

Pardeamiento de la grasa para combatir la obesidad

Marta Agudiez^a, Sofía Campillo^b, María Galvez^c, Carlota Tosat^d, Aina Catalina Mesquida^e

Universidad de Alcalá. Master Universitario en Dianas Terapéuticas en Señalización Celular, Investigación y Desarrollo

a. magudiezperez18@gmail.com b. sofiacam@ucm.es c. m.galvezs@hotmail.com d. carlotatbitri@gmail.com
e. ainacmesquida@gmail.com

Palabras clave: obesidad; γ -secretasa; tratamiento; High Throughput Screening (HTS); nanopartículas

Resumen

La obesidad, definida como una acumulación excesiva de grasa corporal, se ha llegado a definir como la pandemia del siglo XXI. Tradicionalmente se ha atribuido al desequilibrio entre la ingesta y el gasto de energía o a la ausencia de actividad física pero hoy en día se sabe que existe una relación con otras enfermedades y que el factor genético es responsable, de al menos, un 33% de los casos. La fisiopatología de la obesidad cursa con una inflamación crónica y la implicación de distintas vías de señalización entre las que destaca la vía Notch. Además, se distinguen dos tipos de grasa (grasa blanca y grasa parda) tanto por su histología como por la expresión de distintos marcadores (UCP-1 específico de la grasa parda). Mientras que la grasa blanca actúa como reservorio de energía, la grasa parda tiene una función de termogénesis. Es por ello que se ha elegido el pardeamiento de la grasa (o transformación de grasa blanca en grasa parda mediado por la vía Notch) como proceso para la búsqueda de un posible tratamiento contra la obesidad. Con este objetivo se propone la realización de un ensayo de *High Throughput Screening* o HTS libre de células basado en la tecnología AlpaLISA para el cribado de una biblioteca de más de 2 millones de compuestos que nos permita identificar posibles compuestos candidatos capaces de inhibir la actividad de la γ -secretasa (diana farmacológica elegida). Con el objetivo de aumentar la eficacia y disminuir la toxicidad de los compuestos candidatos generados, se desarrollaron distintos estudios tanto *in vitro* como *in vivo* y se propuso un mecanismo de vehiculización basado en nanopartículas compuestas por PLGA (*poly lactide-co glycolide*) con un marcador específico de tejido adiposo para la óptima acción del fármaco.

Cita: Agudiez, Marta; Campillo, Sofía; Galvez, María; Tosat, Carlota; Mesquida, Aina Catalina (2018) Pardeamiento de la grasa para combatir la obesidad. *dianas* 7 (1): e201803c13fp. ISSN 1886-8746 (electronic) journal.dianas.e201803c13fp. URI <http://hdl.handle.net/10017/15181>

Copyright: ©2018 Agudiez M, Campillo S, Galvez M, Tosat C, Mesquida AC. Algunos derechos reservados. Este es un artículo open-access distribuido bajo los términos de una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional. <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

Introducción

La obesidad se define, tal y como lo hace la Organización Mundial de la Salud, como “una acumulación anormal y excesiva de grasa que puede ser perjudicial para la salud”. La prevalencia de ésta casi se ha triplicado desde 1975 y los datos actuales, tanto en niños como en adultos, son cada vez más alarmantes [1]. Por ello, se ha llamado a la obesidad “la epidemia del siglo XXI”.

Las principales causas de la obesidad son una ingesta hipercalórica, combinada con un estilo de vida sedentario [2]. Además, también pueden intervenir factores genéticos [3], ya que se ha visto que hay ciertos *loci* relacionados con la ingesta calórica y la función del tejido adiposo. Las consecuencias de la obesidad son graves, dado que puede dar lugar a complicaciones y comorbilidades de tipo cardiovascular, diabetes tipo II y hacer al sujeto más propenso a padecer algunos tipos de cáncer.

La obesidad suele acompañarse de lo que se denomina inflamación crónica de baja intensidad en la que se crea un ambiente proinflamatorio con citoquinas [4] y especies reactivas de oxígeno en el tejido adiposo. También se ve aumentada la secreción de adipocinas, entre ellas, la leptina, hormona saciante que en estos pacientes no ejerce correctamente su función fisiológica.

Destacan dos tipos de grasa, la grasa blanca y la parda [5]. Las características diferenciales entre ambas son su capacidad termogénica [6] y la expresión de la proteína UCP1, siendo ambos mayores en la grasa parda. Ésta es mayoritaria en niños y su función principal es la liberación de energía y no la de su almacenaje, como es el caso del tejido adiposo blanco, por ello se propone como una posible diana terapéutica para el tratamiento de los pacientes obesos.

