

UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA  
FACULTAD DE MEDICINA Y ODONTOLOGÍA

TRABAJO FIN DE GRADO DE MEDICINA



**Título:** Afectación hepática en ratones deficientes en seipina. Bases moleculares y caracterización anatomopatológica.

**Autor:** García Formoso, Lía

**Tutor:** Araújo Vilar, David

**Cotutora:** Sánchez Iglesias, Sofía

**Colaborador docente:** Lázare Iglesias, Héctor

**Departamento:** Psiquiatría, Radiología, Salud Pública, Enfermería y Medicina

**Curso Académico:** 2019-2020

**Convocatoria:** 1ª Ordinaria (junio 2020)



## **AGRADECIMIENTOS**

Al colaborador, Héctor Lázare Iglesias, por su dedicación docente desinteresada, por su cercanía y, sobre todo, por todas las horas compartidas delante de un ocular.

A Ana Senra, por procesar todas y cada una de las muchas preparaciones en que se basa el estudio.

A mi cotutora, Sofía Sánchez Iglesias, por su tutela a lo largo de casi cuatro años, por su esfuerzo, constancia y atención ejemplares.

A mi tutor, David Araújo Vilar, por brindarme la oportunidad de participar en este proyecto con el equipo de UETeM y de familiarizarme con la investigación básica, así como por su apoyo a lo largo de todo el proceso.

A mi familia, por sufrirme y arroparme en cada paso del camino.

# ÍNDICE

<b>RESUMEN</b> .....	<b>4</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>5</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>6</b>
<b>1 INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>7</b>
1.1. BASES MOLECULARES: <i>BSCL2</i> /SEIPINA .....	7
1.1.1. El gen <i>BSCL2</i> .....	7
1.1.2. La seipina .....	8
1.1.2.1 Topografía, estructura y oligomerización de la seipina .....	8
1.1.2.2 Caracterización anatómica de la expresión de <i>BSCL2</i> /seipina .....	8
1.1.2.3 Funciones de la seipina .....	9
1.2. <i>BSCL2</i> /SEIPINA Y ENFERMEDAD .....	12
1.2.1. Lipodistrofia congénita generalizada tipo 2 .....	12
1.2.2. Otras enfermedades asociadas a <i>BSCL2</i> /seipina .....	13
1.3. LA ENFERMEDAD HEPÁTICA GRASA NO ALCOHÓLICA .....	13
1.3.1. Concepto .....	13
1.3.2. Histopatología .....	14
1.3.3. Patogenia .....	15
1.3.3.1 Hipótesis de los ataques múltiples .....	15
1.3.3.2 FGF21 en el metabolismo lipídico y la EHGNA .....	16
1.4. SEIPINA Y HEPATOPATÍA .....	18
1.4.1. Afectación hepática en pacientes con LCG tipo 2 .....	18
1.4.2. Modelos animales .....	18
1.4.2.1 Modelos animales de EHGNA .....	18
1.4.2.2 Disrupción ubicua de <i>Bscl2</i> /seipina .....	19
1.4.2.3 Disrupción específica de <i>Bscl2</i> /seipina en el hígado .....	20
1.4.2.4 Disrupción específica de <i>Bscl2</i> /seipina en el tejido adiposo .....	20
1.4.3. Patogenia de la EHGNA en el contexto de la pérdida de función de la seipina .....	21
<b>2 JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS</b> .....	<b>22</b>
2.1. JUSTIFICACIÓN .....	22
2.2. OBJETIVOS .....	23
2.2.1. Objetivo principal .....	23
2.2.2. Objetivos específicos .....	23
<b>3 ANIMALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>24</b>
3.1. DISEÑO DEL ESTUDIO .....	24
3.2. MUESTRA DE ESTUDIO Y RECOGIDA DE DATOS .....	25
3.3. VARIABLES RECOGIDAS .....	25
3.4. ANIMALES .....	25
3.4.1. Ratones transgénicos .....	25
3.4.2. Manejo de los animales .....	26

3.4.3.	Necropsia y obtención de las muestras .....	27
3.5.	ANÁLISIS HISTOPATOLÓGICO.....	27
3.6.	ESTUDIOS DE EXPRESIÓN DE <i>Fgf21</i> .....	28
3.7.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	29
<b>4</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>30</b>
4.1.	GENERACIÓN DE RATONES TRANSGÉNICOS .....	30
4.1.1.	Fertilidad y viabilidad .....	30
4.1.2.	Supervivencia y mortalidad .....	30
4.2.	EXAMEN MACROSCÓPICO DEL HÍGADO .....	30
4.3.	EXAMEN MICROSCÓPICO DEL HÍGADO .....	32
4.3.1.	Descripción histopatológica.....	32
4.3.2.	Puntuación NASH CRN.....	34
4.3.3.	Análisis de <i>Oil red O</i> .....	36
4.3.4.	Análisis inmunohistoquímico de CK8/18 .....	36
4.3.5.	Análisis inmunohistoquímico de FGF21 .....	37
4.4.	EXPRESIÓN HEPÁTICA DE ARNm DE <i>Fgf21</i> .....	37
<b>5</b>	<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>38</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>42</b>
<b>7</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>44</b>
<b>8</b>	<b>ANEXO .....</b>	<b>51</b>

## RESUMEN

**Introducción y objetivos.** La lipodistrofia congénita generalizada tipo 2 es una enfermedad rara de herencia autosómica recesiva caracterizada por ausencia casi total de tejido adiposo. Se asocia a alteraciones metabólicas y a afectación hepática de instauración temprana, que condicionan un pronóstico pobre. Variaciones de diversa índole de la seipina, proteína codificada por el gen *BSCL2*, parecen ser las responsables de sus manifestaciones. En este trabajo, se exploran las consecuencias anatomopatológicas y moleculares del déficit de seipina a nivel hepático mediante un modelo murino de la enfermedad para tratar de establecer las relaciones pertinentes entre genotipo, grado de afectación hepática y expresión de la citoquina *Fgf21*.

**Animales y métodos.** Estudio experimental de las consecuencias morfométricas, anatomopatológicas y moleculares a nivel hepático de la disrupción ubicua de la seipina en ratones transgénicos generados mediante tecnología Cre-loxP. Se han establecido tres cohortes de ratones: homocigotos *Bscl2*<sup>-/-</sup>, heterocigotos *Bscl2*<sup>+/-</sup> y controles *wild-type Bscl2*<sup>+/+</sup>, y se han practicado necropsias entre 1 y 24 meses de edad. Se han descrito las características macroscópicas e histopatológicas del hígado, evaluado el grado de esteatohepatitis por medio del sistema de la NASH CRN y analizado la expresión de *Fgf21*.

**Resultados.** Los ratones *knockout* de seipina presentaron lipoatrofia generalizada y hepatomegalia, siendo el peso del hígado mayor que el de los *wild-type*. Desarrollaron esteatosis hepática mixta de predominio macrovesicular y de inicio temprano, con evolución a esteatohepatitis y fibrosis pericelular ligera. Además, la expresión de *Fgf21* resultó ser significativamente mayor que en los controles.

**Conclusiones.** La inactivación del gen *Bscl2* en ratones induce el desarrollo de lipodistrofia generalizada con enfermedad hepática grasa no alcohólica (esteatosis, esteatohepatitis y fibrosis). Además, la desregulación al alza de la expresión de *Fgf21* correlaciona con un mayor grado de afectación hepática.

**Palabras clave:** *Bscl2*, seipina, ratones transgénicos, lipodistrofia congénita de Berardinelli-Seip tipo 2, esteatosis hepática.

## RESUMO

**Introdución e obxectivos.** A lipodistrofia conxénita xeneralizada tipo 2 é unha enfermidade rara de herdanza autosómica recesiva caracterizada por ausencia case total de tecido adiposo. Asíciase a alteracións metabólicas e a afectación hepática de instauración temperá, que condicionan un prognóstico pobre. Variacións de diversa índole da seipina, proteína codificada polo xen *BSCL2*, parecen ser as responsables das súas manifestacións. Neste traballo, explóranse as consecuencias anatomopatolóxicas e moleculares do déficit de seipina a nivel hepático mediante un modelo murino da enfermidade para tratar de establecer as relacións pertinentes entre xenotipo, grao de afectación hepática e expresión da citocina *Fgf21*.

**Animais e métodos.** Estudio experimental das consecuencias morfométricas, anatomopatolóxicas e moleculares a nivel hepático da disrupción ubicua da seipina en ratos transxénicos xerados mediante tecnoloxía Cre-loxP. Establecéronse tres cohortes de ratos: homocigotos *Bscl2*<sup>-/-</sup>, heterocigotos *Bscl2*<sup>+/-</sup> e controis *wild-type* *Bscl2*<sup>+/+</sup>, e practicáronse necropsias entre 1 e 24 meses de idade. Describíronse as características macroscópicas e histopatolóxicas do fígado, avalíouse o grao de esteatohepatite por medio do sistema da NASH CRN e analizouse a expresión de *Fgf21*.

**Resultados.** Os ratos *knockout* de seipina presentaron lipoatrofia xeneralizada e hepatomegalia, sendo o peso do fígado maior ca o dos *wild-type*. Desenvolveron esteatose hepática mixta de predominio macrovesicular e de inicio temperán, con evolución a esteatohepatite e fibrose pericelular leve. Ademais, a expresión de *Fgf21* resultou ser significativamente maior ca nos controis.

**Conclusións.** A inactivación do xen *Bscl2* en ratos induce o desenvolvemento de lipodistrofia xeneralizada con enfermidade hepática graxa non alcohólica (esteatose, esteatohepatite e fibrose). Ademais, a desregulación á alza da expresión de *Fgf21* correlaciona cun maior grao de afectación hepática.

**Palabras clave:** *Bscl2*, seipina, ratos transxénicos, lipodistrofia conxénita de Berardinelli-Seip tipo 2, esteatose hepática.

## ABSTRACT

**Introduction and objectives.** Type 2 congenital generalised lipodystrophy is a rare autosomic recessive disorder characterized by a nearly complete lack of adipose tissue. It is associated to early-onset metabolic abnormalities and liver disease, which determine a poor prognosis. Different variations of seipin, a protein encoded by the gene *BSCL2*, seem to be responsible for its features. In this study, the histological and molecular consequences of seipin deficiency are explored through a murine model of the disease in order to establish relations between genotype, liver involvement, and expression of the cytokine *Fgf21*.

**Animals and methods.** Experimental study of the morphometric, histological, and molecular consequences of seipin ubiquitous disruption in the liver of transgenic mice created with Cre-loxP technology. Three cohorts of mice were established: homozygous *Bscl2*<sup>-/-</sup>, heterozygous *Bscl2*<sup>+/-</sup>, and wild type *Bscl2*<sup>+/+</sup>, and necropsies were performed at ages of 1 to 24 months. Macroscopic and histological features were described, the level of steatohepatitis was rated using the NASH CRN scoring system, and *Fgf21* expression was analyzed.

**Results.** Seipin knockout mice showed generalised lipoatrophy and hepatomegaly. Liver weight was greater than that of wild types. They developed early-onset, mainly macrovesicular, mixed liver steatosis, with progression towards steatohepatitis and mild pericellular fibrosis. Furthermore, *Fgf21* expression turned out to be significantly higher than in controls.

**Conclusions.** *Bscl2* gene knockdown in mice induces the development of generalised lipodystrophy associated to non-alcoholic fatty liver disease (steatosis, steatohepatitis, and fibrosis). Moreover, up-regulation of *Fgf21* expression correlates to greater liver damage.

**Key words:** *Bscl2*, seipin, transgenic mice, type 2 Berardinelli-Seip congenital lipodystrophy, liver steatosis.

# 1 INTRODUCCIÓN

## 1.1. BASES MOLECULARES: *BSCL2*/SEIPINA

### 1.1.1. El gen *BSCL2*

Las lipodistrofias constituyen un grupo heterogéneo de enfermedades raras que comparten la deficiencia selectiva de tejido adiposo en ausencia de privación nutricional o estado catabólico (1). Durante años, se testaron múltiples genes candidatos a fin de dilucidar la etiología de este grupo de enfermedades. En el año 2001, se describió por primera vez el gen *BSCL2* (NM\_001122955.3) dentro de una región de 2.5 Mb crítica para la lipodistrofia congénita de Berardinelli-Seip tipo 2 (*BSCL2*, en sus siglas inglesas), también conocida como lipodistrofia congénita generalizada tipo 2 (LCG tipo 2). Asimismo, se identificó una proteína transmembrana de 398 aminoácidos localizada en el retículo endoplásmico y codificada por el gen en cuestión, la seipina (2).

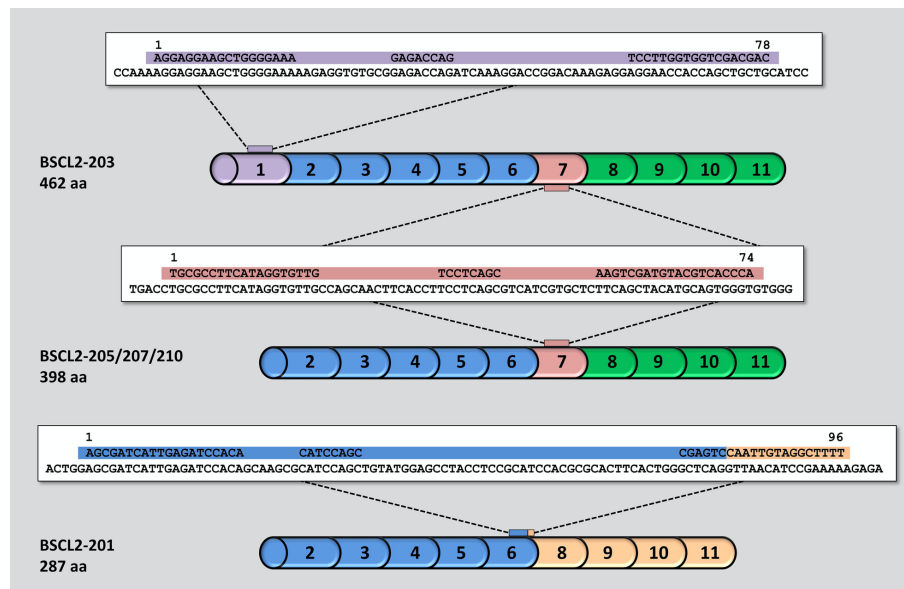


Figura 1. Los tres transcritos principales del gen *BSCL2*. Fuente:(3).

El gen *BSCL2* se localiza en el brazo largo del cromosoma 11, más concretamente, en el locus 11q12.3 (<https://www.omim.org/entry/606158>), inicialmente descrito como 11q13 (4). Presenta tres transcritos de 2.2 (BC009866), 1.8 (AF052149) y 1.6 (BC012140) kb. Por otra parte, se han descrito, bajo condiciones naturales, tres isoformas de seipina de 462 (*BSCL2-203*, ENST00000360796.9; CCDS44627), 398 (*BSCL2-205/207/210*, ENST00000403550.5; ENST00000407022.7; ENST00000421906.5; CCDS8031) y 287 aminoácidos (*BSCL2-201*, ENST00000278893.11; CCDS55769), designadas 1, 2 y 3 respectivamente. Los transcritos de 1.8 y 2.2 kb presentan dos sitios potenciales de iniciación, pudiendo traducirse, tanto en la proteína de 398 residuos (*BSCL2-205/207/210*), como, por medio de la inclusión de 64 residuos adicionales en el extremo amino-terminal, en la proteína de 462 residuos (*BSCL2-203*). Sin embargo, debido a la existencia de un exón alternativo en el extremo 5', el ARNm de 1.6 kb codifica únicamente la isoforma *BSCL2-205/207/210* (5). Hay un cuarto transcrito, de 1.4 kb, que carece de exón 7, lo cual supone una modificación en el marco de lectura desde el exón 6

al exón 10 (6), y que genera una proteína de 287 aminoácidos (*BSCL2-201*) (7). La base de datos *Consensus Coding Sequence* (CCDS) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/CCDS>) recoge diversos transcritos adicionales. De hecho, son más de 60 las variantes públicas informadas en el momento actual (<https://databases.lovd.nl/shared/genes/BSCL2>).

### 1.1.2. La seipina

#### 1.1.2.1 Topografía, estructura y oligomerización de la seipina

La seipina es una proteína residente del retículo endoplásmico con ambos extremos, carboxi y amino-terminal, orientados hacia el citoplasma, dos hélices hidrofóbicas transmembrana y un bucle luminal. La región C-terminal presenta un motivo CAAX (cisteína, alifático, alifático, cualquier aminoácido) de reciente adquisición en términos evolutivos que parece tener importancia en el proceso de adipogénesis (5,8). El bucle luminal o región central, altamente conservado, consta de ocho hebras  $\beta$  y tres hélices  $\alpha$ . Las hélices  $\alpha$  de once monómeros forman un anillo central rodeado de once dominios  $\beta$ . La superficie inferior del anillo central está constituida fundamentalmente por hélices  $\alpha$ , es hidrofóbica y su composición sugiere que es la región responsable del anclaje a la membrana lipídica (9).

La estructura en toroide del undecámero de seipina es fundamental para la correcta yuxtaposición de proteínas asociadas a la seipina entre ellas y/o con sus respectivos sustratos (9). Además, en el retículo endoplásmico, la seipina forma complejos oligoméricos con el factor de ensamblaje de gotas lipídicas 1 (LDAF1) (10), con la proteína 14-3-3 $\beta$  (8) y con AGPAT2-lipina-1 (11).

#### 1.1.2.2 Caracterización anatómica de la expresión de *BSCL2*/seipina

En humanos, el gen *BSCL2* está altamente expresado en los testículos y en determinadas regiones del sistema nervioso central, como el lóbulo frontal, la médula espinal y regiones relacionadas con la regulación del balance energético, como el hipotálamo y el troncoencéfalo (12,13). La expresión total del gen *BSCL2* en el sistema nervioso central es 6.9 veces mayor a la de cualquier otro tejido, siendo la hipófisis y las gónadas los tejidos extraneurales con mayor expresión. El transcrito largo, *BSCL2-203*, es la forma predominante (86.6% de la expresión total de *BSCL2*). Se expresa mayoritariamente en el cerebro y lo hace de forma inversamente proporcional a la edad en el lóbulo temporal, amígdala e hipotálamo. *BSCL2-205/207/210* se expresa en un 12.7% en el sistema nervioso central y lo hace en mayor medida en tejidos extraneurales y a nivel del sistema nervioso periférico. Es, además, el que presenta mayor expresión a nivel hepático. Por último, la expresión de *BSCL2-201* es mínima en todos los tejidos, de forma que supone tan solo un 0.7% de la expresión total de *BSCL2* (3).

En ratones, la expresión es alta en la corteza motora y somatosensorial, mesencéfalo, núcleos de los pares craneales, tálamo e hipotálamo, formación reticular del troncoencéfalo y complejo vestibular (14), así como en tejido adiposo completamente diferenciado (15). A diferencia de humanos y ratas, en ratones, la expresión de *Bsel2* es mayor en grasa que en cerebro (3).

### 1.1.2.3 Funciones de la seipina

Como proteína del retículo endoplásmico, la seipina influye directa e indirectamente en la homeostasis de esta organela de forma tejido-dependiente. Así, aunque el papel de la seipina no se ha logrado dilucidar al completo, los estudios realizados hasta la fecha señalan funciones distintas según nos encontremos ante células adipogénicas o no adipogénicas. Se ha propuesto su papel en la adipogénesis y la homeostasis lipídica, la fertilidad masculina, y a nivel del tejido nervioso.

La seipina participa en el ensamblaje de las gotas lipídicas. Estas están involucradas, no solo en el almacenamiento de lípidos destinados a la obtención de energía, sino también en la transferencia y almacenamiento de componentes de membrana. Son organelas dinámicas cuyo número y tamaño sufren constantes cambios en respuesta a estímulos intracelulares y extracelulares. Los hepatocitos, por ejemplo, contienen un número reducido de pequeñas gotas lipídicas cuyo tamaño puede aumentar radicalmente en la esteatosis hepática. Debido a la relación superficie/volumen, las gotas lipídicas grandes suponen una forma eficiente de almacenamiento de energía. Su presencia es necesaria y favorable bajo condiciones de lipotoxicidad y en determinados tipos celulares, como los adipocitos blancos. Por otra parte, las gotas lipídicas de pequeño tamaño ofrecen una mayor superficie para la interacción con las lipasas, facilitando de este modo el catabolismo lipídico (16). Dada la implicación de la lipólisis en la progresión del ciclo celular, el tamaño de las gotas lipídicas podría ser un factor determinante de la división celular (17).

La seipina se concentra en las regiones de interacción entre el retículo endoplásmico y las gotas lipídicas (18). Estos focos de seipina resultan ser altamente móviles hasta que establecen contacto con las gotas lipídicas nacientes. Cuando esto ocurre, se vuelven relativamente fijos para así permitir la maduración de las gotas lipídicas mediante la transferencia de los lípidos recién sintetizados. En ausencia de seipina, este proceso se ve interrumpido, resultando en la acumulación masiva de gotas lipídicas nacientes. La rápida expansión de las gotas lipídicas y la mayor síntesis de triglicéridos conduce a una disminución de la cantidad de fosfolípidos en la superficie de las gotas lipídicas, con el consiguiente aumento de la tensión superficial de las mismas y la tendencia a coalescer (19). Esto resulta, en última instancia, en la formación de gotas lipídicas de mayor tamaño, pero en menor número.

Sin embargo, la formación de las gotas lipídicas no depende exclusivamente de la seipina, sino que está mediada por el oligómero que esta forma con LDAF1 en la membrana del retículo endoplásmico. Los triglicéridos se acumulan selectivamente en estos complejos hasta que, una vez formadas las gotas lipídicas nacientes, LDAF1 se disocia de la seipina para ubicarse en la superficie de las mismas durante su proceso de maduración. En ausencia de LDAF1, las gotas lipídicas solo pueden formarse a concentraciones de triglicéridos altas, lo que sugiere que el oligómero LDAF1-seipina facilita su formación (10).

