cofinanced by the European Regional Development Fund (FEDER). Andrea G. Izquierdo is funded by CIBERObn and Ana B. Crujeiras is funded by a research contract "Miguel Servet" (CP17/00088) from the Instituto de Salud Carlos III, cofinanced by the European Regional Development Fund (FEDER).

### Supplementary Materials

Supplementary Figure 1: liver expression of SIRT6 and SIRT1 in lean or diet-induced obesity (DIO) Sprague Dawley rats (A). Data are represented as the mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM). Statistically significant differences compared with control-lean counterparts \* $p < 0.05$  vs. lean group. (*Supplementary Materials*)

### References

- [1] H. K. Vincent, K. E. Innes, and K. R. Vincent, "Oxidative stress and potential interventions to reduce oxidative stress in overweight and obesity," *Diabetes, Obesity & Metabolism*, vol. 9, no. 6, pp. 813–839, 2007.
- [2] A. B. Crujeiras, D. Parra, E. Goyenechea, I. Abete, P. González-Muniesa, and J. A. Martínez, "Energy restriction in obese subjects impact differently two mitochondrial function markers," *Journal of Physiology and Biochemistry*, vol. 64, no. 3, pp. 211–219, 2008.
- [3] O. Dizdar and E. Alyamac, "Obesity: an endocrine tumor?," *Medical Hypotheses*, vol. 63, no. 5, pp. 790–792, 2004.
- [4] L. A. Streba, C. C. Vere, I. Rogoveanu, and C. T. Streba, "Non-alcoholic fatty liver disease, metabolic risk factors, and hepatocellular carcinoma: an open question," *World Journal of Gastroenterology*, vol. 21, no. 14, pp. 4103–4110, 2015.
- [5] S. Michan and D. Sinclair, "Sirtuins in mammals: insights into their biological function," *The Biochemical Journal*, vol. 404, no. 1, pp. 1–13, 2007.
- [6] R. A. Frye, "Characterization of five human cDNAs with homology to the yeast SIR2 gene: Sir2-like proteins (sirtuins) metabolize NAD and may have protein ADP-ribosyltransferase activity," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 260, no. 1, pp. 273–279, 1999.
- [7] A. B. Crujeiras, D. Parra, E. Goyenechea, and J. A. Martínez, "Sirtuin gene expression in human mononuclear cells is modulated by caloric restriction," *European Journal of Clinical Investigation*, vol. 38, no. 9, pp. 672–678, 2008.
- [8] C. S. Lim, "Is SIRT6 a new biomarker for oxidative stress and longevity assurance gene?," *Medical Hypotheses*, vol. 69, no. 1, p. 231, 2007.

- [9] Y. Kanfi, V. Peshti, R. Gil et al., "SIRT6 protects against pathological damage caused by diet-induced obesity," *Aging Cell*, vol. 9, no. 2, pp. 162–173, 2010.
- [10] J. Kuang, L. Chen, Q. Tang, J. Zhang, Y. Li, and J. He, "The role of Sirt6 in obesity and diabetes," *Frontiers in Physiology*, vol. 9, p. 135, 2018.
- [11] E. Michishita, J. Y. Park, J. M. Burneski, J. C. Barrett, and I. Horikawa, "Evolutionarily conserved and nonconserved cellular localizations and functions of human SIRT proteins," *Molecular Biology of the Cell*, vol. 16, no. 10, pp. 4623–4635, 2005.
- [12] Y. Kanfi, R. Shalman, V. Peshti et al., "Regulation of SIRT6 protein levels by nutrient availability," *FEBS Letters*, vol. 582, no. 5, pp. 543–548, 2008.
- [13] J. Kuang, Y. Zhang, Q. Liu et al., "Fat-specific Sirt6 ablation sensitizes mice to high-fat diet-induced obesity and insulin resistance by inhibiting lipolysis," *Diabetes*, vol. 66, no. 5, pp. 1159–1171, 2017.
- [14] H. S. Kim, C. Xiao, R. H. Wang et al., "Hepatic-specific disruption of SIRT6 in mice results in fatty liver formation due to enhanced glycolysis and triglyceride synthesis," *Cell Metabolism*, vol. 12, no. 3, pp. 224–236, 2010.
- [15] J. E. Dominy Jr., Y. Lee, M. P. Jedrychowski et al., "The deacetylase Sirt6 activates the acetyltransferase GCN5 and suppresses hepatic gluconeogenesis," *Molecular Cell*, vol. 48, no. 6, pp. 900–913, 2012.
- [16] A. R. Moschen, V. Wieser, R. R. Gerner et al., "Adipose tissue and liver expression of SIRT1, 3, and 6 increase after extensive weight loss in morbid obesity," *Journal of hepatology*, vol. 59, no. 6, pp. 1315–1322, 2013.
- [17] P. Zhang, B. Tu, H. Wang et al., "Tumor suppressor p53 cooperates with SIRT6 to regulate gluconeogenesis by promoting FoxO1 nuclear exclusion," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 111, no. 29, pp. 10684–10689, 2014.
- [18] A. Marengo, C. Rosso, and E. Bugianesi, "Liver cancer: connections with obesity, fatty liver, and cirrhosis," *Annual Review of Medicine*, vol. 67, no. 1, pp. 103–117, 2016.
- [19] J. A. Marrero, R. J. Fontana, G. L. Su, H. S. Conjeevaram, D. M. Emick, and A. S. Lok, "NAFLD may be a common underlying liver disease in patients with hepatocellular carcinoma in the United States," *Hepatology*, vol. 36, no. 6, pp. 1349–1354, 2002.
- [20] Y. Sánchez-Pérez, C. Carrasco-Legleu, C. García-Cuellar et al., "Oxidative stress in carcinogenesis. Correlation between lipid peroxidation and induction of preneoplastic lesions in rat hepatocarcinogenesis," *Cancer Letters*, vol. 217, no. 1, pp. 25–32, 2005.
- [21] O. Beltrán-Ramírez, S. Sokol, V. le-Berre, J. M. François, and S. Villa-Treviño, "An approach to the study of gene expression in hepatocarcinogenesis initiation," *Translational Oncology*, vol. 3, no. 2, pp. 142–148, 2010.
- [22] A. B. Crujeiras, D. Parra, E. Goyenechea, I. Abete, and J. A. Martínez, "Tachyphylaxis effects on postprandial oxidative stress and mitochondrial-related gene expression in overweight subjects after a period of energy restriction," *European Journal of Nutrition*, vol. 48, no. 6, pp. 341–347, 2009.
- [23] H. K. Vincent and A. G. Taylor, "Biomarkers and potential mechanisms of obesity-induced oxidant stress in humans," *International Journal of Obesity*, vol. 30, no. 3, pp. 400–418, 2006.
- [24] L. Tasselli, Y. Xi, W. Zheng et al., "SIRT6 deacetylates H3K18ac at pericentric chromatin to prevent mitotic errors and cellular senescence," *Nature Structural & Molecular Biology*, vol. 23, no. 5, pp. 434–440, 2016.
- [25] Y. Kanfi, S. Naiman, G. Amir et al., "The sirtuin SIRT6 regulates lifespan in male mice," *Nature*, vol. 483, no. 7388, pp. 218–221, 2012.





## Clinical Research

## Weight loss normalizes enhanced expression of the oncogene survivin in visceral adipose tissue and blood leukocytes from individuals with obesity

Andrea G. Izquierdo<sup>1,2</sup> · Marcos C. Carreira<sup>2,3</sup> · Gemma Rodriguez-Carnero<sup>1</sup> · Alfredo Fernandez-Quintela<sup>2,4</sup> · Aurelio M. Sueiro<sup>3</sup> · Miguel A. Martinez-Olmos<sup>1,2</sup> · German Guzman<sup>5</sup> · Daniel De Luis<sup>6</sup> · Marcela A. S. Pinhel<sup>7</sup> · Carolina F. Nicoletti<sup>7</sup> · Carla B. Nonino<sup>7</sup> · Francisco J. Ortega<sup>2,8</sup> · Maria P. Portillo<sup>2,4</sup> · Jose M. Fernandez-Real<sup>2,8</sup> · Felipe F. Casanueva<sup>2,3</sup> · Ana B. Crujeiras<sup>1,2</sup>

Received: 18 February 2020 / Revised: 21 May 2020 / Accepted: 1 June 2020  
© The Author(s), under exclusive licence to Springer Nature Limited 2020

### Abstract

**Background/objectives** Survivin is an oncogene associated with a decrease in apoptosis, an increase in tumor growth, and poor clinical outcome of diverse malignancies. A correlation between obesity, cancer, and survivin is reported in the literature. To date, the impact of weight loss on change in survivin levels is understudied. This study was aimed at: (1) comparing survivin levels in adipose tissue (AT) from lean and obese animal models and evaluating changes after weight loss induced by energy restriction and/or exercise; (2) comparing survivin levels in normal weighted and obese humans and evaluating changes in survivin levels after weight loss induced by a very-low-calorie ketogenic diet (VLCKD) or bariatric surgery in AT and/or blood leukocytes (PBL/PBMCs).

**Subjects/methods** Survivin expression was evaluated in subcutaneous (SAT) and visceral (VAT) AT derived from animal models of monogenic (Zucker rats) and diet-induced obesity (Sprague Dawley rats and C57BL/6J mice) and after a 4-week weight-loss protocol of energy restriction and/or exercise. Plasma was used to measure the inflammatory status. Survivin expression was also evaluated in PBMCs from patients with obesity and compared with normal weight, in PBLs after VLCKD, and in SAT and/or PBLs after bariatric surgery.

**Results** Survivin expression was specifically higher in VAT from obese than lean animals, without differences in SAT. It decreased after weight loss induced by energy restriction and correlated with adiposity and inflammatory markers. In humans, the correlation between being obese and higher levels of survivin was confirmed. In obese subjects, survivin levels were reduced following weight loss after either VLCKD or bariatric surgery. Particularly, a decrease in PBMCs expression (not in SAT one) was found after surgery.

**Conclusions** Weight loss is effective in decreasing survivin levels. Also, PBL/PBMC should be regarded as appropriate mirror of survivin levels in VAT for the identification of an obesity-related protumoral microenvironment.

### Introduction

Obesity, a disease with epidemic proportions [1–3], is responsible for the development of numerous complications such as type 2 diabetes [4, 5], cardiovascular diseases [6], and several types of cancer [7]. This disease originates as a result of a positive energy balance that triggers an abnormal expansion and dysfunction of white adipose tissue [8, 9] and secretion of several bioactive molecules such as adipokines [10]. In addition, this excessive accumulation of visceral and ectopic fat leads to chronic low-grade inflammation [11], so recent research postulates the dysfunction of visceral adipose tissue (VAT) characteristic of obesity as the

These authors contributed equally: Andrea G. Izquierdo, Marcos C. Carreira

**Supplementary information** The online version of this article (<https://doi.org/10.1038/s41366-020-0630-7>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Ana B. Crujeiras  
anabelencrujeiras@hotmail.com

Extended author information available on the last page of the article

Published online: 16 June 2020

SPRINGER NATURE

**Table 1** Characteristics of animal experimental groups (Zucker rats, Sprague Dawley-DIO rats, and C57BL/6J-DIO mice).

	Zucker rats					DIO rats		DIO mice		
	Lean	Ob AL	Ob ER	Ob EX	Ob EREX	Lean	DIO	Lean	DIO	CR
<i>n</i>	10	10	10	10	10	12	14	4	8	8
Age (weeks)	20	20	20	20	20	16	16	38	38	38
Body weight (kg)	428.4 ± 20.2	617.7 ± 46.3 <sup>a</sup>	462.2 ± 38.5 <sup>b</sup>	606.3 ± 44.8 <sup>a,c</sup>	455.3 ± 37.6 <sup>b,d</sup>	228.5 ± 12.0	243.5 ± 21.5 <sup>a</sup>	34.5 ± 2.7	53.0 ± 2.7 <sup>a,c</sup>	42.5 ± 5.2 <sup>a,b</sup>
Fat mass (g)	36.7 ± 7.4	252.2 ± 24.8 <sup>a</sup>	184.5 ± 26.3 <sup>a,b</sup>	245.3 ± 18.9 <sup>a,c</sup>	173.6 ± 19.1 <sup>a,b,d</sup>	15.6 ± 5.2	32.5 ± 5.7 <sup>a</sup>	–	–	–
Fat-free mass (g)	321.2 ± 13.6	296.5 ± 17.7	241.1 ± 12.0 <sup>a,b</sup>	292.9 ± 21.6 <sup>c</sup>	246.0 ± 18.5 <sup>a,b,d</sup>	172.3 ± 7.8	170.0 ± 16.1	–	–	–

*Ob AL* obese ad libitum, *Ob ER* obese energy restriction, *Ob EX* obese exercise, *Ob EREX* obese energy restriction and exercise, *DIO* diet-induced obesity, *CR* caloric restriction.

<sup>a</sup>Statistically significant differences compared with lean.

<sup>b</sup>Statistically significant differences compared with Ob AL or DIO.

<sup>c</sup>Statistically significant differences compared with Ob ER or CR.

<sup>d</sup>Statistically significant differences compared with Ob EX.

mechanism responsible for the development of associated complications, such as metabolic diseases or cancer [12, 13]. In this line, previous works demonstrate that the link between obesity and cancer may be associated with the microenvironment generated by the effect of VAT dysfunction, which could promote the development of tumor [14]. In fact, waist-related measures were predictors of obesity-related cancer in a gender-dependent manner [15]. The cellular mechanisms underlying the association between obesity and cancer are not yet fully known, so new findings in this field will be very relevant in personalized and precision medicine for the treatment of cancers associated with obesity.

The oncogene survivin is a key member of the family of apoptosis inhibitors and is involved in the promotion of cell division. Survivin expression is increased in most tumors [16–19] and it may affect the response of tumor cells to anticancer agents and may be associated with alterations in survival in carcinogenic processes [19–22]. Survivin also acts on several types of non-tumor cells and tumor-free tissues [23], such as the fraction of AT-derived stem cells of obese subjects [24], and it has been identified as a key regulator of lipid storage and adipocyte metabolism [25]. Altered expression of survivin in non-tumor breast tissue of rats [26], in human cell line of non-tumor breast [26], and in tumor-free liver in rats [27] was also found, all in association with the effect of factors secreted by AT in obesity. These effects were also reflected in the circulating leukocytes of women with obesity with breast cancer and without tumor [26].

This work was aimed to evaluate and compare the expression of survivin in subcutaneous adipose tissue (SAT) and VAT of animal models of tumor-free obesity and determine the possible effect of weight-loss interventions. In addition, we aim to validate these results in patients with

obesity and after therapies for weight loss (very-low-calorie ketogenic diet (VLCKD) [28] and bariatric surgery).

## Materials and methods

### Animals

#### Monogenic obesity

The experimental studies (Table 1) were performed using 8-week-old male obese Zucker rats (*fa/fa*,  $n = 40$ ) and lean Zucker rats (*Fa/fa*,  $n = 10$ ) that were purchased from Charles River Laboratories (Barcelona, Spain). They were allowed to acclimatize for 1 week upon arrival and were provided with free access to water and a standard laboratory diet (SAFE—Panlab, Spain) that was comprised of 5.5% lipid, 23% protein, and 70% carbohydrate content. Body weight (BW) and food and water intake were measured throughout the experimental period.

A group of obese rats (*fa/fa*,  $n = 30$ ) was randomly divided into three subgroups that included an energy restriction group (Ob ER;  $n = 10$ ), an exercise group (Ob EX;  $n = 10$ ), and an energy restriction plus exercise group (Ob EREX;  $n = 10$ ). These obese rats were individually housed for 1 week, and their individual food intake was weighed and recorded. Then, the rats in the Ob ER and the Ob EREX groups were fed a diet that was 30% less in quantity compared with that of their individual food intake for 4 weeks (based on the weight of food), and the remaining rats and the rats in the control group (Ob AL;  $n = 10$ ) were maintained on an ad libitum diet. Animals from the Ob EX and the Ob EREX groups were placed on a monitored rodent treadmill (Treadmill system 303401-R-04/C, TSE-Systems, Inc, USA) for 10 min/day, and the

intensity of the exercise was increased progressively from 10 m/min to 20 m/min for 1 week to allow for familiarization. The animals were then placed on the treadmill for 30 min/day at 20 m/min, and this was continued for 7 days per week over a period of 4 weeks.

**Diet-induced obesity (DIO)**

Twenty-six male, 3-week old Sprague Dawley rats, and 20 male, 8-week old C57BL/6J mice [29], were obtained from the central animal facilities of the Universidad de Santiago de Compostela. After the acclimatization period (1 week), rodents were randomized into weight-matched groups (two groups and  $n = 12-14$  animals/group in rats; three groups and  $n = 4-8$  animals/group in mice). One group was provided with ad libitum access to a standard diet (SAFE—Panlab, Spain). The other groups were fed with a high-fat diet (HFD) (Open Source Diets, Research Diets; Brogaarden, Denmark, Reference D 12492) that consisted of 60% lipid, 20% protein, and 20% carbohydrate for 12 weeks in rats and 29 weeks in mice and, in addition, the group caloric restriction (CR) of mice was fed a diet that was 30% less in quantity compared with that of their individual food intake for last 3 weeks (based on the weight of food). BW, food, and water intake were measured throughout the experimental period (Table 1).

All animal experiments and procedures used in this study were approved by the Animal Care Committee of the University of Santiago de Compostela in accordance with our institutional guidelines and the European Union standards for the care and use of experimental animals.