Centrando el estudio en el proceso del pardeamiento de la grasa, existen dos principales vías de señalización posiblemente implicadas: la vía MKK6 [7] y la vía Notch [8]. Ambas vías intervienen en muchos procesos celulares y tienen como molécula común la proteína desacoplante 1 (UCP1), la cual es un transportador de protones que se encuentra en la membrana interna mitocondrial. UCP1 provoca el desacoplamiento del transporte de electrones de la cadena respiratoria, aumentando la termogénesis y el

gasto energético y, por tanto, disminuyendo la obesidad. Sin embargo, ambas vías bloquean la acción de UCP1, lo cual provoca un aumento de la obesidad. Por ello, lo que se propone para combatir la obesidad es inhibir dichas vías de señalización.

De las dos vías de señalización implicadas en la transformación de la grasa blanca a la grasa parda se elige la vía Notch para este estudio ya que la vía MKK6 todavía no está del todo estudiada (es aún un modelo), mientras que la vía Notch ya ha sido estudiada para el tratamiento de la obesidad [9].

Vía Notch

El receptor Notch es una proteína transmembrana formada por tres dominios: un dominio extracelular (NECD), un dominio transmembrana (TMD) y un dominio intracelular (NICD). Los ligandos del receptor Notch también son proteínas transmembrana presentes en la membrana plasmática de otras células. Por tanto, las células que expresan los ligandos Notch deben encontrarse próximas a las células que expresan el receptor Notch para que puedan interactuar. Estos ligandos son miembros de la familia de proteínas DSL (Delta/Serrate/LAG-2) que incluye a las proteínas Delta-like (Dll1, Dll3, Dll4) y Jagged (Jag1 y Jag2) en mamíferos.

La unión del ligando al receptor induce unos cambios conformacionales en dicho receptor. A continuación, la metaloproteasa ADAM10/17 actúa cortando en el segmento S2 del dominio transmembrana liberando el dominio extracelular del receptor (NECD) y, posteriormente, mediante la acción de la γ -secretasa que corta también el dominio transmembrana, en este caso, en los segmentos S3 o S4, se libera el dominio intracelular del receptor (NICD). De esta forma, el dominio NICD queda libre para trasladarse al núcleo. Una vez en el núcleo, el dominio NICD es capaz de unirse a su cofactor Rbpj y actuar como factor de transcripción modulando la expresión de genes como Hes (Hairy/enhancer-of-split) y Hey (Hes related with YRPW motif protein). A su vez, Hes1 es capaz de unirse directamente a la región promotora de varios genes como Prdm16 (PR domain containing 16), Pparg (peroxisome proliferator-activated receptor gamma) o Ppargc1 α (Pparg coactivator 1 alpha), inhibiendo su transcripción y, en última instancia, inhibiendo la expresión de UCP1 [8]. Al inhibir UCP1, se estaría disminuyendo la termogénesis y el gasto de energía, lo cual daría lugar a un aumento de la obesidad (Figura 1). Por ello, se sugiere la inhibición de la vía Notch para revertir este proceso.

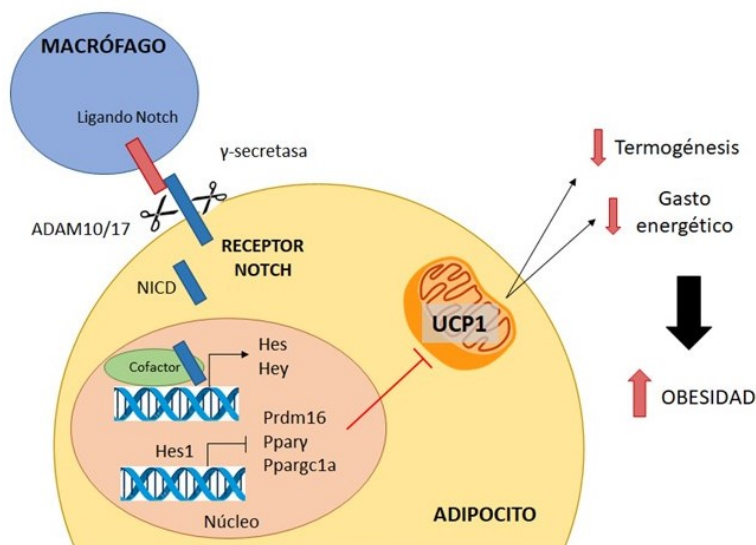


Figura 1. Regulación de la termogénesis y gasto energético en adipocitos a través de la vía Notch. La activación del receptor Notch es inducida tras la unión de su ligando. A continuación, actúa la metaloproteasa ADAM10/17 liberando el dominio extracelular (NECD) del receptor y, posteriormente, la γ -secretasa liberando el dominio intracelular (NICD) del receptor, el cual es capaz de trasladarse al núcleo y modular la expresión de genes como Hes y Hey. A su vez, Hes1 es capaz de unirse directamente a la región promotora de varios genes como Prdm16, Pparg y Ppargc1 α inhibiendo su transcripción y, en última instancia, inhibiendo la expresión de UCP1. Como consecuencia, se produce una disminución de la termogénesis y del gasto energético en el organismo favoreciendo la aparición de la obesidad. Hes, *Hairy/enhancer-of-split*; Hey, *Hes related with YRPW motif protein*; Pparg, *peroxisome proliferator-activated receptor gamma*; Ppargc1 α , *Pparg coactivator 1-alpha*; Prdm16, *PR domain containing 16*; UCP1, *uncoupling protein 1*.