Por otra parte, el dominio luminal  $\beta$  de la seipina se une a fosfolípidos aniónicos, entre los que se encuentra el ácido fosfatídico, un intermediario clave en la síntesis de glicerolípidos. A través de la interacción y, posiblemente, de la detección de ácido fosfatídico, la seipina podría actuar como un “reóstato” de la vía del glicerol-3-fosfato, implicada en el mantenimiento de la homeostasis de membrana. La concentración de ácido fosfatídico tiene un importante impacto sobre la misma y, por tanto, debe ser controlada de forma estrecha. Así, es posible que la

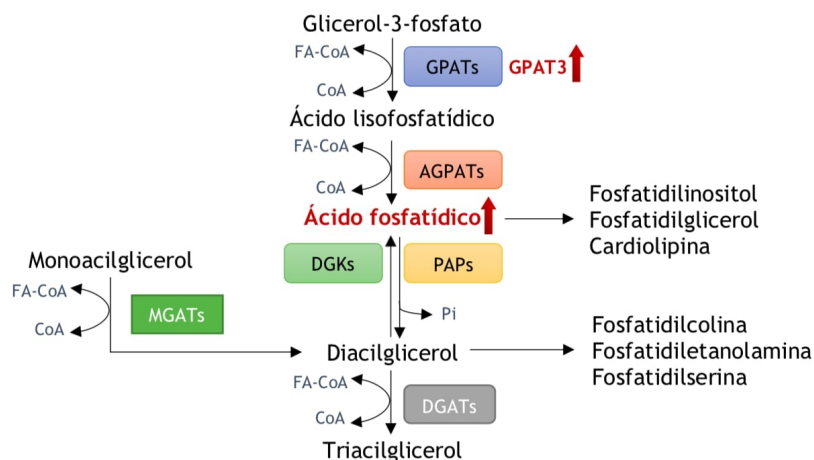
seipina, al mantener el ácido fosfatídico en un entorno confinado, prevenga su incorporación a la membrana y, por tanto, la interrupción de su función. Además, es probable que la seipina transfiera el ácido fosfatídico a enzimas encargadas de la síntesis de triglicéridos, lo cual explicaría la acumulación de ácido fosfatídico en el retículo endoplásmico y en la envoltura nuclear en células deficientes en seipina (9). El incremento de la concentración de ácido fosfatídico, al aumentar su tensión superficial, interfiere en la biogénesis de las gotas lipídicas, lo cual justificaría, al menos en parte, la aberrancia de las mismas en células deficitarias (20–22). A nivel de la envoltura nuclear, este incremento de la concentración de ácido fosfatídico bloquea la función de PPAR $\gamma$  (del inglés, *peroxisome proliferator-activated receptor gamma*) y, subsiguientemente, el proceso de adipogénesis (20,23).

Dos proteínas cuya relación con la seipina parece explicar en mayor medida los hallazgos observados ante su pérdida de función son AGPAT2 (1-acilglicerol-3-fosfato O-aciltransferasa 2) y lipina-1. Se ha estudiado la importancia del complejo seipina-AGPAT2-lipina-1 en la síntesis de triglicéridos y en la homeostasis de los adipocitos. La seipina parece participar en el aumento de su concentración en determinados dominios de la membrana del retículo endoplásmico y en el anclaje del complejo a la misma. La seipina establece su relación con la lipina-1 por medio de su región carboxi-terminal y con AGPAT2, a través de su bucle central (11,22). Durante la maduración de los adipocitos, tiene lugar la fosforilación de la lipina-1, que interacciona con la proteína 14-3-3 $\beta$  y se localiza en el citoplasma (24). No obstante, no se debe pasar por alto el papel de este mismo complejo en la formación de gotas lipídicas en células no adipocitarias (22).

GPAT3 (glicerol-3-fosfato aciltransferasa 3), como una de las enzimas catalizadoras del primer paso de la síntesis de triglicéridos, desempeña un papel fundamental en el desarrollo del tejido adiposo (25). Aunque no es del todo conocida su función, parece estar implicada en el aumento de tamaño de las gotas lipídicas en el tejido adiposo blanco. GPAT3, cuya expresión requiere de la de PPAR $\gamma$ , interacciona con la región central de la seipina, tanto en tejido adiposo como en los demás tejidos, por lo cual no sorprende su localización en el retículo endoplásmico. Craveiro Sarmiento *et al.* (26) proponen que la seipina, en su relación con GPAT3, regula negativamente la actividad de esta proteína y, consecuentemente, la síntesis de triglicéridos. Durante la adipogénesis, la región carboxi-terminal de la seipina asumiría el control a través de su interacción con la lipina-1 y con 14-3-3 $\beta$ , que contribuyen, como se ha explicado anteriormente, a la síntesis de triglicéridos. En estas circunstancias, la disminución de la actividad de GPAT3, mediada por la región central, tendría una menor importancia, sin constituir un verdadero obstáculo en el proceso anabólico y en el desarrollo de los adipocitos. Del mismo modo, la pérdida de función de la seipina en adipocitos resulta en una disminución de la síntesis de triglicéridos, aun cuando la expresión de GPAT3 se ve incrementada por la falta de inhibición. Por su parte, este incremento de los niveles de GPAT3 podría explicar, por medio del aumento de los niveles de ácido fosfatídico (**Fig. 2**), la pérdida de función de PPAR $\gamma$  y la consecuente interferencia en la adipogénesis.

No obstante, en células no adipogénicas, el bucle central parece asumir el papel protagonista, pues la sobreestimulación de GPAT3 ante un déficit de seipina parece ser más importante que la disminución de la lipina-1 en la membrana del retículo (26). En tejidos distintos del tejido adiposo, PPAR $\gamma$  desempeña un papel fundamental en la defensa frente a la sobrecarga lipídica y en el mantenimiento de la función hepática y musculoesquelética. Así, el incremento de actividad de GPAT3 y de los niveles de ácido fosfatídico, con pérdida de función

de PPAR $\gamma$ , parecen ser factores determinantes de los cambios que se observan en estas células no adipogénicas ante la disrupción de *BSCL2* (27–29).



**Figura 2. Biosíntesis de triacilglicerol.** Los triglicéridos pueden sintetizarse a partir de glicerol-3-fosfato o bien a partir de monoacilglicerol (MAG). El glicerol-3-fosfato, como sustrato inicial, es acilado en la posición sn-1 por las glicerol-3-fosfato aciltransferasas (GPATs), entre las que se incluye GPAT3, dando lugar a ácido lisofosfatídico o 1-acilglicerol-3-fosfato. Este es acilado en la posición sn-2 por las 1-acilglicerol-3-fosfato aciltransferasas (AGPATs) para generar ácido fosfatídico. A continuación, las 1-fosfatidato fosfohidrolasas (PAPs) escinden un grupo fosfato (Pi) del ácido fosfatídico, produciendo diacilglicerol (DAG). Las DAG aciltransferasas (DGATs) acilan después al DAG en la posición sn-3 para generar, finalmente, triacilglicerol. Asimismo, el triacilglicerol puede ser generado mediante la acilación de monoacilglicerol por las MAG aciltransferasas (MGATs). El aumento de la actividad de GPAT3 conduce a un aumento de los niveles de ácido fosfatídico. Fuente: propia (30).

Asimismo, la transcripción de *BSCL2* es un evento esencial en la segunda fase de la adipogénesis, esto es, en la diferenciación de los preadipocitos a adipocitos maduros. La seipina es necesaria para la expresión de determinados factores adipogénicos y actúa en un punto previo a PPAR $\gamma$  en la cascada de adipogénesis. Se ha destacado la importancia de la interacción de la seipina, a través de sus extremos amino y carboxi-terminal, con la proteína 14-3-3 $\beta$  en la remodelación de la actina del citoesqueleto. Aunque esta interacción se ha observado también en no adipocitos, parece ser imprescindible para el correcto desarrollo de la adipogénesis (8). Otra proteína cuya interacción con la seipina no es exclusiva de los adipocitos, pero sí esencial en su maduración, es la ADRP (del inglés, *adipocyte differentiation-related protein*) (22), también conocida como PLIN2, que parece desempeñar un papel importante en el desarrollo y mantenimiento del tejido adiposo (31). La seipina se une además a SERCA (del inglés, *sarco/endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase*), regulando su actividad. En consecuencia, la pérdida de *BSCL2* podría impedir el aumento de la concentración de calcio en el retículo endoplásmico, evento necesario para la maduración de los adipocitos (32).

En resumen, la seipina está involucrada, por una parte, en la homeostasis lipídica mediante la restricción de la lipogénesis y de la acumulación de gotas lipídicas en no adipocitos, así como, por otra, en la promoción de la adipogénesis para dar respuesta al almacenamiento del exceso de energía en los adipocitos (33).

En cuanto a su participación en la fertilidad masculina, la seipina parece desempeñar un papel esencial en la regulación de la homeostasis fosfolipídica de los espermatozoides, en la

integridad de la cromatina de las espermatídes, en la formación del acrosoma y en la actividad mitocondrial de las células germinales masculinas. Mientras que la disrupción específica de seipina en el tejido adiposo de ratones no parece afectar a su capacidad reproductiva, la disrupción específica en células germinales murinas es causa de infertilidad masculina y teratozoospermia. Recientemente, se ha propuesto una posible función de la seipina en el parto a través de su expresión en el miometrio de hembras murinas (34).

Por último, el retraso mental, a menudo acompañante de la LCG tipo 2, y la patología nerviosa en pacientes con variantes dominantes de *BSCL2* parecen indicar la participación de esta proteína a nivel neuronal (14). A nivel periférico, los dominios transmembrana de la seipina son críticos en la activación de la respuesta a proteínas mal plegadas (UPR, en sus siglas inglesas) y también parece regular la transmisión nerviosa a nivel presináptico y postsináptico (35). En cuanto a su función a nivel del sistema nervioso central, la seipina regula la expresión de superóxido-dismutasa y catalasa, y promueve la biogénesis de peroxisomas. De este modo, desempeñaría un papel neuroprotector por contribuir a la disminución de los radicales libres, con la consecuente prevención de la neurodegeneración (3). Finalmente, la expresión de *BSCL2* podría ser necesaria para la normal movilización de lípidos hacia el cerebro en desarrollo (36).

## **1.2. *BSCL2*/SEIPINA Y ENFERMEDAD**

### **1.2.1. Lipodistrofia congénita generalizada tipo 2**

La lipodistrofia congénita generalizada (LCG) o síndrome de Berardinelli-Seip es un trastorno autosómico recesivo caracterizado por la ausencia casi total de tejido adiposo (evidente ya al nacimiento o en la infancia en los subtipos 1 y 2), musculatura prominente, flebomegalia, acantosis nigricans, hepatoesplenomegalia y hernia o prominencia umbilical. En la infancia temprana, los pacientes presentan un apetito voraz y, a pesar de un crecimiento acelerado en los primeros años de vida, la talla final habitualmente concuerda con la esperada en base a la estatura de los progenitores. En ocasiones, pueden exhibir hipertricosis y características acromegaloides (1,37). La disfunción reproductiva puede integrar también el cuadro clínico, con manifestaciones como adrenarquía precoz, pubertad precoz verdadera, hipogonadismo central, o síndrome del ovario poliquístico, oligo/amenorrea y fertilidad reducida en mujeres (1,38). Entre las complicaciones metabólicas destacan la hipertrigliceridemia, la hiperinsulinemia y diabetes no cetósica (por lo general, de difícil control), y la esteatosis hepática. La hipertrigliceridemia puede estar presente ya desde los primeros meses y, de ser grave, puede ser causa de pancreatitis aguda (38). La pérdida del tejido adiposo resulta en una disminución de los niveles de leptina, lo cual interfiere en las señales de hambre-saciedad. Dichos niveles se mantienen bajos independientemente de la edad y del sexo (37). Sin tratamiento, el pronóstico es pobre, con una esperanza de vida que no alcanza los 50 años de edad. Las principales causas de muerte son las infecciones y la cirrosis hepática (39), no siendo despreciables las complicaciones cardiovasculares de la diabetes, la pancreatitis, la sepsis o la enfermedad renal en etapa terminal (38).

Se han descrito cuatro subtipos con características clínicas distintivas, siendo la LCG tipo 2, es decir, la debida a variantes en el gen *BSCL2* (MIM: #269700), la más grave. En esta, la pérdida de grasa es evidente al nacimiento o durante el primer año de vida. A diferencia de los subtipos producidos por variantes en otros genes (*AGPAT2*, MIM: #608594; *CAV1*, MIM: #612526; *PTRF*, MIM: #613327) (27–29), la LCG tipo 2 se presenta, de forma característica,

con cierto grado de déficit cognitivo y mayor incidencia de muerte prematura. Los pacientes carecen tanto de grasa mecánica (retroorbitaria, palmar, plantar y periarticular) como de grasa metabólicamente activa. En cambio, la grasa mecánica está conservada en pacientes con los subtipos 1, 3 y 4 (38). La mayor parte de las variantes descritas hasta la fecha en el contexto de la LCG tipo 2 son variantes sin sentido o por cambio en el marco de lectura, que resultan en codones de parada prematuros (12).

La LCG tipo 2 es una enfermedad progresiva y fatal para la que no existe cura. El objetivo es, por tanto, prevenir y/o retrasar las complicaciones de la enfermedad a corto y largo plazo. Los pilares del manejo de la LCG tipo 2 son la dieta, el ejercicio físico y el tratamiento médico de las comorbilidades metabólicas. La leptina recombinante humana (Metreleptin) es, junto con la dieta, el tratamiento de primera línea de las anomalías metabólicas y endocrinas, pudiendo considerarse también para la prevención de las mismas en niños. Metreleptin, autorizada por primera vez en el 2018 por la Agencia Europea del Medicamento, ha demostrado disminuir la hiperfagia, mejorar la glucosa en ayunas, la HbA1c, disminuir la esteatosis hepática y la proteinuria, y normalizar la secreción de gonadotropinas en mujeres (37).

### **1.2.2. Otras enfermedades asociadas a *BSCL2*/seipina**

Al margen de la LCG, se ha descrito toda una serie de trastornos neurológicos en relación con variantes con cambio de sentido en el gen *BSCL2* (40,41). Están mediadas por la formación de agregados de seipina y cursan con afectación de la motoneurona superior e inferior (42).

La encefalopatía de Celia o encefalopatía progresiva con o sin lipodistrofia (PELD) (MIM: #615924) es una enfermedad neurodegenerativa rara de herencia autosómica recesiva, atribuible a la omisión del exón 7 en el gen *BSCL2* (6). Cursa con deterioro cognitivo por formación de macroagregados de seipina (43), lipoatrofia y alteraciones metabólicas. En esos pacientes, la muerte sobreviene entre los siete y los nueve años de edad (37).

## **1.3. LA ENFERMEDAD HEPÁTICA GRASA NO ALCOHÓLICA**

### **1.3.1. Concepto**

La enfermedad hepática grasa no alcohólica (EHGNA) es una entidad clínico-patológica definida por la acumulación excesiva de grasa en forma de triglicéridos (esteatosis) en el hígado en ausencia de un consumo significativo de alcohol (44,45). Típicamente, la EHGNA se divide en dos subtipos: la esteatosis simple o hígado graso no alcohólico (HGNA) y la esteatohepatitis no alcohólica (EHNA), esta última con capacidad de progresión a cirrosis, carcinoma hepatocelular e insuficiencia hepática (46). La progresión a cirrosis o a carcinoma hepatocelular ocurre solo en un 2,5% de los pacientes con EHNA y se produce de forma generalmente más lenta que en otras enfermedades crónicas del hígado. Se ha estimado que la progresión de HGNA o EHNA a cirrosis requiere de 57 y 28 años respectivamente (47). Aunque existen estudios contradictorios al respecto, la esteatosis simple no parece entrañar un aumento significativo de la morbilidad o mortalidad a corto plazo (44,48,49). Además, cabe destacar que la enfermedad cardiovascular, y no la hepática, es la primera causa de muerte en pacientes con EHGNA, si bien la EHNA entraña un mayor riesgo de fallecer por causa hepática que el HGNA (48).

Los principales factores de riesgo de la EHGNA son los propios elementos integrantes del síndrome metabólico: la obesidad central, la diabetes mellitus tipo 2, la dislipemia, la hipertensión arterial y la resistencia a la insulina. La EHGNA es, de hecho, la manifestación hepática de dicho síndrome (46,48). Otras causas de EHGNA, aunque menos frecuentes, son determinados defectos congénitos en el metabolismo, trastornos endocrinos, fármacos e intervenciones quirúrgicas (49). Así, las lipodistrofias, tanto congénitas como adquiridas, forman parte del elenco etiológico de la EHGNA y deberían ser consideradas en el diagnóstico diferencial (50).

### **1.3.2. Histopatología**

En la mayor parte de los casos, los hallazgos histológicos en la EHGNA son indistinguibles de los de la afectación hepática por un consumo crónico de alcohol (51). La característica histológica fundamental que reúnen las diferentes formas de EHGNA es la esteatosis o acúmulo de grasa (triglicéridos fundamentalmente) en los hepatocitos, hallazgo inespecífico y común a diversas enfermedades hepáticas. Por convenio, la esteatosis debe afectar a más de un 5% de los hepatocitos en una preparación teñida con hematoxilina-eosina observada al microscopio óptico a 100x (52). La esteatosis en la EHGNA es, característicamente, macrovesicular, definida por la presencia de una gran gota de grasa en el citoplasma que desplaza el núcleo hacia la periferia. Aunque no es infrecuente la coexistencia de pequeñas vacuolas, la esteatosis microvesicular, de apariencia espumosa, solo se observa en hepatocitos aislados o en pequeños parches, pero no de forma difusa (51). De acuerdo con el sistema de puntuación NAS (*non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) activity score*), diseñado por la NASH CRN (*Nonalcoholic Steatohepatitis Clinical Research Network*), la extensión de la esteatosis se evalúa semicuantitativamente, diferenciando del grado 0 al 3 en función del porcentaje de tejido afecto (**Tabla 1**) (53).

Con fines diagnósticos, los patólogos diferencian entre HGNA (esteatosis predominantemente macrovesicular aislada o acompañada de un leve infiltrado inflamatorio inespecífico, pero sin signos de daño hepatocelular ni fibrosis) y EHNA (esteatosis asociada a cambios necroinflamatorios). La presencia de daño hepatocelular activo establece el límite entre HGNA y EHNA. Aunque no existe consenso absoluto para la definición de daño activo, en general, se consideran elementos del mismo la inflamación lobulillar, la degeneración balonzante y la apoptosis (54). Una sola célula balonzante puede ser suficiente para diagnosticar la EHNA en el contexto adecuado. Se trata de una célula de gran tamaño (varias veces mayor que un hepatocito normal), con citoplasma pálido, rarificado, bandas eosinófilas de apariencia “plumosa” y, en ocasiones, hialina de Mallory (51). Hay células balonzantes que todo patólogo estaría de acuerdo en filiar como tal, las denominadas células balonzantes “clásicas”. Sin embargo, hay otras cuya naturaleza es más controvertida por no reunir de forma estricta todos los hallazgos característicos; son las llamadas células balonzantes “equivocas” (54). Aunque no existe una tinción específica para su identificación, la pérdida citoplasmática de CK8/18, el principal filamento del citoesqueleto de los hepatocitos normales, a menudo acompañada de positividad para ubiquitina, es característica. Es por ello que algunos autores sugieren que las tinciones inmunohistoquímicas pueden ayudar a dilucidar su naturaleza (55). No obstante, para fines diagnósticos, parece que la aproximación más acertada por el momento es ceñirse a las características morfológicas típicas de las células balonzantes “clásicas” (54).

Atendiendo de nuevo al NAS, la presencia de células balonzantes se valora de 0 a 2; la inflamación lobulillar, de 0 a 3 (**Tabla 1**) (53). Tanto la HGNA como la EHNA deben presentar, por lo menos, infiltración grasa y ambas pueden presentar fibrosis (54). Una puntuación total mayor o igual a 4 puntos en el NAS ha demostrado ser válida, así como presentar la máxima sensibilidad y especificidad para predecir EHNA (56). Dado que la puntuación máxima para la esteatosis es de 3 puntos, una puntuación total en el NAS de 4 puntos implica necesariamente la presencia de al menos un punto de inflamación lobulillar y/o degeneración balonzante.

NAS				Fibrosis	
	Esteatosis	Células balonzantes	Inflamación lobulillar		
0	<5% (mínima)	Ninguna	Sin focos	Ausente	0
1	5% a 33%	Alguna	<2 focos por campo de 200x	Perisinusoidal leve, zona 3	1a
				Perisinusoidal moderada, zona 3	1b
				Periportal/portal	1c
2	>33% a 66%	Muchas/prominentes	2-4 focos por campo de 200x	Perisinusoidal y periportal/portal	2
3	>66%		>4 focos por campo de 200x	Puentes de fibrosis	3
				Cirrosis	4

**Tabla 1. Elementos esenciales del sistema de puntuación NASH CRN. Fuente: (53).**

Cabe destacar que la fibrosis, aunque frecuente, no es indispensable para el diagnóstico de EHNA. Típicamente, se inicia en forma de fibrosis pericelular o perisinusoidal ligera, formando el denominado patrón “en malla de alambre” (del inglés, *chicken wire pattern*). La tinción con tricrómico de Masson permite evidenciar esta mínima deposición de colágeno alrededor de los hepatocitos. Conforme aumenta la gravedad de la afectación hepática, es posible observar fibrosis portal, así como puentes porto-portales y veno-portales que terminarán por desestructurar la arquitectura lobulillar y configurar la cirrosis (51). La fibrosis no está incluida en el NAS, por ser menos reversible y por constituir un resultado de la actividad de la enfermedad más que una lesión conductora de la misma. La NASH CRN propone la evaluación de la fibrosis del 0 al 4, siendo 0 la ausencia de fibrosis y 4 la cirrosis (**Tabla 1**) (53).