**Humans**

**Obese and normal-weight patients as a cross-sectional cohort**

A group of healthy humans exhibiting normal weight ( $n = 29$ ;  $35.8 \pm 9.4$  years,  $22.1 \pm 2.2$  kg/m<sup>2</sup>) or obesity ( $n = 22$ ;  $40.1 \pm 11.3$  years;  $39.1 \pm 9.2$  kg/m<sup>2</sup>) was recruited for our study (Table 2). All participants were in apparent good health according to their medical history, physical examination, and routine biochemical and hematologic laboratory test results. The participants reported no use of supplemental vitamins, minerals, or regular prescription medications during the previous 3 months. Blood samples were obtained after overnight fasting, and the plasma was separated by centrifugation at 1268  $\times$  g and 4 °C for 15 min; then was frozen at -80 °C for subsequent analyses. The PBMCs were isolated by differential centrifugation using Polymorphprep (Axis Shield PoC AS, Norway). The cell pellet was resuspended in Trizol reagent (Invitrogen,

**Table 2** Anthropometric and biochemical parameters from the study subjects.

	Cross-sectional cohort		Longitudinal cohorts								
	NW	OB	VLCKD		BS cohort 1 [31]		BS cohort 2 [32]		BS cohort 3 [33]		
			B (0 day)	MK (30 days)	E (180 days)	B (0 day)	E (730 days)	B (0 day)	E (365 days)	B (0 day)	E (180 days)
<i>n</i>	29	22	25	25	25	16	16	16	16	13	13
Gender (men/women)	10/19	10/12	10/15	10/15	10/15	4/12	4/12	4/12	4/12	0/13	0/13
Age (years)	35.8 ± 9.4	40.1 ± 11.3	47.4 ± 9.5	47.4 ± 9.5	47.4 ± 9.5	39.3 ± 10.9	39.3 ± 10.9	39.3 ± 10.9	39.3 ± 10.9	35.9 ± 9.2	36.2 ± 9.3
Body weight (kg)	62.0 ± 8.8	110.5 ± 25.7 <sup>a</sup>	92.4 ± 10.5	83.3 ± 9.3 <sup>a</sup>	72.1 ± 9.1 <sup>a,b</sup>	155.4 ± 24.4	84.4 ± 21.9 <sup>a</sup>	155.4 ± 24.4	96.3 ± 19.5 <sup>a</sup>	115.3 ± 19.4	85.3 ± 13.8 <sup>a</sup>
Height (m)	1.7 ± 0.1	1.7 ± 0.1	1.7 ± 0.1	1.7 ± 0.1	1.7 ± 0.1	1.7 ± 0.1	1.7 ± 0.1	1.7 ± 0.1	1.7 ± 0.1	1.7 ± 0.2	1.7 ± 0.2
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	22.1 ± 2.2	39.1 ± 9.2 <sup>a</sup>	33.1 ± 1.6	29.9 ± 1.7 <sup>a</sup>	25.8 ± 1.7 <sup>a,b</sup>	53.3 ± 4.3	29.2 ± 5.5 <sup>a</sup>	53.3 ± 4.3	33.1 ± 5.0 <sup>a</sup>	42.5 ± 7.0	31.8 ± 5.4 <sup>a</sup>
WC (cm)	82.6 ± 11.6	116.8 ± 17.2 <sup>a</sup>	109.4 ± 8.1	101.0 ± 7.4 <sup>a</sup>	88.2 ± 6.5 <sup>a,b</sup>	—	—	—	—	124.4 ± 16.6	104.9 ± 14.0 <sup>a</sup>

B baseline, BMI body mass index, BS bariatric surgery, E endpoint, MK maximum ketosis, NW normal weight, OB obese, WC waist circumference.

<sup>a</sup>Statistically significant differences compared with control or baseline.

<sup>b</sup>Statistically significant differences compared with maximum ketosis.

Carlsbad, USA) and immediately frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$  until the RNA was extracted.

#### Obese patients following a VLCKD to lose weight as a longitudinal cohort

A group of obese patients undergoing treatment at the Department of Endocrinology and Nutrition at the University Clinical Hospital of Valladolid was recruited to undergo a nutritional intervention based on a VLCKD as a treatment for weight loss (PronoKal<sup>®</sup> Method) [30, 31]. The range of ages and body mass indexes (BMIs) of the obese patients were 1–65 years and 30 to 35 kg/m<sup>2</sup>, respectively. All participants ( $n = 25$ ) were generally healthy individuals, and they exhibited no serious medical conditions (Table 2). The study consisted of a clinical trial that possessed an open and controlled design and included an evaluation by a physician and expert dietitian, group meetings, and exercise recommendations performed in a hospital setting at 0 (baseline), 30 (maximum ketosis), and 180 (endpoint) days from the start of treatment (clinicaltrial.gov: NCT01865448). Blood samples were obtained after overnight fasting, and the plasma was separated by centrifugation at 1268  $\times$  g and 4  $^{\circ}\text{C}$  for 15 min. The plasma samples were then frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$  for subsequent analyses. PBL were stabilized in RNAlater Solution (Invitrogen, Carlsbad, USA) and immediately frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$  until the RNA was extracted.

#### Obese patients following a bariatric surgery as additional longitudinal cohorts

The cohorts 1 and 2 were constituted by samples of SAT from morbidly obese women (BMI  $>40$  kg/m<sup>2</sup>,  $n = 16$ ) before and  $\sim 1$  and  $\sim 2$  years after surgery-induced weight loss (Roux-en-Y gastric bypass (RYGB)). All these subjects were recruited at the Endocrinology Service of the Hospital of Girona “Dr Josep Trueta,” were of Caucasian origin, and reported that their BW had been stable for at least 3 months before the study. Patients had no systemic disease other than type 2 diabetes and obesity and all were free of any infections in the previous month before the study. Samples and data from patients were partially provided by the FAT-BANK platform promoted by the CIBEROBN and coordinated by the IDIBGI Biobank. The average BMI of bariatric patients was reduced by more than 30% after surgery (Table 2).

Wide gene expression (Affymetrix GeneChip<sup>®</sup> Human Gene 2.0 ST Array) and miRNA (miRNA 3.0 Array) profiles were analyzed by Ortega et al. [32]. Global gene expression using two different microarray platforms (AB 1700 and Illumina) was analyzed by Dankel et al. [33].

The cohort 3 was constituted by samples of PBMCs from women with morbid obesity (BMI  $>40$  kg/m<sup>2</sup>,  $n = 13$ )

before and 6 months after RYGB. All subjects were recruited at the Hospital das Clínicas of the Ribeirão Preto Medical School from Brazil. Patients with thyroid disease, cancer, and psychiatric disorders were excluded. After surgery, the average BMI of the patients was reduced by 25% (Table 2). Whole gene expression profiles were determined by microarray analysis (Illumina<sup>®</sup> BeadChip HumanHT-12\_v4 Array) [34].

All participants of the studies provided written informed consent validated and approved by the Ethics Committee of the institution (CEIC Galicia No. 2009/076; C.I.: 40/13, PNK-DHA2013-01; CEIC Girona No. 223/2004; CAEE: 18973913.0.0000.5440).

#### Body composition and biochemical measurements

In the animal models, weekly body composition studies were assessed using an Echo Magnetic Resonance Imaging System (EchoMRI 700; Echo Medical System, USA). Rodents were euthanized with CO<sub>2</sub> and decapitated, and organs and tissues were obtained, immediately frozen on dry ice, and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until analysis. Plasma levels of pro-inflammatory cytokine monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in Zucker rats were analyzed by ELISA following the manufacturer's protocol (Bio-Plex Pro<sup>™</sup> Cytokine MCP-1, Bio-Rad Laboratories, USA).

Patients were weighed on a calibrated scale (Seca 200 scale, Medical Resources, EPI Inc OH, USA). BMI was calculated as BW in kg divided by the square of the body height in meters. Waist circumference was measured using a standard flexible nonelastic metric tape over the midpoint between the last rib and the iliac crest, while the patient was standing and exhaling.

#### Gene expression assessment

RNA was isolated using Trizol (Invitrogen) from the VAT and SAT samples of rats and from leukocytes derived from patients according to the manufacturer's recommendations. The expression of survivin was assessed using TaqMan real-time PCR as previously describe [14, 27]. For data analysis, gene expression levels were normalized GAPDH as internal control, and they were expressed as the average value for the control group according to the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  method. RT-qPCR experiments were performed in compliance with the Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments guidelines ([http:// www.rndml.org/miqe](http://www.rndml.org/miqe)).

#### Protein extraction and western blot analysis

All the steps for extraction and preparation protein samples from tissue were carried out at 4  $^{\circ}\text{C}$  by following the



protocol required as previously described [27]. The data are expressed as percentages corrected for GAPDH (arbitrary units).

### Statistical analysis

The sample size of the current study was calculated to detect differences in BW in both animal and human cohorts. It was calculated to achieve a  $\alpha = 0.05$ , and a power  $(1-\beta)$  of 80%. Normal distributions were assessed using the Kolmogorov–Smirnov test and the Shapiro–Wilk test. Differences in BW and body composition, gene expression, and MCP-1 levels between the groups comprising subjects with normal weight and obesity were evaluated by Student's *t* test. In addition, differences between the weight-loss treatment groups were evaluated by univariate ANOVA for the animal model and by repeated-measurements ANOVA for the longitudinal cohort of patients; both analysis of variance followed by the Bonferroni multiple comparison test. The association between the expression of survivin and body composition and MCP-1 levels was evaluated by the rho Spearman test. All data are expressed as the mean  $\pm$  standard deviation in the tables and as the mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM) in the figures. *P* values  $< 0.05$  were considered statistically significant, and a *P* value  $\leq 0.1$  was considered to be indicative of a trend for significance. Statistical analysis was performed using SPSS 21.0 software (SPSS Inc, USA) for Windows XP (Microsoft, USA) and GraphPad Prism 6.01 software (GraphPad Software Inc, USA).

## Results

### Survivin gene expression in AT of rodents with obesity comparing with lean and in response to weight-loss intervention

In Zucker model, we fed rats a standard diet (ad libitum) while monitoring their BW gain and body composition. At the end of the experiment, the rats with obesity (*falfa*) exhibited a higher BW and higher fat mass (FM) compared with that of their lean littermates (*Falfa*) (Table 1), without statistically significant differences in fat-free mass (FFM). Regarding to the expression of survivin (Fig. 1), no statistically significant differences were observed in SAT between rats with obesity and lean. By contrast, higher levels of both gene (Fig. 1a) and protein (Fig. 1b) expression were observed in VAT from rats with obesity than lean. These differences were statistically significant.

After 4 weeks of weight loss, Ob ER and Ob EREX groups possessed a BW less than Ob AL group and were

similar to lean control (Table 1); however, no differences were observed between the BW of the Ob EX and the Ob AL groups. According to BW loss, the amount of FM was also reduced by a similar amount in Ob ER and Ob EREX groups, and there was a modest reduction in the amount of FFM (Table 1).

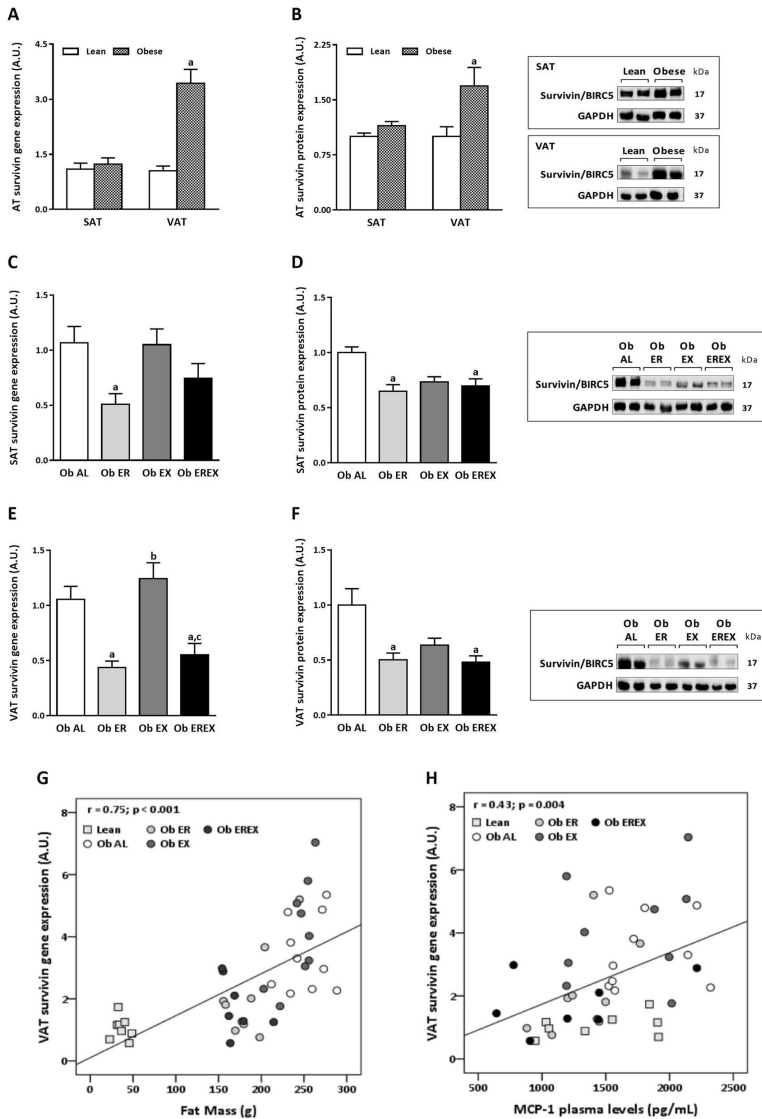
In the context of weight loss, survivin gene expression (Fig. 1c) and protein levels (Fig. 1d) in SAT were reduced more significantly in Ob ER group, while Ob EX and Ob EREX groups exhibited no statistically important changes. In VAT, a relevant and statistically significant reduction was observed in Ob ER and Ob EREX groups compared with Ob AL group (Fig. 1e, f). Ob EX group exhibited an expression similar to Ob AL group, where the survivin expression levels were significantly higher than in Ob ER and Ob EREX groups (Fig. 1e, f).

Moreover, correlation analysis revealed a positive association between the survivin expression levels in VAT and FM (Fig. 1g) and the circulating levels of MCP-1 (Fig. 1h). All the observed associations were statistically significant except between survivin expression in VAT and FFM as well as the expression in SAT and BW, FM, FFM, and MCP-1 (Supplementary 1b–f).

In DIO models, we found similar data to those observed in Zucker rats. Specifically, Sprague Dawley rats with obesity exhibited a higher survivin gene expression in VAT compared with lean rats (Supplementary 2a). Mice with obesity also exhibited a higher survivin gene expression in VAT, which was reduced to levels similar to lean group after CR by weight loss (Supplementary 2b). Interestingly, in this DIO model, survivin expression in SAT was also increased in the group with obesity and reduced after CR (Supplementary 2b).

### Survivin gene expression in human with obesity comparing with normal weight and in response to weight-loss intervention

The analysis of the survivin gene expression in PBMCs of individuals with obesity revealed higher levels compared with those of normal-weight individuals, mirroring the results observed in the VAT of the animal model (Fig. 2a). Moreover, a positive correlation was observed between survivin expression in PBMCs and the BMI (Fig. 2b). It is also relevant that the analysis of the survivin gene expression in the PBLs of patients with obesity undergoing a VLCKD revealed a decrease at the maximum ketosis point (mean of 9 kg of BW loss) and endpoint phase (mean of 20 kg of BW loss) compared with baseline (Fig. 2c). These results are in agreement with those obtained from our animal model after energy restriction-induced weight loss and again a positive correlation was observed between survivin expression in PBLs and the BMI (Fig. 2d). Evolution of



BW, waist circumference, and BMI is represented in Table 2.

To reinforce these findings, we analyzed previously published data from studies of bariatric surgery-induced

weight loss at 2 years [32], at 1 year [33], and at 6 months [34]. The expression of survivin in SAT did not change after 2 or 1 years following bariatric surgery (Fig. 2e); however, according to results of VLCKD observed, the

◀ **Fig. 1 Survivin expression (gene and protein) in AT from obese Zucker rats after weight-loss intervention.** Survivin gene expression (a) and protein levels (b) in SAT and VAT from lean and obese animals. Effect of 4 weeks of weight-loss interventions on survivin expression compared with that in the obese ad libitum group. Survivin gene expression (c) and protein levels (d) in SAT. Survivin gene expression (e) and protein levels (f) in VAT. Correlation between survivin transcript levels in VAT and FM (g), and MCP-1 (h). Data are represented as the mean  $\pm$  SEM,  $n = 10$  animals/group. <sup>a</sup> $P < 0.05$  vs. Ob AL, <sup>b</sup> $P < 0.05$  vs. Ob ER, and <sup>c</sup> $P < 0.05$  Ob EX. Ob AL were evaluated by univariate ANOVA and Bonferroni post hoc tests. Ob AL obese ad libitum group, Ob ER obese energy restriction group, Ob EX obese exercise group, Ob EREX obese energy restriction plus exercise group.

expression of survivin in PBMCs was significantly decreased after 6 months following bariatric surgery-induced weight loss (Fig. 2c).

## Discussion

Survivin is an oncogene that was characterized as one of the most powerful inhibitors of apoptosis [35, 36]. In this study, we demonstrated that survivin expression in obesity is elevated in VAT compared with that in SAT by using animal models of both genetic and DIO, such over-expression is reversible under energy-restricting conditions. These findings were also demonstrated in blood leukocytes from patients with obesity compared with lean individuals and after weight-loss interventions with a VLCKD or bariatric surgery.