La vía Notch está relacionada con el pardeamiento de la grasa dado que cuando está activada, los preadipocitos son capaces de diferenciarse a adipocitos blancos, los cuales presentan unas mayores acumulaciones de grasa y un menor número de mitocondrias. Sin embargo, cuando la vía Notch está inhibida, los preadipocitos se diferencian a adipocitos beige, los cuales presentan unas acumulaciones de grasa más pequeñas y un mayor número de mitocondrias [10]. Por tanto, la inhibición de la señalización

de Notch favorece la diferenciación tanto de preadipocitos como de adipocitos blancos hacia adipocitos beige con el fin de aumentar la termogénesis y el gasto energético, disminuyendo así la obesidad.

Existen múltiples inhibidores de la vía Notch, sin embargo, se elige como diana terapéutica la γ -secretasa, ya que es la responsable de liberar el producto que desencadena la señalización (NICD). Además, estudios previos han utilizado inhibidores de la γ -secretasa para tratar tanto la obesidad como otras patologías como el Alzheimer [11].

γ -secretasa

La γ -secretasa es un complejo multiproteico de gran tamaño constituido por 4 proteínas integrales de membrana. Este complejo comienza a sintetizarse en el retículo endoplasmático y las primeras proteínas en ensamblarse son la nicastrina y la Aph1. La nicastrina presenta un dominio intracelular Ct muy corto y un dominio extracelular Nt muy largo y glicosilado, implicado en el reconocimiento del sustrato, mientras que la Aph1 está formada por 7 segmentos transmembrana. Tras el ensamblaje de estas dos proteínas, se une la presenilina, proteína formada por 10 dominios transmembrana. Esta proteína es una aspartil proteasa que actúa en el interior de la bicapa lipídica y ahí es donde reside la actividad catalítica del complejo, concretamente en dos aspárticos catalíticos (Asp 257 y 385). Durante su ensamblaje en la membrana, la presenilina sufre una endoproteólisis en el dominio transmembrana 7 dando lugar a dos proteínas. Esta endoproteólisis es llevada a cabo por Pen2, la cual presenta 2 dominios transmembrana, de manera que los dos aspárticos catalíticos quedan enfrentados y el complejo se activa (Figura 2).

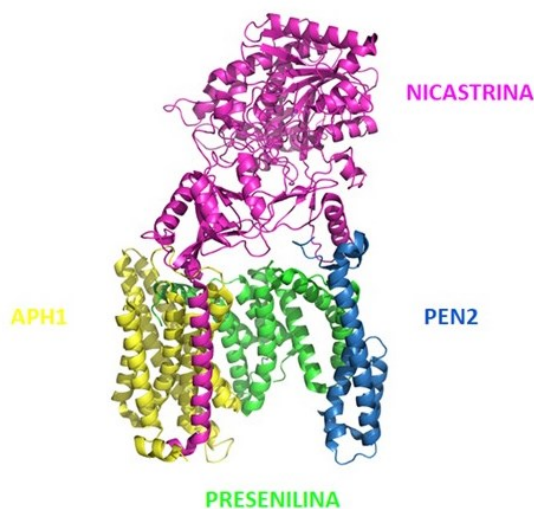


Figura 2. Estructura tridimensional de la γ -secretasa realizada mediante el programa de visualización molecular PyMOL. Se trata de un complejo multiproteico de gran tamaño constituido por 4 proteínas de membrana: la nicastrina, con el sitio de unión del sustrato; la Aph1; la presenilina, con el centro activo formado por dos aspárticos catalíticos (Asp 257 y 385); y Pen2, la cual realiza una endoproteólisis sobre la presenilina activando el complejo.

Materiales y métodos

Diseño HTS

El término *High Throughput Screening* (HTS), o cribado farmacológico de alto rendimiento, consiste en testar grandes colecciones de compuestos químicos o productos naturales para identificar moléculas biológicamente activas. En este estudio se diseñó un ensayo *in vitro* (libre de células) para seleccionar los compuestos que inhiben específicamente a la γ -secretasa en la vía Notch.

Como sustrato de este ensayo se usa el receptor Notch 1 biotinilado [12]. Para ello se construye un vector de expresión formado por el gen del receptor Notch 1, la marca MBP (proteína de unión a maltosa) en su extremo 5' y la marca Avi-Tag, necesaria para la unión de la biotina, en el extremo 3', todo ello bajo el control de un promotor inducible por IPTG. También es necesario un segundo vector en el que se clona el gen de la enzima biotina ligasa.