### 1.3.3. Patogenia

#### 1.3.3.1 Hipótesis de los ataques múltiples

La esteatosis hepática es el resultado de un desequilibrio entre la adquisición de lípidos (captación de ácidos grasos libres [AGL] y lipogénesis *de novo*) y su eliminación ( $\beta$ -oxidación mitocondrial y salida del hígado como componentes de las lipoproteínas de muy baja densidad [VLDL, del inglés, *very low density lipoprotein*]) (57). Aunque esta acumulación de lípidos en el hígado es el factor común de todas las formas de EHGNA, desde un punto de vista fisiopatológico, la esteatohepatitis se desarrolla cuando el exceso de grasa produce un efecto lipotóxico en los hepatocitos y demás células hepáticas (58). En un primer momento, se propuso como explicación de la EHNA la “hipótesis de los dos ataques”: el “primer ataque” tendría por resultado la acumulación de grasa, que sensibilizaría al hígado frente a un ulterior “segundo

ataque”, necesario para el desarrollo de la necroinflamación y fibrosis (59). Sin embargo, hoy se ha sustituido esta teoría por la “hipótesis de los ataques múltiples”, pues son muchos los factores que parecen estar implicados de forma paralela en la fisiopatología y progresión de la EHGNA (60).

La primera consecuencia de la expansión del tejido adiposo en el contexto de la obesidad es el aumento de la liberación de AGL a la circulación. A esto se suma un cambio fenotípico en los macrófagos del tejido adiposo desde un fenotipo antiinflamatorio (M2) a uno proinflamatorio (M1), que condiciona un estado de inflamación crónica de bajo grado (61). Además, disminuye la expresión de adiponectina, hormona con propiedades antiinflamatorias que atenúa la acumulación de lípidos en el hígado y en el tejido adiposo, y que determina la homeostasis glucídica y la sensibilidad hepática a la insulina. Por el contrario, los niveles de leptina, adipoquina que participa en la regulación del apetito, en el aumento del gasto energético y en la reducción del depósito ectópico de grasa en el hígado, se ven incrementados. Este aumento se explica por el desarrollo de resistencia a su acción (58), que estaría, sin embargo, conservada en células fibrogénicas y proinflamatorias. Así, se ha descrito la relación entre los niveles circulantes de leptina y el desarrollo de esteatosis, fibrosis e inflamación hepáticas. La evidencia científica apoya también una relación causal directa entre la resistencia a la insulina y la EHGNA (62). En el hígado, la insulina inhibe la producción de glucosa y promueve la lipogénesis. El desarrollo de resistencia hepática a la insulina supone la pérdida de su efecto inhibitorio sobre la producción de glucosa, pero no del efecto promotor de la lipogénesis hepática (57,63).

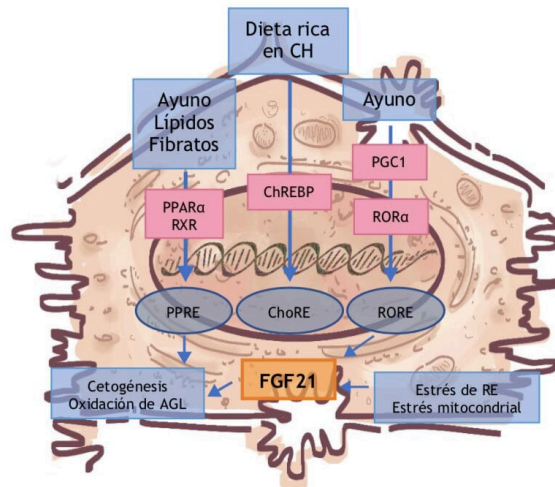
La mayor parte de los triglicéridos hepáticos, en torno al 60%, son sintetizados en el hígado a partir de AGL, cuyos niveles se encuentran aumentados en sujetos con EHGNA (72). Los factores dietéticos, la resistencia a la insulina y la actividad del microbioma intestinal son solo algunos de los factores implicados en el aumento del flujo de AGL hacia el hígado observado en pacientes con EHGNA (67). Este flujo excesivo produce un incremento de la síntesis y acumulación de triglicéridos, que no es hepatotóxica *per se*, sino que es un epifenómeno paralelo a la generación de metabolitos tóxicos, lipotoxicidad y daño hepático (77). En este contexto, se desarrolla estrés oxidativo, con activación de vías profibrogénicas y proinflamatorias (64), así como disfunción del retículo endoplásmico, con desarrollo de UPR y menor estabilidad de las gotas lipídicas (73—75). Otros mecanismos que pueden contribuir en menor medida al depósito de grasa son la disminución de la  $\beta$ -oxidación hepática y de la síntesis y/o secreción de VLDL (67). Además, las células de Kupffer del hígado también se polarizan hacia un fenotipo proinflamatorio (80) y reclutan células estrelladas, con capacidad fibrogénica (64).

Por tanto, son muchos los factores genéticos y epigenéticos que parecen afectar al contenido de grasa de los hepatocitos, los procesos enzimáticos y el entorno inflamatorio del hígado, determinando así el riesgo de progresión a inflamación (EHNA) y fibrosis, o la persistencia de la enfermedad en un estado estable (HGNA) (67).

#### 1.3.3.2 FGF21 en el metabolismo lipídico y la EHGNA

Mención aparte merece el factor de crecimiento fibroblástico-21 (FGF21, del inglés, *fibroblast growth factor-21*), citoquina de reciente descubrimiento cuyos niveles se encuentran elevados en múltiples enfermedades relacionadas en mayor o menor medida con el

metabolismo lipídico, como la obesidad, la diabetes mellitus tipo 2 y la enfermedad vascular coronaria.



**Figura 3. Regulación mediante señalización intracelular de FGF21 en hepatocitos.** En condiciones fisiológicas, la expresión hepática de FGF21 está fundamentalmente regulada por PPAR- $\alpha$ , por el receptor retinoide X hepático (RXR) y por el estado postprandial. Abreviaturas: AGL, ácidos grasos libres; CH, carbohidratos; ChoRE, *carbohydrate response element*; ChREBP, *carbohydrate-responsive element-binding protein*; PGC-1 $\alpha$ , *peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  coactivator*; PPAR $\alpha$ , *peroxisome proliferator-activated receptor alpha*; PPRE, *peroxisome proliferator-activated receptor response element*; RE, retículo endoplásmico; RORE, *retinoid-related orphan receptor response element*; ROR $\alpha$ , *retinoid acid receptor-related orphan receptor alpha*; RXR, *retinoid X receptor*. Fuente: propia (64).

Son múltiples las funciones atribuidas a este factor, con efectos beneficiosos en la modulación de la homeostasis glucídica, del metabolismo lipídico y de la sensibilidad a la insulina. En condiciones de ayuno, FGF21 es secretado junto a PPAR- $\alpha$ , y modula el proceso de cetogénesis, gluconeogénesis y oxidación de ácidos grasos (**Fig. 3**). La regulación de la gluconeogénesis está asimismo mediada por variaciones en la expresión de glucosa-6-fosfatasa (64,65). Tanto la expresión hepática como los niveles plasmáticos de FGF21 están elevados en pacientes con EHGNA. El tratamiento con FGF21, con análogos de dicho factor y con fármacos que secundariamente aumentan su expresión, como la eritropoyetina, parece mejorar el metabolismo energético en los hepatocitos de roedores y primates (66–68). Aunque esto pueda resultar paradójico, no es difícil de comprender si se tiene en cuenta que el FGF21 es un factor protector frente a los trastornos del metabolismo glucolipídico de la EHGNA. Esto es, la elevación de los niveles de FGF21 en la EHGNA podría ser una respuesta encaminada a compensar las alteraciones metabólicas de esta enfermedad (64). Al igual que existe resistencia a otras hormonas, tales como la insulina (63), es posible que también exista cierta resistencia al FGF21, con la subsiguiente desregulación al alza de sus niveles para suplir así su déficit de función. De acuerdo con esto último, se ha observado tanto en humanos como en roedores que, efectivamente, la función de FGF21, al contrario que sus niveles, está disminuida en condiciones de acumulación de grasa (69,70). Esto está justificado, al menos en parte, por una disminución en la expresión de los co-receptores de FGF21,  $\beta$ Klotho y FGFR1 (71).

## 1.4. SEIPINA Y HEPATOPATÍA

### 1.4.1. Afectación hepática en pacientes con LCG tipo 2

Las lipodistrofias generalizadas son un modelo extremo de acúmulo ectópico de grasa, que típicamente se asocia al desarrollo de un síndrome metabólico exagerado (72). Por tanto, son una posible causa de esteatosis hepática que debe ser considerada en el diagnóstico diferencial de la EHGNA (50). En estos pacientes, la reducción del tejido adiposo subcutáneo, combinada con la deficiencia de leptina, hace del hígado el principal almacén de triglicéridos (72). Los niveles de leptina son directamente proporcionales a la masa de tejido adiposo (50), siendo la hipoleptinemia característica de las lipodistrofias y la hiperleptinemia, de la obesidad. En cualquiera de estas dos situaciones, la esteatosis hepática se asocia a una disminución de la acción de la leptina (72) (ya sea por deficiencia en el primer caso o por resistencia en el segundo), y a un aumento del flujo de AGL hacia el hígado (ya sea, respectivamente, por ausencia de tejido adiposo suficiente para el normal depósito de grasa o por expansión del mismo).

Desde el punto de vista clínico, la afectación hepática en la LCG se presenta en forma de hepatomegalia y, con frecuencia, hipertransaminasemia (37). En estos pacientes, la EHGNA cumple con frecuencia los criterios histológicos de esteatohepatitis, ya sea *borderline* o definida (73). Se manifiesta en forma de esteatosis típicamente macrovesicular, daño hepatocelular en la zona 3 (con degeneración balonzante y cuerpos de Mallory Denk), inflamación predominantemente lobulillar y fibrosis (72,73). La cirrosis, el fallo hepático y el carcinoma hepatocelular son potenciales resultados de la progresión de la EHNA en estos pacientes (50). Cabe destacar que los pacientes con LCG tipo 2, el subtipo más grave de síndrome de Berardinelli-Seip, pueden desarrollar fibrosis extrema (en forma de puentes de fibrosis o de cirrosis ya establecida) a edad más temprana (alrededor de los 12 años según Zadeh *et al.*) que los pacientes con otras formas de lipodistrofia (73).

La hipoleptinemia, característica de los pacientes con LCG tipo 2, ha llevado a un esfuerzo por corregir sus consecuencias metabólicas con leptina exógena. El tratamiento con Metreleptin es capaz de revertir la esteatosis y la esteatohepatitis en un grado significativo. Aunque la fibrosis hepática no mejora, tampoco progresa (73), lo cual podría ser esperable si se tiene en cuenta que la hiperleptinemia en pacientes obesos tiene propiedades profibrogénicas.

### 1.4.2. Modelos animales

#### 1.4.2.1 Modelos animales de EHGNA

Los estudios de EHGNA a partir de material humano presentan importantes limitaciones debido a que la incidencia y progresión del HGNA/EHNA requiere, por lo general, de un periodo de tiempo considerable, así como a las consideraciones éticas relativas a la recogida de tejido hepático. Los modelos animales de HGNA/EHNA aportan información fundamental para el conocimiento de la patogenia de la EHGNA y para la evaluación de potenciales agentes terapéuticos. Idealmente, estos modelos deberían reflejar las características tanto anatomopatológicas como fisiopatológicas de la EHGNA para que los resultados pudiesen ser extrapolados a la especie humana (74). Sin embargo, ningún modelo animal hasta la fecha recoge todo el espectro de la enfermedad humana. Aunque la mayoría de los modelos murinos

desarrolla esteatosis y muchos desarrollan esteatohepatitis, el desarrollo espontáneo de fibrosis es excepcional (75).

#### 1.4.2.2 Disrupción ubicua de *Bscl2*/seipina

La ablación constitutiva de seipina en ratones tiene por resultado el desarrollo de una forma grave de lipodistrofia generalizada (76). En comparación con ratones *wild-type*, los ratones transgénicos con disrupción de seipina a nivel sistémico, designados *Bscl2*<sup>-/-</sup> o SKO (del inglés, *seipin knockout*) son viables, pero presentan una marcada reducción del tejido adiposo, esteatosis hepática y resistencia a la insulina. Los niveles de leptina y adiponectina también se ven significativamente disminuidos en estos ratones, mientras que la ingesta se ve incrementada, de forma análoga a lo que ocurre en los pacientes con LCG tipo 2.

En ayunas, los niveles de ácidos grasos insaturados y de glicerol están disminuidos como consecuencia de un aumento de su aclaramiento hepático. Además, los ratones SKO exhiben también hipotrigliceridemia y no la hipertrigliceridemia característica de los humanos con el síndrome de Berardinelli-Seip tipo 2 (76–78). La disminución en los niveles plasmáticos de triglicéridos se asocia a un aumento de la captación hepática de proteínas ricas en triacilglicerol (quilomicrones y VLDL), lo cual convierte a los ratones SKO en un particular modelo animal para el estudio de la esteatosis hepática (78).

Los niveles de glucosa e insulina, determinados de forma aleatoria, se muestran significativamente elevados en los ratones SKO. Sin embargo, el ayuno induce un aumento de la sensibilidad hepática a la insulina, con la consiguiente disminución de los niveles de insulina y glucosa (77,78). Este fenotipo metabólico único sugiere una regulación diferencial del metabolismo glucídico y lipídico en los ratones SKO (79).

En la disección, los ratones SKO muestran una ausencia prácticamente total de grasa gonadal y una reducción de aproximadamente el 70% en el tejido adiposo subcutáneo, así como organomegalia, fundamentalmente, a nivel de hígado, bazo y riñones (77). Desde el punto de vista anatomopatológico, según Cui *et al*, la esteatosis en estos ratones es mixta, aunque predominantemente macrovesicular. Sin embargo, a los tres meses de edad, no parecen presentar infiltrados inflamatorios ni células balonzantes, hallazgos sugestivos de esteatohepatitis. La tinción con *Oil red O* evidencia que los ratones SKO presentan muchas más gotas lipídicas que los *wild-type* (76). En ratones SKO, la re-expresión de seipina únicamente en adipocitos bajo el control del promotor  $\alpha$ P2 rescata la lipodistrofia, resistencia a la insulina y esteatosis hepática (80).

Más recientemente, Gao *et al*. estudiaron un modelo *Bscl2*<sup>-/-</sup> *Gpat3*<sup>-/-</sup>, esto es, ratones con déficit de seipina y de GPAT3. En comparación con los ratones SKO, estos dobles *knockout* presentaron una mejoría significativa tanto en la esteatosis hepática como en la resistencia a la insulina. Esto se podría explicar por la pequeña, pero significativa recuperación de masa de tejido adiposo blanco, así como por el mayor “pardeamiento” de la grasa subcutánea. Estos resultados sugieren que el incremento de los niveles de GPAT3 podría ser responsable, al menos en parte, del fracaso de la adipogénesis y que los inhibidores de GPAT podrían tener un efecto beneficioso en pacientes con LCG tipo 2 (81).

#### 1.4.2.3 Disrupción específica de *Bscl2*/seipina en el hígado

Chen *et al.* generaron ratones con déficit de seipina específicamente en hepatocitos (ratones *Bscl2<sup>Li/-</sup>*). Demostraron la ausencia de diferencias significativas entre los ratones *Bscl2<sup>Li/-</sup>* y sus controles *wild-type* en cuanto a masa corporal, hepática y de tejido adiposo. Tampoco el contenido hepático de triglicéridos resultó ser significativamente mayor, ni siquiera cuando los ratones *Bscl2<sup>Li/-</sup>* recibían una dieta rica en grasa. Se descartaron también anomalías en la expresión de los principales genes implicados en el metabolismo lipídico del hígado y en los tests de tolerancia a la glucosa (79).

#### 1.4.2.4 Disrupción específica de *Bscl2*/seipina en el tejido adiposo

Chen *et al.* observaron que la delección específica de *Bscl2* en adipocitos diferenciados mediante el modelo aP2-Cre, a diferencia de la pérdida congénita de seipina en humanos, no altera significativamente la masa de tejido adiposo en las primeras etapas de vida, sino que lleva al desarrollo de una lipodistrofia progresiva en la edad adulta. Dado que aP2 se expresa en etapas tardías de la diferenciación de los adipocitos, la inactivación de *Bscl2* por medio del promotor aP2 produce la pérdida de seipina tras la formación de depósitos de grasa, permitiendo la normal diferenciación de los adipocitos. Estos ratones ASKO (*adipose-specific knockout*) presentan adipocitos hipertróficos con gotas lipídicas aumentadas de tamaño, lipólisis reducida, inflamación del tejido adiposo, pérdida progresiva del tejido adiposo blanco y pardo, resistencia a la insulina, y esteatosis hepática. La masa hepática, apariencia macroscópica e histología de los ratones ASKO de 3 meses de edad es similar a la de los ratones *wild-type*. Con el paso del tiempo, la masa y el contenido hepático de triglicéridos se ven progresivamente incrementados. A los 10 meses de edad, la esteatosis en estos ratones es ya significativa (82).

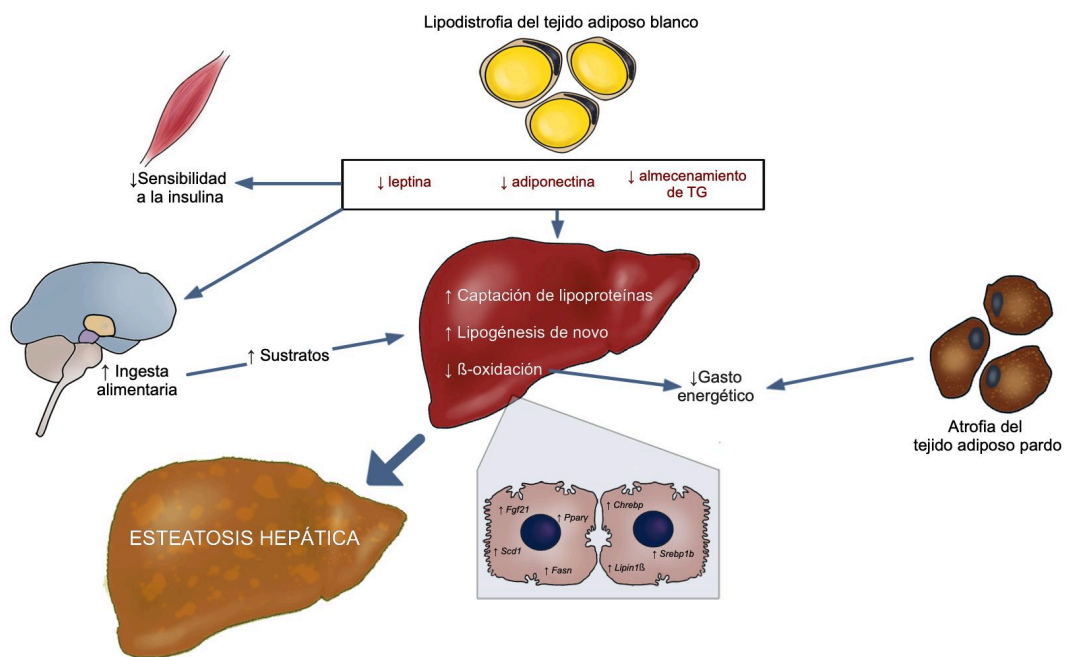
Zhou *et al.* generaron un ratón *knockout* condicional de seipina en tejido adiposo maduro (Ad-mKO) inducido por tamoxifeno. Tanto los ratones Ad-mKO como los ASKO comparten la resistencia a la insulina, el estrés del retículo endoplásmico, la inflamación del tejido adiposo y la pérdida progresiva del mismo. Sin embargo, los Ad-mKO desarrollan esteatosis hepática solo si reciben una dieta rica en grasa, poseen menor infiltración macrofágica del tejido adiposo y son tolerantes a la glucosa (a pesar de la resistencia a la insulina, debido a un metabolismo aumentado de la misma) (83). Ahora bien, el tamoxifeno por sí mismo puede alterar el desarrollo y función del tejido adiposo, por lo que podría constituir un factor de confusión en la interpretación de estos estudios (84).

En el 2018, Mcilroy *et al.* (85) estudiaron las consecuencias de la ablación de seipina en el tejido adiposo en desarrollo de ratones empleando un modelo no inducible Adipoq-Cre. Los resultados revelaron que la inactivación de *Bscl2* en adipocitos en desarrollo es suficiente para producir lipodistrofia de inicio temprano, pero no para inducir todas las consecuencias metabólicas del déficit sistémico y congénito de seipina. Estos ratones Ad-B2<sup>(-/-)</sup> presentan una mayor cantidad de tejido adiposo residual que los ratones SKO y no poseen organomegalia generalizada. Tampoco exhiben intolerancia a la glucosa ni resistencia a la insulina y, aunque el depósito hepático de triglicéridos sí está incrementado en los ratones Ad-B2<sup>(-/-)</sup> alimentados con pienso, estos no desarrollan esteatosis hepática como tal, ni siquiera cuando reciben una dieta rica en grasa (85).

En resumen, los modelos murinos de LCG tipo 2, sin terminar de reproducir a la perfección todas las características de la enfermedad humana, son de gran utilidad para el estudio de su patogenia y el ensayo de posibles terapias. A nivel del hígado, se ha descrito, en relación con la disrupción ubicua de seipina, el desarrollo de esteatosis mixta de predominio macrovesicular, sin evidencias de actividad inflamatoria o fibrosis.

### 1.4.3. Patogenia de la EHGNA en el contexto de la pérdida de función de la seipina

En los ratones deficientes en seipina, tanto la disminución de la adipogénesis como el incremento de la lipólisis suponen una disminución de los adipocitos disponibles para el almacenamiento de triglicéridos y la secreción de adipoquinas (86). Esto conduce al depósito ectópico de lípidos, sin poder descartar que la pérdida local de seipina en el hígado pueda empeorar el estado metabólico en caso de pérdida o disfunción del tejido adiposo (85).