During this century, the close relationship between obesity and cancer has become evident and represents one of the greatest challenges among the pathologies associated with obesity [37]. Despite this, the mechanisms responsible for this association have not yet been characterized in detail. Previous studies have revealed that leptin levels induce carcinogenesis and this effect could be mediated in part by survivin [24, 38, 39]. Leptin upregulates survivin expression in cardiomyocytes and breast cancer cells [40, 41]. Subjects with obesity have high levels of circulating leptin unable to exert its function, a state named leptin resistance [42, 43]. Relevantly, the current study has been performed using Zucker rats, a monogenic obesity model that presents a missense mutation in the leptin receptor gene, which reduces its affinity for leptin and its capacity for signal transduction [44]. Therefore, the obesity-related expression of survivin observed in this study may be independent of the action of leptin. The increased expression of survivin in both genetic and DIO was specially detected in VAT, while the transcript levels of survivin was similar in SAT from animals with obesity than animals with normal weight. Conversely, when the expression of survivin was evaluated in animals that were fed a HFD during a long time (29 vs. 12 weeks), the obesity-related increase in the expression of

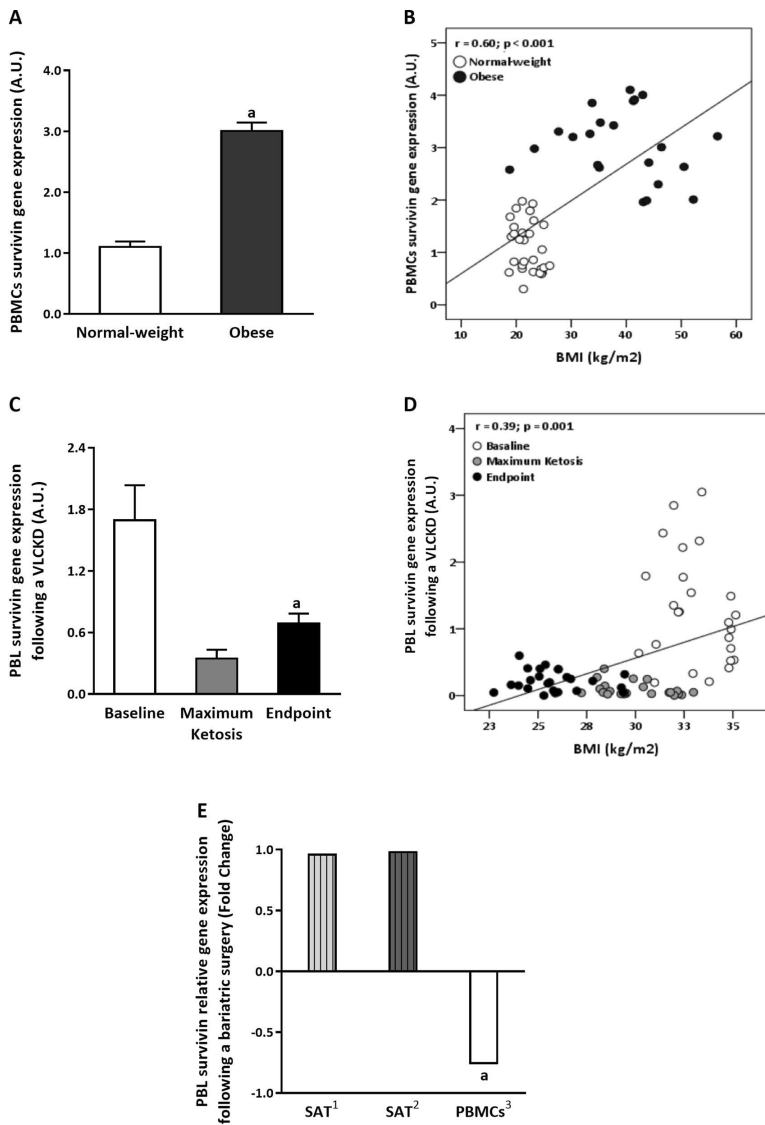
survivin was also observed in the SAT of these animals. These results could suggest that survivin is regulated by factors induced by a dysfunctional VAT, such as inflammation and oxidative stress, which were proposed as major promoters of obesity-related diseases, such as insulin resistance, cardiovascular disease, and cancer [12, 13]. So, exposing an obesogenic environment for a long time would also alter the functionality of the SAT which could secrete the same inflammatory and oxidative stress factors that regulate survivin expression in both VAT and SAT of these animals.

Weight-loss treatments considerably reduce these intrinsic pathological conditions within AT, and therefore, they also decrease the health risks [45–47]. In this context, our data clearly indicate that survivin levels in VAT and in SAT are reduced by 50% after weight loss induced by energy restriction treatment. It suggests that survivin expression is associated with adiposity features. In fact, positive correlations with BW and FM were observed in the animal model of Zucker rats. Correlations were also observed between survivin expression and plasma levels of MCP-1, a relevant marker of obesity-related inflammation.

Even though physical exercise is able to induce a reduction in several pathological conditions associated to obesity, in the current study, physical exercise did not influence the survivin expression. Further studies are needed to demonstrate if the expression of survivin is not modulated by exercise or whether more time or intensity of exercise is necessary to detect these effects.

In order to translate the preclinical results to a clinical setting, in the current study, the survivin expression was also evaluated in human PBMCs, as similar of that observed in AT. Accordingly, the results observed in the animal models were replicated in PBMCs from patients with obesity compared with subjects who were normal weight. Moreover, after weight loss induced by energy-restricted diet or bariatric surgery [34] the survivin expression in blood leukocytes was downregulated and correlated with obesity features; similar to that observed in the preclinical models. However, the expression of survivin did not change in SAT from patients after bariatric surgery [32, 33]. It could suggest that the expression of survivin in PBMCs could be mirroring the expression of this gene in VAT. In fact, both, a VLCKD [31] and bariatric surgery [48] are able to induce a huge reduction in BW and FM, particularly visceral FM. These finding further corroborates the use of blood leukocytes as a noninvasive model for the molecular monitoring of the state of AT in both physiological and pathological states.

Therefore, our current study revealed an increase in the antiapoptotic pathways in AT under conditions of obesity and their correlation with the degree of systemic inflammation in animal models, highlighting that survivin could be related to the abnormal expansion of FM and the



development of tumor processes. Notably, our findings also indicate that these associations between survivin expression and adiposity features are restored after weight loss.

The strength of this study is the use of different animal models of obesity and the development of an energy restriction treatment to lose weight in both genetic and DIO

◀ **Fig. 2 Survivin gene expression in humans related with adiposity grade.** **a** Survivin gene expression in PBMCs in normal-weight subjects compared with patients with obesity. Data are represented as the mean  $\pm$  SEM,  $n = 22$ – $29$  subjects/group.  $^{\#}P < 0.05$  vs. normal weight, evaluated by Student's *t* test. **b** Correlation between the survivin transcripts levels in PBMCs and BMI in a group of healthy with obesity and normal-weight patients. **c** Survivin gene expression in PBL in patients with obesity after VLCKD treatment. Data are represented as the mean  $\pm$  SEM,  $n = 25$  subjects/group.  $^{\#}P < 0.05$  vs. baseline. **d** Correlation between the survivin transcript levels in PBLs and BMI in humans following a VLCKD. **e** Survivin gene expression in SAT and PBMCs from patients with obesity following bariatric surgery. Data are represented as the fold change in survivin transcript levels after bariatric surgery and were obtained from previously published studies following bariatric surgery-induced weight loss at 2 years ( $^1$ Ortega study [32]), at 1 year ( $^2$ Dankel study [33]), and at 6 months ( $^3$ Pinhel study [34]).  $^{\#}P < 0.05$  vs. before bariatric surgery intervention.

models. Other strength is the replication of the preclinical results in a noninvasive sample from human cohorts of obesity and after weight-loss therapies such as a VLCKD or bariatric surgery. In fact, this study provides for the first time, evidence revealing that survivin is mainly over-expresses in obesity-related VAT and it can be evaluated in blood leukocytes for monitoring the evolution of obesity pathogenesis. A limitation of this study could be its observational design and the lack of VAT in the longitudinal cohort of patients after energy restriction treatment or bariatric surgery. This fact only allows proposing hypothesis and mechanisms on the potential involvement of VAT survivin expression in the association between obesity and cancer, rather than demonstrating causality; but they warrant the need for further studies to demonstrate the role of survivin expression in the pathogenesis of obesity.

In conclusion, the oncogene survivin has emerged as an important molecule in the biology of AT, as its expression levels could be involved in the development and maintenance of obesity. This molecule may also provide a potential link between obesity and cancer. Our results show that its expression is increased in obesity, and it is particularly elevated in VAT, a type of fat responsible for the secretion of cytokines and pro-inflammatory factors. Interventions for weight loss can reverse this effect, ultimately decreasing the levels to values similar to those of the control group. In the human cohorts evaluated, the same pattern of expression was observed, where they increased in obesity and decreased after weight-loss interventions. These data suggest that survivin could be used as a possible biomarker for the identification of a pro-tumorigenic microenvironment that may result from obesity and prevented after a therapy to lose weight. In addition, our findings also reinforce the idea of using minimally invasive human samples (blood/leukocytes) to monitor non-accessible tissues in the management of obesity.

**Acknowledgements** The authors thank Maribel Rendo and Maria Amil from the Department of Molecular and Cellular Endocrinology of the Instituto de Investigacion Sanitaria de Santiago (IDIS) for their support with research data management. This study was supported by the Centro de Investigacion Biomedica en Red de Fisiopatologia de la Obesidad y Nutricion (CIBERObn) and grants from the Instituto de Salud Carlos III-ISCIII (PI17/01287), and it was cofinanced by the European Regional Development Fund (FEDER). ABC is funded by a research contract "Miguel Servet" (CP17/00088) from the ISCIII and cofinanced by the European Regional Development Fund (FEDER).

**Author contributions** AGI and ABC designed the study. AGI, MCC, AFQ, and MPP contributed to the acquisition of the data and samples from the animal models. GRC, MAMO, and AMS contributed to the acquisition of the data and samples from human. GG and DDL performed the nutrition intervention to lose weight. FJO, JMFR, CFN, CBN, and MASP contributed to the acquisition of the data and samples from the bariatric surgery cohort. AGI and ABC performed the statistical analysis. AGI, MCC, and ABC wrote the first draft of the paper, and FFC contributed to the interpretation of data and critical revision of the paper. All authors were involved in the writing of the paper and approved the final version of this article.

### Compliance with ethical standards

**Conflict of interest** ABC, FFC, and DDL received research grants and conference fees from Pronokal Spain. GG is medical director of Pronokal Group. The other authors declare no conflict of interest regarding the results of this study.

**Publisher's note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

### References

1. Apovian CM. Obesity: definition, comorbidities, causes, and burden. *Am J Manag Care.* 2016;22:s176–85.
2. Blüher M. Obesity: global epidemiology and pathogenesis. *Nat Rev Endocrinol.* 2019;15:288–98.
3. NCD Risk Factor Collaboration (NCD-RisC). Worldwide trends in body-mass index, underweight, overweight, and obesity from 1975 to 2016: a pooled analysis of 2416 population-based measurement studies in 128.9 million children, adolescents, and adults. *Lancet.* 2017;390:2627–42.
4. NCD Risk Factor Collaboration (NCD-RisC). Worldwide trends in diabetes since 1980: a pooled analysis of 751 population-based studies with 4.4 million participants. *Lancet.* 2016;387:1513–30.
5. Leitner DR, Frubbeck G, Yumuk V, Schindler K, Micic D, Woodward E, et al. Obesity and type 2 diabetes: two diseases with a need for combined treatment strategies—EASO can lead the way. *Obes Facts.* 2017;10:483–92.
6. Van Gaal LF, Mertens IL, De Block CE. Mechanisms linking obesity with cardiovascular disease. *Nature.* 2006;444:875–80.
7. Lauby-Secretan B, Scoccianti C, Loomis D, Grosse Y, Bianchini F, Straif K, et al. Body fatness and cancer-viewpoint of the IARC working group. *N Engl J Med.* 2016;375:794–8.
8. Carobbio S, Pellegrinelli V, Vidal-Puig A. Adipose tissue function and expandability as determinants of lipotoxicity and the metabolic syndrome. *Adv Exp Med Biol.* 2017;960:161–96.
9. Blüher M. Adipose tissue dysfunction in obesity. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2009;117:241–50.

10. Choe SS, Huh JY, Hwang JJ, Kim JI, Kim JB. Adipose Tissue Remodeling: Its Role in Energy Metabolism and Metabolic Disorders. *Front Endocrinol.* 2016;7:30.
11. Crewe C, An YA, Scherer PE. The ominous triad of adipose tissue dysfunction: inflammation, fibrosis, and impaired angiogenesis. *J Clin Invest.* 2017;127:74–82.
12. Juárez-Rojas JG, Torre-Villalva I, Medina-Urrutia AX, Reyes-Barrera J, Sainz-Escarrega VH, Posadas-Romero C, et al. Participation of white adipose tissue dysfunction on circulating HDL cholesterol and HDL particle size in apparently healthy humans. *Int J Obes (Lond).* 2020;44:920–8.
13. Longo M, Zatterale F, Naderi J, Parrillo L, Formisano P, Raciti GA. Adipose tissue dysfunction as determinant of obesity-associated metabolic complications. *Int J Mol Sci.* 2019;20:2358.
14. Cabia B, Andrade S, Carreira MC, Casanueva FF, Crujeiras AB. A role for novel adipose tissue-secreted factors in obesity-related carcinogenesis. *Obes Rev.* 2016;17:361–76.
15. Chadid S, Kregler BE, Singer MR, Loring Bradley M, Moore LL. Anthropometric measures of body fat and obesity-related cancer risk: sex-specific differences in Framingham Offspring Study adults. *Int J Obes (Lond).* 2020;44:601–8.
16. Ambrosini G, Adida C, Altieri DC. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat Med.* 1997;3:917–21.
17. Kolb R, Sutterwala FS, Zhang W. Obesity and cancer: inflammation bridges the two. *Curr Opin Pharmacol.* 2016;29:77–89.
18. Mita AC, Mita MM, Nawrocki ST, Giles FJ. Survivin: key regulator of mitosis and apoptosis and novel target for cancer therapeutics. *Clin Cancer Res.* 2008;14:5000–5.
19. Nachmias B, Ashhab Y, Ben-Yehuda D. The inhibitor of apoptosis protein family (IAPs): an emerging therapeutic target in cancer. *Semin Cancer Biol.* 2004;14:231–43.
20. Als AB, Dyrskjot L, von der Maase H, Koed K, Mansilla F, Toldbod HE, et al. Emmprin and survivin predict response and survival following cisplatin-containing chemotherapy in patients with advanced bladder cancer. *Clin Cancer Res.* 2007;13:4407–14.
21. Derin D, Soydic HO, Guney N, Tas F, Camlica H, Duranyildiz D, et al. Serum levels of apoptosis biomarkers, survivin and TNF- $\alpha$  in nonsmall cell lung cancer. *Lung Cancer.* 2008;59:240–5.
22. Zaffaroni N, Daidone MG. Survivin expression and resistance to anticancer treatments: perspectives for new therapeutic interventions. *Drug Resist Updat.* 2002;5:65–72.
23. Fukuda S, Pelus LM. Survivin, a cancer target with an emerging role in normal adult tissues. *Mol Cancer Ther.* 2006;5:1087–98.
24. Ejarque M, Ceperuelo-Mallafre V, Serena C, Pachon G, Nunez-Alvarez Y, Terron-Puig M, et al. Survivin, a key player in cancer progression, increases in obesity and protects adipose tissue stem cells from apoptosis. *Cell Death Dis.* 2017;8:e2802.
25. Ju L, Zhang X, Deng Y, Han J, Yang J, Chen S, et al. Enhanced expression of Survivin has distinct roles in adipocyte homeostasis. *Cell Death Dis.* 2017;8:e2533.
26. Crujeiras AB, Cabia B, Carreira MC, Amil M, Cueva J, Andrade S, et al. Secreted factors derived from obese visceral adipose tissue regulate the expression of breast malignant transformation genes. *Int J Obes.* 2016;40:514–23.
27. Izquierdo AG, Carreira MC, Amil M, Mosteiro CS, Garcia-Caballero T, Fernandez-Quintela A, et al. An energy restriction-based weight loss intervention is able to reverse the effects of obesity on the expression of liver tumor-promoting genes. *FASEB J.* 2019;34:2312–25.
28. Trimboli P, Castellana M, Bellido D, Casanueva FF. Confusion in the nomenclature of ketogenic diets blurs evidence. *Rev Endocr Metab Disord.* 2020;21:1–3.
29. Heiker JT, Kunath A, Kosacka J, Flehmig G, Knigge A, Kern M, et al. Identification of genetic loci associated with different responses to high-fat diet-induced obesity in C57BL/6N and C57BL/6J substrains. *Physiol Genomics.* 2014;46:377–84.
30. de Luis D, Domingo JC, Izaola O, Casanueva FF, Bellido D, Sajoux I. Effect of DHA supplementation in a very low-calorie ketogenic diet in the treatment of obesity: a randomized clinical trial. *Endocrine.* 2016;54:111–22.
31. Gomez-Arbelaez D, Bellido D, Castro AI, Ordóñez-Mayán L, Carreira J, Galban C, et al. Body composition changes after very-low-calorie ketogenic diet in obesity evaluated by 3 standardized methods. *J Clin Endocrinol Metab.* 2017;102:488–98.
32. Ortega FJ, Mercader JM, Moreno-Navarrete JM, Nonell L, Puigdecanet E, Rodríguez-Hermosa JJ, et al. Surgery-induced weight loss is associated with the downregulation of genes targeted by MicroRNAs in adipose tissue. *J Clin Endocrinol Metab.* 2015;100:E1467–76.
33. Dankel SN, Fadnes DJ, Stavrum AK, Stansberg C, Holdhus R, Hoang T, et al. Switch from stress response to homeobox transcription factors in adipose tissue after profound fat loss. *PLoS ONE.* 2010;5:e11033.
34. Pinhel MAS, Noronha NY, Nicoletti CF, de Oliveira BAP, Cortes-Oliveira C, Pinhanelli VC, et al. Changes in global transcriptional profiling of women following obesity surgery bypass. *Obes Surg.* 2018;28:176–86.
35. Reichert S, Rodel C, Mirsch J, Harter PN, Tomicic MT, Mittelbronn M, et al. Survivin inhibition and DNA double-strand break repair: a molecular mechanism to overcome radioresistance in glioblastoma. *Radiother Oncol.* 2011;101:51–8.
36. Vequaud E, Desplanques G, Jezequel P, Juin P, Barille-Nion S. Survivin contributes to DNA repair by homologous recombination in breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat.* 2016;155:53–63.
37. Avgerinos KI, Spyrou N, Mantzoros CS, Dalamaga M. Obesity and cancer risk: emerging biological mechanisms and perspectives. *Metabolism.* 2019;92:121–35.
38. Knight BB, Oprea-Ilie GM, Nagalingam A, Yang L, Cohen C, Saxena NK, et al. Survivin upregulation, dependent on leptin-EGFR-Notch1 axis, is essential for leptin-induced migration of breast carcinoma cells. *Endocr Relat Cancer.* 2011;18:413–28.
39. Palianopoulou M, Papanikolaou V, Stefanou N, Tsezou A. The activation of leptin-mediated survival is limited by the inducible suppressor SOCS-3 in MCF-7 cells. *Exp Biol Med.* 2011;236:70–6.
40. Jiang H, Yu J, Guo H, Song H, Chen S. Upregulation of survivin by leptin/STAT3 signaling in MCF-7 cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008;368:1–5.
41. McGaffin KR, Zou B, McTiernan CF, O'Donnell CP. Leptin attenuates cardiac apoptosis after chronic ischaemic injury. *Cardiovasc Res.* 2009;83:313–24.
42. Crujeiras AB, Carreira MC, Cabia B, Andrade S, Amil M, Casanueva FF. Leptin resistance in obesity: an epigenetic landscape. *Life Sci.* 2015;140:57–63.
43. Izquierdo AG, Crujeiras AB, Casanueva FF, Carreira MC. Leptin, obesity, and leptin resistance: where are we 25 years later? *Nutrients.* 2019;11:2704.
44. Chua SC Jr., White DW, Wu-Peng XS, Liu SM, Okada N, Kershaw EE, et al. Phenotype of fatty due to Gln269Pro mutation in the leptin receptor (Lepr). *Diabetes.* 1996;45:1141–3.
45. Crujeiras AB, Gomez-Arbelaez D, Zulet MA, Carreira MC, Sajoux I, de Luis D, et al. Plasma FGF21 levels in obese patients undergoing energy-restricted diets or bariatric surgery: a marker of metabolic stress? *Int J Obes.* 2017;41:1570–8.
46. Lopez-Domenech S, Martínez-Herrera M, Abad-Jimenez Z, Morillas C, Escribano-Lopez I, Diaz-Morales N, et al. Dietary weight loss intervention improves subclinical atherosclerosis and oxidative stress markers in leukocytes of obese humans. *Int J Obes.* 2019;43:2200–9.