Tras co-transformar células de *E. coli* de la cepa BL21 con ambos vectores en presencia de biotina e IPTG, se obtienen grandes cantidades de la proteína recombinante, formada por la marca MBP en el extremo Ct, la secuencia del receptor Notch 1 y la biotina unida al extremo Nt. La purificación de la proteína recombinante del resto de proteínas microbianas se realiza usando una columna de amilosa. Tras la unión de la proteína recombinante a la columna a través de la marca MBP, ésta se eluye

específicamente usando un *buffer* de concentración elevada de maltosa. La eliminación posterior de la marca MBP se realiza con un tratamiento con trombina (Figura 3A).

Posteriormente se lleva a cabo la incubación del receptor Notch 1 marcado con la biotina con la γ -secretasa previamente aislada y purificada [13]. Finalmente, para la detección de la reacción se emplea la tecnología AlphaLISA [14]. Este ensayo utiliza además anticuerpos monoclonales SM320 (producidos previamente en ratón) que reconocen específicamente el fragmento de escisión resultante de la acción de la γ -secretasa sobre el punto de corte S3 del fragmento transmembrana del receptor Notch 1.

Por último, completando la lista de reactivos, son necesarias una bola donadora unida a estreptavidina (que reconoce específicamente la biotina), una bola aceptora unida a la proteína A (que reconoce la fracción constante del anticuerpo) y un buffer específico de este ensayo (25 mM HEPES, pH 7.5, 75mM NaCl, 0.05% BSA, 0.05% Tween-20) (Figura 3B).

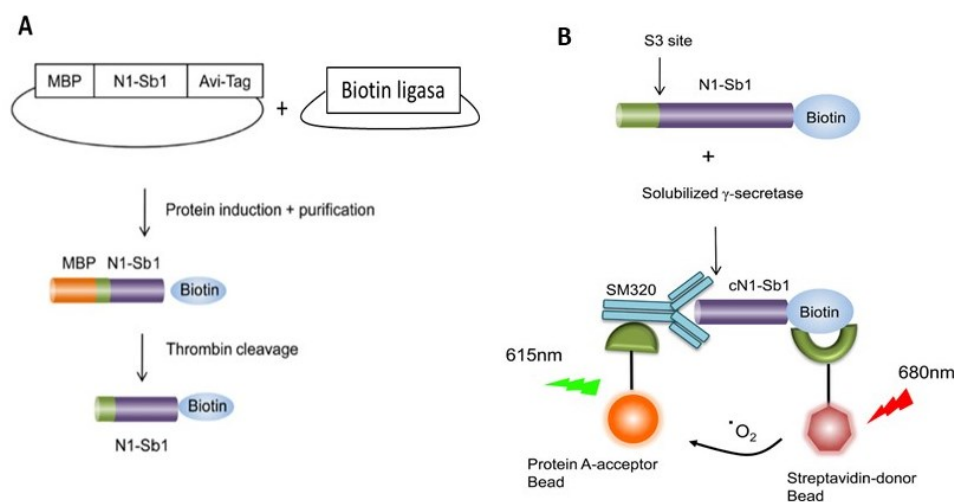


Figura 3. Representación del protocolo de obtención del receptor Notch 1 biotinilado y del ensayo *in vitro* AlphaLISA contra la γ -secretasa. (A) El gen del receptor Notch 1 es clonado en un vector de expresión entre la marca MBP (proteína de unión a la maltosa) y la marca Avi-tag. La construcción es inducida con IPTG en presencia de biotina exógena. Posteriormente tiene lugar la purificación de la proteína recombinante y la eliminación de la marca MBP con un tratamiento de trombina. (B) El receptor Notch 1 biotinilado se incuba junto con la γ -secretasa y ésta corta en el segmento S3 liberándose el producto de escisión el cual es reconocido en su extremo Nt por el anticuerpo monoclonal SM320. La bola donadora unida a la estreptavidina se une a la biotina y la bola aceptora unida a la proteína A se une al anticuerpo. La interacción entre la bola donadora y la bola aceptora del ensayo AlphaLISA a través de la producción de singletes de oxígeno permite la generación y detección de una señal de quimioluminiscencia a una longitud de onda de 615 nm.

Paso de hit a lead

Una vez realizado el cribado de una biblioteca de, aproximadamente, 2.000.000 de compuestos frente al ensayo HTS anteriormente descrito, se identifican aquellos *hits* o moléculas biológicamente activas que tienen la capacidad de inhibir a la γ -secretasa.