**Figura 4. Alteraciones metabólicas en ratones *Bcl2*<sup>-/-</sup>.** La disminución de la adipogénesis y el aumento de la lipólisis en el tejido adiposo blanco suponen la pérdida de adipocitos capaces de almacenar triglicéridos y la disminución de los niveles de adipoquinas. En ratones, esto conduce al depósito ectópico de lípidos y al desarrollo de resistencia periférica a la insulina. En el hígado, el aumento de la captación de lípidos y la inducción de la lipogénesis contribuyen a la esteatosis hepática. En este contexto, el menor gasto energético podría explicarse por la baja tasa de β-oxidación en el hígado, así como por la atrofia del tejido adiposo pardo. Fuente: propia (76,78,87).

El desarrollo de esteatosis hepática en ratones SKO se ha atribuido, al menos en parte, a un aumento de la captación hepática de lipoproteínas (78) y de la lipogénesis *de novo*, así como a la activación de una vía alternativa de síntesis de triglicéridos mediada por la expresión de *Mgat1* y a una disminución de la oxidación de ácidos grasos (**Fig. 4**). En estos ratones SKO, típicamente hiperfágicos, estos mecanismos se ven potenciados por el exceso de sustratos (79). Consistentemente con la mayor captación de lípidos, los hepatocitos presentan mayor expresión de *CD36*, gen involucrado en el flujo lipídico. Genes responsables de la lipogénesis *de novo*, como *Pparγ*, *Fasn* (sintasa de ácidos grasos), *Scd1* (esteroil-CoA desaturasa 1), *ChREBP*

(proteína de unión al elemento de respuesta a carbohidratos), *Srebp1c* (proteína de unión 1c al elemento de respuesta a esterol) y *Lipin1β* están también regulados al alza en hepatocitos aislados de estos ratones deficientes en seipina (76,87). En cuanto a la secreción de VLDL, existen discrepancias entre los distintos grupos. Mientras que Cui y, posteriormente, Wang *et al.* constataron una disminución de la misma en ratones SKO (76,88), Prieur *et al.* registraron niveles similares a los de ratones control (78) y Chen *et al.*, superiores (79). Según los primeros, la disminución de la secreción de VLDL, debida a la menor expresión de la proteína microsomal de transferencia de triacilglicerol (MTP), contribuiría al desarrollo de esteatosis hepática e hipotrigliceridemia (76).

En ratones *wild-type*, el ayuno prolongado aumenta el depósito hepático de triglicéridos (79). Por el contrario, en ratones SKO, induce la hidrólisis de triglicéridos mediada por ATGL, lo cual sugiere su utilización por otros tejidos en un estado de deficiente energía movilizable. En consecuencia, el contenido hepático de triglicéridos disminuye en respuesta al ayuno prolongado (88).

Típicamente, la EHGNA se asocia a resistencia hepática a la insulina. Sin embargo, la sensibilidad hepática de los ratones esteatósicos SKO puede verse aumentada en determinadas circunstancias. En condiciones basales, no existen diferencias significativas en la producción hepática de glucosa entre ratones SKO y *wild-type*. No obstante, el ayuno prolongado induce un aumento en la sensibilidad hepática a la insulina, con la subsiguiente disminución de la producción hepática de glucosa. Este efecto parece estar mediado por la regulación al alza de factores implicados en las vías de señalización de la insulina, como IRβ y IRS2 (78). Ni la resistencia a la insulina ni el aumento de la sensibilidad a la misma con el ayuno en el hígado esteatósico de los ratones SKO se asocian a cambios en los principales metabolitos lipídicos (diacilglicerol y ceramidas) (79). Tampoco parecen estar determinadas por un estado inflamatorio, ya que los ratones SKO presentan dicha resistencia a la insulina aun en ausencia de inflamación hepática (76,77).

El papel que la seipina desempeña en el hígado es controvertido. Por una parte, estudios *in vitro* sugieren que el déficit de seipina en hepatocitos desempeña un papel autónomo en el desarrollo de EHGNA (89). Por otra, existen modelos animales a favor (33,84) y en contra de esta hipótesis (79,80,85,90). Por tanto, la patogenia de la EHGNA en el contexto de la LCG tipo 2 no termina de ser comprendida, siendo varias las explicaciones propuestas para explicar el vínculo entre el déficit de seipina y el acúmulo ectópico de lípidos.

## 2 JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

### 2.1. JUSTIFICACIÓN

En el presente estudio, se detalla la afectación hepática en un modelo murino de lipodistrofia congénita generalizada tipo 2. Hasta la fecha, la mayor parte de la literatura científica relativa a la EHGNA en ratones deficientes en seipina (SKO) concierne a los mecanismos fisiopatológicos involucrados en las alteraciones metabólicas y a las modificaciones producidas por terapias a estudio. Las referencias a la anatomía patológica del hígado son escasas y nunca antes se ha estudiado la evolución histológica a largo plazo ni

evaluado esta mediante un sistema de puntuación. Llama la atención que, en contraposición con lo observado en pacientes con LCG tipo 2, en ningún modelo animal de la enfermedad se haya constatado el desarrollo de esteatohepatitis o de fibrosis.

En este estudio, se describen la anatomía patológica y las características morfométricas del hígado de ratones *Bscl2*<sup>-/-</sup>, *Bscl2*<sup>+/-</sup> y *Bscl2*<sup>+/+</sup> en función de la edad con vistas a progresar en el conocimiento de la hepatopatía relacionada con el déficit de seipina. Se plantea la hipótesis de que la esteatohepatitis y la fibrosis tengan cabida en el espectro de afectación hepática de los ratones SKO, estando supeditado su desarrollo al tiempo de evolución de la enfermedad. Así, se estudia la progresión hasta los 24 meses de edad, y se evalúa por primera vez el grado de actividad y fibrosis mediante el sistema de puntuación de la NASH CRN.

Se analiza también la expresión hepática de *Fgf21* en cada una de las tres cohortes genotípicas a fin de ahondar en las bases moleculares de la afectación hepática asociada a la lipodistrofia congénita generalizada tipo 2.

## **2.2. OBJETIVOS**

### **2.2.1. Objetivo principal**

Determinar las características anatomopatológicas y moleculares de la EHGNA en ratones *Bscl2*<sup>-/-</sup> (homocigotos) (SKO) generados mediante tecnología Cre-loxP, y comparar los hallazgos con los observados en ratones *Bscl2*<sup>+/-</sup> (heterocigotos) y *Bscl2*<sup>+/+</sup> (*wild type*).

### **2.2.2. Objetivos específicos**

- Estudiar las características macroscópicas del hígado y cuantificar sus características morfométricas.
- Describir cualitativamente la anatomía patológica del hígado en preparaciones de hematoxilina-eosina.
- Evidenciar la infiltración grasa y el daño hepatocelular mediante tinciones específicas.
- Cuantificar el grado de actividad y fibrosis mediante el sistema de puntuación de la NASH CRN en cada una de las preparaciones histológicas examinadas.
- Examinar la expresión proteica de FGF21 en el tejido hepático mediante técnicas inmunohistoquímicas.
- Cuantificar la expresión del gen *Fgf21* en el hígado en estos ratones.
- Explorar la gravedad de la afectación hepática globalmente en cada grupo, así como establecer una relación entre la edad de evaluación y la gravedad.
- Constatar la presencia o ausencia de diferencias significativas entre sexos para cada uno de los parámetros estudiados.

### 3 ANIMALES Y MÉTODOS

Esta experimentación animal fue realizada en el animalario SPF autorizado del CiMUS de acuerdo con las disposiciones bioéticas establecidas en la Declaración de la Asamblea Médica Mundial sobre el uso de animales en la investigación biomédica. Todas las prácticas fueron realizadas en conformidad con los estándares de atención y cuidado animal estipulados en los reglamentos internacionales y en la legislación española:

- 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.
- Real Decreto 53/2013, de 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.
- Directiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 22 de septiembre de 2010, relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos.
- Ley 32/2007, de 7 de noviembre, para el cuidado de los animales, en su explotación, transporte, experimentación y sacrificio.
- Real Decreto 1201/2005, de 10 de octubre, sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos.
- Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre de Protección de Datos de Carácter Personal.
- Real Decreto 664/1997, de 12 de mayo, sobre la protección de los trabajadores contra los riesgos relacionados con la exposición a agentes biológicos durante el trabajo.

El proyecto ha sido aprobado por el Comité de Bioética de la Universidad de Santiago de Compostela, órgano habilitado según el Real Decreto 53/2013 y por la Xunta de Galicia (código 15010/17/004).

#### 3.1. DISEÑO DEL ESTUDIO

El presente trabajo se basa en el estudio experimental de las consecuencias moleculares, anatomopatológicas y morfométricas a nivel hepático de la disrupción ubicua de seipina en ratones transgénicos generados mediante tecnología Cre-loxP.

Se han establecido tres cohortes de ratones: homocigotos *Bscl2*<sup>-/-</sup>, heterocigotos *Bscl2*<sup>+/-</sup> y controles *wild-type* *Bscl2*<sup>+/+</sup>. Se han practicado necropsias en ejemplares de entre 1 y 24 meses de vida a fin de caracterizar la afectación hepática en ratones deficientes en seipina.

### 3.2. MUESTRA DE ESTUDIO Y RECOGIDA DE DATOS

Se han seleccionado 70 ratones: 15 homocigotos *Bscl2*<sup>-/-</sup>, 25 heterocigotos *Bscl2*<sup>+/-</sup> y 30 controles *wild-type* *Bscl2*<sup>+/+</sup>. Las necropsias de los animales incluidos en el estudio se llevaron a cabo entre los años 2017 y 2020.

### 3.3. VARIABLES RECOGIDAS

Como variables independientes, se recogieron genotipo, edad y sexo, siendo las demás variables dependientes (**Tabla 2**).

Variable	Unidad de medida/Categorías	Tipo	Definición/determinación
Genotipo	<i>Bscl2</i> <sup>+/+</sup> / <i>Bscl2</i> <sup>+/-</sup> / <i>Bscl2</i> <sup>-/-</sup>	Variable cualitativa con tres categorías	PCR
Edad	Meses	Variable cuantitativa continua	Meses desde el nacimiento hasta la necropsia
Sexo	Masculino o femenino	Variable cualitativa dicotómica	Sexado morfológico mediante observación de la papila genital
Peso corporal	Gramos (g)	Variable cuantitativa continua	Pesado en báscula de laboratorio
Peso hepático	Gramos (g)	Variable cuantitativa continua	Pesado en báscula de laboratorio
Proporción de peso hepático	%	Variable cuantitativa continua	$\frac{\text{peso hepático (g)}}{\text{peso corporal (g)}} \times 100$
Esteatosis	0-3	Variable cuantitativa discreta	Criterios de la NASH CRN
Degeneración balonizante	0-2	Variable cuantitativa discreta	Criterios de la NASH CRN
Inflamación lobulillar	0-3	Variable cuantitativa discreta	Criterios de la NASH CRN
Puntuación total NAS (actividad)	0-8	Variable cuantitativa discreta	Criterios de la NASH CRN
Fibrosis	0-4	Variable cuantitativa discreta	Criterios de la NASH CRN
HGNA	Presencia o ausencia	Variable cualitativa dicotómica	Puntuación NAS $\geq$ 1
EHNA	Presencia o ausencia	Variable cualitativa dicotómica	Puntuación NAS $\geq$ 4
Fibrosis	Presencia o ausencia	Variable cualitativa dicotómica	Fibrosis NASH CRN $\geq$ 1a
ARNm <i>Fgf21</i>	<i>Fgf21/18S</i>	Variable cuantitativa continua	Cuantificación relativa qPCR

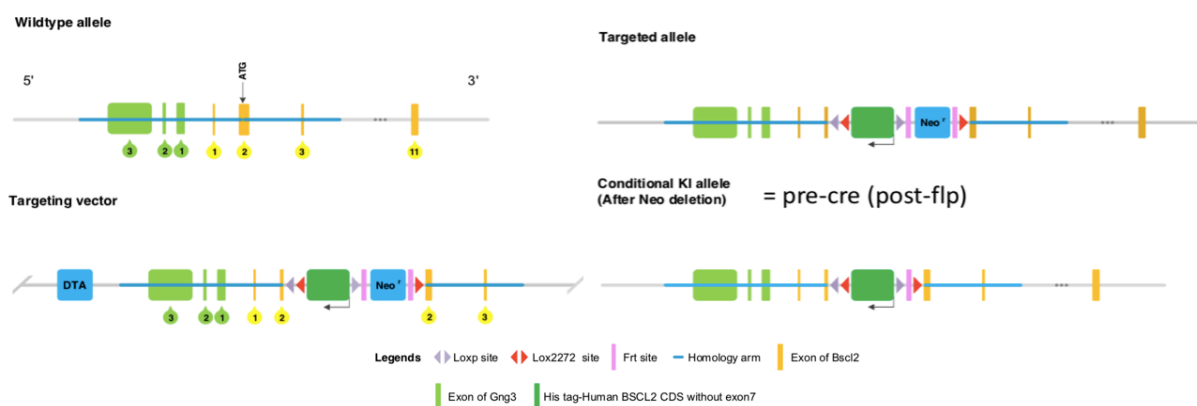
Tabla 2. Variables a estudio.

### 3.4. ANIMALES

#### 3.4.1. Ratones transgénicos

Para la obtención de los diferentes genotipos de estos ratones transgénicos hemos seguido la siguiente estrategia (**Anexo, Fig. 1**):

Los ratones (C57BL6/N) heterocigotos pre-Cre *Bscl2*<sup>+/-</sup> fueron generados mediante recombinación homóloga, empleando la estrategia basada en el sistema de recombinación Cre/loxP. El codón de inicio ATG del gen *BSCL2* fue reemplazado por un *cassette* invertido (LoxP-Lox2272-His tag invertido-Human *BSCL2* CDS sin exón7-LoxP invertido-Neo cassette-Lox2272 invertido) mediante recombinación homóloga. El constructo diana fue electropolarizado en las células ES (células madre embrionarias, del inglés, *embryonary stem*). Las células que integraron el transgén de forma estable, incorporaron también, en un *cassette* de expresión distinto, un gen de resistencia farmacológica. Así, mediante un proceso de selección farmacológica consistente en la exposición de las células a antibióticos nocivos, se aislaron únicamente las células ES transfectadas de forma estable. Estas células modificadas, previa confirmación mediante PCR y *Southern blot*, fueron introducidas en blastocistos C57BL6/N. Los blastocistos fueron implantados en hembras pseudopreñadas (apareadas previamente con un macho estéril). Las quimeras de la descendencia positivas para la transmisión por línea germinal se seleccionaron y cruzaron con ratones *wild-type*, resultando en una progenie de ratones *wild-type* y heterocigotos para el vector. Estos heterocigotos se cruzaron con ratones que expresaban la recombinasa Fip para obtener ratones con delección de Neo, esto es, ratones post-Flp o pre-Cre heterocigotos (*Bscl2*<sup>+/-</sup>). El cruce de estos ratones entre sí resultó en la generación de una progenie de ratones control (*Bscl2*<sup>+/+</sup> o *wild type*) (~25%), heterocigotos pre-Cre *Bscl2*<sup>+/-</sup> (~50%) y homocigotos pre-Cre *Bscl2*<sup>-/-</sup> (~25%). El genotipo de los transgénicos fue confirmado mediante PCR tradicional. Estos ratones homocigotos post-Flp o pre-Cre (*Bscl2*<sup>-/-</sup>) son, estrictamente, *knockin* para el alelo en cuestión, esto es, se ha incorporado un gen en su genoma. Sin embargo, desde un punto de vista funcional, se comportan como *knockout* de seipina (SKO), puesto que el alelo incorporado no produce la proteína (**Fig. 5**).



**Figura 5. Estrategia de generación del alelo pre-Cre o post-Flp.** El codón de inicio ATG del gen *BSCL2* (*wildtype allele*) es reemplazado por un cassette invertido (LoxP-Lox2272-His tag invertido-Human *BSCL2* CDS sin exón7-LoxP invertido-Neo cassette-Lox2272 invertido) (*targeting vector*) mediante recombinación homóloga, de forma que el alelo diana (*targeted allele*) no expresa ninguna proteína funcional. La expresión de la recombinasa Flp es necesaria para la delección de Neo, lo cual resulta en el alelo KI condicional, pre-Cre o post-Flp. Fuente: propia.

### 3.4.2. Manejo de los animales

Para la identificación de cada ejemplar, se recurrió al marcaje mediante pendientes metálicos numerados. Los ratones se alojaron en jaulas, segregados según genotipo y sexo, bajo condiciones ambientales constantes (ciclo luz/oscuridad de 12:12 horas; temperatura de 22 °C ± 1 °C y humedad del 60%). Recibieron una dieta estándar de laboratorio con Teklad Global

Extruded 19% Protein Rodent Diet, Sterilizable, cat. 2019S, con dosificación del alimento en cantidad suficiente para permitir su consumo *ad libitum*.

### **3.4.3. Necropsia y obtención de las muestras**

Los ratones fueron sacrificados mediante la inhalación de dióxido de carbono del 30% al 70% del volumen de la cámara/minuto de acuerdo con las directrices de las *AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals: 2020 Edition* (91).

El protocolo de necropsia se inició con la inspección externa de los cadáveres, incluyendo esta el registro del peso corporal y la realización de fotografías digitales para constatar las posibles alteraciones morfométricas. A continuación, se procedió al examen interno mediante una incisión sagital en la piel de la pared abdominal desde el pubis hasta la región submentoniana. Tras la disección de la piel del tejido celular subcutáneo y la musculatura subyacente, se procedió a la apertura de la cavidad abdominal mediante una nueva incisión longitudinal en la línea media del peritoneo parietal. Una vez expuestas las vísceras abdominales, se obtuvieron nuevas fotografías para hacer constar la presencia o ausencia de grasa visceral y organomegalia, así como el aspecto macroscópico del hígado. Para la remoción del hígado, se seccionaron los ligamentos que lo mantienen en su posición anatómica. Una vez liberado, se procedió al registro de su peso y a la sección en dos porciones. La porción destinada al estudio histopatológico de rutina se fijó en una solución de formaldehído al 4% m/v – tampón de fosfato 0,05 M en PBS (Bio-Optika, cat. 05-K01022), mientras que la porción restante se introdujo en nitrógeno líquido a -80 °C para la ulterior obtención de ARN y DNA complementario, y realización de PCR en tiempo real.

## **3.5. ANÁLISIS HISTOPATOLÓGICO**

El tejido hepático destinado al estudio histológico de rutina fue fijado durante 24 horas en una solución de formaldehído al 4% m/v, en tampón de fosfato 0,05 M en PBS e incluido posteriormente en parafina. Para las preparaciones convencionales, las secciones fueron sometidas a una secuencia de desparafinado (1 hora a 60 °C en estufa e inmersión en xilol durante 10 minutos), hidratación en concentraciones decrecientes de alcohol (absoluto, 5 minutos; 96°, 70°, 5 minutos y 50 °, 5 minutos) y lavado en agua destilada. A continuación, se sumergieron los cristales en hematoxilina durante 10 minutos, se lavaron en agua 2 minutos y se sumergieron en eosina alcohólica 5 minutos. Por último, se procedió a la deshidratación en concentraciones crecientes de alcohol (70°, 96° y alcohol absoluto) y en xilol para después proceder al montaje.

Para la tinción con tricrómico de Masson, se recurrió de nuevo a la secuencia de desparafinado e hidratación. A continuación, se sumergieron las preparaciones en hematoxilina de Weigert por 10 minutos, se lavaron con agua corriente otros 10 minutos y se procedió a la inmersión en Ponceau 10 minutos más. Se prosiguió con el lavado con agua destilada y el tratamiento con ácido fosfomolibdico durante 10 minutos y con azul de anilina 3 minutos. Se lavaron de nuevo las preparaciones con agua destilada y se procedió a la deshidratación, aclarado y montaje.

De cada espécimen, fueron examinadas dos preparaciones al microscopio óptico Leica DM 2000 LED por dos investigadores ciegos a los datos clínicos de los ratones. En la preparación

de hematoxilina y eosina, se valoró el grado de esteatosis, degeneración balonzante e inflamación lobulillar mediante el sistema de puntuación NAS ideado por la NASH CRN (**Tabla 1**), mientras que la preparación teñida con tricrómico de Masson se utilizó para determinar la fibrosis, también en conformidad con el sistema de gradación de NASH CRN (**Tabla 1**).

Para constatar la infiltración grasa, se seleccionaron ejemplares representativos de cada uno de los grados de esteatosis en el NAS. Se obtuvieron cortes criostáticos de 8  $\mu\text{m}$  de grosor de tejido hepático, se fijaron en formalina neutra tamponada al 10% durante 2 horas y se tiñeron con solución *Oil red O* durante 20 minutos. Se procedió después al lavado, contrateñido con Hematoxilina de Harris durante 10 minutos y lavado de nuevo, para finalizar con el montaje con medio acuoso.

Con vistas a estudiar la expresión proteica de FGF21, se empleó el anticuerpo anti-FGF21 en dos preparaciones seleccionadas, correspondientes a un ratón homocigoto de 9 meses de edad y su correspondiente control. Se procedió con una secuencia de desparafinado y recuperación antigénica en tampón citrato (10 mM Citric Acid, 0.05% Tween 20, pH 6.0) durante 20 minutos, en módulo PT Link. Se realizó después un lavado con PBS, un bloqueo con peroxidasa al 3% durante 10 minutos y un segundo lavado con PBS. A continuación, se incubaron las muestras en el anticuerpo primario anti-FGF21 (ref. ab171941, Abcam; 1:500), por 1 hora a temperatura ambiente, y secundario anti-rabbit, 30 minutos a temperatura ambiente, lavando las preparaciones con PBS entre y tras el uso de los anticuerpos. Tras esto, se revelaron con 3,3'-diaminobenzidina (DAB, ref. K3468, Dako) durante 5 min a temperatura ambiente, se enjuagaron con PBS y se contrateñeron con hematoxilina de Mayer (Bio Optica, ref. 05-M06002) durante 10 min, a temperatura ambiente. Por último, se deshidrataron y montaron las preparaciones.