Weight loss normalizes enhanced expression of the oncogene survivin in visceral adipose tissue and...

47. Carreira MC, Izquierdo AG, Amil M, Casanueva FF, Crujeiras AB. Oxidative stress induced by excess of adiposity is related to a downregulation of hepatic SIRT6 expression in obese individuals. *Oxid Med Cell Longev*. 2018;2018:6256052.
48. Merlotti C, Ceriani V, Morabito A, Pontiroli AE. Subcutaneous fat loss is greater than visceral fat loss with diet and exercise, weight-loss promoting drugs and bariatric surgery: a critical review and meta-analysis. *Int J Obes*. 2017;41:672–82.

## Affiliations

Andrea G. Izquierdo<sup>1,2</sup> · Marcos C. Carreira<sup>2,3</sup> · Gemma Rodriguez-Carnero<sup>1</sup> · Alfredo Fernandez-Quintela<sup>2,4</sup> · Aurelio M. Sueiro<sup>3</sup> · Miguel A. Martinez-Olmos<sup>1,2</sup> · German Guzman<sup>5</sup> · Daniel De Luis<sup>6</sup> · Marcela A. S. Pinhel<sup>7</sup> · Carolina F. Nicoletti<sup>7</sup> · Carla B. Nonino<sup>7</sup> · Francisco J. Ortega<sup>1,2,8</sup> · Maria P. Portillo<sup>2,4</sup> · Jose M. Fernandez-Real<sup>2,8</sup> · Felipe F. Casanueva<sup>2,3</sup> · Ana B. Crujeiras<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Epigenomics in Endocrinology and Nutrition Group, Instituto de Investigacion Sanitaria (IDIS), Complejo Hospitalario Universitario de Santiago (CHUS/SERGAS), Santiago de Compostela, Spain

<sup>2</sup> CIBER Fisiopatologia de la Obesidad y Nutricion (CIBERObn), Madrid, Spain

<sup>3</sup> Molecular Endocrinology Group, Instituto de Investigacion Sanitaria (IDIS), Complejo Hospitalario Universitario de Santiago (CHUS/SERGAS) and Santiago de Compostela University (USC), Santiago de Compostela, Spain

<sup>4</sup> Nutrition and Obesity Group, Department of Nutrition and Food Science, University of the Basque Country (UPV/EHU) and Lucio Lascaray Research Institute, Vitoria, Spain

<sup>5</sup> Medical Department Pronokal, Pronokal Group, Barcelona, Spain

<sup>6</sup> Endocrinology and Nutrition Research Center, School of Medicine, Department of Endocrinology and Nutrition, Hospital Clínico Universitario, University of Valladolid, Valladolid, Spain

<sup>7</sup> Department of Internal Medicine, Laboratory of Nutrigenomic Studies, Ribeirao Preto Medical School, FMRP, University of Sao Paulo, USP, Sao Paulo, Brazil

<sup>8</sup> Department of Diabetes, Endocrinology, and Nutrition (UDEN), Institut d'Investigació Biomèdica de Girona (IdIBGi), Girona, Spain









ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Clinical Nutrition

journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/clnu>

Original article

## Epigenetic landscape in blood leukocytes following ketosis and weight loss induced by a very low calorie ketogenic diet (VLCKD) in patients with obesity

Ana B. Crujeiras<sup>a, h, \*, 1</sup>, Andrea G. Izquierdo<sup>a, h, 1</sup>, David Primo<sup>b</sup>, Fermin I. Milagro<sup>c, h</sup>, Ignacio Sajoux<sup>d</sup>, Amalia Jácome<sup>e</sup>, Alfredo Fernandez-Quintela<sup>f, h</sup>, María P. Portillo<sup>f, h</sup>, J. Alfredo Martínez<sup>c, h</sup>, Miguel A. Martínez-Olmos<sup>a, h</sup>, Daniel de Luis<sup>b</sup>, Felipe F. Casanueva<sup>g, h</sup>

<sup>a</sup> Epigenomics in Endocrinology and Nutrition Group, Epigenomics Unit, Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago de Compostela (IDIS), Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela (CHUS/SERGAS), Spain

<sup>b</sup> Center of Investigation of Endocrinology and Nutrition, Medicine School and Department of Endocrinology and Investigation, Hospital Clínico Universitario, University of Valladolid, Valladolid, Spain

<sup>c</sup> Department of Nutrition, Food Science and Physiology, Centre for Nutrition Research, University of Navarra (UNAV) and IdISNA, Navarra Institute for Health Research, 31009, Pamplona, Spain

<sup>d</sup> Medical Department Pronokal Group, PronokalGroup, Barcelona, Spain

<sup>e</sup> Department of Mathematics, MODES Group, CITIC, Universidade da Coruña, Faculty of Science, A Coruña, Spain

<sup>f</sup> Nutrition and Obesity Group, Department of Nutrition and Food Science, University of the Basque Country (UPV/EHU), Lucio Lascaray Research Institute and Health Research Institute BIOARABA, Vitoria, Spain

<sup>g</sup> Molecular and Cellular Endocrinology Group, Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago de Compostela (IDIS), Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela (CHUS) and Santiago de Compostela University (USC), Spain

<sup>h</sup> CIBER Fisiopatología de La Obesidad y Nutrición (CIBERObn), Spain



## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 7 January 2021

Accepted 13 May 2021

## Keywords:

Adiposity  
Methylation  
Nutritional intervention  
Circulating blood cells  
Biomarkers

## SUMMARY

**Background:** The molecular mechanisms underlying the potential health benefits of a ketogenic diet are unknown and could be mediated by epigenetic mechanisms.

**Objective:** To identify the changes in the obesity-related methylome that are mediated by the induced weight loss or are dependent on ketosis in subjects with obesity underwent a very-low calorie ketogenic diet (VLCKD).

**Methods:** Twenty-one patients with obesity ( $n = 12$  women,  $47.9 \pm 1.02$  yr,  $33.0 \pm 0.2$  kg/m<sup>2</sup>) after 6 months on a VLCKD and 12 normal weight volunteers ( $n = 6$  women,  $50.3 \pm 6.2$  yrs,  $22.7 \pm 1.5$  kg/m<sup>2</sup>) were studied. Data from the Infinium MethylationEPIC BeadChip methylomes of blood leukocytes were obtained at time points of ketotic phases (basal, maximum ketosis, and out of ketosis) during VLCKD ( $n = 10$ ) and at baseline in volunteers ( $n = 12$ ). Results were further validated by pyrosequencing in representative cohort of patients on a VLCKD ( $n = 18$ ) and correlated with gene expression.

**Results:** After weight reduction by VLCKD, differences were found at 988 CpG sites (786 unique genes). The VLCKD altered methylation levels in patients with obesity had high resemblance with those from normal weight volunteers and was concomitant with a downregulation of DNA methyltransferases (DNMT)1, 3a and 3b. Most of the encoded genes were involved in metabolic processes, protein metabolism, and muscle, organ, and skeletal system development. Novel genes representing the top scoring associated events were identified, including *ZNF331*, *FGFR1* (VLCKD-induced weight loss) and *CBFA2T3*, *C3orf38*, *JSRP1*, and *LRFN4* (VLCKD-induced ketosis). Interestingly, *ZNF331* and *FGFR1* were validated in an independent cohort and inversely correlated with gene expression.

**Conclusions:** The beneficial effects of VLCKD therapy on obesity involve a methylome more suggestive of normal weight that could be mainly mediated by the VLCKD-induced ketosis rather than weight loss.

© 2021 The Authors. Published by Elsevier Ltd. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

\* Corresponding author. Instituto de Investigación Sanitaria, Complejo Hospitalario de Santiago (CHUS), C/ Choupana, S/N, 15706, Santiago de Compostela, Spain.

E-mail addresses: [anabelencrujeiras@hotmail.com](mailto:anabelencrujeiras@hotmail.com), [endocrine@usc.es](mailto:endocrine@usc.es) (A.B. Crujeiras).

<sup>1</sup> Both authors equally contributed to this work.

**Abbreviations list**

<i>ACACB</i>	Acetyl-CoA Carboxylase Beta	<i>GAPDH</i>	Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase
<i>AEBP1</i>	AE binding protein 1	<i>GO</i>	gene ontology
<i>ANOVA</i>	analysis of variance	<i>HRAS</i>	HRas proto-oncogene, GTPase
<i>BMI</i>	body mass index	<i>INSR</i>	insulin receptor
<i>C3orf38</i>	chromosome 3 open reading frame 38	<i>JSRP1</i>	Junctional Sarcoplasmic Reticulum Protein 1
<i>CACNA1H</i>	Calcium Voltage-Gated Channel Subunit Alpha1 H	<i>LAMA2</i>	Laminin Subunit Alpha 2
<i>CAMKK1</i>	Calcium/Calmodulin Dependent Protein Kinase Kinase 1	<i>LRFN4</i>	Leucine Rich Repeat And Fibronectin Type III Domain Containing 4
<i>CBFA2T3</i>	CBFA2/RUNX1 Partner Transcriptional Co-Repressor 3	<i>MKNK2</i>	MAPK Interacting Serine/Threonine Kinase 2
<i>cdNA</i>	complementary DNA	<i>PRKAG2</i>	Protein Kinase AMP-Activated Non-Catalytic Subunit Gamma 2
<i>CENPF</i>	Centromere Protein F	<i>PRKCZ</i>	Protein Kinase C Zeta
<i>CHAT</i>	choline O-acetyltransferase	qRT-PCR	Real-time quantitative polymerase chain reaction
<i>CHUK</i>	Component Of Inhibitor Of Nuclear Factor Kappa B Kinase Complex	<i>RELA</i>	v-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A
<i>COL1A1</i>	collagen, type I, alpha 1	<i>RNA</i>	Ribonucleic acid
<i>COL5A1</i>	collagen type V alpha 1 chain	<i>RPTOR</i>	Regulatory Associated Protein Of MTOR Complex 1
<i>COL9A2</i>	collagen, type IX, alpha 2	<i>SD</i>	standard deviation
<i>CV</i>	coefficient of variation	<i>SEM</i>	standard error of the mean
<i>DMCpGs</i>	differentially methylated CpGs	<i>SGCB</i>	Beta-sarcoglycan
<i>DNMTs</i>	DNA methyltransferases	<i>SMTN</i>	Smoothelin
<i>DNA</i>	deoxyribonucleic acid	<i>TRAF2</i>	TNF Receptor Associated Factor 2
<i>EWAS</i>	epigenome-wide association study	<i>TSC2</i>	Tuberous Sclerosis Complex 2
<i>FDR</i>	false discovery rate	<i>TSS 200</i>	transcription start sites 200
<i>FF</i>	fresh-frozen	<i>VLCKD</i>	very-low-calorie ketogenic diet
<i>FGFR1</i>	Fibroblast growth factor receptor (FGFR)-like protein 1	<i>WC</i>	Waist circumference
		<i>ZFXH3</i>	zinc finger Homeobox 3
		<i>ZNF331</i>	zinc finger protein 331
		$\beta$ -OHB	beta-hydroxy-butyrate

**1. Introduction**

Ketosis has gained interest over recent years due to its induced benefits that it imparts on several health conditions [1,2]. Ketosis is associated with a delay in the onset of diseases and increased longevity [3]. Similarly, ketosis is suggested to have an extensive range of health benefits, from increased physical endurance in athletes [4,5] to delayed aging [6]. Also to improve conditions such as neurodegenerative disease [7–9] cancer [10–12], cardiovascular disease [13], and obesity [14]. Some of these studies involved high fat ketogenic diets and even though the main characteristic of ketogenic diets is the carbohydrates restriction, the specific composition in macronutrients and calories should be taken into consideration for the impact in clinical practice [15].

A very-low-calorie-ketogenic diet (VLCKD) was demonstrated to be an effective strategy in managing obesity [16], including weight loss and maintenance [17], increased preservation of muscle mass [18], and enhanced resting metabolic rate [19]. Moreover, it is able to improve metabolic parameters in patients with obesity [20,21] and type 2 diabetes [22]. Additionally, it was demonstrated that a VLCKD is able to reduce food craving and improve psychobiological parameters to help improve quality of life in patients with obesity [23]. However, the molecular mechanisms underlying these benefits of ketogenic diet remain unknown.

The main molecular mechanism that links the effect of environmental factors, such as nutrition, with the regulation of the genes function is epigenetics [24]. Indeed, dietary factors or dietary patterns were identified as modulators of epigenetic mechanisms [25–28].

Recently, it was suggested that ketone bodies orchestrate gene expression via epigenomic mechanisms [29]. This molecular effect

of nutritional ketosis has been reported in neurologic disorders such as epilepsy [30,31] and Kabuki syndrome and related disorders [32]. The effect of ketone bodies on epigenetic regulation was also proposed as a potential opportunity for anticancer therapies [33]. Moreover, ketogenic diets, including dietary restriction, delay aging through epigenetic effects [34].

On the other hand, obesity is associated with a specific methylation profile in several tissues [35–38] and the obesity-related methylome is related to complications such as insulin resistance [39] and cancer [40,41]. Moreover, several methylation marks were identified as potential biomarkers for predicting the success of weight loss therapies during the active phase of treatment [42–46] or during the period of weight loss maintenance [47,48]. Therefore, DNA methylation was proposed as a target for preventing and managing obesity [48–51].

In light of the above evidence, the aim of the current study was to evaluate how a VLCKD might affect the obesity methylome. Furthermore, this study aimed to identify the changes in the obesity-related methylome that are mediated by the induced weight loss or are dependent on ketosis.

**2. Materials and methods****2.1. Patient cohort**

The DNA and RNA for methylation and gene expression assays were isolated from blood samples of patients from a 6-month nutritional intervention study performed at the Endocrinology and Nutrition Department of the Hospital Clínico, Universitario de Valladolid; the patients were receiving treatment for obesity. In

addition, samples from a group of healthy volunteers were also analyzed.

The inclusion criteria were: age between 18 and 65 years, body mass index (BMI)  $\geq 30$  kg/m<sup>2</sup>, stable body weight over the previous 3 months, a desire to lose weight, and a history of failed dietary efforts. The main exclusion criteria were thyroid alteration, diabetes mellitus, obesity induced by other endocrine disorders or drugs, and participation in any active weight-loss program in the previous 3 months. In addition, patients with previous bariatric surgery, reported or suspected abuse of narcotics or alcohol, severe depression or any other psychiatric disease, severe hepatic insufficiency, any type of renal insufficiency or gout episodes, nephrolithiasis, neoplasia, previous instances of cardiovascular or cerebrovascular disease, uncontrolled hypertension, orthostatic hypotension, and hydroelectrolytic or electrocardiographic alterations were excluded. Females who were pregnant, breastfeeding, or intending to become pregnant and those with child-bearing potential who were not using adequate contraceptive methods were also excluded. Apart from obesity and metabolic syndrome, participants were generally healthy individuals. Under these criteria, 21 patients with obesity and 12 volunteers with normal weight were included in this study.