Para reducir el número de *hits* obtenidos, se realizan ensayos de toxicidad, permeabilidad, solubilidad y SAR (*Structure-Activity Relationship*) obteniéndose de este modo los *leads* o cabezas de serie. Estos *leads* son compuestos químicos con actividad farmacológica y biológica cuya estructura debe ser optimizada para aumentar su selectividad, eficacia o potencia entre otros parámetros farmacocinéticos. Tras la realización de estas modificaciones sería necesario volver a probar el ensayo HTS frente a las nuevas moléculas generadas para ver que los cambios realizados no originan una pérdida de actividad.

Una vez reducido considerablemente el número de compuestos candidatos y dado que el ensayo HTS propuesto es un ensayo libre de células, realizamos ensayos *in vitro* para ver que la actividad de los candidatos no se pierde al trabajar en el contexto celular. Por otra parte, se realizan ensayos *in vivo* ya que se ha propuesto un mecanismo de vehiculización del fármaco mediante el uso de nanopartículas.

Diseño ensayo *in vitro*

Para testar la actividad de los fármacos inhibiendo la vía Notch y estimulando por tanto el pardeamiento *in vitro*, se diseñó un ensayo *in vitro* utilizando la línea celular CRL-3280 (ATCC) de adipocitos de ratón. Esta línea celular es un buen modelo celular para el estudio de la obesidad y más concretamente para estudiar el pardeamiento de la grasa blanca ya que dichos adipocitos se pueden diferenciar a tejido pardo [15].

Las células se tratan con las moléculas a estudiar y se determinan los efectos del pardeamiento analizando la expresión de proteínas marcadoras de la grasa parda tanto por qPCR como por *Western Blot*. También se estudia la actividad oxidativa de la mitocondria para lo que se analiza la expresión de los genes Cox [16].

Vehiculización del fármaco

Con el objetivo de reducir los posibles efectos secundarios consecuencia de la administración del fármaco, se propuso la vehiculización de los fármacos para dirigirlos específicamente frente a tejido adiposo. Los compuestos se encapsulan en nanopartículas (NP), aprobadas por la FDA (*Food and Drug Administration*), que promueven la liberación directa del fármaco en los adipocitos. Están compuestas por PLGA (*poly lactide-co glycolide*) con un marcador específico de tejido adiposo, ya que se ha visto que incrementan la captación específica por parte del tejido. En el interior de dichas NP se encuentran las moléculas a estudiar [16, 17].

Para confirmar la liberación del fármaco en los adipocitos, se analiza la captación celular de las nanopartículas por parte de la línea celular CRL-3280 utilizando microscopía de fluorescencia. Las células CRL-3280 se incuban con NP en cuyo interior contienen un colorante fluorescente para facilitar la visualización por microscopía de fluorescencia. Paralelamente, se marcan fluorescentemente en verde los endo/lisomas con *LysoTracker Green*, ya que dichas partículas se internalizan por endocitosis. Este proceso de endocitosis también podría visualizarse por microscopio electrónico de transmisión (TEM) [16].

Por otro lado, es necesario analizar la biodistribución de las NP en el ratón y garantizar que no se distribuyen por el organismo alcanzando otros tejidos. Las NP deben dirigirse específicamente a tejido adiposo y no difundir. Para ello, se examina la distribución de las NP-PLGA marcadas con Cy5.5 tras inyección en depósitos de grasa blanca inguinal de ratón. Se inyectan en la grasa inguinal ya que tiene una alta capacidad de reclutar adipocitos beige y ha sido de los más estudiadas [16].

Diseño experimento *in vivo*

Se diseñó un ensayo *in vivo*, para seleccionar las moléculas que inhiben la γ -secretasa y estudiar la eficacia de la vehiculización de los compuestos dirigidos específicamente frente a tejido adiposo. Para ello, se utiliza un modelo animal de ratón, concretamente la cepa C57BL/6 de 10 semanas a la que se induce obesidad con una dieta HFD (*high fat diet*). Para mantener la obesidad de dichos ratones durante el ensayo, se continúa su alimentación con dicha dieta. Los resultados obtenidos en ratón, teóricamente, deben ser bastante extrapolables a humanos ya que la vía Notch está muy conservada [16].

Estos ratones fueron tratados con cuatro condiciones, el compuesto disuelto en DMSO, DMSO como control, el compuesto interiorizado en NP, y la NP como control. Además de los compuestos seleccionados para el ensayo, se analiza también la dibenzazepina (DBZ) ya que está siendo estudiada para inhibir la γ -secretasa y con ella se han realizado estos mismos estudios por lo que puede servir como un buen control. El porcentaje de DMSO en el que se disuelven los compuestos debe ser mínimo para evitar problemas de solubilidad [18].