Se seleccionaron especímenes en los que la degeneración balonzante era dudosa en el estudio de rutina, así como controles en los que las células balonzantes presentaban todas sus características definitorias, para el estudio inmunohistoquímico con CK8/18 (Flex Monoclonal Rabbit Anti-Cytokeratin 8/18, Clone EP17/EP30; Dako Pathology Solutions from Agilent). Las muestras se fijaron en una solución de etanol al 70%, siendo procesadas con una metodología análoga a la descrita anteriormente.

Las imágenes que se incluyen en el estudio fueron obtenidas con el microscopio Olympus BX51, equipado con una cámara Olympus DP70, y procesadas con el software DP Controller Olympus Optical.

### **3.6. ESTUDIOS DE EXPRESIÓN DE *Fgf21***

La extracción de ARN total de las muestras de tejido hepático se realizó con el kit ReliaPrep TM RNA Tissue Miniprep System, cat. Z6112 (Promega, Madrid, España). Las muestras congeladas de tejido hepático (de 20 mg) se pesaron y homogeneizaron en 250  $\mu\text{l}$  de tampón de lisis (LBA previamente suplementado con 1-tioglicerol al 2%) empleando el Tissue Ruptor (Qiagen, Hilden, Alemania). A continuación, se añadieron 750  $\mu\text{l}$  del reactante TRIzol (Invitrogen, Madrid, España) a las muestras homogeneizadas, que después se agitaron en vórtex durante 10 segundos y se incubaron a temperatura ambiente durante 5 minutos para permitir la completa disociación del complejo nucleoproteico. Se añadieron 200  $\mu\text{l}$  de cloroformo (Sigma,

Madrid, España) y se agitaron las muestras a mano vigorosamente durante 15 segundos, procediendo después a una nueva incubación a temperatura ambiente durante 2 minutos. Se centrifugaron las muestras a 12000 g durante 15 minutos a 4°C y se transfirió la fase acuosa a un nuevo tubo. Se añadieron 35 µl de 2-propanolol por cada 100 µl de sobrenadante y las muestras se agitaron en el vórtex durante 5 segundos. El lisado se transfirió a una columna ReliaPrep y se centrifugó a 14000 g durante 30 segundos a temperatura ambiente.

Para la purificación del ARN, se añadieron 200 ml de solución de lavado y las muestras se centrifugaron las muestras a 14000 g durante 15 segundos a temperatura ambiente. Se añadieron nuevamente 500 µl de solución de lavado de ARN y se procedió al centrifugado a 14000 g durante 15 segundos a temperatura ambiente. Se añadieron 300 µl de solución de lavado de ARN y se centrifugaron durante 2 minutos a temperatura ambiente. Por último, el ARN se eluyó con 30 µl de nucleasa y agua libre de RNasa en un último paso de centrifugación a 14000 g durante 1 minuto a temperatura ambiente. La concentración y pureza de cada muestra se determinó con un espectrofotómetro (ND2000; Nanodrop). El ARN obtenido fue almacenado a -80°C hasta su ulterior uso.

A continuación, se hizo la retrotranscripción del ARN total obtenido con el kit de M-MLV RT (Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase, Invitrogen, España, cat. 28025-013), ajustando la concentración del ARN de partida a 1 µg. Se usó una mezcla de 2 mM desoxi-NTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP, Invitrogen, cat. 55082) y, como cebadores, se emplearon los “random primers” p(dN)6 (Roche, cat. 11034731001) (10 ng/µl). El ADNc obtenido fue almacenado a -20 °C hasta ser analizado.

La expresión diferencial del gen *Fgf21* en cada genotipo fue evaluada mediante PCR cuantitativa (qPCR). Los cebadores específicos (**Tabla 3**) fueron diseñados por la Universal Probe Library (Roche Diagnostics, Sant Cugat del Valles, España) y utilizados en un termociclador LightCycler 2.0 (Roche Diagnostics) para determinar la expresión de los genes de interés. Los resultados se normalizaron con el gen *18S* usando el método  $2^{-\Delta\Delta CT}$  (92).

Gen	Cebador	%GC	Secuencia	Sonda	Amplión (nt)
18S	Izquierda	50	aaacggctaccacatccaag	74 (cat. no. 04688970001)	108
	Derecha	55	tacagggcctcgaagagtc		
<i>Fgf21</i>	Izquierda	55	agcataccccatccctgact	25 (cat. no. 04686993001)	64
	Derecha	60	gtacctctgccggacttgac		

Tabla 3. Cebadores y sondas de la Universal Probe Library empleados en el análisis por qPCR.

### 3.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos se presentan como medias  $\pm$  desviación estándar. La normalidad de las variables se estudió mediante la prueba de Shapiro-Wilks. Para la comparación estadística de variables cualitativas entre grupos se aplicaron la prueba  $\chi^2$  y el test exacto de Fisher. La comparación de variables cuantitativas se realizó mediante la prueba de la U de Mann-Whitney para dos muestras independientes y mediante la prueba de Kruskal-Wallis para tres o más muestras independientes. La asociación estadística entre variables se estudió mediante el coeficiente de correlación de Spearman. Se han considerado estadísticamente significativos los resultados con un valor de  $p < 0,05$ .

## 4 RESULTADOS

### 4.1. GENERACIÓN DE RATONES TRANSGÉNICOS

Mediante recombinación homóloga, por medio de una estrategia basada en el sistema de recombinación Cre/loxP, se han generado ratones (C57BL6/N) post-Flp o pre-Cre homocigotos ( $Bscl2^{-/-}$ ) y heterocigotos ( $Bscl2^{+/-}$ ), portadores de un *cassette* invertido que reemplaza el codón de inicio ATG en el gen *Bscl2* e impide la expresión de seipina funcional. Esto es, los ratones homocigotos pre-Cre ( $Bscl2^{-/-}$ ) son, en realidad, *knockout* de seipina (SKO).

#### 4.1.1. Fertilidad y viabilidad

Desde abril de 2016 y partiendo de 2 unidades de cría de ratones heterocigotos ( $Bscl2^{+/-}$ ), hemos generado 126 ratones transgénicos: 53 hembras (*wild type*: 19; heterocigotas: 25; homocigotas: 9) y 73 machos (*wild type*: 20; heterocigotos: 39; homocigotos: 14). Con la deducción de los ratones obtenidos de unidades de cría de refresco (cruces entre heterocigotos con nuevos ratones silvestres para evitar la deriva genética) se cumplen las proporciones mendelianas (1:2:1). Se puede concluir así que el genotipo de los ratones en heterocigosis ( $Bscl2^{+/-}$ ) no condiciona la viabilidad de los mismos al destete. El número promedio de crías por camada fue  $5.8 \pm 3.0$ . Por su parte, los ratones homocigotos no son fértiles.

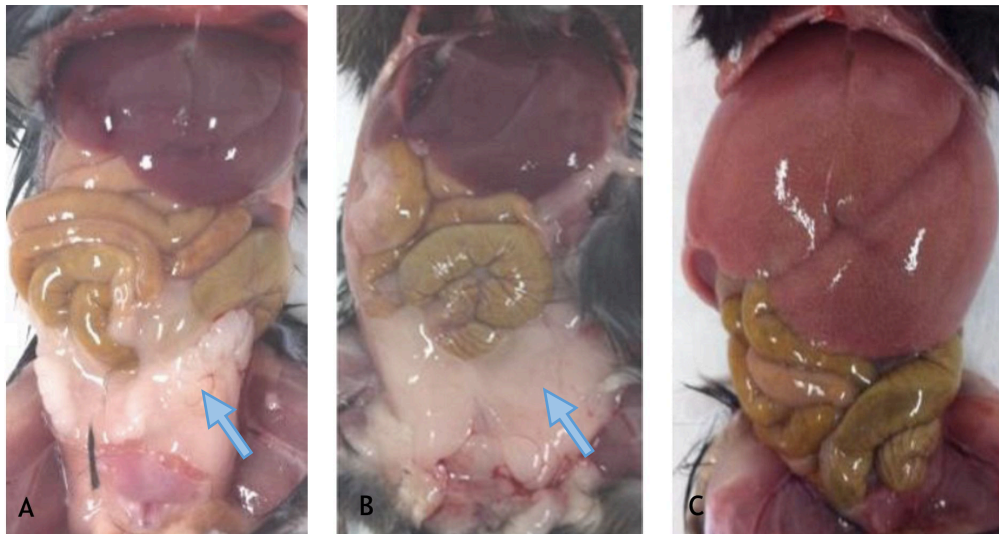
#### 4.1.2. Supervivencia y mortalidad

La esperanza de vida de los ratones de todos los genotipos fue la esperada para un ratón *wild-type* (19-23 meses) y no se objetivaron problemas de salud que obligaran al adelanto del sacrificio de los ratones. Las necropsias se realizaron de manera programada con objeto de caracterizar los hallazgos de las necropsias o bien por necesidad de optimizar recursos. Por genotipo, se realizó necropsia a: 30 ratones *wild-type* (de entre 0.4 y 12.1 meses de edad), 25 heterocigotos (de entre 0.9 y 24.3 meses de edad) y 15 homocigotos (de entre 0.9 y 20.3 meses de edad).

### 4.2. EXAMEN MACROSCÓPICO DEL HÍGADO

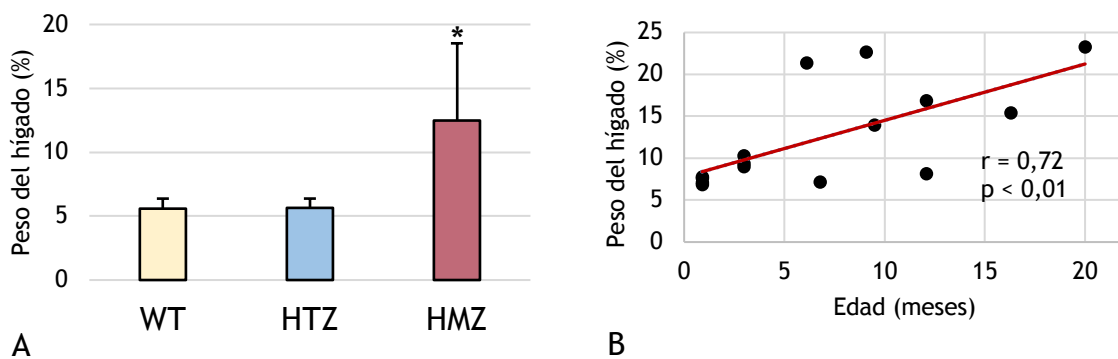
A la disección, los ratones SKO u homocigotos  $Bscl2^{-/-}$  presentaron lipoatrofia generalizada, con práctica ausencia de grasa blanca (inguinal y gonadal) y parda (interescapular). En cambio, no se evidenciaron alteraciones reseñables en la cantidad de tejido adiposo observada en ratones heterocigotos  $Bscl2^{+/-}$  y ratones *wild-type*  $Bscl2^{+/+}$ .

Al examen macroscópico, el hígado de los controles y de los ratones  $Bscl2^{+/-}$  resultó ser, a cualquier edad, normal en cuanto a coloración y tamaño. Por el contrario, los ratones SKO mostraron hepatomegalia y palidez hepática, esto es, un hígado con apariencia sugestiva de acúmulo ectópico de grasa (**Fig. 6**).



**Figura 6.** Diseción macroscópica de ratones control (A), heterocigoto *Bsc12*<sup>+/-</sup> (B) y homocigoto *Bsc12*<sup>-/-</sup> (C) de 9 meses. Nótese la grasa visceral (flechas) en los ratones control (A) y heterocigoto (B), ausente en el ratón homocigoto (C). Apréciase además la palidez y el mayor tamaño del hígado en el ratón *Bsc12*<sup>-/-</sup> (C) en relación con sus coetáneos.

A fin de valorar de un modo más objetivo la hepatomegalia, se realizó un estudio cuantitativo del peso del hígado y del peso corporal total. En comparación con los ratones control, el peso del hígado de los ratones SKO resultó ser mayor tanto en términos absolutos como en términos relativos, esto es, como proporción respecto al peso corporal total. En cambio, no se observaron diferencias significativas entre el peso del hígado de los heterocigotos y el de los controles *wild-type*. Se evaluó la participación de la edad y del sexo como factores de confusión, sin encontrar diferencias significativas en la distribución de estas variables entre las tres muestras a comparar (**Fig. 7A**).



**Figura 7. Peso relativo del hígado (%).** A. Peso relativo del hígado por genotipos. Datos representados como media  $\pm$  desviación estándar. WT: n = 29, HTZ: n = 24, HMZ: n = 15; \*p < 0,05 vs WT (WT, *wild types*; HTZ, heterocigotos; HMZ, homocigotos) B. Correlación de Spearman para el peso relativo del hígado y la edad en homocigotos; n = 15.

Dentro de la cohorte de ratones SKO, se encontró una correlación fuertemente positiva entre la edad y el peso del hígado en términos absolutos ( $r_s = 0,82$ ; p < 0,01) y relativos ( $r_s = 0,72$ ; p < 0,01), esto es, la hepatomegalia es más marcada cuanto mayor es la edad del ratón deficiente en seipina (**Fig. 7B**).

Además, se establecieron dos grupos de edad, con punto de corte a los 6 meses, con vistas a estudiar las variables de interés dentro de cada uno de ellos. El porcentaje del peso del hígado en relación al peso corporal resultó ser mayor de forma estadísticamente significativa en los ratones SKO en ambas cohortes (**Tabla 4**).

Edad (meses)	Genotipos	Peso corporal total (g)	Peso hepático (g)	Peso hepático (%)	n
<6 meses	<i>Wild type</i>	17,1 ± 7,0	1,0 ± 0,4	5,8 ± 0,8	22
	Heterocigotos <i>Bscl2</i> <sup>+/-</sup>	17,4 ± 5,9	1,0 ± 0,3	6,0 ± 0,6	13
	Homocigotos <i>Bscl2</i> <sup>-/-</sup> (SKO)	16,9 ± 5,6	1,4 ± 0,7	<b>8,3 ± 1,3 *</b>	7
≥6 meses	<i>Wild type</i>	29,7 ± 4,6	1,5 ± 0,2	5,1 ± 0,5	8
	Heterocigotos <i>Bscl2</i> <sup>+/-</sup>	35,6 ± 5,7	1,9 ± 0,3	5,3 ± 0,8	11
	Homocigotos <i>Bscl2</i> <sup>-/-</sup> (SKO)	34,2 ± 8,3	<b>5,3 ± 1,8 *</b>	<b>16,1 ± 6,2 *</b>	8

Tabla 4. Peso corporal y del hígado de ratones control, heterocigotos *Bscl2*<sup>+/-</sup> y homocigotos *Bscl2*<sup>-/-</sup>. Datos para cada subgrupo representados como media ± desviación estándar; \*p < 0,05.

### 4.3. EXAMEN MICROSCÓPICO DEL HÍGADO

#### 4.3.1. Descripción histopatológica

Para comprender las alteraciones anatomopatológicas que subyacen los hallazgos macroscópicos descritos en los ratones SKO, se analizaron al microscopio óptico las tinciones de hematoxilina-eosina y tricrómico de Masson de todos los ratones incluidos en el estudio. La histología hepática de los ratones *wild-type* y heterocigotos resultó ser normal a todas las edades evaluadas. Si bien es cierto que en algunos casos se describió la presencia de mínimos infiltrados lobulillares, no dejan de ser un hallazgo inespecífico que se debe contextualizar. Así, en ausencia de esteatosis y de degeneración balonizante, el evidenciar algún foco de inflamación no tiene ningún tipo de implicación diagnóstica.

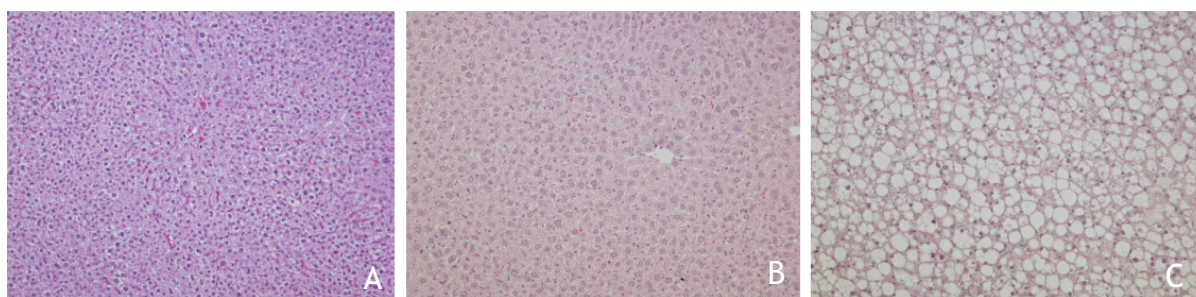
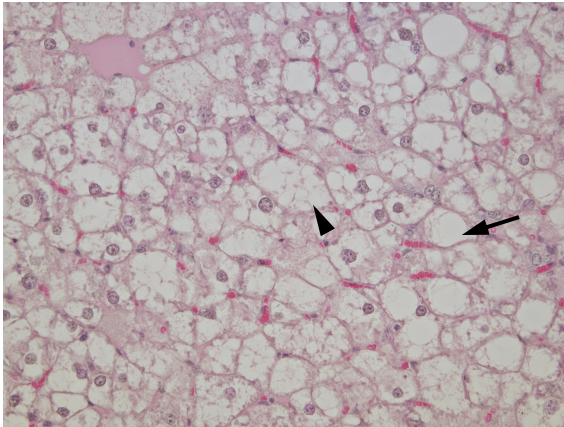
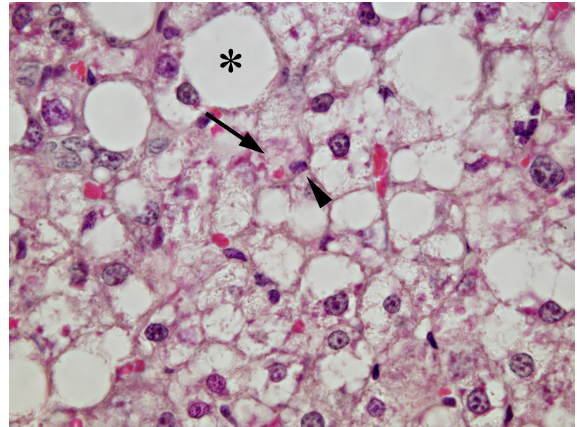


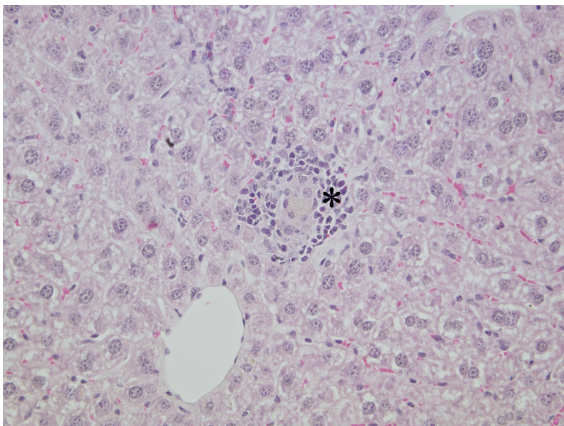
Figura 8. Histología hepática comparativa de ratones *wild-type*, heterocigoto *Bscl2*<sup>+/-</sup> y homocigoto *Bscl2*<sup>-/-</sup> de 6 meses. La histología hepática de los ratones *wild-type* y heterocigoto es normal (A, B), mientras que el ratón homocigoto presenta grave esteatosis mixta macrovesicular y microvesicular, así como degeneración balonizante (C). (H&E, 200x)



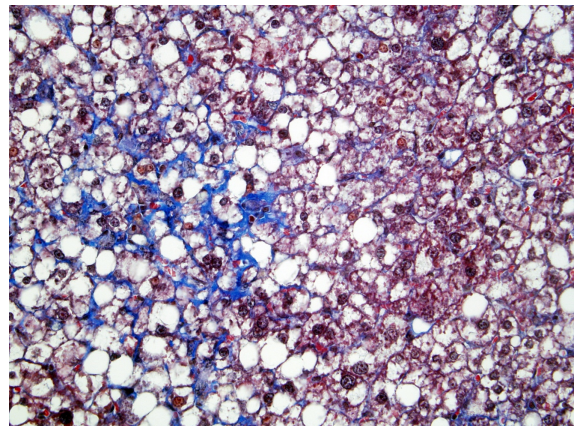
**Figura 9. Esteatosis hepática mixta.** Se presenta un patrón anatomopatológico compuesto por grandes vacuolas lipídicas que desplazan el núcleo a la periferia, características de la esteatosis macrovesicular (flecha), y pequeñas gotas lipídicas que llenan el citoplasma sin desplazar el núcleo, típicas de la esteatosis microvesicular (cabeza de flecha). (H&E, 400x)



**Figura 10. Degeneración balonzante.** Las células balonzantes (flecha) presentan un citoplasma pálido de apariencia plumosa y núcleo hiper cromático de pequeño tamaño (cabeza de flecha). Estas células balonzantes aparecen en un contexto de esteatosis de predominio macrovesicular, en que los hepatocitos contienen una única gota lipídica intracitoplasmática (asterisco) que desplaza al núcleo hacia la periferia. (H&E, 1000x)



**Figura 11. Inflamación lobulillar.** Se presenta un foco de inflamación lobulillar compuesto por células mononucleares. (H&E, 400x)



**Figura 12. Fibrosis pericelular ligera.** Se muestra un patrón de fibrosis 1a (fibrosis pericelular ligera) de acuerdo con el sistema NASH CRN. Compárese la disposición de las fibras de colágeno teñidas de azul entre los hepatocitos (patrón “en malla de alambre”) a la izquierda de la imagen con el tejido hepático normal a la derecha. (Tricrómico de Masson, 400x)

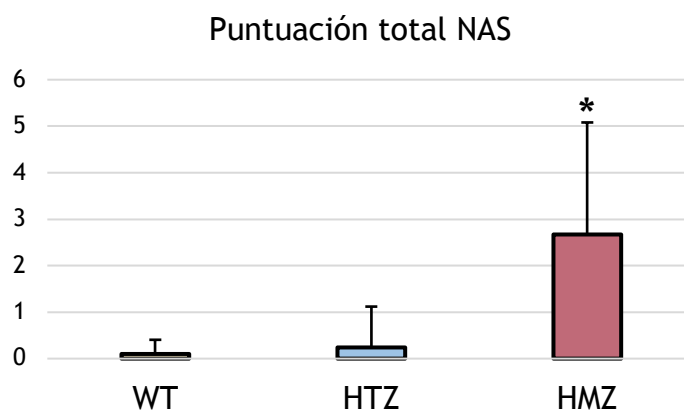
En cambio, en ratones homocigotos, la esteatosis hepática se constató ya a partir de los 3 meses de edad y resultó ser un hallazgo constante a partir de los 6 meses (**Fig. 8**). Esta infiltración grasa es mixta, aunque de predominio macrovesicular (**Fig. 9**). La presencia de células balonzantes (**Fig. 10**), elemento concordante con el concepto de actividad o daño hepatocelular activo, hace que, en la gran mayoría de los casos, podamos hablar no solo de esteatosis, sino también de esteatohepatitis. También con cierta frecuencia, se observaron focos

de inflamación lobulillar, compuestos por células mononucleares (**Fig. 11**). Algunos casos mostraron además un infiltrado crónico perivascular llamativo de significado incierto que no se incluye en el sistema de puntuación NASH CRN. En el contexto de la esteatohepatitis, algunos de estos ratones homocigotos desarrollaron fibrosis pericelular ligera. Esta, evidenciable únicamente con tricrómico de Masson y no mediante hematoxilina-eosina, confiere a las zonas afectas un patrón “en malla de alambre” (**Fig. 12**). Por último, aunque no incluida en el sistema de puntuación NASH CRN, cabe destacar la presencia constante, en los *Bsc12*<sup>-/-</sup>, de esteatosis microvesicular. Se observan numerosísimos hepatocitos con el citoplasma repleto de pequeñas gotas lipídicas que no desplazan el núcleo, de tal modo que este conserva su posición más o menos central en la célula (**Fig. 9**).