The study protocol was in accordance with the Declaration of Helsinki and was approved by the Ethics Committee for Clinical Research of Hospital Clínico Universitario de Valladolid, Spain (C.I.: 40/13, PNK-DHA2013-01). Participants provided written informed consent before any intervention related to the study. Participants received no monetary incentives.

## 2.2. Very-low-calorie ketogenic diet protocol

Patients included in this study derived from a randomized clinical trial investigating the effect of docosahexaenoic acid (DHA) supplementation in a very low-calorie ketogenic diet. The clinical trial consisted in two arms: one arm where patients follow a VLCKD and other arms where patients followed a VLCKD + DHA [21].

Nutritional intervention was based on a commercial weight-loss program (PNK method ®), as described elsewhere [18,21]. Briefly, the intervention included an evaluation by the specialist physician conducting the study, an assessment by an expert dietician, and exercise recommendations. This method is based on high-biological-value protein preparations obtained from cow's milk, soy, avian eggs, green peas, and cereals. Each protein preparation contained 15g protein, 4g carbohydrates, 3g fat, and provided 90–100 kcal. The VLCKD + DHA arm was supplemented with 500 mg/day DHA [21].

The weight-loss program has five steps and adheres to the most recent guidelines of the EFSA (2015) on total carbohydrate intake [52]. The first three steps consist of a VLCKD (600–800 kcal/day) that is low in carbohydrates (<50g daily from vegetables) and lipids (only 10g of olive oil per day). The amount of high biological-value proteins ranged between 0.8 and 1.2g per kg of ideal body weight to ensure that patients were meeting their minimum bodily requirements and to prevent the loss of lean mass. In step 1, the patients ate high-biological-value protein preparations five times a day and vegetables with low glycemic indices. In step 2, one of the protein servings was substituted with a natural protein (e.g., meat or fish) either at lunch or at dinner. In step 3, a second serving of low-fat natural protein was substituted for the second serving of biological protein preparation. Throughout these ketogenic phases, supplements of vitamins and minerals, such as K, Na, Mg, Ca, and omega-3 fatty acids, were provided in accordance with international recommendations [53]. These three steps were maintained until the patient lost the target amount of weight, ideally 80%. Because of this, the ketogenic steps varied in time depending on the

individual and the weight-loss target. The total ketosis state lasted for a maximum of 60 days.

In either step 4 or 5, ketosis was ended by the physician in charge of the patient based on the amount of weight lost, and the patient began a low-calorie diet (800–1500 kcal/day). At this point, the patients underwent a progressive incorporation of different food groups and participated in a program of alimentary re-education to guarantee long-term maintenance of the weight loss. The maintenance diet consisted of an eating plan balanced for carbohydrates, protein, and fat. Depending on the individual, calories consumed ranged between 1500 and 2000 kcal/day, with the goal of maintaining the weight loss and promoting a healthy lifestyle.

During this study, patients followed the steps of the method until they reached the target weight, or up to a maximum of 4 months of follow-up, although patients remained under medical supervision for the following months. Patients visited the research team every 15 ± 2 days to evaluate adherence and potential side effects. Complete anthropometry, body composition, and biochemical assessments were performed at four of the visits, which were determined according to the evolution of each patient through the steps of ketosis and weight loss: Visit 1 (Baseline), visit 2 (Maximum Ketosis), visit 3 (Reduced Ketosis) and visit 4 (Endpoint). DNA methylation and gene expression were performed at visits 1, 2, and 4.

In all visits, patients received dietary instructions, individual supportive counsel, and encouragement to exercise on a regular basis using a formal exercise program. Additionally, a program of reinforcement telephone calls was instituted, and a phone number was provided to all participants to address any concerns.

## 2.3. Anthropometric assessment

All anthropometric measurements were performed after an overnight fast (8–10 h) under resting conditions in duplicate and performed by well-trained health workers. At each visit, patients were weighed on the same calibrated scale (Seca 200 scale, Medical Resources, EPI Inc OH, USA). BMI was calculated as body weight in kg, divided by the square of body height in meters (BMI = weight (kg)/height<sup>2</sup> (m)). Waist circumference (WC) was measured using a standard flexible non-elastic metric tape placed over the midpoint between the last rib and the iliac crest, with the patient standing and exhaling.

## 2.4. Determining levels of ketone bodies

Ketosis was determined by measuring ketone bodies, specifically  $\beta$ -hydroxy-butyrate ( $\beta$ -OHB), in capillary blood using a portable meter (GlucoMen LX Sensor, A. Menarini Diagnostics, Neuss, Germany; sensitivity <0.2 mmol/l). As with anthropometric assessments, all determinations of capillary ketonemia were made after an overnight fast of 8–10 h. These measurements were performed daily by each patient during the entire VLCKD, and the corresponding values were reviewed using machine memory by the research team to control adherence. Additionally,  $\beta$ -OHB levels were determined at each visit by the physician in charge of the patient.

## 2.5. DNA methylation analysis

### 2.5.1. DNA preparation and bisulphite conversion

DNA from fresh-frozen (FF) blood samples was isolated using a standard phenol-chloroform/proteinase-k protocol according to the manufacturer's instructions, with slight modifications. Genomic DNA was isolated from leukocytes using the MasterPure™ DNA purification kit (Epicentre Biotechnologies,

Madison, WI, USA). The isolated DNA was treated with RNase A for 1 h at 45 °C. All DNA samples were quantified using the fluorometric method (Quan-iT PicoGreen DsDNA Assay, Life Technologies) and were assessed for purity using a NanoDrop (Thermo Scientific) to determine 260/280 and 260/230 ratio measurements. The integrity of the FF DNA was verified by electrophoresis in 1.3% agarose gel. DNA (500 ng) was bisulfite converted using the EZ DNA methylation kit Methylation-Gold (Zymo Research, CA, USA) according to the manufacturer's instructions, which converts non-methylated cytosine into uracil.

#### 2.5.2. Infinium MethylationEPIC BeadChip

High-quality DNA samples (500 ng) obtained from blood leukocytes of patients included in the VLCKD + DHA arm of the clinical trial (discovery cohort;  $n = 10$  patients, 3 paired samples/patient) were selected for bisulfite conversion (Zymo Research; EZ-96 DNA Methylation™ Kit) and hybridization to Infinium MethylationEPIC BeadChip (Illumina) following the Illumina Infinium HD methylation protocol. DNA quality checks, bisulfite modification, hybridization, data normalization, statistical filtering, and value calculations were performed as previously described [54,55].

Whole-genome amplification and hybridization were then performed on a BeadChip followed by single-base extension and analysis on a HiScan SQ module (Illumina) to assess cytosine methylation states. The annotation of CG islands (CGIs) used the following categorization: 1) shore, for each of the 2-kb sequences flanking a CGI; 2) shelf, for each of the 2-kb sequences next to a shore; and 3) open sea, for DNA not included in any of the previous sequences or in CGIs [54,55]. The transcription start site 200 and the transcription start site 1500 indicate regions either 200 or 1500 bp from the transcription start site, respectively.

#### 2.5.3. Pyrosequencing analysis

Pyrosequencing was used to assess selected markers in 18 patients (validation cohort: ( $n = 7$  derived from the discovery cohort and  $n = 11$  from an independent cohort of patients; 3 paired samples/patient)). DNA samples analyzed in the validation cohort were derived from patients included in the two arms of the clinical trial and merged for the statistical analysis (VLCKD:  $n = 10$ ; VLCKD + DHA:  $n = 8$ ). The primer sequences used in this analysis were designed using Qiagen's PyroMark Assay Design 2.0 software to hybridize to CpG-free sites to ensure methylation-independent amplification (details and primer sequences are available in Supplementary Table S1). Genomic DNA was isolated from FF blood leukocytes using the MasturPure™ DNA purification kit (Epicentre Biotechnologies, Madison, WI, USA), according to the manufacturer's instructions. DNA methylation analyses were performed using bisulfite-treated DNA (Zymo Research; EZ-96 DNA Methylation™ Kit) followed by a highly quantitative analysis based on PCR-based pyrosequencing using the PyroMark Q24 System version 2.0.7 (Qiagen). Methylation level was expressed as the percentage of methylated cytosine over the sum of methylated and unmethylated cytosines. Non-CpG cytosine residues were used as built-in controls to verify bisulfite conversion. The values are expressed as the mean for all sites. We also included human non-methylated and methylated DNA set as controls in each run (Zymo Research). The inter-assay precision (%CV) was <2.5%, intra-assay (%CV) was <1.0%.

#### 2.6. Expression assay by qRT-PCR

RNA from blood leukocytes ( $n = 18$  patients) was extracted using Trizol (Invitrogen) according to the manufacturer's recommendations. The RNA concentrations were measured with a Nanodrop 2000 spectrophotometer (Thermo Scientific). From total extracted RNA, 2 µg were DNase treated using a DNA-free kit as a

template (Ambion) to generate first-strand cDNA synthesis using the High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems). Real-time quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR) was performed using TaqMan Universal PCR Master Mix, TaqMan Probes (Applied Biosystems) (details and primer sequences are available in Supplementary Table S1), and the Step OnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems). All experiments were performed in duplicate, and gene expression levels were normalized to the levels of housekeeping gene GAPDH. The fold change in gene expression was calculated using the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  relative quantification method according to the manufacturer's guidelines (Applied Biosystems), and data are reported as the geometric mean (SEM). qRT-PCR experiments were performed in compliance with the MIQE (Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments) guidelines (<http://www.rdml.org/miqe>).

#### 2.7. Statistical analysis

The sample size of the current study was calculated to detect differences for methylation levels taking into account published values of epigenome-wide analysis in the field of obesity [35,40,41]. The interventional differences were examined in two independent cohorts. Microarray-based DNA methylation analysis was performed in the discovery cohort ( $n = 10$  patients; 3 paired samples/patient), and then the identified genes were validated in an independent cohort of patients (validation cohort;  $n = 18$  patients; 3 paired samples/patient). Finally, the association between DNA methylation level of the identified CpG sites and the anthropometric or biochemical parameters was assessed in the global cohort of patients included in this study ( $n = 28$ ).

The methylation level of each cytosine was expressed as a  $\beta$  value, which was calculated as the fluorescence intensity ratio of the methylated to the unmethylated version of the probe.  $\beta$  values ranged between 0 (unmethylated) and 1 (completely methylated) according to the combination of the Cy3 and Cy5 fluorescence intensities. Color balance adjustment and normalization were performed to normalize the samples between the two-color channels using Genome Studio Illumina software (V2010.3). Genome Studio normalizes data using different internal controls that are present on the Infinium MethylationEPIC BeadChip. This software also normalized data depending on internal background probes [55].  $\beta$  values with detected  $p$ -values > 0.01 were considered to fall below the minimum intensity and threshold, and these CpGs were consequently removed from further analysis. Additionally, probes that contained single nucleotide polymorphisms (SNPs) at the 10 bp 3' end of the interrogating probe were filtered out. To identify consistent patterns of DMCPGs due to the nutritional intervention, a linear model was fitted using a B-spline approximation [56]. Three linear models were fitted: Model 1 was fitted by including the three points of the nutritional intervention to evaluate the general effect of VLCKD; Model 2 including baseline and maximum ketosis to evaluate the effect of ketosis and weight loss; Model 3 including methylation levels at maximum ketosis and endpoint to evaluate the effect of only weight loss, without ketosis.  $P$  values were adjusted for multiple comparisons using the false discovery rate (FDR) procedure of Benjamini and Hochberg, and results were considered statistically significant when  $FDR < 0.10$ . Additionally, we applied a threshold for the significant sites based on the mean difference between visits with a minimum  $\beta$  value change of  $\pm 0.02$ . Euclidean cluster analysis of significant CpGs was performed using a heatmap function. The global methylation level was compared between the nutritional intervention visits by univariate ANOVA and a Bonferroni post-hoc analysis. All of the aforementioned statistical analyses were performed using R software (version 3.2.0).

To estimate enrichment in biological processes, a hypergeometric test was performed using the GOSTats package on the biological processes defined by gene ontology (GO) [57]. This analysis detected significant over-representation of GO terms in one set (i.e., list of identified genes) with respect to the entire genome. GO terms with an adjusted *p*-value < 0.05 were considered significant.

With SPSS version 21.0 software (SPSS Inc., Chicago, IL) for Windows XP (Microsoft, Redmond, WA), the genomic distribution of the differentially methylated CpGs was compared with the distribution of the CpGs from all analyzed sites on the Infinium MethylationEPIC BeadChip. *P* values were computed using the chi-square test to determine over- or under-representation of the CpGs. The potential association between anthropometric or biochemical parameters and DNA methylation levels ( $\beta$ -values) was evaluated using the Spearman coefficient test. Differences in DNA methylation levels and expression of the identified genes during the time-course of the intervention and between the nutritional intervention visits were assessed by the non-parametric tests, Kruskal Wallis and Mann–Whitney *U*, respectively.  $P \leq 0.05$  was considered statistically significant.

### 3. Results

#### 3.1. Patient characteristics

Samples from a total of 21 patients who followed the nutritional intervention based on a VLCKD were compared with samples from 12 healthy volunteers with normal weight and evaluated in this study (Supplemental Fig. 1). We first evaluated the discovery cohort ( $n = 10$  participants with obesity who followed a VLCKD + DHA ( $n = 5$  women) and  $n = 12$  (6 women) volunteers with normal weight). An extended validation cohort composed of 11 patients (7 women) with obesity that followed a VLCKD + DHA or a VLCKD-DHA was also analyzed. Statistically significant differences were not observed between either cohort in age, gender, height, body weight, BMI, waist circumference, ketosis, or the response to weight loss treatment (Table 1). Differences statistically significant were only detected in body weight, BMI and waist circumference between patients with obesity and subjects with normal weight (Table 1). All patients lost weight after nutritional intervention ( $21.8 \pm 4.9\%$ ), together with reductions in BMI ( $21.9 \pm 5.1\%$ ) and waist circumference ( $19.3 \pm 4.4\%$ ).

#### 3.2. DNA methylation changes during the global VLCKD intervention

DNA methylation profiles of blood leukocytes involving approximately 850 thousand CpGs were analyzed after VLCKD intervention. This analysis revealed statistically significant differences (cut-off point  $\Delta \geq 0.02$ ;  $FDR \leq 0.10$ ) at 988 CpG sites, from a total of 739,222 valid CpGs (see detailed list in Supplemental Table S2). The differentially methylated CpGs were mostly characterized as changes towards CpG hypomethylation occurring after nutritional intervention, in both total DMCPGs (Fig. 1A) and in the DMCPGs located in promoters, and islands or shores (Fig. 1B). This result of global hypomethylation was correlated with the down-regulation in the expression of DNA methyltransferase (DNMT) 1 and the *de novo* methyltransferases DNMT3A and DNMT3B (Fig. 1C and Supplemental Fig. 2).

The identified CpG sites mapped to 786 unique genes and we were able to separate the samples according to nutritional intervention visits using a hierarchical cluster approach (Fig. 1D). It should be noted that the methylation levels of the 988 CpG sites differentially methylated after nutritional intervention were altered to resemble methylation levels observed in samples from subjects with normal weight (Fig. 1C). The 20 DMCPGs with the highest difference with respect to baseline among genes that are represented by more than 2 CpGs are represented in Table 2.

Regarding the functional distribution (Fig. 2), the differences in DNA methylation were mainly observed in open sea regions (Fig. 2A), with 43.2% of the DMCPG sites located in promoter regions and the majority of DMCPGs in the body (Fig. 2B). Moreover, the DMCPGs were mainly found in chromosomes 2, 9, 16, 17, 19, and 22 when compared with all CpGs analyzed (Fig. 2C).