Los compuestos, tanto libres como interiorizados en NP, se inyectan en los depósitos de grasa inguinal. La inyección de estos compuestos, inhiben la señalización de Notch promoviendo el pardeamiento de la grasa, disminuyendo los niveles de Hes1 y aumentando la síntesis de UCP1. Es por ello, que, para estudiar el efecto de los compuestos, se analizan los niveles de las proteínas marcadoras de pardeamiento tanto por qPCR como por *Western Blot*. Además, se realiza una tinción inmunohistoquímica de hematoxilina y eosina, y de Ucp1 para observar los cambios fenotípicos del tejido y el aumento de la expresión de UCP1 [8, 16].

Resultados

Ensayo HTS

Con el objetivo de identificar inhibidores de nuestra diana farmacológica, el ensayo HTS se prueba frente a una biblioteca de 2.000.000 de compuestos. Aquellos compuestos que originen una intensidad de fluorescencia a 615 nm menor que la situación control (γ -secretasa, buffer de reacción AlphaLISA, y DMSO) serán considerados *hits*. Esto es debido a que si se están buscando inhibidores de la γ -secretasa, la γ -secretasa no tendrá la capacidad de hidrolizar al receptor Notch en su segmento S3. De este modo, no se liberará el fragmento NCID, el anticuerpo SM320 no reconocerá su sustrato y como consecuencia final, no tendrá lugar la transferencia de singletes de oxígeno entre la bola donadora y la bola aceptora, disminuyendo así la intensidad de la señal de fluorescencia a 615 nm.

Para reducir el número de *hits* obtenidos frente a la actividad de la γ -secretasa, se realizan ensayos de toxicidad, permeabilidad, solubilidad y SAR obteniéndose de este modo los *leads*. Finalmente, tras la optimización de los *leads*, los compuestos candidatos pasan a probarse en ensayos *in vitro* e *in vivo*.

Ensayo in vitro

Tras el tratamiento de la línea celular CRL-3280 con las moléculas de estudio, se determinaron los niveles de mRNA de proteínas marcadoras del pardeamiento mediante qPCR y *Western Blot*. Se seleccionan aquellas moléculas que incrementen significativamente los niveles de UCP1, proteína desacoplante que aumenta la termogénesis y el gasto energético, reduciendo la cantidad de grasa corporal [19]; los niveles de DIO2, enzima responsable de la conversión de las hormonas tiroideas T4 a T3 que incrementa los niveles de UCP1 [20]; los niveles de Ppargc1 α (coactivador 1 α de Pparg) coactivador que incrementa la actividad transcripcional de Pparg (regulador del metabolismo lípido) [21]; mientras que los niveles de Cidea deberían disminuir significativamente ya que restringe a lipólisis y favorece el almacenamiento [22].

También se espera obtener un incremento de la expresión de los genes Cox lo cual indica un incremento de la capacidad oxidativa de la mitocondria, proceso estrechamente relacionado con el pardeamiento de la grasa.

El conjunto de estos resultados sugiere la inhibición de la vía Notch y la inducción del pardeamiento por parte de las moléculas que se están analizando [16].

Vehiculización del fármaco

La captación celular de las NP se analiza mediante el marcaje fluorescente de las mismas ya que facilita su visualización y permite estudiar su localización celular. Las NP son endocitadas por los adipocitos por lo que, a tiempos cortos tras la incubación, se esperaría una co-localización del marcaje de las NP con los endosomas tardíos marcados con *LysoTracker Green*, indicando una rápida endocitosis de las NP.

Las NP además de interiorizarse en los adipocitos, deben retenerse en ellos y no difundir a otros tejidos pues incrementarían los efectos secundarios. Por ello, tras la inyección de las NP marcadas con Cy5.5 en los depósitos de grasa blanca inguinal, debería observarse una alta señal de fluorescencia en el sitio de inyección. Además, debería mantenerse retenida en los depósitos según pasa el tiempo, garantizando así que las NP no se distribuyen en el organismo.

Resultados positivos en ambos experimentos, validan las nanopartículas como vehículo en la administración de nuestros compuestos [16].

Ensayo in vivo

Los efectos que producen sobre el pardeamiento los compuestos inyectados en los modelos de ratón obesos se estudian por qPCR y *Western Blot*, analizando la expresión de los genes marcadores de la grasa parda. Aquellos compuestos que inhiben la vía Notch, producirían un incremento de UCP1, DIO2 y Ppargc1 α mientras que los niveles de Cidea deberían disminuir. Estos resultados indican una transformación de la grasa blanca a grasa parda con mayor consumo energético.

El pardeamiento de la grasa también se estudia por tinción inmunohistoquímica con hematoxilina y eosina. Los cambios fenotípicos esperados serían una pérdida de gotas de lípidos multiloculares, contracción de los adipocitos y un incremento de la expresión de UCP1 [8, 16].