La anatomía patológica del hígado de los ratones SKO se podría definir, por tanto, como esteatosis mixta de predominio macrovesicular de inicio temprano con ulterior desarrollo de esteatohepatitis. En algunos casos con daño activo marcado, se desarrolla también fibrosis pericelular ligera.

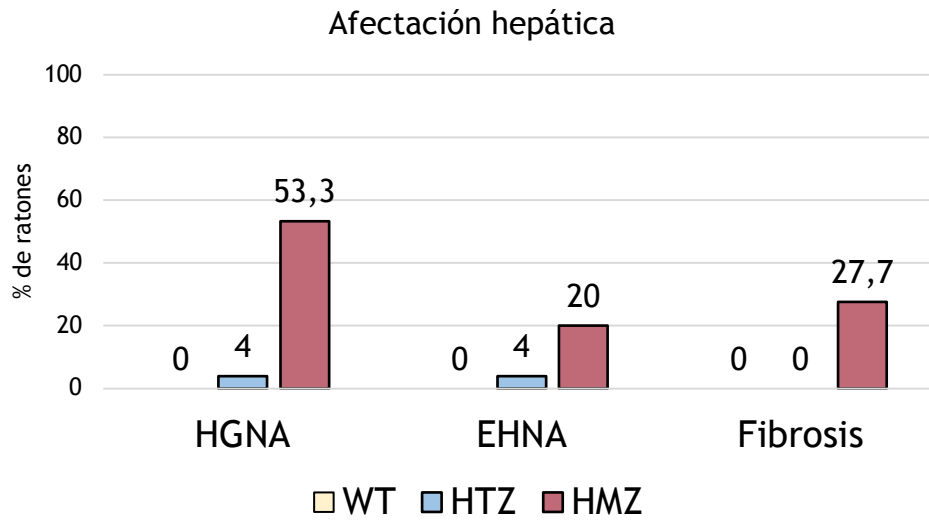
#### 4.3.2. Puntuación NASH CRN

Cada uno de los ratones incluidos en el estudio fue evaluado por medio de dos preparaciones (hematoxilina-eosina y tricrómico de Masson) y recibió, en consecuencia, una puntuación para su grado de actividad (NAS) y fibrosis de acuerdo con el sistema de la NASH CRN. Observamos que los ratones lipodistróficos deficientes en seipina (SKO) desarrollan EHGNA y lipotoxicidad. Globalmente, presentaron mayores puntuaciones de forma estadísticamente significativa para el grado de actividad (puntuación total del NAS) y de fibrosis, así como para las puntuaciones de esteatosis y degeneración balonzante (**Fig. 13**). Las diferencias fueron también significativas para el porcentaje de ratones que, dentro de cada subgrupo, desarrollaron fibrosis, hígado graso no alcohólico (HGNA) o esteatohepatitis no alcohólica (EHNA) de acuerdo con los criterios ya explicados. Cabe aclarar que no existen diferencias significativas en la distribución de edad y sexo entre los tres grupos a comparar.



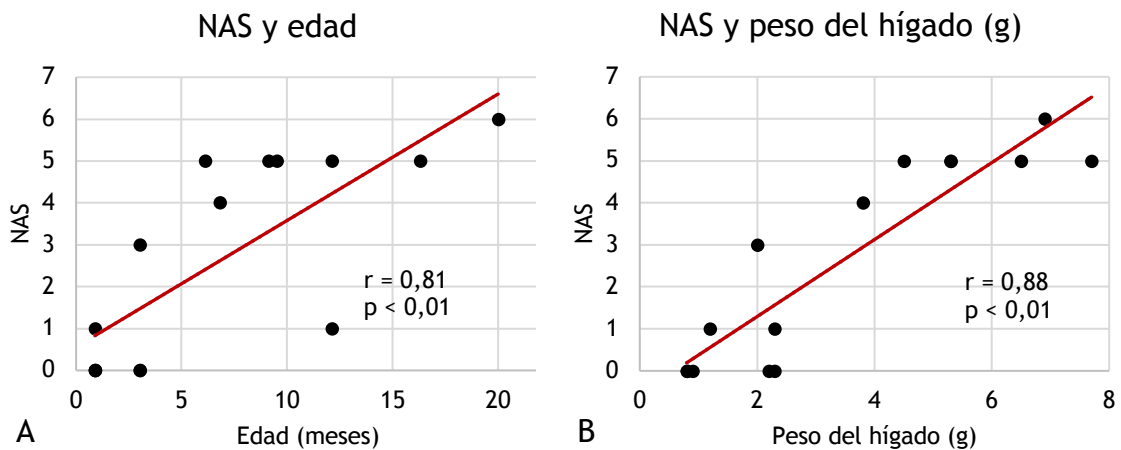
**Figura 13. Puntuación total NAS por genotipos.** Grado de actividad de la enfermedad hepática grasa no alcohólica calculada como sumatorio de las puntuaciones de esteatosis, degeneración balonzante e inflamación lobulillar según el sistema de puntuación NAS de la NASH CRN. Datos representados como media ± desviación estándar; WT: n = 30, HTZ: n = 25, HMZ: n = 15; \*p < 0,05 vs WT (WT, *wild type*; HTZ, heterocigotos; HMZ, homocigotos).

Del total de homocigotos, un 53,3% presentó HGNA; un 20%, EHNA, y un 27,7%, fibrosis (Fig. 14). Se observó asociación estadísticamente significativa entre la disrupción del gen *Bscl2* en homocigosis y la presencia de afectación hepática en sus tres formas.



**Figura 14. Afectación hepática por genotipos.** Porcentaje de ratones que cumple criterios de cada una de las formas de afectación entre el total de ratones de cada cohorte. WT: n=30, HTZ: n=25, HMZ: n=15 (WT, *wild type*; HTZ, heterocigotos; HMZ, homocigotos; HGNA, hígado graso no alcohólico; EHNA, esteatohepatitis grasa no alcohólica).

Dentro de la cohorte de SKO, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los parámetros microscópicos de afectación hepática entre ambos sexos. Por otro lado, existe una correlación fuertemente positiva entre la edad y el grado de actividad (NAS) ( $r_s = 0,81$ ;  $p < 0,01$ ). Aunque la asociación entre edad y fibrosis no es significativa, el grado de actividad y la presencia de fibrosis sí se correlacionan de forma estadísticamente significativa ( $r_s = 0,69$ ;  $p < 0,01$ ). Por último, se ha observado que existe asociación entre la afectación microscópica (grado de actividad) y la macroscópica (peso hepático absoluto y relativo) ( $r_s = 0,88$ ;  $p < 0,01$ ;  $r_s = 0,79$ ;  $p < 0,01$ , respectivamente) (Fig. 15).



**Figura 15. Correlaciones del grado de actividad en homocigotos.** A. Correlación de Spearman para el grado de actividad y la edad en homocigotos; n=15. B. Correlación de Spearman para el grado de actividad y el peso del hígado en homocigotos; n=15.

Por otro lado, se estudiaron las variables de interés en dos grupos de edad, estableciendo el punto de corte a los 6 meses. En la **Tabla 5**, se resumen las puntuaciones medias de cada ítem para cada genotipo en cada uno de los dos rangos de edad. Cuando se comparan las puntuaciones entre genotipos en ratones menores de 6 meses, no se encuentran diferencias estadísticamente significativas para ninguno de los ítems. En cambio, en la cohorte de ratones de 6 o más meses, las diferencias son estadísticamente significativas para todos los parámetros del sistema de puntuación NASH CRN a excepción de la inflamación lobulillar.

Edad (meses)	Genotipos	NASH					n
		NAS				Fibrosis	
		Esteatosis	Células balonzantes	Inflamación lobulillar	Puntuación total		
<6 meses	<i>Wild type</i>	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,1 ± 0,3	0,1 ± 0,3	0,0 ± 0,0	22
	Heterocigotos <i>Bscl2</i> <sup>+/-</sup>	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	14
	Homocigotos <i>Bscl2</i> <sup>-/-</sup> (SKO)	0,1 ± 0,4	0,3 ± 0,8	0,1 ± 0,4	0,6 ± 1,1	0,0 ± 0,0	7
≥6 meses	<i>Wild type</i>	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,1 ± 0,4	0,1 ± 0,4	0,0 ± 0,0	8
	Heterocigotos <i>Bscl2</i> <sup>+/-</sup>	0,1 ± 0,3	0,2 ± 0,6	0,3 ± 0,6	0,6 ± 1,3	0,0 ± 0,0	11
	Homocigotos <i>Bscl2</i> <sup>-/-</sup> (SKO)	2,3 ± 1,2 *	1,8 ± 0,7 *	0,5 ± 0,5	4,5 ± 1,5 *	0,5 ± 0,5 *	8

Tabla 5. Puntuación NASH CRN de ratones *wild-type*, heterocigotos (*Bscl2*<sup>+/-</sup>) y homocigotos (*Bscl2*<sup>-/-</sup>). Datos representados como media ± desviación estándar; \*p < 0,05.

#### 4.3.3. Análisis de Oil red O

Se seleccionaron siete casos representativos de los distintos grados de esteatosis observados en las preparaciones de hematoxilina-eosina. Con la tinción *Oil red O*, se confirma la naturaleza lipídica (depósitos grasos) de las lesiones (**Fig. 16**).

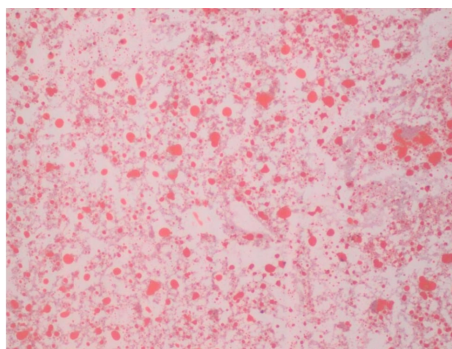


Figura 16. Esteatosis hepática. Obsérvense las gotas lipídicas teñidas de rojo en una preparación correspondiente a un grado 3 de esteatosis según el sistema de puntuación NASH CRN. (*Oil Red O*)

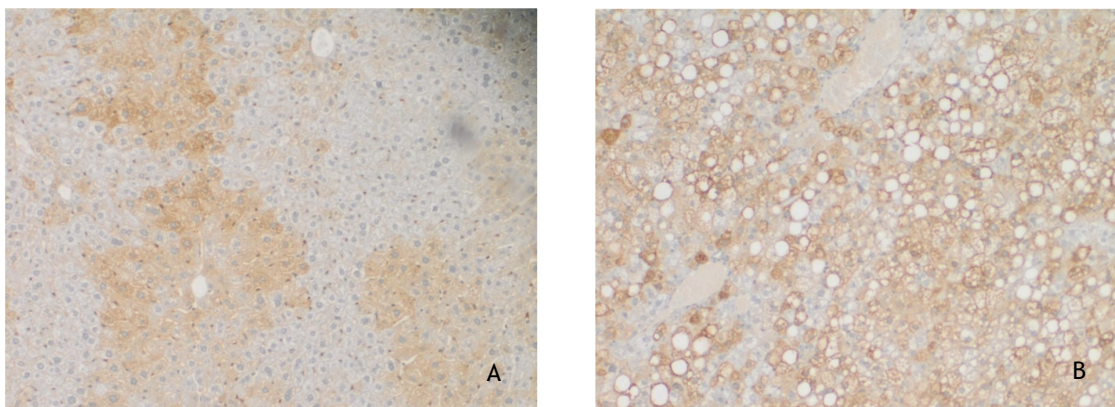
#### 4.3.4. Análisis inmunohistoquímico de CK8/18

Como ya se ha mencionado, a día de hoy, lo más aceptado para la identificación de la degeneración balonzante no es su caracterización inmunohistoquímica, sino la constatación de las características morfológicas típicas de las denominadas células balonzantes “clásicas”. Sin

embargo, dado que en el presente estudio se observaron también células balonzantes “equivocas”, se optó por valorar la tinción inmunohistoquímica para CK8/18 por si pudiera ayudar a esclarecer su naturaleza. En este caso, la tinción con CK8/18 no resultó concluyente.

#### 4.3.5. Análisis inmunohistoquímico de FGF21

Se realizó análisis inmunohistoquímico de FGF21, comparando dos muestras hepáticas correspondientes a un ratón homocigoto con esteatohepatitis (5 puntos en NAS) y un control sin afectación hepática. En este último, se observó expresión difusa citoplasmática en aproximadamente el 40% del tejido estudiado, con una intensidad de tinción intermedia. El homocigoto no presentó diferencias significativas en relación a la intensidad de expresión de la proteína, aunque sí fue posible, aparentemente, advertir la tinción en una proporción mayor de hepatocitos (**Fig. 17**). Por lo tanto, la expresión inmunohistoquímica de FGF21 resultó ser ligeramente superior en el caso homocigoto que en el control, pero ha de tenerse en cuenta que estos resultados no son extrapolables al resto de la muestra y, por tanto, no nos permiten extraer conclusiones.



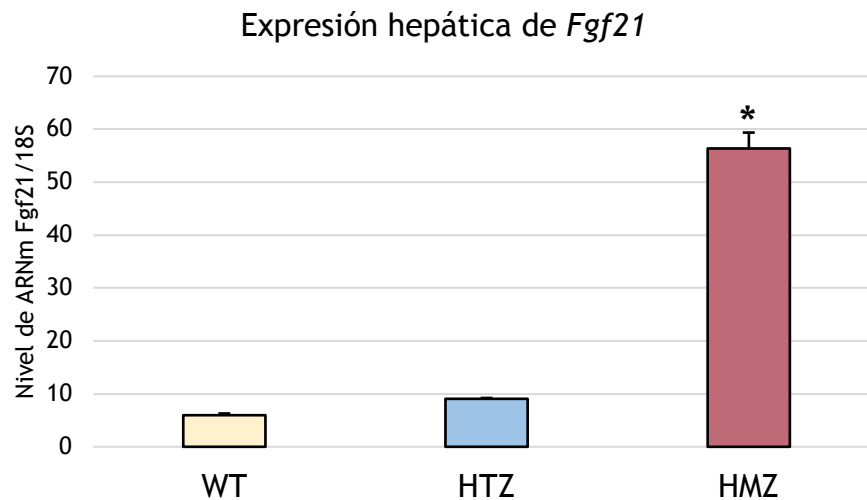
**Figura 17. Expresión hepática de FGF21.** Compárese la proporción de hepatocitos afectados en las secciones correspondientes al *wild type* (A) y al homocigoto *Bsc12<sup>-/-</sup>*. (IHQ anti-FGF21, 200x)

#### 4.4. EXPRESIÓN HEPÁTICA DE ARNm DE *Fgf21*

Se evaluó la expresión hepática del gen *Fgf21* en cada una de las cohortes genotípicas y resultó ser significativamente superior en los ratones homocigotos SKO (**Tabla 6; Fig. 18**).

Genotipo	Media	Desviación estándar	n
<i>Wild type</i>	5,971	0,986	10
Heterocigotos <i>Bsc12<sup>+/-</sup></i>	9,069	0,634	17
Homocigotos <i>Bsc12<sup>-/-</sup></i> (SKO)	56,380	9,501	10

**Tabla 6. Expresión hepática de *Fgf21* en ratones *wild-type*, heterocigotos *pre-cre Bsc12<sup>+/-</sup>* y homocigotos *pre-cre Bsc12<sup>-/-</sup>*.** Datos presentados como nivel de ARNm de *Fgf21* respecto a *18S*;  $p < 0,05$ .



**Figura 18. Expresión hepática de *Fgf21*.** Nivel de ARNm *Fgf21* respecto a 18S. Datos representados como media  $\pm$  desviación estándar; WT: n=10, HTZ: n=17, HMZ: n=10; \*p < 0,05 vs WT (WT, *wild type*; HTZ, heterocigotos; HMZ, homocigotos).

## 5 DISCUSIÓN

En el presente estudio, se evalúa la afectación hepática en un modelo murino de LCG tipo 2. Por primera vez, la disrupción ubicua de seipina es consecuencia de la sustitución del codón de inicio ATG por un *cassette* invertido, lo cual induce el desarrollo de un codón de parada prematuro. Los resultados observados en este modelo de ratones deficientes en seipina o SKO son consistentes con lo reportado por otros grupos en relación con la inactivación del gen *Bscl2* en homocigosis. Confirmamos que los ratones SKO desarrollan lipodistrofia generalizada con práctica ausencia de grasa blanca (inguinal y gonadal) y parda (interescapular), así como marcada hepatomegalia. A nivel microscópico, estos hallazgos se traducen en esteatosis hepática mixta de predominio macrovesicular de inicio temprano, con posterior desarrollo de esteatohepatitis y fibrosis. Los ratones heterocigotos, no estudiados desde el punto de vista histológico en ningún estudio previo, no muestran ningún grado de afectación hepática ni tampoco lipodistrofia. Esto reafirma, pues, el carácter autosómico recesivo de la lipodistrofia congénita generalizada tipo 2.

Autores	Mutación	Proteína predicha
Cui <i>et al.</i> (2011)	Delección del exón 3	—
Chen <i>et al.</i> (2012)	Delección del exón 3	Codón de parada prematuro
Prieur <i>et al.</i> (2013)	Delección de los exones 4-6	Codón de parada prematuro

**Tabla 7. Modelos animales *Bscl2*<sup>-/-</sup>.** Fuente: (76-78)

Es escasa la literatura relativa a la histopatología hepática en pacientes con LCG tipo 2 y, en general, con cualquier lipodistrofia. La gran mayoría de los decesos en pacientes con LCG tipo 2 son atribuibles a la afectación hepática o a infecciones. Sin embargo, una limitación

común a todos los estudios publicados al respecto es que son retrospectivos, realizados en base a la revisión de historias clínicas, certificados de defunción e información recogida en las familias de los fallecidos, siendo mínimo el número de pacientes a los que se les ha practicado la necropsia (39,93). Son también excepcionales los estudios que hacen referencia a biopsias realizadas en vida. Manrique Miranda *et al.* constataron la presencia de fibrosis portal avanzada en una paciente de 18 años diagnosticada de LCG tipo 2 (94), mientras que Ribeiro *et al.* describieron la presencia de esteatosis macrovesicular y fibrosis avanzada/cirrosis en una paciente de 13 años con lipodistrofia adquirida generalizada (50). En el 2005, Javor *et al.*, publicaron un ensayo clínico con r-metHuLeptin en pacientes con formas graves de lipodistrofia, entre las que se incluía la LCG. Compararon la histología hepática previa y tras 4, 8 o 18 meses de tratamiento. El patrón de daño descrito es similar al que se presenta en nuestro estudio, con esteatosis panacinar de predominio macrovesicular y degeneración balonizante de los hepatocitos. La terapia con leptina supuso una reducción dramática de ambos hallazgos hasta su práctica resolución (72). En el 2013, Jadeh *et al.*, evaluaron biopsias antes y después de la terapia sustitutiva con leptina en pacientes con lipodistrofia congénita generalizada empleando el sistema de puntuación de la NASH CRN. En la biopsia basal, se evidenció EHGNA en un 90% de los casos, con criterios de EHNA hasta en un 82%. Se observó también degeneración balonizante y, menos frecuentemente, fibrosis. Concretamente, los pacientes con mutaciones de *BSCL2*, presentaron fibrosis extrema a edad temprana (73).

