



TESIS DE DOCTORADO

**EFECTO DE LOS AGONISTAS DEL  
RECEPTOR GUCY2C SOBRE LA  
ESTEATOSIS HEPÁTICA EN  
MODELOS *IN VITRO* E *IN VIVO* Y  
MECANISMOS MOLECULARES  
IMPLICADOS**

Patricia E. González Sáenz

ESCUELA DE DOCTORADO INTERNACIONAL  
PROGRAMA DE DOCTORADO EN ENDOCRINOLOGÍA

SANTIAGO DE COMPOSTELA  
2020





## **DECLARACIÓN DEL AUTOR DE LA TESIS**

### **Efecto de los agonistas del receptor GUCY2C sobre la esteatosis hepática en modelos *in vitro* e *in vivo* y mecanismos moleculares implicados**

Dña Patricia Esther González Sáenz

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

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

*En Santiago de Compostela, Mayo de 2020*

Fdo. Patricia E. González Sáenz





## AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR / TUTOR DE LA TESIS

**Efecto de los agonistas del receptor GUCY2C sobre la  
esteatosis hepática en modelos *in vitro* e *in vivo* y  
mecanismos moleculares implicados**

Dña. Luisa María Seoane Camino  
D. Rubén Nogueiras Pozo

INFORMAN:

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

*En Santiago de Compostela, Abril de 2020.*

Fdo. Luisa María Seoane Camino

Fdo. Rubén Nogueiras Pozo



*“Nada en la vida debe ser temido,  
solamente comprendido.  
Ahora es el momento de comprender más.  
para temer menos.”*

**Marie Curie**





*A toda mi familia por todo su apoyo y cariño*





## FINANCIACIÓN

En la realización de esta Tesis Doctoral, Patricia E. González Sáenz ha sido beneficiaria de una ayuda predoctoral perteneciente al programa: *“Axudas de apoio á etapa predoutoral nas universidades do SUG, nos organismos públicos de investigación de Galicia e noutras entidades do Sistema galego de I+D+i, cofinanciadas parcialmente polo programa operativo FSE Galicia 2014-2020”* de la Xunta de Galicia (Convocatoria 2016).





## RESUMO

Na presente tese doutoral lévase a cabo o estudo da acción que exercen os agonistas do receptor transmembrana GUCY2C no metabolismo lipídico hepático e os mecanismos involucrados neste proceso. Concretamente, a nivel molecular, os tratamentos *in vitro* e *in vivo* con estes agonistas, uroguanilina e linaclotide respectivamente, permiten a activación do mecanismo de  $\beta$ - oxidación de ácidos graxos hepáticos mediado por o receptor activado por proliferador de peroxisomas alfa (PPAR $\alpha$ ) grazas á unión específica ao seu receptor. As modificacións sobre o receptor GUCY2C ou sobre PPAR $\alpha$  en presenza dos tratamentos, producen un bloqueo no mecanismo molecular que dá lugar a un exceso de graxa acumulada no citoplasma dos hepatocitos. Ademais, o tratamento oral con linaclotide produce unha diminución do peso corporal e da adiposidade nos modelos murinos de forma independente da inxesta. Porén, o tratamento farmacolóxico que antagoniza o receptor  $\beta_3$  adrenérgico é capaz de bloquear o efecto do linaclotide a este nivel sen afectar o seu efecto oxidativo a nivel hepático.

**PALABRAS CHAVE:** esteatose, fígado, uroguanilina, GUCY2C, linaclotide, PPAR $\alpha$ .



## RESUMEN

En la presente tesis doctoral se lleva a cabo el estudio de la acción que ejercen los agonistas del receptor transmembrana GUCY2C en el metabolismo lipídico hepático y los mecanismos involucrados en este proceso. Concretamente, a nivel molecular, los tratamientos *in vitro* e *in vivo* con estos agonistas, uroguanilina y linaclotide respectivamente, permiten la activación del mecanismo de  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos hepáticos mediado por el receptor activado por proliferador de peroxisomas alfa (PPAR $\alpha$ ) gracias a la unión específica a su receptor. Las modificaciones sobre el receptor GUCY2C o sobre PPAR $\alpha$  en presencia de los tratamientos, producen un bloqueo en el mecanismo molecular que da lugar a un exceso de grasa acumulada en el citoplasma de los hepatocitos. Además, el tratamiento oral con linaclotide produce una disminución del peso corporal y de la adiposidad en los modelos murinos de forma independiente de la ingesta. Sin embargo, el tratamiento farmacológico que antagoniza el receptor  $\beta_3$  adrenérgico es capaz de bloquear el efecto del linaclotide a este nivel sin afectar su efecto oxidativo a nivel hepático.