Mecanismo de acción

Dado la importancia que tiene el conocer el mecanismo de acción de los compuestos, se busca cómo interaccionan diferentes compuestos con la γ -secretasa. Se sabe que DBZ (compuesto utilizado como control) interacciona en la presinilina (subunidad de la γ -secretasa). Este compuesto puede interaccionar de dos maneras a través del extremo carboxilo terminal o del amino terminal, pero nunca interactúa con el centro catalítico de la enzima [22].

A través del *Protein Data Bank* (PDB), se ha visto que la γ -secretasa tiene muchos inhibidores que interaccionan en diferentes partes de la estructura. Hay que destacar que para que la enzima sea funcional tiene que formar el complejo entero y que, por lo tanto, al inhibir cualquiera de las subunidades, el complejo se puede ver alterado y de esta manera queda alterada la función del complejo por completo. Se cree que puede suponer una ventaja a la hora de tratar futuras resistencias y la capacidad de hacer terapia combinada.

Vía de Administración

Los pacientes con obesidad se caracterizan por acumular gran cantidad de grasa. Hay un reservorio de grasa blanca (nuestro objeto de estudio) principalmente en la parte abdominal. Dentro de éste, se diferencia la localizada en la zona subcutánea y en la zona visceral, rodeando a los diferentes órganos.

La vía de administración de los compuestos en las nanopartículas más adecuada sería por vía subcutánea, que hace que se inyecten directamente en la zona de interés y al estar vehiculizadas a tejido adiposo, se pueden minimizar efectos adversos.

Efectos Secundarios

Para determinar los posibles efectos secundarios, se estudia la localización de la γ -secretasa y del receptor Notch1 en los diferentes tejidos del organismo utilizando *The Human Protein Atlas* [23]. Como resultado de dicha búsqueda, se ha visto que las dos proteínas son muy ubicuas, estando presente en la mayoría de los tejidos del organismo, pero el tejido adiposo en ninguna de las dos es el tejido mayoritario, de ahí la importancia de la vehiculización y la correcta vía de administración.

Hay que destacar que la vía Notch tiene un papel importante en el desarrollo, en la comunicación célula-célula, en el control del destino celular al controlar la proliferación y en la homeostasis de los tejidos, al estar implicada en procesos de diferenciación [8]. Debido a ello, es relevante destacar posibles efectos secundarios que podrían aparecer. A nivel del sistema inmune, se puede ver afectado el desarrollo de linfocitos T y B. En cuanto al sistema gastrointestinal, se pueden ver efectos tóxicos [24, 25], lo que hace que no sea aconsejable la administración vía oral. Y, por último, en la médula ósea, se puede ver alterado el mantenimiento y la quiescencia de células madre. Además, debido al incremento de la capacidad termogénica en el tejido adiposo, se puede ver incrementada la temperatura corporal.

Perspectivas futuras

Se ha visto que la inhibición de la γ -secretasa y la vía Notch se puede aplicar a otras patologías y se han visto resultados de la utilización de inhibidores de la γ -secretasa para enfermedades como Alzheimer [11], distintos tipos de cáncer [24, 25] y para hígado graso [26]. Es importante destacar que para que las terapias sean efectivas y se minimicen los efectos secundarios hay que dirigir de una manera muy eficaz los inhibidores a sus dianas farmacológicas y elegir una adecuada vía de administración, además de usar una terapia totalmente dirigida.

Referencias

1. Obesidad y sobrepeso. 2018 (8 febrero) En Organización Mundial de la Salud. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/es/>
2. Sun, X., Li, P., Yang, X., Li, W., Qiu, X. and Zhu, S. 2017. From genetics and epigenetics to the future of precision treatment for obesity. *Gastroenterol Rep (Oxf)*. 5(4):266-70.
3. Herrera, B.M. and Lindgren, C.M. 2010. The genetics of obesity. *Curr Diab Rep*. 10(6):498-505.
4. Acosta, E. 2012. Obesidad, tejido adiposo y resistencia a la insulina. *Acta Bioquím Clín Latinoam*. 46(2):183-94.
5. Park, A., Kim, W.K. and Bae, K.H. 2014. Distinction of white, beige and brown adipocytes derived from mesenchymal stem cells. *World J Stem Cells*. 6(1):33-42.
6. Wu, J., Boström, P., Sparks, L.M., Ye, L., Choi, J.H., Giang, A.H., Khandekar, M., Virtanen, K.A., Nuutila, P., Schaart, G., Huang, K., Tu, H., van Marken Lichtenbelt, W.D., Hoeks, J., Enerbäck, S., Schrauwen, P. and Spiegelman B.M. 2012. Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. *Cell*. 150(2):366-76.
7. Matesanz, N., Bernardo, E., Acín-Pérez, R., Manieri, E., Pérez-Sieira, S., Hernández-Cosido, L., Montalvo-Romeral, V., Mora, A., Rodríguez, E., Leiva-Vega, L., Lechuga-Vieco, A.V., Ruiz-Cabello, J., Torres, J.L., Crespo-Ruiz, M., Centeno, F., Álvarez, C.V., Marcos, M., Enríquez, J.A., Nogueiras, R. and Sabio, G. 2017. MKK6 controls T3-mediated browning of white adipose tissue. *Nat Commun*. 8(1):856.
8. Bi, P. and Kuang, S. 2015. Notch signaling as a novel regulator of metabolism. *Trends Endocrinol Metab*. 26(5):248-55.
9. Bi, P., Shan, T., Liu, W., Yue, F., Yang, X., Liang, X.R., Wang, J., Li, J., Carlesso, N., Liu, X. and Kuang, S. 2014. Notch signaling regulates adipose browning and energy metabolism. *Nat Med*. 20(8): 911-8.