Hasta la fecha, el análisis histológico del hígado en ratones lipodistróficos deficientes en seipina se había limitado al estudio de muestras aisladas en ratones de 8 semanas (87), 3 meses (76,80) y 4 meses (78). Según los autores de dichos estudios, los ratones SKO desarrollan esteatosis, pero no esteatohepatitis ni fibrosis. Estos hallazgos contrastan con la historia natural de la enfermedad en humanos, en quienes el desarrollo de EHNA y fibrosis es frecuente y precoz. Ahora bien, ha de tenerse en cuenta que la EHGNA es una patología de curso progresivo. Esto nos puede inducir a pensar que, en estos estudios previos, el tiempo de evolución pudo no haber sido suficiente para que se manifestase la enfermedad en todo su espectro. Sin embargo, Liu *et al.* constataron, en ratones ASKO (*adipose-specific seipin knockout*) de 10 meses de edad, la presencia de esteatosis sin datos de inflamación (82). Por otra parte, Liao *et al.*, en el 2018, describieron por primera vez esteatohepatitis en ratones deficientes en seipina y ApoE (*Bscl2<sup>-/-</sup>ApoE<sup>-/-</sup>*) de 9 meses de edad (95). Esta discrepancia con los estudios previos podría explicarse de dos maneras. En primer lugar, podría considerarse que, en el estudio de Liao *et al.*, el tiempo de progresión fue suficiente para el desarrollo de inflamación. No obstante, tanto en este estudio como en el de Liu *et al.* debemos plantearnos si estos ratones son comparables con los SKO. Una hipótesis alternativa sería considerar que, en el estudio de Liao *et al.*, son dos los factores que contribuyen al desarrollo de la esteatohepatitis: el déficit de seipina y, adicionalmente, el déficit de ApoE.

En nuestro estudio, los ratones *Bscl2<sup>-/-</sup>* desarrollan esteatohepatitis, pero lo hacen a partir de los 6 meses de edad. De hecho, la cohorte de homocigotos menores de 6 meses no presenta diferencias significativas en el grado de actividad respecto a la cohorte de controles *wild-type*. La puntuación NAS media en ratones homocigotos de 6 o más meses de edad resultó de  $4,5 \pm 1,5$ , siendo 4 puntos diagnósticos de EHNA. Así, concluimos que la disrupción ubicua de seipina se asocia al desarrollo de EHGNA tanto en forma de esteatosis como, a mayor tiempo de evolución, en forma de inflamación lobulillar y daño hepatocelular. En cuanto a este último, debemos matizar que no se considera necesario evaluar mediante técnicas inmunohistoquímicas la degeneración balonizante. Sin embargo, ante la presencia de células “equivocas” en las

preparaciones de hematoxilina-eosina, se evaluó la expresión inmunohistoquímica de CK8/18 por si pudiera ayudar a filiarlas. Se observaron células morfológicamente sospechosas de degeneración balonzante con pérdida de tinción citoplasmática para CK8/18, lo cual apoyaría el diagnóstico. No obstante, la ausencia generalizada de tinción citoplasmática intensa y homogénea también en hepatocitos normales sugiere un fallo en el marcaje de las citoqueratinas. Es probable que la tinción empleada, diseñada para el marcaje de citoqueratinas humanas, no sea aplicable a muestras murinas. Así, nos ceñimos a los criterios universalmente aceptados y optamos por considerar células balonzantes únicamente aquellas que reúnen las características típicas en las preparaciones de hematoxilina-eosina.

Se han desarrollado múltiples modelos animales de EHGNA y se considera que ninguno de ellos refleja al completo el espectro fisiopatológico y anatomopatológico hepático de la enfermedad humana. De hecho, en la mayor parte de los modelos murinos de EHGNA de cualquier etiología, no se desarrolla fibrosis (74). Tampoco se ha constatado hasta ahora el desarrollo de fibrosis hepática en ratones lipodistróficos deficientes en seipina (86). Sin embargo, la disrupción del receptor de insulina específicamente en el tejido adiposo, en los llamados ratones IRKO, induce el desarrollo de lipodistrofia generalizada y esteatosis que, a las 52 semanas de edad, se acompaña de inflamación y fibrosis (96). También nuestros ratones lipodistróficos, deficientes en seipina, terminan por desarrollar fibrosis en el contexto de una grave afectación hepática. Ante la disyuntiva, podemos aludir, una vez más, al mayor tiempo de evolución. Asimismo, cabe destacar que los ratones de nuestro estudio solo desarrollan fibrosis 1a, esto es, leve o perisinusoidal, evidenciable únicamente mediante tinción con tricrómico de Masson. Por tanto, tampoco podemos descartar que los estudios previos pasasen por alto este hallazgo, pues en ninguno de ellos se constata el empleo de esta tinción (76–78,87).

Una cuestión todavía por terminar de resolver es si la esteatosis hepática en ratones *knockout* de seipina (*Bscl2*<sup>-/-</sup> o SKO) se puede explicar únicamente por la ausencia de tejido adiposo o si, por el contrario, esta proteína desempeña una función específica a nivel local en el metabolismo lipídico de los hepatocitos.

Por una parte, en ratones SKO, la restauración de la expresión de seipina únicamente en adipocitos revierte, no solo la lipodistrofia, sino también la esteatosis hepática (80). Además, Chen *et al.* observaron que la ablación de seipina específicamente en el hígado (*Bscl2*<sup>Li/-</sup>) no es suficiente para el desarrollo de esteatosis hepática en ratones de entre 11 y 13 semanas (79). Estos hallazgos parecen sugerir que la EHGNA, en la LCG tipo 2, es consecuencia únicamente de la ausencia de una capacidad apropiada de depósito lipídico en el tejido adiposo. Ahora bien, en nuestro estudio, se constata esteatosis hepática a partir de los tres meses de edad, pero solo a partir de los seis meses esta constituye un hallazgo constante en homocigotos, con lo cual no se puede descartar que el tiempo de evolución en el estudio de Chen *et al.* fuese insuficiente. Más recientemente, Mcilroy *et al.* describieron que los ratones *knockout* condicionales con disrupción específica de seipina en el tejido adiposo (*Bscl2*<sup>Ad/-</sup>) (85), así como los ratones *knockout* condicionales de seipina en adipocitos y hepatocitos (*Bscl2*<sup>Ad/-Li/-</sup>) no desarrollan esteatosis hepática (90). Además, tanto en los ratones *Bscl2*<sup>Ad/-</sup> (estudiados hasta las 16 semanas de vida) como en los *Bscl2*<sup>Ad/-Li/-</sup> (estudiados hasta las 32 semanas) resultó ser discreta, pero significativamente superior la capacidad de depósito de grasa y de secreción de adipoquinas respecto a los SKO. Así, según Mcilroy *et al.*, pequeñas cantidades de tejido adiposo serían suficientes para evitar el desarrollo de las anomalías metabólicas de los SKO. De acuerdo con

esto, la esteatosis hepática no estaría en relación con la pérdida de una función de la seipina específica del hígado, sino con la cantidad de tejido adiposo metabólicamente activo (85,90).

Por otra parte, Tian *et al.*, en base a sus observaciones en *Drosophila* deficientes en seipina, sugirieron que, en tejidos distintos al adiposo, esta proteína promueve el depósito de lípidos y que, por tanto, sí desarrolla un papel tejido-específico (97). La región central de la seipina controla la homeostasis lipídica en células no adipocitarias, de forma que sería la encargada de restringir la lipogénesis y la acumulación de lípidos en los hepatocitos, así como de promover la adipogénesis ante un aporte de energía en exceso (33). Por tanto, la pérdida de esta proteína a nivel hepático podría empeorar el estado metabólico ante la ausencia o disfunción del tejido adiposo (85). Además, estudios *in vitro* sugieren que el déficit hepático de seipina induce, por medio de un incremento en la actividad de SCD1, un aumento de la síntesis de triglicéridos, de la formación de gotas lipídicas y de la expresión de marcadores de estrés del retículo endoplásmico en los hepatocitos, todos ellos factores implicados en la patogenia de la EHGNA (90). Esto apoya la segunda de las teorías, según la cual la disrupción de seipina, sin ser suficiente, sí que contribuiría localmente al desarrollo de la esteatosis hepática. Estaríamos hablando, pues, de dos factores concurrentes: la inactivación de seipina en el hígado y la ausencia de un tejido adiposo capaz de almacenar el exceso de lípidos.

En el presente estudio, se ha descrito un aumento significativo de la expresión hepática de *Fgf21* en los ratones deficientes en seipina. Recientemente, este factor se ha postulado como una adipoquina con efectos positivos en la homeostasis glucídica, en el metabolismo lipídico y en la salud vascular (69,98–100). El FGF21 protege a las células  $\beta$  de los islotes pancreáticos frente a la apoptosis, mejora la sensibilidad a la insulina, interfiere en la patogénesis de la arterioesclerosis, reduce el riesgo de enfermedad cardiovascular, protege frente al daño renal y regula el comportamiento circadiano. A nivel adiposo, favorece el catabolismo lipídico y el “pardeamiento” del tejido adiposo blanco. Por último, en el hígado, el FGF21 disminuye la acumulación de lípidos, aumenta la oxidación de ácidos grasos, disminuye la secreción de VLDL-TG y protege frente al desarrollo de EHGNA (64).

Ya en el 2016, Miehle *et al.* demostraron por primera vez una concentración de FGF21 circulante significativamente mayor en pacientes con lipodistrofia no-VIH respecto a los controles (101). Ese mismo año, Dollet *et al.* constataron, en ratones lipodistróficos *Bscl2*<sup>-/-</sup>, una marcada sobreexpresión de *Fgf21* en el tejido adiposo a las cuatro semanas de vida, con disminución de la misma a las doce semanas. En estos ratones, el tratamiento con FGF21 parece promover el mantenimiento de los adipocitos maduros al ejercer un efecto anti-estrés celular, mejorando el perfil metabólico, con aumento de los niveles plasmáticos de adiponectina, normalización de la sensibilidad a la insulina y mejoría del patrón de expresión génica del tejido adiposo (102). Por otra parte, Softic *et al.* observaron que los ratones lipodistróficos KO para el receptor de insulina específico del tejido adiposo presentan un aumento de la expresión hepática de *Fgf21*. Dado que la grasa acumulada en el hígado de los ratones lipodistróficos se destina a la cetogénesis (96,102), el aumento de este proceso metabólico sería consecuencia de la mayor expresión hepática de *Fgf21* (96).

El aumento de los niveles de *Fgf21* observado en nuestros ratones deficientes en seipina es consistente con lo descrito en los estudios previos y podría justificarse de múltiples formas, si bien, por el momento, su patogenia permanece incierta. La regulación al alza de FGF21 podría considerarse un mecanismo compensatorio y, sin embargo, insuficiente para paliar las

consecuencias metabólicas de la lipodistrofia. Esto es aplicable también al aumento de FGF21 en la EHGNA relacionada con el síndrome metabólico. Existe otra posibilidad, relacionada con los micro-ARNs (miRNA) circulantes derivados del tejido adiposo, secuencias de entre 21 y 25 nucleótidos que inhiben la expresión génica actuando como reguladores postranscripcionales. Thomou *et al.*, en el 2017, propusieron el *Fgf21* como potencial diana de micro-ARNs contenidos en exosomas procedentes del tejido adiposo pardo. Demostraron que tanto la expresión hepática de *Fgf21* como los niveles de FGF21 circulante se ven disminuidos por la acción de estos micro-ARNs (fundamentalmente, miR99a, miR99b y miR100) (103). Según esto, la menor cantidad de tejido adiposo pardo (86) y la alteración de su función (104) en ratones deficientes en seipina explicaría el aumento de la expresión hepática de *Fgf21*.

En resumidas cuentas, el modelo murino de LCG tipo 2 que aquí se presenta emula con bastante exactitud la historia natural de la enfermedad en humanos. Los ratones SKO desarrollan esteatosis, así como esteatohepatitis a partir de los 6 meses de vida. A diferencia de la mayor parte de modelos murinos de EHGNA, los ratones SKO de nuestro estudio, en un contexto de actividad marcada, presentan fibrosis. Sin embargo, solo se ha constatado en un grado 1a, esto es, fibrosis pericelular leve, cuando en humanos es común la presencia de grados extremos de fibrosis a edad temprana. Por tanto, si no perfecto, sí podemos considerarlo un modelo óptimo para el estudio de la LCG tipo 2 y de la EHGNA. En base a lo aquí presentado, podría decirse que el hígado puede actuar a modo de depósito de grasa, al menos en condiciones de ausencia o insuficiencia de tejido adiposo. No obstante, el suplir la función del tejido adiposo tiene un coste para este órgano, que sufre, en el medio a largo plazo, las consecuencias de la lipotoxicidad.

## 6 CONCLUSIONES

Teniendo en cuenta los resultados expuestos, podríamos llegar a las siguientes conclusiones en relación a la afectación hepática en ratones deficientes en seipina *Bscl2*<sup>-/-</sup> generados mediante tecnología Cre-loxP:

-En el locus del gen *Bscl2*, el alelo resultante de la recombinación mediada por Flp da lugar a un codón de parada prematuro, por lo que no produce seipina funcional. Así, los ratones homocigotos post-Flp, pre-Cre o *Bscl2*<sup>-/-</sup> son *knockout* de seipina y, como tal, constituyen un modelo murino para el estudio de la LCG tipo 2.

-Los ratones heterocigotos *Bscl2*<sup>+/-</sup> no presentan patología hepática ni adiposa atribuible a la ablación de *Bscl2* en heterocigosis. Tampoco existen diferencias significativas en los niveles de expresión hepática de *Fgf21* entre ratones control y heterocigotos *Bscl2*<sup>+/-</sup>, siendo esto congruente con la herencia recesiva de la lipodistrofia congénita generalizada tipo 2.

-En los ratones homocigotos *Bscl2*<sup>-/-</sup>, la ausencia de tejido adiposo conduce a un depósito ectópico de grasa. En este contexto, la patología hepática es atribuible, fundamentalmente, a la lipotoxicidad.

-El hígado de los ratones homocigotos *Bscl2*<sup>-/-</sup> presenta las características macroscópicas típicas del acúmulo ectópico de grasa: hepatomegalia y palidez.

-El peso del hígado de los ratones deficientes en seipina es significativamente mayor que el de los ratones heterocigotos y *wild-type* de su misma edad, y aumenta progresivamente con la edad en los ratones afectados.

-A nivel microscópico, los ratones homocigotos *Bscl2*<sup>-/-</sup> desarrollan esteatosis hepática mixta de predominio macrovesicular.

-Los ratones *Bscl2*<sup>-/-</sup> también desarrollan esteatohepatitis, pero, dado el carácter progresivo de la enfermedad, es un hallazgo que puede pasar desapercibido si atendemos únicamente al estudio de ratones de temprana edad.

-Los estudios realizados hasta la fecha con ratones *Bscl2*<sup>-/-</sup> desestiman el desarrollo de fibrosis hepática en ratones SKO. No obstante, de acuerdo con los hallazgos de nuestro estudio, los ratones homocigotos deficientes en seipina sí pueden terminar por desarrollar fibrosis, aunque en un grado leve, constatable únicamente por medio de tinción con tricrómico de Masson y tras un tiempo suficiente de evolución de la enfermedad.

-A nivel hepático, existe una desregulación al alza de la expresión hepática de *Fgf21*, factor protector desde el punto de vista metabólico. Este hallazgo podría explicarse como un mecanismo compensatorio frente a las alteraciones metabólicas asociadas al déficit de seipina.

-La mayor parte de los modelos murinos de EHGNA desarrolla esteatosis, siendo la esteatohepatitis menos frecuente y la fibrosis, excepcional. Esto convierte a los ratones SKO, en un buen modelo para el estudio de la EHGNA, especialmente, en el contexto de la LCG tipo 2, así como para el ensayo de posibles terapias.

## 7 BIBLIOGRAFÍA

1. Brown RJ, Araujo-Vilar D, Cheung PT, Dunger D, Garg A, Jack M, et al. The Diagnosis and Management of Lipodystrophy Syndromes: A Multi-Society Practice Guideline. *J Clin Endocrinol Metab.* 2016;101(12):4500-11.
2. Agarwal AK, Garg A. Seipin: a mysterious protein. *Trends Mol Med.* 2004;10(9):440-444.
3. Sánchez-Iglesias S, Fernández-Liste A, Guillín-Amarelle C, Rábano A, Rodríguez-Cañete L, González-Méndez B, et al. Does Seipin Play a Role in Oxidative Stress Protection and Peroxisome Biogenesis? New Insights from Human Brain Autopsies. *Neuroscience.* 2019;396:119-37.
4. Magré J, Delépine M, Khallouf E, Gedde-Dahl T, Van Maldergem L, et al. Identification of the gene altered in Berardinelli–Seip congenital lipodystrophy on chromosome 11q13. *Nat Genet.* 2001;28(4):365-70.
5. Lundin C, Nordström R, Wagner K, Windpassinger C, Andersson H, von Heijne G, et al. Membrane topology of the human seipin protein. *FEBS Lett.* 2006;580(9):2281-4.
6. Guillén-Navarro E, Sánchez-Iglesias S, Domingo-Jiménez R, Victoria B, Ruiz-Riquelme A, Rábano A, et al. A new seipin-associated neurodegenerative syndrome. *J Med Genet.* 2013;50(6):401-9.
7. Cartwright BR, Goodman JM. Seipin: from human disease to molecular mechanism. *J Lipid Res.* 2012;53(6):1042-55.
8. Yang W, Thein S, Wang X, Bi X, Ericksen RE, Xu F, et al. BSCL2/seipin regulates adipogenesis through actin cytoskeleton remodelling. *Hum Mol Genet.* 2014;23(2):502-13.
9. Yan R, Qian H, Lukmantara I, Gao M, Du X, Yan N, et al. Human SEIPIN Binds Anionic Phospholipids. *Dev Cell.* 2018;47(2):248-256.
10. Chung J, Wu X, Lambert TJ, Lai ZW, Walther TC, Farese RV. LDAH1 and Seipin Form a Lipid Droplet Assembly Complex. *Dev Cell.* 2019;51(5):551-563.
11. Talukder MdMU, Sim MFM, O’Rahilly S, Edwardson JM, Rochford JJ. Seipin oligomers can interact directly with AGPAT2 and lipin 1, physically scaffolding critical regulators of adipogenesis. *Mol Metab.* 2015;4(3):199-209.
12. Magré J, Delépine M, Khallouf E, Gedde-Dahl T, Van Maldergem L, Sobel E, et al. Identification of the gene altered in Berardinelli–Seip congenital lipodystrophy on chromosome 11q13. *Nat Genet.* 2001;28(4):365-70.
13. Ito D, Fujisawa T, Iida H, Suzuki N. Characterization of seipin/BSCL2, a protein associated with spastic paraplegia 17. *Neurobiol Dis.* 2008;31(2):266-77.
14. Liu X, Xie B, Qi Y, Du X, Wang S, Zhang Y, et al. The expression of SEIPIN in the mouse central nervous system. *Brain Struct Funct.* 2016;221(8):4111-27.
15. Chen W, Yechoor VK, Chang BH-J, Li MV, March KL, Chan L. The Human Lipodystrophy Gene Product Berardinelli-Seip Congenital Lipodystrophy 2/Seipin Plays a Key Role in Adipocyte Differentiation. *Endocrinology.* 2009;150(10):4552-61.

16. Fei W, Du X, Yang H. Seipin, adipogenesis and lipid droplets. *Trends Endocrinol Metab.* 2011;22(6):204-10.
17. Kurat CF, Wolinski H, Petschnigg J, Kaluarachchi S, Andrews B, Natter K, et al. Cdk1/Cdc28-Dependent Activation of the Major Triacylglycerol Lipase Tgl4 in Yeast Links Lipolysis to Cell-Cycle Progression. *Mol Cell.* 2009;33(1):53-63.
18. Szymanski KM, Binns D, Bartz R, Grishin NV, Li W-P, Agarwal AK, et al. The lipodystrophy protein seipin is found at endoplasmic reticulum lipid droplet junctions and is important for droplet morphology. *Proc Natl Acad Sci.* 2007;104(52):20890-5.
19. Wang H, Becuwe M, Housden BE, Chitraju C, Porras AJ, Graham MM, et al. Seipin is required for converting nascent to mature lipid droplets. *eLife [Internet].* 2016 Ago [citado 18 jun. 2019];5:16582. Disponible en: <https://elifesciences.org/articles/16582>
20. Fei W, Shui G, Zhang Y, Krahmer N, Ferguson C, Kapterian TS, et al. A Role for Phosphatidic Acid in the Formation of “Supersized” Lipid Droplets. *PLoS Genet.* 2011;7(7):e1002201.
21. Wolinski H, Hofbauer HF, Hellauer K, Cristobal-Sarramian A, Kolb D, Radulovic M, et al. Seipin is involved in the regulation of phosphatidic acid metabolism at a subdomain of the nuclear envelope in yeast. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Biol Lipids.* 2015;1851(11):1450-64.
22. Sim MFM, Dennis RJ, Aubry EM, Ramanathan N, Sembongi H, Saudek V, et al. The human lipodystrophy protein seipin is an ER membrane adaptor for the adipogenic PA phosphatase lipin 1. *Mol Metab.* 2013;2(1):38-46.
23. Pagac M, Cooper DE, Qi Y, Lukmantara IE, Mak HY, Wu Z, et al. SEIPIN Regulates Lipid Droplet Expansion and Adipocyte Development by Modulating the Activity of Glycerol-3-phosphate Acyltransferase. *Cell Rep.* 2016;17(6):1546-59.
24. Péterfy M, Harris TE, Fujita N, Reue K. Insulin-stimulated Interaction with 14-3-3 Promotes Cytoplasmic Localization of Lipin-1 in Adipocytes. *J Biol Chem.* 2010;285(6):3857-64.
25. Shan D, Li J, Wu L, Li D, Hurov J, Tobin JF, et al. GPAT3 and GPAT4 are regulated by insulin-stimulated phosphorylation and play distinct roles in adipogenesis. *J Lipid Res.* 2010;51(7):1971-81.
26. Craveiro Sarmiento AS, de Azevedo Medeiros LB, Agnez-Lima LF, Lima JG, de Melo Campos JTA. Exploring Seipin: From Biochemistry to Bioinformatics Predictions. *Int J Cell Biol.* 2018;2018:1-21.
27. Agarwal AK, Arioglu E, de Almeida S, Akkoc N, Taylor SI, Bowcock AM, et al. AGPAT2 is mutated in congenital generalized lipodystrophy linked to chromosome 9q34. *Nat Genet.* 2002;31(1):21-3.
28. Hayashi YK, Matsuda C, Ogawa M, Goto K, Tominaga K, Mitsuhashi S, et al. Human PTRF mutations cause secondary deficiency of caveolins resulting in muscular dystrophy with generalized lipodystrophy. *J Clin Invest.* 2009;119(9):2623-33.
29. Kim CA, Delépine M, Boutet E, El Mourabit H, Le Lay S, Meier M, et al. Association of a Homozygous Nonsense Caveolin-1 Mutation with Berardinelli-Seip Congenital Lipodystrophy. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008;93(4):1129-34.