**PALABRAS CLAVE:** esteatosis, hígado, uroguanilina, GUCY2C, linaclotide, PPAR $\alpha$ .



## ABSTRACT

This doctoral thesis is based on the study of the action exerted by the agonists of the transmembrane receptor GUCY2C on the hepatic lipid metabolism and the mechanisms involved in this process. Specifically, at the molecular level, *in vitro* and *in vivo* treatments with these agonists, uroguanylin and linaclotide respectively, activate the mechanism of  $\beta$ -oxidation of hepatic fatty acids mediated by peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR $\alpha$ ) thanks to the specific binding to its receptor. The modifications on either the GUCY2C receptor or PPAR $\alpha$  produce a blockage in the molecular mechanism, generating an excess of fat in the cytoplasm of the hepatocytes. Moreover, the oral treatment of linaclotide leads to a reduction of body weight and adiposity in murine models independently of food intake. However, a pharmacological treatment of antagonizing the  $\beta_3$  adrenergic receptor can block the linaclotide effect at this level without affecting its hepatic oxidative effect.

**KEY WORDS:** steatosis, liver, uroguanylin, GUCY2C, linaclotide, PPAR $\alpha$ .



## AGRADECIMIENTOS

Según decía el poeta Antonio Machado en sus versos: “*Verás la maravilla del Camino; camino de soñada Compostela*” y como al andar se hace camino, ha llegado el momento de su destino. Pero antes, es necesario mostrar mi agradecimiento a todas las personas que han formado parte de este camino hasta el final de sus pasos.

Primeramente, me gustaría agradecer a mis directores, Sisi Seoane y Rubén Nogueiras por haberme dado la oportunidad de realizar este trabajo de tesis doctoral. Muchas gracias, Sisi por todo lo que me has ayudado en este trabajo, toda la experiencia y el apoyo constante en todo momento y también la ilusión que nos ha permitido alcanzar grandes objetivos. Muchas gracias, Rubén por todos los consejos aportados que me han ayudado a crecer en conocimiento, por todo el apoyo para seguir adelante y por tu gran disposición.

Muchas gracias también a Sulay Tovar y a Carlos Diéguez por la ayuda mostrada. A Rosaura Leis por su amabilidad y cercanía. A Miguel Fidalgo y a todo su equipo por la elaboración de los vectores lentivirales.

Otra parte importante de los agradecimientos corresponde a todos los compañeros que han formado parte de este trabajo. Muchas gracias a mis compañeras de laboratorio en el IDIS. A Cintia por sus ánimos, disponibilidad y gran esfuerzo constante. A Silvia por la ayuda brindada en todo momento. A Ceci por su experiencia y conocimiento. A Vero por su ayuda y disposición y a Raquel por todo su apoyo constante. También me gustaría acordarme de Rocío de la Unidad de Nutrición Pediátrica por su amabilidad y disponibilidad. Gracias a todos los compañeros del IDIS por vuestros ánimos, amabilidad y ayuda en todo este período.

Además, tengo que agradecer a todos los compañeros del CiMUS porque también han participado en este camino. A Cintia y a Dani, por su ayuda con los experimentos y todo su apoyo. A Marcos por toda su ayuda constante y todas sus palabras de ánimo en todo este período. A Chusa por su disponibilidad, su alegría y ánimos. A Cris, muchas gracias por su confianza y por enseñarme tantas cosas.

Muchas gracias a todos los compañeros que pasaron por POLES por toda la ayuda, los consejos y las palabras de aliento: Natalia, Amparo, Violeta, Mar, Omar, Bego, Mónica, Leonardo, René, Patricia, Eva, Uxía, Juan, Sabela, Javi, Eva, Laura, Pamela. A todos los compañeros del CiMUS que con sus palabras me animaron en muchas ocasiones.

Gracias a Ana Senra por su trabajo en las tinciones histológicas y celulares. A Pili, por toda su ayuda y por su generosidad. Gracias a Bernardo y a Ana por todo el cuidado de los animales y por sus consejos.

A Esther y a Ebel que junto con Cris habéis sido uno de mis pilares en Santiago. Muchas gracias por todo, ha sido increíble compartir esta experiencia con vosotras.

Llegando a esta última parte me queda agradecer a todas esas personas que desde la distancia han estado presentes. Gracias a todos los amigos por toda su paciencia, su comprensión y el gran apoyo mostrado en todo momento.

Por último, agradecer a toda mi familia, especialmente a mis padres todo el cariño, la ayuda y los consejos que me han permitido luchar y seguir adelante siempre. También agradecer a mi hermano por estar muy presente a pesar de la distancia que nos separa.

Con todo mi cariño y afecto y por hacer que todo esto se haga posible. Muchas gracias.

## ÍNDICE

<b>ACRÓNIMOS.....</b>	<b>27</b>
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>37</b>
1. CONTROL HOMEOSTÁTICO DEL BALANCE ENERGÉTICO ...	39
1.1. Disfunción de la homeostasis energética: fisiopatología de la obesidad y enfermedades asociadas .....	40
1.2. Tratamientos frente a la obesidad: efectos de los fármacos y la cirugía bariátrica .....	41
2. REGULACIÓN DE LA HOMEOSTASIS ENERGÉTICA POR EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL .....	43
2.1. Hipotálamo: núcleos, funciones y regulación .....	43
2.2. Sistema nervioso autónomo: composición y funciones .....	46
3. REGULACIÓN DE LA HOMEOSTASIS ENERGÉTICA POR LA ACCIÓN DE DIFERENTES ÓRGANOS .....	47
3.1. Regulación de la homeostasis energética por el tracto gastrointestinal: sistema nervioso entérico y señales hormonales.....	47
3.2. Regulación de la homeostasis energética por el tejido adiposo: tipos, función y señales endocrinas.....	51
3.2.1. Tejido adiposo blanco (WAT).....	52
3.2.2. Tejido adiposo marrón (BAT) .....	54
3.3. Hormona gastrointestinal uroguanilina (UGN) .....	56
3.3.1. Mecanismo de acción de la uroguanilina .....	57
3.3.2. Regulación de la producción intestinal de uroguanilina.....	60
3.3.3. Efectos farmacológicos de la administración de uroguanilina.....	61
3.3.4. Otros agonistas del receptor GUCY2C .....	63
3.3.5. Disfunciones en la señalización intestinal del receptor GUCY2C asociadas a enfermedades.....	64