Among the 988 DMCPGs, we found 886 (89.7%) with decreased and 102 (10.32%) with increased levels of DNA methylation after nutritional intervention. Moreover, the DMCPGs that lost methylation with respect to baseline were located mainly in the open sea (Fig. 2D) and body (Fig. 2E). In contrast, the DMCPGs that gained methylation after the nutritional intervention were mostly located in promoters (TSS 200 and 1st exon) (Fig. 2D) and in CpG islands (Fig. 2E). Regarding chromosome distribution, the DMCPGs with decreased methylation levels after nutritional treatment were found on chromosomes 1, 4, 6, 7, 8, 9, 14, and 16, whereas DMCPGs with increased

**Table 1**  
Clinical characteristics of patients at baseline and during the intervention with a VLCKD.

	Discovery cohort				Validation cohort			P value			
	Normal weight	Obesity			Obesity			Adiposity	Time	Cohort	Time x Cohort
		Baseline (day 0)	Maximum ketosis (day 30)	Endpoint (day 180)	Baseline (day 0)	Maximum ketosis (day 30)	Endpoint (day 180)				
N	12	10	10	10	18*	18	18	–	–	–	–
Age (years)	50.3 ± 6.2	48.8 ± 9.20	–	–	47.1 ± 9.8	–	–	0.654	–	0.678	–
Gender (men/women)	6/6	5/5	–	–	7/11	–	–	–	–	–	–
Height (m)	1.67 ± 0.08	1.68 ± 0.08	–	–	1.65 ± 0.10	–	–	0.773	–	0.446	–
Body weight (Kg)	63.8 ± 8.7	93.4 ± 9.9 <sup>a</sup>	84.3 ± 8.4	73.9 ± 6.7 <sup>b</sup>	90.8 ± 11.6	81.9 ± 10.4	70.4 ± 10.4 <sup>b</sup>	<0.0001	<0.001	0.488	0.649
BMI (Kg/m <sup>2</sup> )	22.7 ± 1.49	32.9 ± 1.4 <sup>a</sup>	29.8 ± 1.7	26.1 ± 1.8 <sup>b</sup>	33.2 ± 1.7	30.06 ± 1.7	25.7 ± 1.7 <sup>b</sup>	<0.0001	<0.001	0.986	0.334
Waist circumference (cm)	77.4 ± 7.2	111.1 ± 6.6 <sup>a</sup>	102.3 ± 7.4	90.2 ± 3.1 <sup>b</sup>	108.3 ± 8.5	100.1 ± 7.3	86.9 ± 7.4 <sup>b</sup>	<0.0001	<0.001	0.325	0.836
Ketoneuria (mM)	–	0.15 ± 0.07	2.11 ± 1.11 <sup>b</sup>	0.15 ± 0.07	0.18 ± 0.08	1.71 ± 1.08 <sup>b</sup>	0.18 ± 0.08	–	<0.0001	0.445	0.374
Weight loss (%)	–	–	9.69 ± 2.51	20.58 ± 5.17 <sup>c</sup>	–	9.80 ± 1.99	22.52 ± 4.75 <sup>c</sup>	–	<0.0001	0.336	0.455

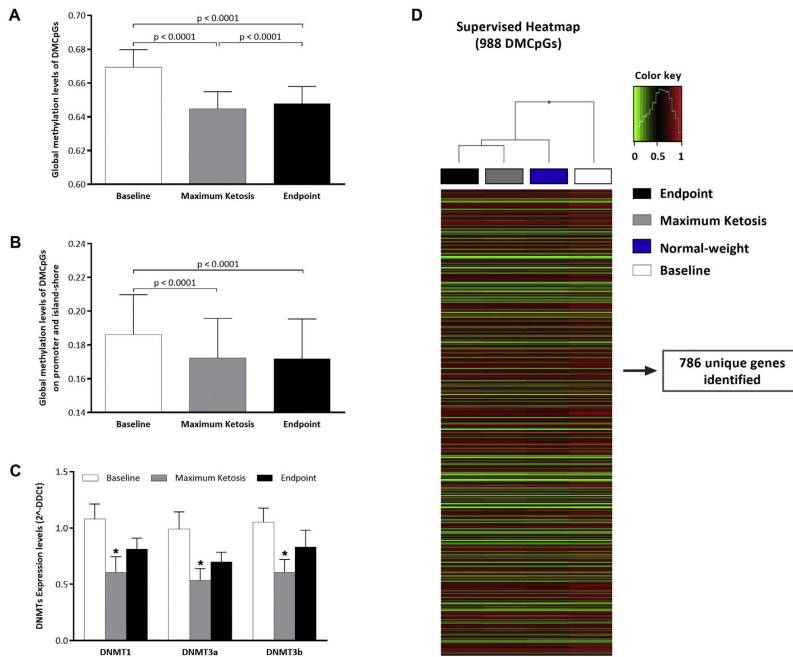
Data shown are mean ± SD (standard deviation). \* The sample size of the validation cohort was completed with  $n = 7$  patients from the discovery cohort and 11 patients from an independent cohort.

Abbreviations: VLCKD, very-low-calorie ketogenic diet.

<sup>a</sup> Statistically significant differences compared with control Normal weight in discovery cohort.

<sup>b</sup> Statistically significant differences compared with Baseline in both cohorts.

<sup>c</sup> Statistically significant differences compared with Maximum Ketosis in both cohorts.



**Fig. 1.** Profile of DNA methylation following the VLCKD (n = 10; Discovery cohort). (A), Global differences in methylation levels of 988 DMCpGs identified by Infinium MethylationEPIC BeadChip analysis. (B), Global differences in methylation levels of DMCpGs located in the promoter and island/shore. (C), Expression levels of DNA methyltransferase (DNMT) 1 and the de novo methyltransferases DNMT3A and DNMT3B (D), Supervised clustering of the 988 CpGs that were found to be differentially methylated between patients with obesity and healthy volunteers with normal weight (n = 12) groups. The identified CpG sites mapped to 786 unique genes. Differences statistically significant detected (P < 0.0001). DMCpGs, differentially methylated CpGs; VLCKD, very-low calorie ketogenic diet.

methylation levels were mainly found in chromosomes 3, 5, 10, 11, 12, 17, 21, and 22 (Fig. 2F).

3.3. Biological significance of the dietary intervention-related DMCpG sites and associated genes

Interestingly, most differentially methylated genes belonged to a network significantly enriched in protein interactions (p < 0.001) according to STRING analysis (Fig. 3A). GO analysis was performed to test whether certain molecular functions or biological processes were significantly enriched within the 786 genes associated with the 988 DMCpGs discovered through VLCKD intervention (Fig. 3B). Among the categories of functional processes that exhibited statistical significance (FDR < 0.05), we found processes related to regulation of transcription, signal transduction, cell differentiation, proliferation and apoptosis, metabolic processes, response to hypoxia, protein processing, muscle organ and skeletal system development, nervous system development and axon guidance (Fig. 3B). Among these, we highlighted relevant pathways in the field of obesity physiopathology such as insulin signaling, protein digestion and absorption, adipocytokine signaling and muscle development (Fig. 4A–D). To investigate biological relevance, the CpG sites

representing promoter regions (TSS1500, TSS200, 5' UTR and 1st Exon) at CpG islands/shores were selected. This selection yielded 141 CpGs representing 150 unique genes. Based on this filter we identified CpG sites that could be genetic targets whose methylation is associated with VLCKD responses. Among these, the most representative gene was ZNF331, which was represented by 2 CpG sites located in the promoter and island with the highest difference with respect to baseline. Furthermore, FGFR1 was also selected from among the DMCpG sites because of its biological relevance in metabolic pathways and obesity pathogenesis and because the methylation level of this gene in leukocytes was previously proposed as an episiature that mirrors methylation levels of dysfunctional adipose tissue in obesity [35].

3.4. DNA methylation changes associated with the effects of dietary-induced ketosis

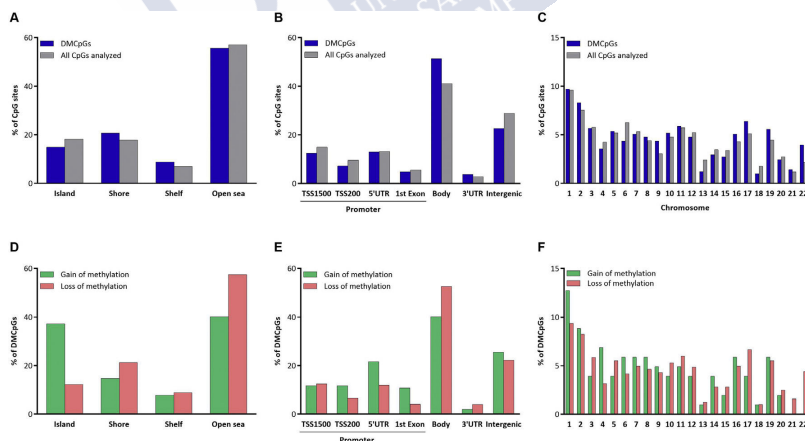
An analysis comparing baseline (day 0) with maximum ketosis (day 30) yielded 1365 DMCpGs. With respect to all CpGs analyzed, these CpGs were found mainly in the open sea (Fig. 5A) and body (Fig. 5B) and in chromosomes 1, 10, 11, 17, 19, and 22 (Fig. 5C). The DMCpGs that gained methylation were found in the island and

**Table 2**  
List of DMCPGs with the highest differences for Baseline - Maximum Ketosis - Endpoint between genes that are represented by more than 2 CpGs.

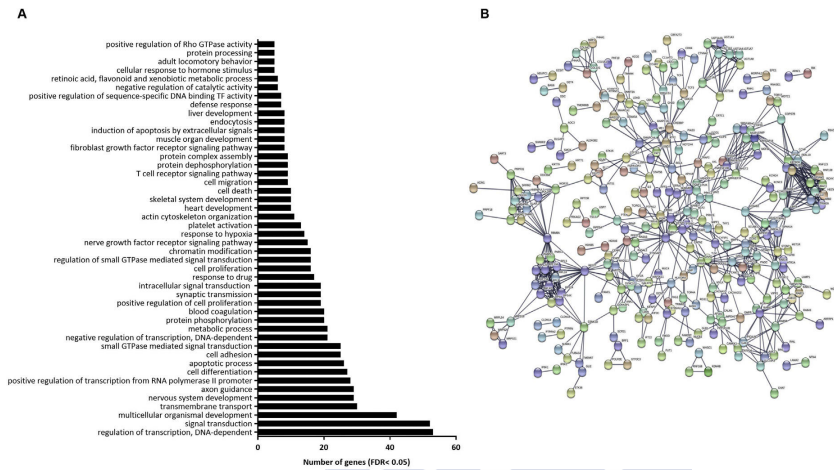
TargetID	CHR	Position	Gene Name	Gene region	CpG context	Methylation levels (mean)			Differences		p value	FDR
						B	MK	E	MK - B	E - B		
cg04254103	19	1794380	ATP8B3; ATP8B3; ATP8B3	Body; Body; Body	N_Shore	0.826	0.786	0.796	-0.039	-0.030	0.001	0.091
cg06643002	14	105735797	BRF1; BRF1; BRF1; BRF1;	Body; Body; Body; Body; Body		0.782	0.741	0.748	-0.040	-0.034	0.001	0.099
cg12063937	1	7731375	CAMTA1	Body		0.837	0.785	0.802	-0.051	-0.034	0.000	0.054
cg00035197	16	88962986	CBFA2T3; CBFA2T3	Body; Body	Island	0.803	0.748	0.763	-0.056	-0.040	0.001	0.082
cg09962824	21	44479417	CBS	Body	N_Shore	0.754	0.707	0.714	-0.047	-0.040	0.000	0.051
cg23790296	10	73233854	CDH23; CDH23; CDH23; CDH23;	Body; Body; Body; Body; Body		0.846	0.814	0.820	-0.032	-0.026	0.001	0.095
cg26493726	19	36508614	CLIP3	Body	S_Shelf	0.808	0.771	0.773	-0.037	-0.035	0.000	0.069
cg01818220	9	23821773	ELAVL2; ELAVL2; ELAVL2; ELAVL2;	5'UTR; TSS1500	Island	0.092	0.148	0.134	0.056	0.042	0.000	0.008
cg01933710	5	132596864	FSTL4	Body		0.828	0.778	0.799	-0.049	-0.029	0.001	0.076
cg07390459	2	121582002	GLI2	Body		0.768	0.720	0.727	-0.048	-0.041	0.001	0.097
cg14777822	2	121728297	GLI2	Body		0.770	0.728	0.726	-0.042	-0.044	0.001	0.093
cg16120742	7	50345049	IKZF1	5'UTR	S_Shore	0.114	0.058	0.041	-0.057	-0.073	0.000	0.026
cg02999309	10	134502626	INPP5A	Body	N_Shore	0.836	0.799	0.807	-0.037	-0.029	0.000	0.024
cg14010696	19	5119250	KDM4B	Body	Island	0.853	0.812	0.819	-0.041	-0.034	0.000	0.008
cg16333587	14	101369826	MEG8	Body		0.857	0.817	0.828	-0.040	-0.029	0.000	0.051
cg20963002	14	101360088	MEG8	TSS1500		0.862	0.821	0.828	-0.041	-0.034	0.001	0.098
cg18026309	2	26683651	OTOF; OTOF; OTOF; OTOF; OTOF;	Body; Body; Body; Body; Body		0.884	0.851	0.857	-0.033	-0.027	0.000	0.051
cg01764953	11	70814657	SHANK2	Body		0.914	0.887	0.887	-0.027	-0.026	0.000	0.067
cg19696891	19	54057705	ZNF331; ZNF331; ZNF331;	5'UTR; 5'UTR; TSS1500	Island	0.379	0.431	0.447	0.052	0.068	0.000	0.015
cg03643149	19	54041519	ZNF331; ZNF331; ZNF331; ZNF331;	TSS1500; 1stExon; TSS200; TSS200; 5'UTR; 5'UTR	Island	0.397	0.445	0.458	0.048	0.061	0.000	0.019

Data shown are mean.

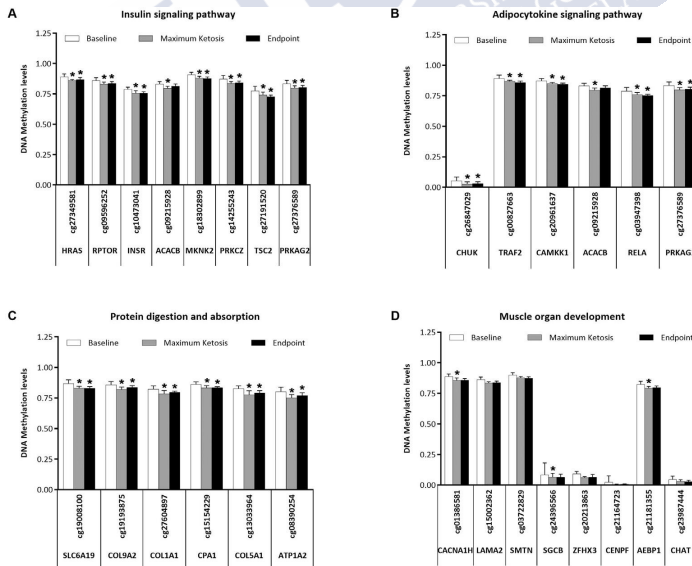
Abbreviations: B, baseline; CHR, chromosome; E, endpoint; FDR, false discovery rate; MK, maximum ketosis.



**Fig. 2.** Characterization of the DMCPGs after VLCKD in the discovery cohort (n = 10). (A) Genomic distribution of the DMCPGs and their respective locations regarding the broader CpG context, (B) gene region and (C) chromosome. (D) Genomic distribution of DMCPGs comparing those that exhibited an increase with those that exhibited a decrease in methylation levels following VLCKD, and their respective locations in the broader CpG context, (E) the gene region and (F) chromosome. DMCPGs, differentially methylated CpGs; VLCKD, very-low calorie ketogenic diet.

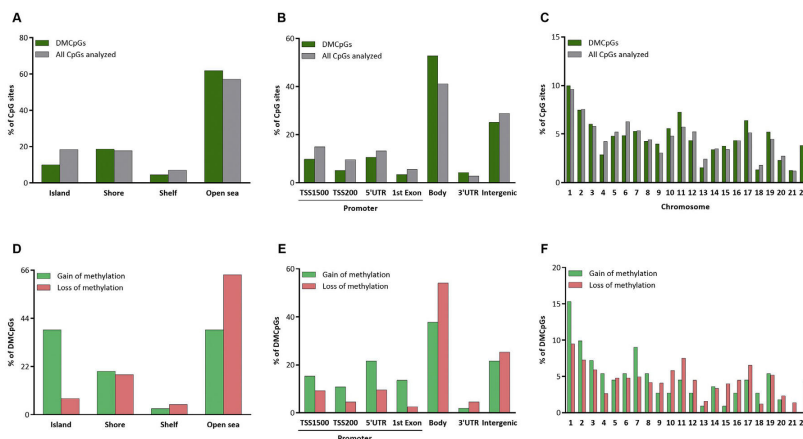


**Fig. 3.** Biological implications of the DMCpGs following a VLCKD. (A) Summary of the GO analysis of the biological process categories representing the differentially methylated genes associated with DMCpG sites. (B) Gene-protein interaction network-STRING analysis. Most of the genes regulated by methylation belonged to a network significantly enriched in protein interactions ( $p < 0.001$ ) according to STRING analysis. DMCpGs, differentially methylated CpGs; GO, gene ontology; VLCKD, very-low-calorie ketogenic diet.



**Fig. 4.** Genes with known functions that present DMCpGs following a VLCKD. (A) Novel genes epigenetically regulated following VLCKD belonged to the insulin signaling pathway, (B) adipocytokine signaling pathway, (C) protein digestion and absorption functions, and (D) muscle organ development functions. DNA methylation values are expressed as b-values from the Infinium MethylationEPIC BeadChip. \*Denotes differences statistically significant ( $P < 0.05$ ). DMCpGs, differentially methylated CpGs; VLCKD, very-low-calorie ketogenic diet.





**Fig. 5.** Characterization of the DMCpGs during ketosis induced by a VLCKD from the discovery cohort (n = 10). (A) Genomic distribution of the DMCpGs and their respective locations regarding the broader CpG context. (B) Genomic distribution of DMCpGs comparing those that exhibited an increase with those that exhibited a decrease in methylation levels during the VLCKD-induced ketosis and their respective locations in the broader CpG context. (C) Genomic distribution of DMCpGs, differentially methylated CpGs; VLCKD, very-low calorie ketogenic diet.

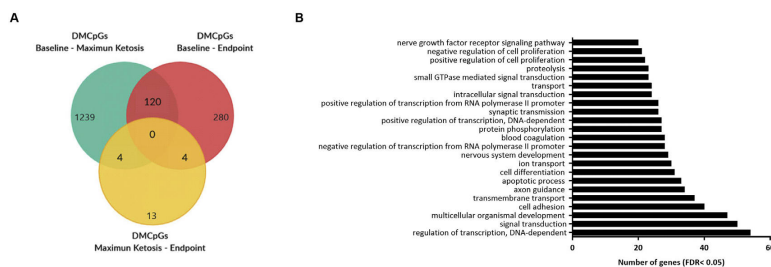
promoter and in chromosomes 1, 2, 3, 4 and 7. The DMCpGs that lost methylation were found in the open sea and body and in chromosomes 9, 10, 11, 12, 17, 21, 22 (Fig. 5D–F).