30. Cortés VA, Curtis DE, Sukumaran S, Shao X, Parameswara V, Rashid S, et al. Molecular Mechanisms of Hepatic Steatosis and Insulin Resistance in the AGPAT2-Deficient Mouse Model of Congenital Generalized Lipodystrophy. *Cell Metab.* 2009;9(2):165-76.
31. Mori E, Fujikura J, Noguchi M, Nakao K, Matsubara M, Sone M, et al. Impaired adipogenic capacity in induced pluripotent stem cells from lipodystrophic patients with BSCL2 mutations. *Metabolism.* 2016;65(4):543-56.
32. Bi J, Wang W, Liu Z, Huang X, Jiang Q, Liu G, et al. Seipin Promotes Adipose Tissue Fat Storage through the ER Ca<sup>2+</sup>-ATPase SERCA. *Cell Metab.* 2014;19(5):861-71.
33. Yang W, Thein S, Guo X, Xu F, Venkatesh B, Sugii S, et al. Seipin differentially regulates lipogenesis and adipogenesis through a conserved core sequence and an evolutionarily acquired C-terminus. *Biochem J.* 2013;452(1):37-44.
34. Zowalaty AEE, Ye X. Seipin deficiency leads to defective parturition in mice. *Biol Reprod.* 2017;97(3):378-86.
35. Wei S, Soh SL-Y, Xia J, Ong W-Y, Pang ZP, Han W. Motor neuropathy-associated mutation impairs Seipin functions in neurotransmission. *J Neurochem.* 2014;129(2):328-38.
36. Holtta-Vuori M, Salo VT, Ohsaki Y, Suster ML, Ikonen E. Alleviation of seipinopathy-related ER stress by triglyceride storage. *Hum Mol Genet.* 2013;22(6):1157-66.
37. Araújo-Vilar D, Sánchez-Iglesias S, Guillín-Amarelle C, Fernández-Pombo A. Guía Práctica para el Diagnóstico y Tratamiento de las Lipodistrofias Infrecuentes. Totana: AELIP; 2018. 7, Lipodistrofia congénita generalizada: p. 23-27.
38. Garg A. Lipodystrophies: Genetic and Acquired Body Fat Disorders. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011;96(11):3313-25.
39. Lima JG, Nobrega LHC, Lima NN, dos Santos MCF, Silva PHD, Baracho M de FP, et al. Causes of death in patients with Berardinelli-Seip congenital generalized lipodystrophy. Strnad P, editor. *PLOS ONE.* 2018;13(6):e0199052.
40. Patel H, Hart PE, Warner TT, Houlston RS, Patton MA, Jeffery S, et al. The Silver Syndrome Variant of Hereditary Spastic Paraplegia Maps to Chromosome 11q12-q14, with Evidence for Genetic Heterogeneity within This Subtype. *Am J Hum Genet.* 2001;69(1):209-15.
41. Bird TD. Charcot-Marie-Tooth (CMT) Hereditary Neuropathy Overview. 1998 Sep 28 [Actualizado 2 ene 2020]. En: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, et al., editors. *GeneReviews* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2020 [Citado 2 feb. 2020]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1358/>
42. Windpassinger C, Auer-Grumbach M, Irobi J, Patel H, Petek E, Hörl G, et al. Heterozygous missense mutations in BSCL2 are associated with distal hereditary motor neuropathy and Silver syndrome. *Nat Genet.* 2004;36(3):271-6.
43. Guillén-Navarro E, Ruiz-Riquelme A, Sánchez-Iglesias S, Rábano A, Domingo-Jiménez R, Ramos A, et al. Larger aggregates of mutant seipin in Celia's Encephalopathy, a new protein misfolding neurodegenerative disease. *Neurobiol Dis.* 2015;83:44-53.

44. Monzón CG. Libro de Gastroenterología y Hepatología. Problemas comunes en la práctica clínica. 2ª ed. Madrid: Jarpyo Editores; 2012. 56, Enfermedad hepática grasa no alcohólica; p. 815-24.
45. World Gastroenterology Organisation Global Guidelines [Internet]. Milwaukee, WI: WGO; 2002-2019. Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Nonalcoholic Steatohepatitis. 2012 jun. [Citado 8 jun. 2019]. Disponible en: <http://www.worldgastroenterology.org/guidelines/global-guidelines/nafl-d-nash/nafl-d-nash-english>
46. Loomba R, Sanyal AJ. The global NAFLD epidemic. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2013;10(11):686-90.
47. Singh S, Allen AM, Wang Z, Prokop LJ, Murad MH, Loomba R. Fibrosis Progression in Nonalcoholic Fatty Liver vs Nonalcoholic Steatohepatitis: A Systematic Review and Meta-analysis of Paired-Biopsy Studies. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2015;13(4):643-654.
48. Bellentani S. The epidemiology of non-alcoholic fatty liver disease. *Liver Int*. 2017;37:81-4.
49. 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.
50. Ribeiro A, Brandão JR, Cleto E, Santos M, Borges T, Santos Silva E. Fatty Liver and Autoimmune Hepatitis: Two Forms of Liver Involvement in Lipodystrophies. *GE - Port J Gastroenterol*. 2019;1-8.
51. Brown GT, Kleiner DE. Histopathology of nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis. *Metabolism*. 2016;65(8):1080-6.
52. Sanyal AJ, Brunt EM, Kleiner DE, Kowdley KV, Chalasani N, Lavine JE, et al. Endpoints and clinical trial design for nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*. 2011;54(1):344-53.
53. Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, Behling C, Contos MJ, Cummings OW, et al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2005;41(6):1313-21.
54. Torbenson MS. Fatty liver disease. En: *Biopsy Interpretation of the Liver*. 3ª ed. Philadelphia, PA: Wolters Kluwer; 2014. 9, Fatty Liver Disease; p. 147-70.
55. Guy CD, Suzuki A, Burchette JL, Brunt EM, Abdelmalek MF, Cardona D, et al. Costaining for keratins 8/18 plus ubiquitin improves detection of hepatocyte injury in nonalcoholic fatty liver disease. *Hum Pathol*. 2012;43(6):790-800.
56. Hjelkrem M, Stauch C, Shaw J, Harrison SA. Validation of the non-alcoholic fatty liver disease activity score: Validation of NAFLD activity score. *Aliment Pharmacol Ther*. 2011;34(2):214-8.
57. Manne V, Handa P, Kowdley KV. Pathophysiology of Nonalcoholic Fatty Liver Disease/Nonalcoholic Steatohepatitis. *Clin Liver Dis*. 2018;22(1):23-37.
58. Marra F, Lotersztajn S. Pathophysiology of NASH: Perspectives for a Targeted Treatment. *Curr Pharm Des*. 2013;19(29):5250-69.

59. Day CP, James O. Steatohepatitis: a tale of two «hits»? *Gastroenterology*. 1998;114(4):842-5.
60. Buzzetti E, Pinzani M, Tsochatzis EA. The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Metabolism*. 2016;65(8):1038-48.
61. Lumeng CN, Bodzin JL, Saltiel AR. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J Clin Invest*. 2007;117(1):175-84.
62. Semple RK, Sleight A, Murgatroyd PR, Adams CA, Bluck L, Jackson S, et al. Postreceptor insulin resistance contributes to human dyslipidemia and hepatic steatosis. *J Clin Invest*. 2009;119(2):315-322.
63. Hwang J-H, Stein DT, Barzilai N, Cui M-H, Tonelli J, Kishore P, et al. Increased intrahepatic triglyceride is associated with peripheral insulin resistance: in vivo MR imaging and spectroscopy studies. *Am J Physiol-Endocrinol Metab*. 2007;293(6):E1663-9.
64. Su X, Kong Y, Peng D. Fibroblast growth factor 21 in lipid metabolism and non-alcoholic fatty liver disease. *Clin Chim Acta*. 2019;498:30-7.
65. Pohl R, Haberl EM, Rein-Fischboeck L, Zimny S, Neumann M, Aslanidis C, et al. Hepatic chemerin mRNA expression is reduced in human nonalcoholic steatohepatitis. *Eur J Clin Invest*. 2017;47(1):7-18.
66. Guo Y, Liu Q, Xu D. Shedding light on FGF21: A potential negative regulator of PCSK9. *Int J Cardiol*. 2016;214:75-6.
67. Guo Y, Luo F, Yi Y, Xu D. Fibroblast growth factor 21 potentially inhibits microRNA-33 expression to affect macrophage actions. *Lipids Health Dis*. 2016;15(1):208.
68. Hong T, Ge Z, Zhang B, Meng R, Zhu D, Bi Y. Erythropoietin suppresses hepatic steatosis and obesity by inhibiting endoplasmic reticulum stress and upregulating fibroblast growth factor 21. *Int J Mol Med*. 2019; 44(2): 469-478.
69. Fisher f. M, Chui PC, Antonellis PJ, Bina HA, Kharitononkov A, Flier JS, et al. Obesity Is a Fibroblast Growth Factor 21 (FGF21)-Resistant State. *Diabetes*. 2010;59(11):2781-9.
70. Dushay J, Chui PC, Gopalakrishnan GS, Varela-Rey M, Crawley M, Fisher FM, et al. Increased Fibroblast Growth Factor 21 in Obesity and Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology*. 2010;139(2):456-63.
71. Rusli F, Deelen J, Andriyani E, Boekschoten MV, Lute C, van den Akker EB, et al. Fibroblast growth factor 21 reflects liver fat accumulation and dysregulation of signalling pathways in the liver of C57BL/6J mice. 2016;6(1).
72. Javor ED, Ghany MG, Cochran EK, Oral EA, DePaoli AM, Premkumar A, et al. Leptin reverses nonalcoholic steatohepatitis in patients with severe lipodystrophy. *Hepatology*. 2005;41(4):753-60.
73. Safar Zadeh E, Lungu AO, Cochran EK, Brown RJ, Ghany MG, Heller T, et al. The liver diseases of lipodystrophy: The long-term effect of leptin treatment. *J Hepatol*. 2013;59(1):131-7.
74. Takahashi Y. Animal models of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. *World J Gastroenterol*. 2012;18(19):2300.

75. Nagarajan P. Genetically modified mouse models for the study of nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol.* 2012;18(11):1141.
76. Cui X, Wang Y, Tang Y, Liu Y, Zhao L, Deng J, et al. Seipin ablation in mice results in severe generalized lipodystrophy. *Hum Mol Genet.* 2011;20(15):3022-30.
77. Chen W, Chang B, Saha P, Hartig SM, Li L, Reddy VT, et al. Berardinelli-Seip Congenital Lipodystrophy 2/Seipin Is a Cell-Autonomous Regulator of Lipolysis Essential for Adipocyte Differentiation. *Mol Cell Biol.* 2012;32(6):1099-111.
78. Prieur X, Dollet L, Takahashi M, Nemani M, Pillot B, Le May C, et al. Thiazolidinediones partially reverse the metabolic disturbances observed in Bsl2/seipin-deficient mice. *Diabetologia.* 2013;56(8):1813-25.
79. Chen W, Zhou H, Saha P, Li L, Chan L. Molecular Mechanisms Underlying Fasting Modulated Liver Insulin Sensitivity and Metabolism in Male Lipodystrophic Bsl2 /Seipin-Deficient Mice. *Endocrinology.* 2014;155(11):4215-25.
80. Gao M, Wang M, Guo X, Qiu X, Liu L, Liao J, et al. Expression of seipin in adipose tissue rescues lipodystrophy, hepatic steatosis and insulin resistance in seipin null mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015;460(2):143-50.
81. Gao M, Liu L, Wang X, Mak HY, Liu G, Yang H. GPAT3 deficiency alleviates insulin resistance and hepatic steatosis in a mouse model of severe congenital generalized lipodystrophy. *Hum Mol Genet.* 2020;29(3):432-43.
82. Liu L, Jiang Q, Wang X, Zhang Y, Lin RCY, Lam SM, et al. Adipose-Specific Knockout of Seipin/Bsl2 Results in Progressive Lipodystrophy. *Diabetes.* 2014;63(7):2320-31.
83. Zhou H, Lei X, Benson T, Mintz J, Xu X, Harris RB, et al. Berardinelli-Seip congenital lipodystrophy 2 regulates adipocyte lipolysis, browning, and energy balance in adult animals. *J Lipid Res.* 2015;56(10):1912-25.
84. Ye R, Wang QA, Tao C, Vishvanath L, Shao M, McDonald JG, et al. Impact of tamoxifen on adipocyte lineage tracing: Inducer of adipogenesis and prolonged nuclear translocation of Cre recombinase. *Mol Metab.* 2015;4(11):771-8.
85. Mcilroy GD, Suchacki K, Roelofs AJ, Yang W, Fu Y, Bai B, et al. Adipose specific disruption of seipin causes early-onset generalised lipodystrophy and altered fuel utilisation without severe metabolic disease. *Mol Metab.* 2018;10:55-65.
86. Dollet L, Magré J, Cariou B, Prieur X. Function of seipin: New insights from Bsl2/seipin knockout mouse models. *Biochimie.* 2014;96:166-72.
87. Xu P, Wang H, Kayoumu A, Wang M, Huang W, Liu G. Diet rich in Docosahexaenoic Acid/Eicosapentaenoic Acid robustly ameliorates hepatic steatosis and insulin resistance in seipin deficient lipodystrophy mice. *Nutr Metab.* 2015;12(1).
88. Wang M, Gao M, Liao J, Han Y, Wang Y, Liu G. Dysfunction of lipid metabolism in lipodystrophic Seipin-deficient mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015;461(2):206-10.
89. Lounis MA, Lalonde S, Rial SA, Bergeron K-F, Ralston JC, Mutch DM, et al. Hepatic BSCL2 (Seipin) Deficiency Disrupts Lipid Droplet Homeostasis and Increases Lipid Metabolism via SCD1 Activity. *Lipids.* 2017;52(2):129-50.

90. Mcilroy GD, Mitchell SE, Han W, Delibegović M, Rochford JJ. Ablation of Bsc12 /seipin in hepatocytes does not cause metabolic dysfunction in congenital generalised lipodystrophy. *Dis Model Mech*. 2020;13(1):dmm042655.
91. Leary S, Pharmaceuticals F, Underwood W, Anthony R, Cartner S, Johnson CL, et al. AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals: 2020 Edition. 2020;121.
92. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Method. *Methods*. 2001;25(4):402-8.
93. Van Maldergem L. Genotype-phenotype relationships in Berardinelli-Seip congenital lipodystrophy. *J Med Genet*. 2002;39(10):722-33.
94. Manrique Miranda G, Chumbiauca Vela E. Congenital Generalized Lipodystrophy Type 2 in a Patient From a High-Prevalence Area. *J Endocr Soc*. 2017;1(8):1012-4.
95. Liao J, Liu X, Gao M, Wang M, Wang Y, Wang F, et al. Dyslipidemia, steatohepatitis and atherogenesis in lipodystrophic apoE deficient mice with Seipin deletion. *Gene*. 2018;648:82-8.
96. Softic S, Boucher J, Solheim MH, Fujisaka S, Haering M-F, Homan EP, et al. Lipodystrophy Due to Adipose Tissue-Specific Insulin Receptor Knockout Results in Progressive NAFLD. *Diabetes*. 2016;65(8):2187-200.
97. Tian Y, Bi J, Shui G, Liu Z, Xiang Y, Liu Y, et al. Tissue-Autonomous Function of Drosophila Seipin in Preventing Ectopic Lipid Droplet Formation. Ashrafi K, editor. *PLoS Genet*. 2011;7(4):e1001364.
98. Kharitononkov A, Wroblewski VJ, Koester A, Chen Y-F, Clutinger CK, Tigno XT, et al. The Metabolic State of Diabetic Monkeys Is Regulated by Fibroblast Growth Factor-21. *Endocrinology*. 2007;148(2):774-81.
99. Lin Z, Pan X, Wu F, Ye D, Zhang Y, Wang Y, et al. Fibroblast Growth Factor 21 Prevents Atherosclerosis by Suppression of Hepatic Sterol Regulatory Element-Binding Protein-2 and Induction of Adiponectin in Mice. *Circulation*. 2015;131(21):1861-71.
100. Sarruf DA, Thaler JP, Morton GJ, German J, Fischer JD, Ogimoto K, et al. Fibroblast Growth Factor 21 Action in the Brain Increases Energy Expenditure and Insulin Sensitivity in Obese Rats. *Diabetes*. 2010;59(7):1817-24.
101. Miehle K, Ebert T, Kralisch S, Hoffmann A, Kratzsch J, Schlögl H, et al. Serum concentrations of fibroblast growth factor 21 are elevated in patients with congenital or acquired lipodystrophy. *Cytokine*. 2016;83:239-44.
102. Dollet L, Levrel C, Coskun T, Le Lay S, Le May C, Ayer A, et al. FGF21 Improves the Adipocyte Dysfunction Related to Seipin Deficiency. *Diabetes*. 2016;65(11):3410-7.
103. Thomou T, Mori MA, Dreyfuss JM, Konishi M, Sakaguchi M, Wolfrum C, et al. Adipose-derived circulating miRNAs regulate gene expression in other tissues. *Nature*. febrero de 2017;542(7642):450-5.
104. Zhou H, Black SM, Benson TW, Weintraub NL, Chen W. Berardinelli-Seip Congenital Lipodystrophy 2/Seipin Is Not Required for Brown Adipogenesis but Regulates Brown Adipose Tissue Development and Function. *Mol Cell Biol*. 2016;36(15):2027-38.

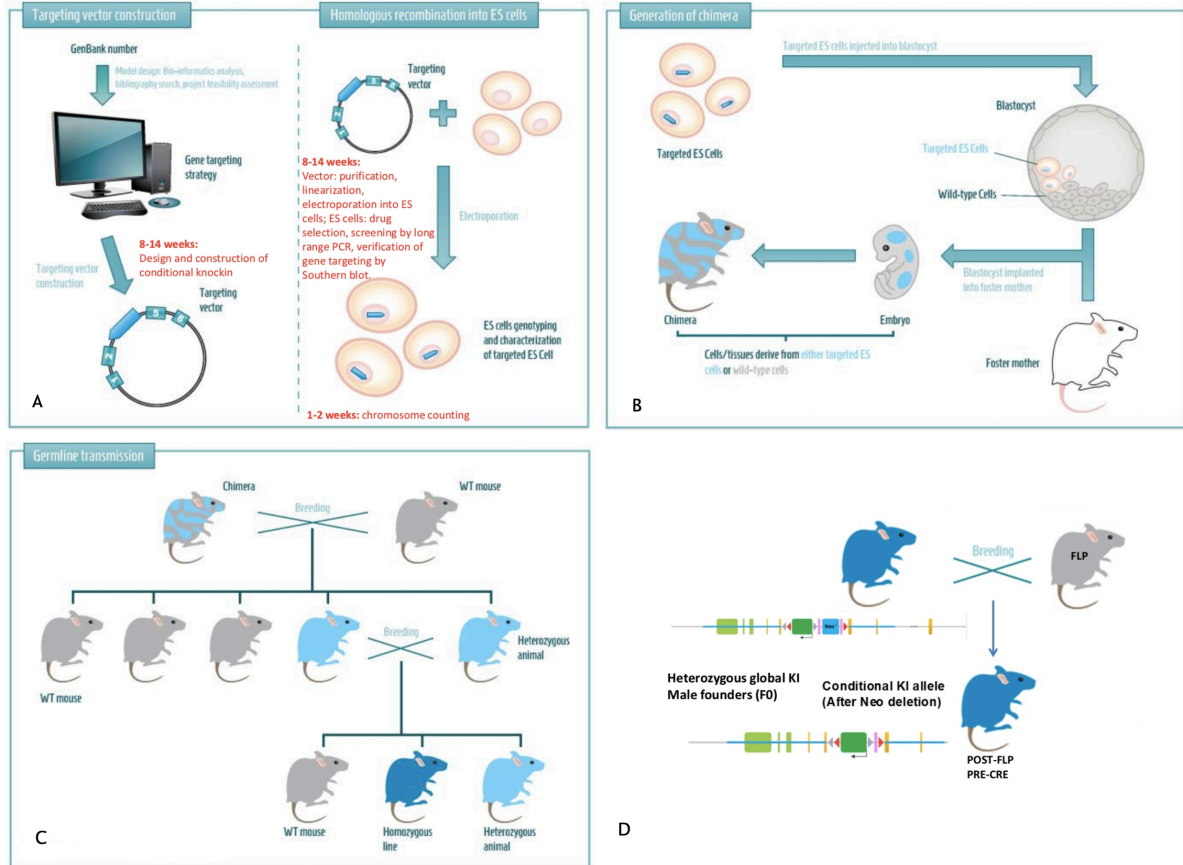


Figura 1. Generación de ratones heterocigotos *Bsc12*<sup>+/-</sup> mediante tecnología Cre-LoxP. A. Construcción del vector y recombinación homóloga en células madre embrionarias. B. Generación de ratón quimera. C. Transmisión por línea germinal. D. Delección de Neo.