3.4. Regulación de la homeostasis energética por el hígado: funciones y metabolismo.....	66
3.4.1. Regulación del metabolismo de la glucosa.....	66
3.4.2. Regulación del metabolismo de lípidos .....	67
3.4.2.1. Fuentes de energía hepática: origen y funciones principales.....	68
3.4.2.2. Asimilación de ácidos grasos y transporte .....	69
3.4.2.3. Síntesis de ácidos grasos: lipogénesis <i>de novo</i> (LDN) 70	70
3.4.2.4. Oxidación de ácidos grasos y cetogénesis .....	71
3.4.2.4.1. Componentes clave en el desarrollo de la $\beta$ - oxidación .....	74
Receptores activados por proliferador de peroxisomas (PPARs) .....	74
Familia de factores de crecimiento de fibroblastos (FGFs) .....	81
Factor de crecimiento de fibroblastos 21 (FGF21).....	83
Sistema carnitina palmitoiltransferasa (CPT) .....	85
Función principal de CPT1A en la $\beta$ -oxidación de ácidos grasos e impacto en el metabolismo hepático.....	87
<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>89</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>93</b>
1. PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTACIÓN <i>IN VITRO</i> .....	95
1.1. Cultivos celulares .....	95
1.2. Tratamientos celulares .....	96
1.2.1. Tratamiento con ácido oleico.....	96
1.2.2. Tratamiento con el antagonista de PPAR $\alpha$ (GW6471) .....	96
1.2.3. Tratamiento con la hormona uroguanilina (UGN).....	97
1.3. Diseños experimentales <i>in vitro</i> .....	97
1.3.1. Efecto del tratamiento con la uroguanilina en un modelo de esteatosis hepática y mecanismos moleculares implicados .....	98

1.3.1.1. Establecimiento de un modelo de esteatosis hepática en la línea celular humana, HepG2 .....	98
1.3.1.2. Efecto del tratamiento de la hormona gastrointestinal uroguanilina sobre el modelo de esteatosis hepática <i>in vitro</i> .....	98
1.3.1.3. Estudio de los mecanismos moleculares involucrados en la acción de la uroguanilina sobre el metabolismo lipídico hepático.....	99
1.3.2. Papel del receptor GUCY2C hepático en el efecto de la UGN sobre la esteatosis hepática. ....	100
1.3.2.1. Tratamiento del silenciamiento parcial del receptor GUCY2C con un siRNA específico.....	100
1.3.2.2. Efecto del silenciamiento parcial del receptor GUCY2C en el mecanismo molecular activado por la UGN en la línea celular hepática HepG2 .....	101
1.3.3. Papel de PPAR $\alpha$ sobre la oxidación de ácidos grasos activada por la hormona uroguanilina .....	103
2. PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTACIÓN <i>IN VIVO</i> .....	104
2.1. Legislación y ética en los procedimientos con animales de experimentación.....	104
2.2. Modelo de experimentación animal utilizado en los procedimientos. condiciones de mantenimiento y cuidado .....	105
2.3. Procedimientos Experimentales.....	106
2.3.1. Vías de administración de sustancias .....	106
2.3.1.1. Vía intraperitoneal (IP).....	106
2.3.1.2. Vía intravenosa por la vena de la cola (IV).....	107
2.3.1.3. Vía oral.....	108
2.3.1.4. Vía subcutánea (SC).....	109
2.3.2. Monitorización del peso corporal, la ingesta y la composición corporal .....	110
2.3.3. Sacrificio, extracción de tejidos y recogida de las muestras.....	111
2.4. Diseños experimentales .....	112
2.4.1. Modelo <i>in vivo</i> de obesidad inducida por dieta (DIO) .....	112