With the aim of isolating the specific effects of ketosis on methylation profile, additional analysis was performed. A Venn diagram was created by including: DMCpGs Baseline – Maximum Ketosis = 1365, DMCpGs Baseline – Endpoint = 405, and DMCpGs Maximum Ketosis – Endpoint = 21. Using these conditions, we identified 280 CpGs whose methylation was affected by the induced weight loss *per se* (see detailed list in Supplementary Table S3) and 1239 CpGs were identified as VLCKD-induced ketosis-related DMCpGs (Fig. 6A). These VLCKD-induced ketosis-related DMCpGs corresponded to 966 annotated genes, and 161 of these were represented by 137 VLCKD-induced ketosis-related DMCpGs located in the promoter and island or shore (see detailed list in Supplementary Table S4). Among the categories of

functional processes that exhibited statistical significance (FDR < 0.05), we found processes related to regulation of transcription, signal transduction, cell adhesion, cell differentiation, proliferation and apoptosis, as well as nervous system development and axon guidance. Moreover, these ketosis-related differentially methylated genes belonged to pathways involved in focal adhesion, insulin and adipocytokine signaling pathways, MAPK and P53 signaling pathways and in cancer and type II diabetes mellitus-related pathways (Fig. 6B). Overall pathways associated with obesity physiopathology.

Among these, we highlighted relevant pathways in the field of obesity physiopathology such as insulin signaling, protein digestion and absorption, adipocytokine signaling and muscle development.

To identify potentially novel signatures of DNA methylation associated with VLCKD-induced ketosis, those genes with more



**Fig. 6.** Biological implications of the DMCpGs related to VLCKD-induced ketosis. (A) Venn diagram of the DMCpGs detected between baseline and maximum ketosis, between baseline and endpoint, and between maximum ketosis and endpoint. From this analysis, 1239 CpGs were identified as nutritional ketosis-related DMCpGs. (B) Summary of the GO analysis of the biological process categories representing the differentially methylated genes associated with nutritional ketosis-related DMCpG sites. DMCpGs, differentially methylated CpGs; GO, gene ontology; VLCKD, very-low calorie ketogenic diet.

than 2 CpG sites located within CpG islands and shores and with a difference in  $\beta$ -values  $\geq |2\%$  were selected. Based on these criteria, 12 genes were identified and are listed in Table 3. When the list was further filtered by promoter region, the genes *CBFA2T3*, *C3orf38*, *JSRP1*, and *LRFN4* showed at least one VLCKD-induced ketosis-related DMCpG located in the promoter and island/shore.

### 3.5. Validation of candidate genes in a representative cohort

We used pyrosequencing, a technique that is most feasible for studies of patients in hospitals, to evaluate the DNA methylation levels of *ZNF331* and *FGFRL1* in an independent cohort of samples from leukocytes (validation cohort;  $n = 18$  patients who follow a VLCKD + DHA or VLCKD-DHA merged Table 1).

Statistically significant differences were found in the methylation levels after nutritional intervention with respect to baseline (Fig. 7A). After weight loss treatment, a statistically significant increase with respect to baseline was observed during maximal ketosis in the 4 CpGs evaluated ( $p = 0.049$ ). However, no statistically significant changes were observed in *FGFRL1* methylation levels after the weight loss treatment (Fig. 7B).

DNA methylation has previously been associated with transcriptional repression [58,59]. Accordingly, the expressions of *ZNF331* (Fig. 7C) and *FGFRL1* (Fig. 7D) were evaluated. A statistically significant downregulation in the expression of *ZNF331* was found after nutritional intervention, while the expression of *FGFRL1* was upregulated, especially at maximum ketosis compared with baseline. Even though the results for methylation level of *FGFRL1* were not validated in the independent cohort, the expression of this gene was inversely correlated with the methylation levels observed in the discovery cohort. Overall, these results suggest that epigenetic regulation of *ZNF331* and *FGFRL1* related to weight loss could have a relevant biological function.

The validation part of the current study was performed by merged the two arms of the clinical trial because the initial results revealed that both arms induced similar weight loss and ketosis [21], the main outcome used to evaluate changes in the methylome. Indeed, a further analysis in the validation cohort keeping the two arms separated, showed that the trend in the methylation levels through the intervention was similar to that observed in the merged analysis for the studied genes, *ZNF331* and *FGFRL1* (Supplemental Fig. 3). Differences through the intervention appeared to be higher in the VLCKD + DHA than in the VLCKD arm; however, a repeated measured ANOVA analysis depending on arm showed statistically significance only for the time-course of the intervention in *ZNF331* methylation levels ( $p < 0.01$ ), without statistically significance for the interaction between time x arm, nor between the two arms ( $p > 0.05$ ).

## 4. Discussion

In this study, we carried out an epigenome-wide association study (EWAS) with a longitudinal approach to evaluate the effects of a ketogenic nutritional intervention for weight-loss (based on a very-low-calorie ketogenic diet (VLCKD)) on DNA methylation levels in patients with obesity. As far as we know, this is the first study performed that evaluated the effects of a ketogenic diet, particularly a low fat-low carbohydrate ketogenic diet, to treat obesity on the pattern of DNA methylation. This analysis was performed using an array-based platform that interrogates 850,000 specific CpG sites. Using this design, 988 CpG sites exhibited differential methylation after VLCKD intervention. These CpG sites encoded 786 genes belonging to biological processes involved in the function of adipose tissue, neurological function, muscle development, and others metabolic processes. In particular, the

methylation profile of DMCpGs after a short-period of dieting was similar to the profile observed in normal-weight individuals. A global hypomethylation was observed in the DMCpGs identified correlated with a downregulation in the DNA methyltransferase (DNMT) family, which are DNA-modifying enzymes that play a crucial role in regulation of DNA methylation [60]. These effects were observed from the acute phase of this nutritional intervention characterized by an induced ketosis state. We identified 1239 CpG sites that were modified by a short-time and moderate ketosis state *per se*, independently of the magnitude of weight loss. Therefore, changes in DNA methylation profile after VLCKD could be related with the beneficial effects of this kind of nutritional therapy on body weight and body composition [18], biochemical and hormonal parameters [20,61], and quality of life [23] and promoted mainly by the induced ketosis state.

In our longitudinal study after weight reduction, there were changes in methylation levels of genes involved in the insulin signaling pathway, such as *HRAS*, *RPTOR*, *INSR*, *ACACB*, *MKNK2*, *PRKCZ*, *TSC2*, and *PRKAG2*; Collagen-related genes such as *COL9A2*, *COL1A1*, and *COL5A1* as well as, genes involved in adipocyte signaling such as *CHUK*, *TRAF2*, *CAMKK1*, *ACACB*, *RELA*, and *PRKAG2*. These results endorse the hypothesis of epigenetic regulation of adipose tissue dysfunction in obesity as it was previously observed in visceral adipose tissue [39].

The current study also revealed an epigenetic effect of treatment with a VLCKD on genes associated with muscle development such as *CACNA1H*, *LAMA2*, *SMTN*, *SGCB*, *ZFXH3*, *CENPF*, *AEBP1*, and *CHAT*. Muscle is an important tissue in the pathogenesis of obesity, which is directly linked with morbidity and mortality in humans [59,62,63]. It has been demonstrated that a VLCKD is able to preserve the mass and function of muscle [18], as well as modulate the secretion of specific myokines [61]. The current study demonstrates that these effects could be mediated by epigenetic mechanisms.

The most relevant characteristic of epigenetic regulation is plasticity [64]. However, a cross-sectional approach is unable to evaluate the potential reversibility of obesity-related epigenetic marks and causal interferences. With this study, we could identify that the methylation levels of most of the DMCpGs after VLCKD were similar to that observed in normal weight patients.

Importantly, the achieved results in this study after VLCKD were representative of the more acute phase, during a short period (<60 days) and moderate intensity VLCKD-induced ketosis state. In fact, a specific methylome was observed independent of weight loss induced by VLCKD intervention. Among the encoded genes, *CBFA2T3* (also called *MTG16*) was the most represented, with 4 CpGs differentially methylated and *JSRP1*, represented by 2 CpGs in the promoter region. Ketone bodies have previously been described as important signaling molecules [65] and were proposed to be able to modulate epigenetic mechanisms [66]. Molecular and cell biology assays showed *CBFA2T3* to have characteristics consistent with a tumor suppressor [67] that lead to decreased glycolysis and stimulated mitochondrial respiration, and therefore may induce a Warburg-like effect [68] which is consistent with ketosis. This finding further relevant considering that obesity is a risk factor for cancer development [69,70]. On the other hand, *JSRP1* was associated with pathways involving skeletal muscle excitation-contraction [71]. If we consider that often methylation in the gene promoter regions implies reductions in gene expression [58,59,72], the lower methylation levels observed for *CBFA2T3* and *JSRP1* could lead to higher expression of these genes, with consequent improvements in mitochondrial and muscle function, respectively. However, until now there have been no studies regarding the role of these genes in the context of energy

**Table 3**

List of DMCPGs with the highest differences for Baseline - Maximum Ketosis between genes that are represented by more than 2 CpGs.

Target Id	Gene name	Function	Disease Annotation	CHR	Position	Gene region	CpG Context	Methylation levels				p value	FDR
								B		MK			
								Mean	SD	Mean	SD		
cg10143842	C3orf38	No items found		3	88198517	TSS1500	Island	0.066	0.114	0.024	0.024	0.001	0.096
cg24029436				3	88198835	Body	S_Shore	0.113	0.105	0.059	0.038	0.000	0.018
cg00035197	CBFA2T3	response to		16	88962986	Body; Body	Island	0.803	0.041	0.748	0.036	0.000	0.051
cg01977582		hypoxia, negative		16	88976280	5'UTR; Body	S_Shore	0.812	0.031	0.782	0.012	0.001	0.094
cg07243576		regulation of cell		16	88973245	5'UTR; Body	N_Shelf	0.849	0.028	0.817	0.017	0.001	0.098
cg27102297		proliferation, granulocyte differentiation, negative regulation of glycolytic process, negative regulation of transcription, DNA-templated, regulation of aerobic respiration		16	88966903	Body; Body	S_Shore	0.767	0.032	0.731	0.023	0.001	0.088
cg01775970	CBS	L-serine metabolic process, L-serine catabolic process, cysteine biosynthetic process, L-cysteine catabolic process, DNA protection, homocysteine catabolic process, homocysteine metabolic process, hydrogen sulfide biosynthetic process	Obesity-related traits	21	44486298	Body	Island	0.873	0.012	0.852	0.014	0.000	0.077
cg09962824				21	44479417	Body	N_Shore	0.748	0.037	0.706	0.031	0.000	0.044
cg13033964	COL5A1	cell adhesion, cell migration, collagen fibril organization, collagen biosynthetic process	Crohn's disease	9	137634551	Body; Body		0.825	0.023	0.775	0.033	0.000	0.025
cg13714791			Blood pressure	9	137694578	Body	S_Shore	0.839	0.025	0.813	0.024	0.001	0.096
cg00308560	FAM20C	protein serine/threonine kinase activity, protein binding, manganese ion binding		7	216899	Body	N_Shore	0.857	0.014	0.836	0.013	0.000	0.046
cg11554153				7	209165	Body	S_Shore	0.821	0.020	0.788	0.017	0.000	0.052
cg17915125	INPP5A	protein binding and PH domain binding		10	134476336	Body	N_Shore	0.879	0.020	0.852	0.011	0.000	0.079
cg02999309				10	134502626	Body	N_Shore	0.836	0.024	0.799	0.020	0.000	0.021
cg10356204	JSRP1	skeletal muscle contraction		19	2255744	TSS1500	S_Shore	0.697	0.040	0.654	0.032	0.001	0.099
cg16098170				19	2255848	TSS1500	S_Shore	0.806	0.034	0.770	0.025	0.000	0.085
cg12010750	KCNC1	protein tetramerization	Night sleep phenotypes	11	17803160	Body	S_Shore	0.834	0.030	0.803	0.019	0.000	0.069
cg23787205				11	17801046	Body	Island	0.894	0.031	0.869	0.016	0.000	0.086
cg03214876	KIAA1875	No items found		8	145166631	Body	S_Shore	0.875	0.019	0.843	0.013	0.000	0.006
cg11202914				8	145172221	Body	S_Shore	0.905	0.017	0.886	0.010	0.000	0.010
cg12378449	LRFN4	protein binding		11	66627382	Body; Body; Body; Body	N_Shore	0.780	0.036	0.742	0.023	0.001	0.097
cg19391515				11	66626563	Body; Body; 1stExon; Body	Island	0.812	0.025	0.785	0.015	0.000	0.032
cg12378449	PC	protein binding	Pyruvate carboxylase deficiency	11	66627382	Body; Body; Body; Body	N_Shore	0.780	0.036	0.742	0.023	0.001	0.097
cg19391515				11	66626563	Body; Body; 1stExon; Body	Island	0.812	0.025	0.785	0.015	0.000	0.032
cg16014906	STK32C	No items found		10	134095321	Body	N_Shore	0.841	0.023	0.819	0.019	0.000	0.070
cg24305451				10	134021178	3'UTR	S_Shore	0.843	0.035	0.810	0.030	0.001	0.091

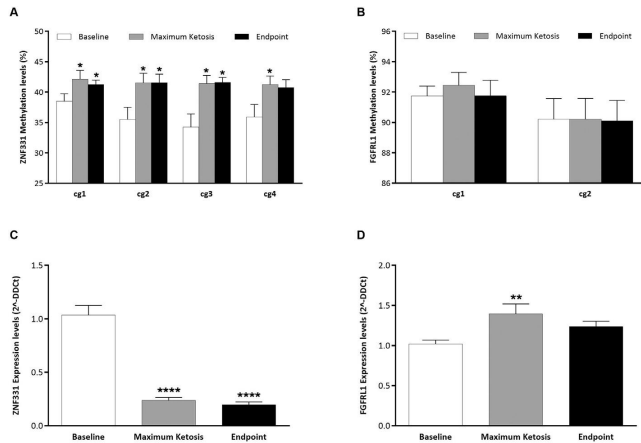
Data shown are mean  $\pm$  SD (standard deviation).

Abbreviations: B, baseline; CHR, chromosome; FDR, false discovery rate; MK, maximum ketosis.

metabolism related-diseases such as obesity, or regarding their regulation by ketone bodies-induced epigenetic regulation. The current results warrant further investigation on this topic.

To strengthen these findings and to explore the relationship between methylation levels and the expression of the identified genes, we analyzed the methylation and expression of *ZNF331* and

*FGFR1* in an independent cohort. These genes belong to a family of genes associated with adipogenesis [73], T2D, insulin resistance [74,75], and obesity-related cancer [40,41], and their methylation levels of its sequence could be part of an obesity-related epigenetic signature as previously proposed [35]. Even though the role of these genes in body weight homeostasis requires further elucidation, the



**Fig. 7. DNA methylation of ZNF331 and FGFR1L1 is inversely associated with gene expression.** DNA methylation differences for ZNF331 (A) and FGFR1L1 (B) after VLCKD in the validation cohort (n = 18) as measured by pyrosequencing. Differential gene expression of ZNF331 (C) and FGFR1L1 (D) after VLCKD in the validation cohort (n = 18). \*Denotes differences statistically significant (\*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*\*P < 0.001). VLCKD, very-low calorie ketogenic diet.

results of this study support future exploration of this concept and suggest its epigenetic regulation may be a novel mechanism involved in the management obesity.

A strength of this study is its longitudinal design. With this design, we could evidence for the first time an association between ketosis and DNA methylation independent of weight loss. Despite the tissue specificity of DNA methylation, we were able to detect time-course changes in methylation levels of genes involved in adipose and muscle physiopathology using an easy to obtain tissue for serial sampling in a clinical setting. The relatively small sample size is one limitation of this study. However, as each subject underwent 3 evaluations and the results were subjected to paired analysis, statistical power was increased and real differences were observed between experimental points. Moreover, subsequent analyses were performed with highly stringent filters to produce consistent results, which were further validated in an independent cohort. In addition, although the magnitude of the DNA methylation differences after nutritional intervention could be considered small, these differences may have been due to the use of a mix of blood cells as opposed to single cell analysis, and also because of the short follow-up period used (6 months of weight loss and 30 days of ketosis state), which further increases the relevance of the findings as they were detected even with such a short clinical course. Longer-term prospective studies are needed to confirm the association between DNA methylation levels in blood leukocytes and weight loss response to a VLCKD, and more particularly, the role of ketosis in the regulation of epigenetic mechanisms such as DNA methylation. This study provides information that could be valuable and useful in the context of -omics and big data era to assess both potential benefits and adverse effects of therapeutic agents [76], such as ketone bodies to counteract obesity.

In conclusion, this study demonstrates for the first time that the beneficial effects of VLCKD therapy in reducing obesity involve epigenetic mechanisms. Because the effect was observed in the more acute phase of the nutritional intervention, this epigenetic

effect could be mainly mediated by ketosis induced by the VLCKD. Further studies are needed to evaluate whether the DNA methylation markers identified could be useful in predicting the success of this intervention in the context of personalized medicine.

**Author contributions**

ABC and AGI designed and performed experiments, analyzed data and wrote the manuscript; DL, DP, IS and FIM performed the recruitment and following of the patients and helped with experiments; AJ helped with data analysis; AFQ, MPP, JAM and MAMO contributed to the interpretation of data and discussion; FFC and ABC obtained funding, designed and coordinated research. FFC and ABC are the guarantors of this work and, as such, had full access to all the data in the study and take responsibility for the integrity of the data and accuracy of the data analysis. All authors read and approved the final manuscript.

**Conflict of Interest**

A.B.C., D. dL. and F.F.C. received advisory board fees and/or research grants from Pronokal Protein Supplies, Spain. I.S. is the Medical Director of Pronokal, Spain.

**Acknowledgments**

The authors thank all the participants of this study and the research group involved in the project, as well as the individuals who performed the field work.