10. Gridley, T. and Kajimura, S. 2014. Lightening up a notch: Notch regulation of energy metabolism. *Nat Med.* 20(8):811-2.
11. Lundkvist, J. and Näslund, J. 2007. Gamma-secretase: a complex target for Alzheimer's disease. *Curr Opin Pharmacol.* 7(1):112-8.
12. Chau, D.M., Crump, C.J., Villa, J.C., Scheinberg, D.A. and Li, Y.M. 2012. Familial Alzheimer Disease Presenilin-1 Mutations Alter the Active Site Conformation of gamma-secretase. *J Biol Chem.* 287:17288–96.
13. Chau, D.M., Shum, D., Radu, C., Bhinder, B., Gin, D., Gilchrist, M.L., Djaballah, H. and Li, Y.M. 2013. A Novel High-Throughput 1536-well Notch1 γ -Secretase. AlphaLISA Assay. *Comb Chem High Throughput Screen.* 16(6):415–24.
14. Shelton, C.C., Tian, Y., Shum, D., Radu, C., Djaballah, H. and Li, Y.M. 2009. A miniaturized 1536-well format gamma-secretase assay. *Assay Drug Dev Technol.* 7:461–70.
15. CRL-3280. 2018 (8 febrero) Casa comercial ATCC https://www.lgestandards-atcc.org/Products/All/CRL-3282.aspx?utm_id=e16082552814&geo_country=es
16. Jiang, C., Cano-Vega, M.A., Yue, F., Kuang, L., Narayanan, N., Uzunalli, G., Merkel, M.P., Kuang, S. and Deng, M. 2017. Dibenzazepine-Loaded Nanoparticles Induce Local Browning of White Adipose Tissue to Counteract Obesity. *Molecular Therapy.* 25(7):1718-29.
17. Xue, Y., Xu, X., Zhang, X.Q., Farokhzad, O.C. and Langer, R. 2016. Preventing Diet-Induced Obesity in Mice by Adipose Tissue Transformation and Angiogenesis Using Targeted Nanoparticles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 113(20):5552-7.
18. UCP1 Uncoupling Protein 1. 2018 (10 febrero). En Gene NCBI. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7350>
19. DIO2 Iodothyronine Deiodinase 2. 2018 (10 febrero). En Gene NCBI. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1734>
20. Hondares, E., Rosell, M., Díaz-Delfín, J., Olmos, Y., Monsalve, M., Iglesias, R., Villarroya, F. and Giral, M. 2011. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α (PPAR α) Induces PPAR γ Coactivator 1 α (PGC-1 α) Gene Expression and Contributes to Thermogenic Activation of Brown Fat: Involvement of PRDM16. *J Biol Chem.* 286(50):43112-22.
21. Cidea Cell Death-Inducing DFFA-like Effector A. 2018 (10 febrero). En Gene, NCBI. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1149>
22. Fuwa, H., Takahashi, Y., Konno, Y., Watanabe, N., Miyashita, H., Sasaki, M., Natsugari, H., Kan, T., Fukuyama, T., Tomita, T. and Iwatsubo, T. 2007. Divergent Synthesis of Multifunctional Molecular Probes To Elucidate the Enzyme Specificity of Dipeptidic γ -Secretase Inhibitors. *ACS CHEMICAL BIOLOGY.* 2(6):408-18.
23. Gamma secretase and notch1. 2018 (12 febrero). En The Human Protein Atlas. <https://www.proteinatlas.org/>
24. Purow, B. 2012. Notch Inhibition as a Promising New Approach to Cancer Therapy. *Adv Exp Med Biol.* 727:305–19.
25. Olsauskas-Kuprys, R., Zlobin, A. and Osipo, C. 2013. Gamma secretase inhibitors of Notch signaling. *OncoTargets and Therapy.* 6:943–55.
26. Zhao, N.J., Liao, M.J., Wu, J.J., Chu, K.X. 2018. Curcumin suppresses Notch-1 signaling: Improvements in fatty liver and insulin resistance in rats. *Mol Med Rep.* 17(1):819-26.