2.4.2. Efecto de la administración del fármaco linaclotide (oral) y del antagonista del receptor $\beta_3$ -adrenérgico (SC) en modelos murinos .....	113
2.4.3. Efecto del silenciamiento del receptor GUCY2C (IV) y del tratamiento oral con linaclotide sobre el modelo de experimentación <i>in vivo</i> , DIO .....	116
2.4.4. Efecto del tratamiento con el antagonista (GW6471) de PPAR $\alpha$ (IP) y del tratamiento oral con linaclotide sobre el modelo de experimentación <i>in vivo</i> DIO .....	118
3. TÉCNICAS ANALÍTICAS .....	120
3.1. Análisis de expresión proteica: Western Blot .....	120
3.1.1. Extracción de proteína .....	120
3.1.2. Cuantificación de proteínas .....	122
3.1.3. Preparación de las muestras .....	124
3.1.4. Electroforesis SDS-PAGE .....	125
3.1.4.1. Elaboración de los geles de poliacrilamida .....	125
3.1.4.2. Electroforesis SDS-PAGE .....	127
3.1.5. Transferencia húmeda .....	128
3.1.6. Comprobación de la transferencia gel-membrana: Tinción rojo Ponceau .....	130
3.1.7. Inmunodetección .....	131
3.1.7.1. Bloqueo .....	131
3.1.7.2. Hibridación de los anticuerpos .....	131
3.1.7.3. Detección .....	133
3.1.7.4. Análisis de las bandas proteicas detectadas .....	134
3.2. Análisis de expresión génica: pcr cuantitativa (Q-PCR) .....	135
3.2.1. Extracción de RNA: método Tiocianato de Guanidina-Fenol-Cloroformo .....	135
3.2.2. Cuantificación del RNA aislado de las muestras .....	138
3.2.3. Retrotranscripción .....	139
3.2.4. PCR en tiempo real (Q-PCR) .....	140
3.3. Análisis del perfil lipídico en sangre y en hígado .....	144
3.4. Técnica de tinción de ácidos grasos <i>in vitro</i> : Oil-Red-O .....	145
3.5. Estudios histológicos .....	146
3.5.1. Tinción de hematoxilina y eosina (H&E) .....	146
3.5.2. Tinción de Oil Red O .....	147

3.6. Análisis estadístico .....	148
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>149</b>
<b>ESTUDIOS <i>IN VITRO</i> .....</b>	<b>151</b>
1. EFECTO DEL TRATAMIENTO CON LA HORMONA UROGUANILINA EN UN MODELO CELULAR DE ESTEATOSIS HEPÁTICA Y MECANISMOS MOLECULARES IMPLICADOS .	151
1.1. Identificación del receptor de la uroguanilina, GUCY2C en el hígado .....	151
1.2. Establecimiento de un modelo de esteatosis hepática en la línea celular humana, HepG2.....	152
1.3. Efecto del tratamiento con la hormona gastrointestinal uroguanilina en un modelo de esteatosis hepática <i>in vitro</i> .....	153
1.4. Estudio de los mecanismos moleculares involucrados en la acción de la uroguanilina sobre el metabolismo lipídico hepático.....	155
1.5. Papel del receptor GUCY2C hepático en la acumulación de lípidos citoplasmáticos en la línea celular humana, HepG2 .....	156
1.6. Efecto del silenciamiento parcial del receptor GUCY2C en el mecanismo molecular activado por la uroguanilina en presencia del tratamiento con ácido oleico .....	158
1.7. Papel de PPAR $\alpha$ sobre la oxidación de ácidos grasos activada por uroguanilina.....	160
<b>ESTUDIOS <i>IN VIVO</i>.....</b>	<b>163</b>
2. EFECTO DEL TRATAMIENTO ORAL CON UN AGONISTA DE GUCY2C SOBRE EL HÍGADO DE RATONES Y MECANISMOS MOLECULARES IMPLICADOS .....	163
2.1. Efecto de la administración oral del fármaco linaclotide sobre el fenotipo de ratones DIO.....	163
2.2. Efecto del tratamiento con linaclotide sobre la esteatosis hepática y sobre los niveles de ácidos grasos libres y de triglicéridos .....	165

2.3. Efecto del tratamiento con linaclotide sobre la activación de los mecanismos moleculares que forman parte del metabolismo lipídico hepático .....	166
<b>3. PAPEL DEL RECEPTOR GUCY2C HEPÁTICO EN EL EFECTO DEL LINACLOTIDE SOBRE EL METABOLISMO LIPÍDICO .....</b>	<b>167</b>
3.1. Efecto del silenciamiento por el vector lentiviral <i>shGucy2c</i> sobre el fenotipo de ratones DIO .....	167
3.2. Estudio del efecto del linaclotide y del silenciamiento del receptor GUCY2C hepático sobre la esteatosis hepática y sobre los niveles de triglicéridos y ácidos grasos libres .....	169
3.3. Papel del receptor GUCY2C hepático en el efecto del linaclotide sobre la activación de mecanismos moleculares asociados al metabolismo lipídico .....	171
3.4. Efecto de la administración oral del linaclotide en la regulación del peso corporal y de los mecanismos moleculares hepáticos en presencia del bloqueo farmacológico del receptor $\beta_3$ -AR .....	172
3.5. Estudio del papel de PPAR $\alpha$ como mediador del efecto de linaclotide sobre el fenotipo de ratones DIO .....	174
3.6. Estudio del papel de PPAR $\alpha$ como mediador del efecto de linaclotide sobre la esteatosis hepática y sobre los niveles de ácidos grasos libres y triglicéridos .....	176
3.7. Estudio del papel de PPAR $\alpha$ como mediador del efecto de linaclotide en la activación de mecanismos moleculares asociados al metabolismo lipídico hepático .....	178
<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>179</b>
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>193</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>197</b>