This work was supported by the Pronokal Group® and grants from the Fondo de Investigación Sanitaria as well as P117/01287, P120/00628 and P120/00650 research projects and CIBERobn from the Instituto de Salud Carlos III (ISCIII)-Subdirección General de Evaluación y Fomento de la Investigación; Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) Ana B Crujeiras is funded by a research

contract "Miguel Servet" (CP17/00088) from the ISCIII, co-financed by the European Regional Development Fund (FEDER) and Xunta de Galicia-GAIN (IN607B2020). The funding source had no involvement in the study design or interpretation of the results.

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2021.05.010>.

## References

- McSwiney FT, Wardrop B, Hyde PN, Lafountain RA, Volek JS, Doyle L. Keto-adaptation enhances exercise performance and body composition responses to training in endurance athletes. *Metabolism* 2018;81:25–34.
- Pureza IROM, Macena ML, da Silva Junior AE, Praxedes DRS, Vasconcelos LGL, Bueno NB. Effect of early time-restricted feeding on the metabolic profile of adults with excess weight: a systematic review with meta-analysis. *Clin Nutr* 2021;40:1788–99.
- Di Francesco A, Di Germanio C, Bernier M, de Cabo R. A time to fast. *Science* 2018;362:770–5.
- Cox PJ, Kirk T, Ashmore T, Willerton K, Evans R, Smith A, et al. Nutritional ketosis alters fuel preference and thereby endurance performance in athletes. *Cell Metabol* 2016;24:256–68.
- Evans M, Cogan KE, Egan B. Metabolism of ketone bodies during exercise and training: physiological basis for exogenous supplementation. *J Physiol* 2017;595:2857–71.
- Roberts MN, Wallace MA, Tomilov AA, Zhou Z, Marcotte GR, Tran D, et al. A ketogenic diet extends longevity and healthspan in adult mice. *Cell Metabol* 2017;26:539–46. e5.
- Wodarek D. Role of ketogenic diets in neurodegenerative diseases (Alzheimer's Disease and Parkinson's Disease). *Nutrients* 2019;11.
- Jensen NJ, Woodschow HZ, Nilsson M, Rungby J. Effects of ketone bodies on brain metabolism and function in neurodegenerative diseases. *Int J Mol Sci* 2020 Nov 20;21(22):8767.
- Vanitallie TB. Biomarkers, ketone bodies, and the prevention of Alzheimer's disease. *Metabolism* 2015;64:S51–7.
- Weber DD, Aminzadeh-Gohari S, Kofler B. Ketogenic diet in cancer therapy. *Ageing (N Y)* 2018;10:164–5.
- Klement RJ. The emerging role of ketogenic diets in cancer treatment. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2019;22:129–34.
- Khodabakhshi A, Akbari ME, Mirzaei HR, Seyfried TN, Kalamian M, Davoodi SH. Effects of Ketogenic metabolic therapy on patients with breast cancer: A randomized controlled clinical trial. *Clin Nutr* 2021;40:751–8.
- Kosinski C, Jorjanyav FR. Effects of ketogenic diets on cardiovascular risk factors: evidence from animal and human studies. *Nutrients* 2017;9.
- Gershuni VM, Yan SL, Medici V. Nutritional ketosis for weight management and reversal of metabolic syndrome. *Curr Nutr Rep* 2018;7:97–106.
- Trimboli P, Castellana M, Bellido D, Casanueva FF. Confusion in the nomenclature of ketogenic diets blurs evidence. *Rev Endocr Metab Disord* 2020;21:1–3.
- Castellana M, Conte E, Cignarelli A, Perrini S, Giustina A, Giovannella L, et al. Efficacy and safety of very low caloric ketogenic diet (VLCKD) in patients with overweight and obesity: A systematic review and meta-analysis. *Rev Endocr Metab Disord* 2019.
- Moreno B, Crujeiras AB, Bellido D, Sajoux I, Casanueva FF. Obesity treatment by very low-calorie-ketogenic diet at two years: reduction in visceral fat and on the burden of disease. *Endocrine* 2016;54:681–90.
- Gomez-Arbelaez D, Bellido D, Castro AI, Ordoñez-Mayan L, Carreira J, Galban C, et al. Body composition changes after very-low-calorie ketogenic diet in obesity evaluated by 3 standardized methods. *J Clin Endocrinol Metab* 2017;102:488–98.
- Gomez-Arbelaez D, Crujeiras AB, Castro AI, Martinez-Olmos MA, Canton A, Ordoñez-Mayan L, et al. Resting metabolic rate of obese patients under very low caloric ketogenic diet. *Nutr Metab* 2018;15:18.
- Crujeiras AB, Gomez-Arbelaez D, Zulet MA, Carreira MC, Sajoux I, de Luis D, et al. Plasma FGF21 levels in obese patients undergoing energy-restricted diets or bariatric surgery: a marker of metabolic stress? *Int J Obes* 2017;41:1570–8.
- de Luis D, Domingo JC, Izalola O, Casanueva FF, Bellido D, Sajoux I. Effect of DHA supplementation in a very low-calorie ketogenic diet in the treatment of obesity: a randomized clinical trial. *Endocrine* 2016;54:111–22.
- Goday A, Bellido D, Sajoux I, Crujeiras AB, Burguera B, García-Luna PP, et al. Short-term safety, tolerability and efficacy of a very low-calorie-ketogenic diet interventional weight loss program versus hypocaloric diet in patients with type 2 diabetes mellitus. *Nutr Diabetes* 2016;6:e230.
- Castro AI, Gomez-Arbelaez D, Crujeiras AB, Granero R, Agüera Z, Jimenez-Murcia S, et al. Effect of a very low-calorie ketogenic diet on food and alcohol cravings, physical and sexual activity, sleep disturbances, and quality of life in obese patients. *Nutrients* 2018;10.
- Cuevas-Sierra A, Ramos-Lopez O, Riezu-Boj JI, Milagro FI, Martinez JA. Diet, gut microbiota, and obesity: links with host genetics and epigenetics and potential applications. *Adv Nutr* 2019;10:517–30.
- Mandaviya PR, Joehanes R, Brody J, Castillo-Fernandez JE, Dekkers KF, Do AN, et al. Association of dietary folate and vitamin B-12 intake with genome-wide DNA methylation in blood: a large-scale epigenome-wide association analysis in 5841 individuals. *Am J Clin Nutr* 2019;110:437–50.
- Feng R, Cirera S, Taşöz E, Liu Y, Olsen LH, Christoffersen BØ. Diet-Dependent Changes of the DNA Methylation Using a Gating Minipig Model for Obesity. *Front Genet* 2021;12:632859.
- Salas-Huetos A, Moraleda R, Giardina S, Anton E, Blanco J, Salas-Salvado J, et al. Effect of nut consumption on semen quality and functionality in healthy men consuming a Western-style diet: a randomized controlled trial. *Am J Clin Nutr* 2018;108:953–62.
- Fasanelli F, Giraudou MT, Vineis P, Fiano V, Fiorito G, Grasso C, et al. DNA methylation, colon cancer and Mediterranean diet: results from the EPIC-Italy cohort. *Epigenetics* 2019;14:977–88.
- Ruan H-B, Crawford PA. Ketone bodies as epigenetic modifiers. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2018;21:260–6.
- Chen F, He X, Luan G, Li T. Role of DNA methylation and adenosine in ketogenic diet for pharmacoresistant epilepsy: focus on epileptogenesis and associated comorbidities. *Front Neurol* 2019;10:119.
- Lusardi TA, Akula KK, Coffman SQ, Ruskin DN, Masino SA, Boison D. Ketogenic diet prevents epileptogenesis and disease progression in adult mice and rats. *Neuropharmacology* 2015;99:500–9.
- Benjamin JS, Pilarowski GO, Carosso GA, Zhang L, Huso DL, Goff LA, et al. A ketogenic diet rescues hippocampal memory defects in a mouse model of Kabuki syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2017;114:125–30.
- Jaworski DM, Nambodiri AMA, Moffett JR. Acetate as a metabolic and epigenetic modifier of cancer therapy. *J Cell Biochem* 2016;117:574–88.
- Moreno CL, Mobbs CV. Epigenetic mechanisms underlying lifespan and age-related effects of dietary restriction and the ketogenic diet. *Mol Cell Endocrinol* 2017;455:33–40.
- Crujeiras AB, Diaz-Lagares A, Sandoval J, Milagro FI, Navas-Carretero S, Carreira MC, et al. DNA methylation map in circulating leukocytes mirrors subcutaneous adipose tissue methylation pattern: a genome-wide analysis from non-obese and obese patients. *Sci Rep* 2017;7:41903.
- Wahl S, Drong A, Lehne B, Loh M, Scott WR, Kunze S, et al. Epigenome-wide association study of body mass index, and the adverse outcomes of adiposity. *Nature* 2017;541:81–6.
- van Dijk SJ, Molloy PL, Varinli H, Morrison JL, Muhlhauser BS. Members of EpiSCOPE. Epigenetics and human obesity. *Int J Obes* 2015;39:85–97.
- Liu L, Chen Y, Chen J, Lu M, Guo R, Han J, et al. The relationship between PRDM16 promoter methylation in abdominal subcutaneous and omental adipose tissue and obesity. *Clin Nutr* 2021;40:2293–300.
- Crujeiras AB, Diaz-Lagares A, Moreno-Navarrete JM, Sandoval J, Hervas D, Gomez A, et al. Genome-wide DNA methylation pattern in visceral adipose tissue differentiates insulin-resistant from insulin-sensitive obese subjects. *Transl Res* 2016;178:13–24. e5.
- Crujeiras AB, Diaz-Lagares A, Stefanos OA, Macias-Gonzalez M, Sandoval J, Cueva J, et al. Obesity and menopause modify the epigenomic profile of breast cancer. *Endocr Relat Canc* 2017;24:351–63.
- Crujeiras AB, Morcillo S, Diaz-Lagares A, Sandoval J, Castellano-Castillo D, Torres E, et al. Identification of an epispignature of human colorectal cancer associated with obesity by genome-wide DNA methylation analysis. *Int J Obes* 2019;43:176–88.
- Bouchard L, Rabasa-Lhoret R, Faraj M, Lavoie M-E, Mill J, Pérusse L, et al. Differential epigenomic and transcriptomic responses in subcutaneous adipose tissue between low and high responders to caloric restriction. *Am J Clin Nutr* 2010;91:309–20.
- Moleres A, Campion J, Milagro FI, Marcos A, Campoy C, Garagorri JM, et al. Differential DNA methylation patterns between high and low responders to a weight loss intervention in overweight or obese adolescents: the EVASYON study. *Obesity* 2013;27:2504–12.
- Milagro FI, Campión J, Cordero P, Goyenechea E, Gómez-Uríz AM, Abete I, et al. A dual epigenomic approach for the search of obesity biomarkers: DNA methylation in relation to diet-induced weight loss. *Obesity* 2011;25:1378–89.
- García-Lacarte M, Milagro FI, Zulet MA, Martínez JA, Mansego ML. LINE-1 methylation levels, a biomarker of weight loss in obese subjects, are influenced by dietary antioxidant capacity. *Redox Rep* 2016;21:67–74.
- Nicoletti CF, Nonino CB, de Oliveira BAP, Pinhel Ma de S, Mansego ML, Milagro FI, et al. DNA Methylation and Hydroxymethylation Levels in Relation to Two Weight Loss Strategies: Energy-Restricted Diet or Bariatric Surgery. *Obes Surg* 2016;26:603–11.
- Crujeiras AB, Campion J, Díaz-Lagares A, Milagro FI, Goyenechea E, Abete I, et al. Association of weight regain with specific methylation levels in the NPY and POMC promoters in leukocytes of obese men: a translational study. *Regul Pept* 2013;186:1–6.
- Nicoletti CF, Pinhel MS, Noronha NY, Jácome A, Crujeiras AB, Nonino CB. Association of MFSD3 promoter methylation level and weight regain after gastric bypass: Assessment for 3 y after surgery. *Nutrition* 2020;70:110499.
- Samblas M, Milagro FI, Martínez A. DNA methylation markers in obesity, metabolic syndrome, and weight loss. *Epigenetics* 2019;14:421–44.
- Rohde K, Keller M, la Cour Poulsen L, Blüher M, Kovacs P, Böttcher Y. Genetics and epigenetics in obesity. *Metabolism* 2019;92:37–50.

- [51] Beisani M, Pappa S, Moreno P, Martínez E, Tarascó J, Granada ML, et al. Laparoscopic sleeve gastrectomy induces molecular changes in peripheral white blood cells. *Clin Nutr* 2020;39:592–8.
- [52] Opinion S. Scientific Opinion on the essential composition of total diet replacements for weight control. *EFSA J* 2015;13:1–52.
- [53] SCOOP-VLCD. Collection of data on products intended for use in very-low-calorie diets. EU: Report Brussels European Commission; 2002.
- [54] Sandoval J, Heyn H, Moran S, Serra-Musach J, Pujana MA, Bibikova M, et al. Validation of a DNA methylation microarray for 450,000 CpG sites in the human genome. *Epigenetics* 2011;6:692–702.
- [55] Moran S, Arribas C, Esteller M. Validation of a DNA methylation microarray for 850,000 CpG sites of the human genome enriched in enhancer sequences. *Epigenomics* 2016;8:389–99.
- [56] Wang L, Liu X, Liang H, Carroll RJ. Estimation and variable selection for generalized additive partial linear models. *Ann Stat* 2011;39:1827–51.
- [57] Falcon S, Gentleman R. Using GOSTats to test gene lists for GO term association. *Bioinformatics* 2007;23:257–8.
- [58] Jones PA. Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nat Rev Genet* 2012;13:484–92.
- [59] Tirado-Magallanes R, Rebbani K, Lim R, Pradhan S, Benoukraf T. Whole genome DNA methylation: beyond genes silencing. *Oncotarget* 2017;8:5629–37.
- [60] Lyko F. The DNA methyltransferase family: a versatile toolkit for epigenetic regulation. *Nat Rev Genet* 2018;19:81–92.
- [61] Sajoux I, Lorenzo PM, Gomez-Arbelaez D, Zulet MA, Abete I, Castro AI, et al. Effect of a very-low-calorie ketogenic diet on circulating myokine levels compared with the effect of bariatric surgery or a low-calorie diet in patients with obesity. *Nutrients* 2019;11.
- [62] Wu H, Liu M, Chi YTO, Wang J, Zhang Q, Liu L, et al. Handgrip strength is inversely associated with metabolic syndrome and its separate components in middle aged and older adults: a large-scale population-based study. *Metabolism* 2019;93:61–7.
- [63] Xu H, Liu J, Zhang X, Xue Y, Shi J, Chen W, et al. Estimation of skeletal muscle mass by bioimpedance and differences among skeletal muscle mass indices for assessing sarcopenia. *Clin Nutr* 2021. S0261-5614(21)00057-1.
- [64] Ling C, Rönn T. Epigenetics in human obesity and type 2 diabetes. *Cell Metabol* 2019;29:1028–44.
- [65] Koutnik AP, D'Agostino DP, Egan B. Anticatabolic effects of ketone bodies in skeletal muscle. *Trends Endocrinol Metabol* 2019;30:227–9.
- [66] Newman JC, Verdin E. Ketone bodies as signaling metabolites. *Trends Endocrinol Metabol* 2014;25:42–52.
- [67] Kumar R, Manning J, Spendlove HE, Kremmidiotis G, McKirdy R, Lee J, et al. ZNF652, a novel zinc finger protein, interacts with the putative breast tumor suppressor CBA2T3 to repress transcription. *Mol Canc Res* 2006;4:655–65.
- [68] Kumar P, Sharoyko VV, Spégel P, Gullberg U, Mulder H, Olsson I, et al. The transcriptional co-repressor myeloid translocation gene 16 inhibits glycolysis and stimulates mitochondrial respiration. *PLoS One* 2013;8:e68502.
- [69] Boutari C, Polyzos SA, Mantzoros CS. Of mice and men: Why progress in the pharmacological management of obesity is slower than anticipated and what could be done about it? *Metabolism* 2019;96: vi-xi.
- [70] Basile D, Bartoletti M, Polano M, Bortot L, Gerratana L, Di Nardo P, et al. Prognostic role of visceral fat for overall survival in metastatic colorectal cancer: A pilot study. *Clin Nutr* 2021;40:286–94.
- [71] Yasuda T, Delbono O, Wang Z-M, Messi ML, Girard T, Urwyler A, et al. JP-45/JSRP1 variants affect skeletal muscle excitation-contraction coupling by decreasing the sensitivity of the dihydropyridine receptor. *Hum Mutat* 2013;34:184–90.
- [72] Samblas M, Mansego ML, Zulet MA, Milagro FI, Martinez JA. An integrated transcriptomic and epigenomic analysis identifies CD44 gene as a potential biomarker for weight loss within an energy-restricted program. *Eur J Nutr* 2019;58:1971–80.
- [73] Kähkönen TE, Ivaska KK, Jiang M, Büki KG, Väänänen HK, Härkönen PL. Role of fibroblast growth factor receptors (FGFR) and FGFR like-1 (FGFR1) in mesenchymal stromal cell differentiation to osteoblasts and adipocytes. *Mol Cell Endocrinol* 2018;461:194–204.
- [74] Jia Y, Yuan L, Hu W, Liao Y, Suo L, Yang M, et al. Zinc-finger BED domain-containing 3 (Zbed3) is a novel secreted protein associated with insulin resistance in humans. *J Intern Med* 2014;275:522–33.
- [75] Scherneck S, Vogel H, Nester M, Kluge R, Schürmann A, Joost H-G. Role of zinc finger transcription factor zip69 in body fat storage and diabetes susceptibility of mice. *Results Probl Cell Differ* 2010;52:57–68.
- [76] Perakakis N, Yazdani A, Karniadakis GE, Mantzoros C. Omics, big data and machine learning as tools to propel understanding of biological mechanisms and to discover novel diagnostics and therapeutics. *Metabolism* 2018;87:A1–9.