# ACRÓNIMOS

---





ACC:	Acetil-CoA carboxilasa (“ <i>Acetyl-CoA Carboxilase</i> ”).
AgRP:	Péptido similar a Agouti (“ <i>Agouti-Related Peptide</i> ”).
Akt/PKB:	Proteína quinasa B (“ <i>Protein Kinase B</i> ”).
AP:	Área Postrema.
APS:	Amonio PerSulfato.
AR:	Receptores adrenérgicos (“ <i>Adrenergic Receptors</i> ”).
ARC/AN:	Núcleo arcuato (“ <i>ARCuate Nucleus</i> ”).
ATP:	Adenosín trifosfato (“ <i>Adenosine TriPhosphate</i> ”).
β-AR(s):	Receptor(es) Beta Adrenergico(s) (“ <i>β-AdrenoReceptor(s)</i> ”).
BAT:	Tejido adiposo pardo (“ <i>Brown Adipose Tissue</i> ”).
BBB:	Barrera Hemato-Encefálica (“ <i>Blood-Brain Barrier</i> ”).
BSA:	Albúmina de Suero Bovino (“ <i>Bovine Serum Albumine</i> ”).
CACT:	Carnitina-AcilCarnitina Translocasa.
cAMP:	Adenosín monofosfato cíclico (“ <i>cyclic Adenosine MonoPhosphate</i> ”).
CaR:	Receptor sensible al ión Ca <sup>2+</sup> (“ <i>Calcium Receptor</i> ”).
CART:	Tránsito regulado de cocaína y anfetamina (“ <i>Cocaine and Amphetamine Regulated Transcript</i> ”).
CCK:	Colecistoquinina (“ <i>CholeCystoKinin</i> ”).
cDNA:	DNA complementario (“ <i>complementary DNA</i> ”).
CFTR:	Regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística (“ <i>Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator</i> ”).
cGMP:	Guanosín monofosfato cíclico (“ <i>cyclic Guanosine MonoPhosphate</i> ”).
CIBD:	Enfermedades inflamatorias intestinales crónicas (“ <i>Chronic Inflammatory Bowel Diseases</i> ”).
CNGs:	Canales iónicos de entrada de nucleótidos cíclicos (“ <i>Cyclic Nucleotide-Gated ion channels</i> ”).

CoA:	<b>C</b> oenzima <b>A</b> .
CPT:	<b>C</b> arnitina <b>P</b> almitoil <b>T</b> ransferasa.
dATP:	deoxiAdenosín trifosfato (“ <i>deoxyAdenosine TriPhosphate</i> ”).
DBD:	Dominio de unión a DNA (“ <i>DNA Binding Domain</i> ”).
DBP:	<b>D</b> erivación <b>B</b> ilio <b>P</b> ancreática.
dCTP:	deoxiCitidina trifosfato (“ <i>deoxyCytidine TriPhosphate</i> ”).
DEPC:	<b>D</b> i <b>E</b> til <b>P</b> iro <b>C</b> arbonato.
dGTP:	deoxiGuanosina trifosfato (“ <i>deoxyGuanosine TriPhosphate</i> ”).
DHA/DMH/DMN:	Núcleo dorsomedial (“ <i>DorsoMedial Nucleus</i> ”).
DIO:	Obesidad inducida por dieta (“ <i>Diet-Induced Obesity</i> ”).
DMEN:	“ <i>Dulbecco’s Modified Eagle Medium</i> ”.
DMSO:	<b>D</b> i <b>M</b> etil <b>S</b> ulfóxido.
DNA:	Ácido desoxirribonucleico (“ <i>DeoxyriboNucleic Acid</i> ”).
dNTPs:	desoxiNucleósido trifosfatos (“ <i>deoxyNucleoside TriPhosphates</i> ”).
dTTP:	deoxiTimidina trifosfato (“ <i>deoxyThymidine TriPhosphate</i> ”).
DVC:	Complejo Vagal Dorsal (“ <i>Dorsal Vagal Complex</i> ”).
EDTA:	Ácido etilendiaminotetraacético (“ <i>EthyleneDiamineTetraacetic Acid</i> ”).
Ep:	<b>E</b> pendimocitos.
FAs:	Ácidos grasos (“ <i>Fatty Acids</i> ”).
FADH <sub>2</sub> :	Flavín adenín dinucleótido (“ <i>Flavin Adenine Dinucleotide</i> ”).
FATP:	Proteína transportadora de ácidos grasos (“ <i>Fatty Acid Transporter Protein</i> ”).
FAS:	Sintasa de ácidos grasos (“ <i>Fatty Acids Synthase</i> ”).
FBS:	Suero bovino fetal (“ <i>Fetal Bovine Serum</i> ”).
FGFs:	Factores de crecimiento de fibroblastos (“ <i>Fibroblast Growth Factors</i> ”).

FGFRs:	Receptores de los FGFs (“ <b>FGF Receptors</b> ”).
FNDC:	Factor Neurotrófico Derivado de Cerebro.
GABA:	ácido $\gamma$ -aminobutírico (“ <b>Gamma AminoButyric Acid</b> ”).
GHS-R:	Receptor de secretagogos de la hormona de crecimiento (“ <b>Growth Hormone Secretagogue-Receptor</b> ”).
GI:	<b>GastroIntestinal</b> .
GIP:	Polipéptido inhibidor gástrico (“ <b>Gastric Inhibitory Polypeptide</b> ”).
GLP-1:	Péptido similar a Glucagón tipo 1 (“ <b>Glucagon-Like Peptide-1</b> ”).
GLUT:	Transportador de glucosa (“ <b>GLUcose Transporter</b> ”).
GN:	Guanilina (“ <b>GuaNylin</b> ”).
GUCA2A:	Activador de la guanilato ciclasa 2A (“ <b>GUanylate Cyclase Activator 2A</b> ”).
GUCA2B:	Activador de la guanilato ciclasa 2B (“ <b>GUanylate Cyclase Activator 2B</b> ”).
GUCY2C:	Guanilato ciclasa 2c (“ <b>GUanylate CYclase 2C</b> ”).
GWAT:	Tejido adiposo blanco gonadal (“ <b>Gonadal White Adipose Tissue</b> ”).
HCC:	<b>HepatoCarcinoma Celular</b> .
HDL:	Lipoproteína de alta densidad (“ <b>High Density Lipoprotein</b> ”).
HE:	<b>Hematoxilina Eosina</b> .
HFD:	Dieta alta en grasa (“ <b>High Fat Diet</b> ”).
HPRT:	Hipoxantina-guanina fosforibosiltransferasa (“ <b>Hypoxanthine-guanine PhosphoRibosylTransferase</b> ”).
HPSGs:	Proteoglicanos heparán sulfato (“ <b>Heparan Sulfate ProteoGlycans</b> ”).
HRP:	Peroxidasa de rábano (“ <b>HorseRadish Peroxidase</b> ”).
HSL:	Lipasa sensible a la hormona (“ <b>Hormone Sensitive Lipase</b> ”).
IL-6:	<b>InterLeucina-6</b> .

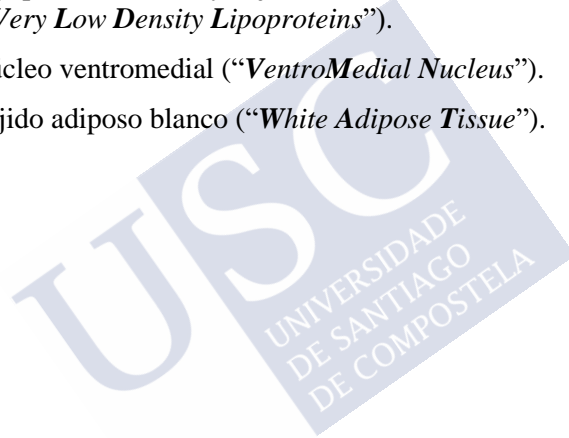
IMC:	Índice de <b>M</b> asa <b>C</b> orporal.
IP:	<b>I</b> ntra <b>P</b> eritoneal.
IV:	<b>I</b> ntra <b>V</b> enosa.
KO:	<i><b>K</b>nock<b>O</b>ut.</i>
KRH:	<b>K</b> rebs- <b>R</b> inger- <b>H</b> EPES.
LBD:	Región de unión al ligando (“ <i><b>L</b>igand <b>B</b>inding <b>D</b>omain</i> ”).
LCFAs:	Ácidos grasos de cadena larga (“ <i><b>L</b>ong-<b>C</b>hain <b>F</b>atty <b>A</b>cids</i> ”).
LDL:	Lipoproteína de baja densidad (“ <i><b>L</b>ow <b>D</b>ensity <b>L</b>ipoprotein</i> ”).
LDN:	Lipogénesis <i><b>D</b>e <b>N</b>ovo</i> .
L-FABP:	Proteína de unión a ácidos grasos hepáticos (“ <i><b>L</b>iver- <b>F</b>atty <b>A</b>cid <b>B</b>inding <b>P</b>rotein</i> ”).
LHA:	Núcleo lateral (“ <i><b>L</b>ateral <b>H</b>ypothalamic <b>A</b>rea</i> ”).
LPL:	<b>L</b> ipo <b>P</b> roteína <b>L</b> ipasa.
MAPKs:	Proteínas quinasas activadas por mitógeno (“ <i><b>M</b>itogen-<b>A</b>ctivated <b>P</b>rotein <b>K</b>inases</i> ”).
MB:	Cuerpos mamilares (“ <i><b>M</b>ammillary <b>B</b>odies</i> ”).
MCH:	Hormona concentradora de melanina (“ <i><b>M</b>elanin-<b>C</b>oncentrating <b>H</b>ormone</i> ”).
MCP-1:	Proteína quimioatrayente de monocitos-1 (“ <i><b>M</b>onocyte <b>C</b>hemoattractant <b>P</b>rotein -<b>1</b></i> ”).
ME:	Eminencia Media (“ <i><b>M</b>edian <b>E</b>minence</i> ”).
M-MLV RT:	Transcriptasa reversa del virus de leucemia murino Moloney (“ <i><b>M</b>oloney-<b>M</b>urine <b>L</b>eukemia <b>V</b>irus <b>R</b>everse <b>T</b>ranscriptase</i> ”).
MMTT:	Prueba de tolerancia a alimentos mixtos (“ <i><b>M</b>ixed <b>M</b>eal <b>T</b>olerance <b>T</b>est</i> ”).
MRI:	Imagen por resonancia magnética (“ <i><b>M</b>agnetic <b>R</b>esonance <b>I</b>maging</i> ”).
mRNA:	Ácido ribonucleico mensajero (“ <i><b>m</b>essenger <b>R</b>ibo<b>N</b>ucleic<b>A</b>cid</i> ”).

NADH:	Nicotinamida adenina dinucleótido (“ <i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide</i> ”).
NADPH:	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (“ <i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate</i> ”).
NAFLD:	Enfermedad del hígado graso no alcohólico (“ <i>Non-Alcoholic Fatty Liver Disease</i> ”).
NASH:	Esteatohepatitis no alcohólica (“ <i>Non-Alcoholic SteatoHepatitis</i> ”).
NEFAs:	Ácidos grasos no esterificados (“ <i>Non-Esterified Fatty Acids</i> ”).
NHE:	intercambiador sodio hidrógeno (“ <i>Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> Exchanger</i> ”).
NPY:	Neuropéptido Y (“ <i>NeuroPeptide Y</i> ”).
NTD:	Dominio N terminal (“ <i>N Terminal Domain</i> ”).
NTS:	Núcleo del Tracto Solitario.
OA:	Ácido oleico (“ <i>Oleic Acid</i> ”).
OMS:	Organización Mundial de la Salud.
ORO:	Rojo oleoso O (“ <i>Oil Red O</i> ”).
OX:	Orexinas (“ <i>OreXins</i> ”).
OXM:	<b>OX</b> into <b>M</b> odulina.
OWAT:	Tejido adiposo blanco omental (“ <i>Omental White Adipose Tissue</i> ”).
PBS:	Tampón fosfato salino (“ <i>Phosphate-Buffered Saline</i> ”).
PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa (“ <i>Polymerase Chain Reaction</i> ”).
PDE:	Fosfodiesterasa (“ <i>PhosphoDiEsterase</i> ”).
PFA:	Área PeriFornical (“ <i>PeriFornical Area</i> ”).
PGC-1 $\alpha$ / $\beta$ :	Receptor gamma activado por proliferador de peroxisomas coactivador-1alfa/ beta (“ <i>Peroxisome proliferator-activated receptor <b>Gamma</b> Coactivator-<b>1alpha</b>/<b>betha</b></i> ”).

PI3K:	Fosfatidilinositol 3-quinasa (“ <i>PhosphatidyIInositol 3-Kinase</i> ”).
PKA:	Proteína kinasa dependiente de cAMP (“ <i>Protein Kinase cAMP-dependent</i> ”).
PKGII:	proteína kinasa dependiente de cGMP tipo 2 (“ <i>Protein Kinase cGMP-dependent type 2</i> ”).
POA:	Área preóptica (“ <i>PreOptic Area</i> ”).
POMC:	<b>Pro</b> Opio <b>Melano</b> Cortina.
PP:	<b>Pol</b> ipéptido <b>Pan</b> creático.
PPARs:	Receptores activados por proliferador de peroxisomas (“ <i>Peroxisome Proliferator-Activated Receptors</i> ”).
PPRE:	Elemento de respuesta al proliferador de peroxisomas (“ <i>Peroxisome Proliferator Response Element</i> ”).
PVH/PVN:	Núcleo paraventricular (“ <i>ParaVentricular Nucleus</i> ”).
PVDF:	Difluoruro de polivinilideno (“ <i>PolyVinylidene DiFluoride</i> ”).
PYY:	<b>Pé</b> ptido <b>YY</b> .
Q-PCR:	PCR cuantitativa (“ <i>Quantitative-Polymerase Chain Reaction</i> ”).
RBP-4:	Proteína de unión al retinol-4 (“ <i>Retinol Binding Protein-4</i> ”).
RD:	<b>Real</b> Decreto.
RMN:	<b>Resonancia</b> Magnética Nuclear.
RNA:	Ácido Ribonucleico (“ <i>RiboNucleic Acid</i> ”).
RT-PCR:	reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (“ <i>Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction</i> ”).
RXR:	<b>Receptor X</b> Retinoide.
RYGB:	Baipás Gástrico (“ <i>Roux en-Y, Gastric Bypass</i> ”).
SC:	<b>Sub</b> Cutánea.
SCN:	Núcleo supraquiasmático (“ <i>SupraChiasmatic Nucleus</i> ”).

SCP-2:	Proteína transportadora de esteroides-2 (“ <i>Sterol Carrier Protein-2</i> ”).
SD:	Dieta Standard (“ <i>Standard Diet</i> ”).
SDS:	Sodio Dodecil Sulfato.
SDS-PAGE:	Sodio Dodecil Sulfato- Electroforesis en gel de poliacrilamida (“ <i>Sodium Dodecyl Sulfate- PolyAcrylamide Gel Electrophoresis</i> ”).
SEM:	Error estándar de la media (“ <i>Standard Error of the Mean</i> ”).
SF1:	Factor esteroideogénico (“ <i>Steroidogenic Factor 1</i> ”).
shRNA;	Ácido ribonucleico de horquilla pequeña (“ <i>short hairpin RNA</i> ”).
siRNA:	Ácido ribonucleico pequeño de interferencia (“ <i>small interference RNA</i> ”).
SIRT-1:	<b>SIRT</b> uina-1.
SNA:	Sistema Nervioso Autónomo.
SNC:	Sistema Nervioso Central.
SNE:	Sistema Nervioso Entérico.
SNP:	Sistema Nervioso Parasimpático.
SNS:	Sistema Nervioso Simpático.
SON:	Núcleo supraóptico (“ <i>SupraOptic Nucleus</i> ”).
SPF:	Sala libre de patógenos (“ <i>Specific Pathogen Free</i> ”).
STs:	Enterotoxinas bacterianas termoestables (“ <i>heat-Stable enteroToxins</i> ”).
STAT:	Transductora de señal y activadora de transcripción (“ <i>Signal Transducer and Activator of Transcription</i> ”).
TBL:	Transducina beta tipo 1 (“ <i>Transducin Beta Like 1</i> ”).
TBLR1:	Receptor de la TBL1 (“ <i>TBL Receptor1</i> ”).
TBS-T:	Tampón de lavado tris salino-tween (“ <i>Tris Buffer Saline-Tween</i> ”).
TEMED:	<b>TE</b> tra <b>ME</b> tiletilen <b>D</b> iamina.

TGs:	<b>Tri</b> Glicéridos.
TNF- $\alpha$ :	Factor de necrosis tumoral- $\alpha$ (“ <i>Tumor Necrosis Factor- <math>\alpha</math></i> ”).
TVI:	Inyección por la vena lateral de la cola (“ <i>Tail Vein Injection</i> ”).
UCP1:	Proteína desacoplante 1 (“ <i>UnCoupling Protein1</i> ”).
UGN:	<b>Uro</b> Gua <b>N</b> ilina.
UV:	<b>U</b> nidades <b>V</b> irales.
V:	<b>V</b> ehículo.
VLDL:	Lipoproteínas de muy baja densidad (“ <i>Very Low Density Lipoproteins</i> ”).
VMH/VMN:	Núcleo ventromedial (“ <i>VentroMedial Nucleus</i> ”).
WAT:	Tejido adiposo blanco (“ <i>White Adipose Tissue</i> ”).



# **INTRODUCCIÓN**

---





## 1. CONTROL HOMEOSTÁTICO DEL BALANCE ENERGÉTICO

Como es bien conocido, la habilidad de los organismos para mantener un ambiente metabólico interno homeostático<sup>1</sup> que permite regular el peso corporal, constituye un requerimiento fundamental para la supervivencia de los mismos. La homeostasis energética constituye un proceso biológico altamente regulado definido como el equilibrio entre la energía consumida (ingesta), energía almacenada y el gasto de energía (actividad física, metabolismo basal y termogénesis adaptativa) necesario para llevar a cabo las funciones básicas fisiológicas<sup>2</sup> (Imagen 1). Este proceso de gestión energética necesita de una regulación muy estricta por parte del sistema nervioso central (SNC) junto con diversos órganos periféricos (hígado, páncreas, tejido adiposo, tracto gastrointestinal, etc) la cual permite mantener este equilibrio. Esta regulación requiere de una gran variedad de señales que proporcionan información acerca del estado de los órganos periféricos cruciales en el consumo energético, la absorción de alimentos y la acumulación energética.



**Imagen 1.** Control del balance energético. Representación gráfica del equilibrio de energía entrante (Consumo de energía) y la energía saliente (Gasto de energía). El consumo de energía se encuentra representado por la ingesta de alimentos y el gasto de energía está representado por la actividad física, el metabolismo basal y la termogénesis adaptativa. Imagen procedente de la referencia (2). Con permiso de Elsevier, número de licencia 4684331051603.

### **1.1. DISFUNCIÓN DE LA HOMEOSTASIS ENERGÉTICA: FISIOPATOLOGÍA DE LA OBESIDAD Y ENFERMEDADES ASOCIADAS**

La obesidad se produce como consecuencia de un desequilibrio positivo del proceso homeostático. La Organización Mundial de la Salud (OMS)<sup>3</sup> define este desequilibrio como un exceso de acumulación de grasa que puede ser perjudicial para la salud y se diagnostica con un índice de masa corporal (IMC) superior a 30 kg/m<sup>2</sup>. Por lo tanto, se trata de una enfermedad crónica progresiva de constante riesgo para la salud de las personas.

Además, esta patología incrementa de forma sustancial el riesgo de desarrollar otras patologías de diversa naturaleza como por ejemplo enfermedades metabólicas, entre las que se encuentran la diabetes tipo 2 y el hígado graso no alcohólico, enfermedades cardiovasculares como la hipertensión o el infarto de miocardio, enfermedades músculoesqueléticas como la osteoartritis e incluso el desarrollo de algunos tipos de cáncer como el cáncer de mama, de ovario, de próstata, de hígado, de riñón o de colon. Al mismo tiempo, se producen cambios en la apariencia física de los individuos que pueden desembocar en problemas en las relaciones sociales y en una menor calidad de vida<sup>4</sup>.

Durante los últimos 50 años la prevalencia de la obesidad se ha incrementado notablemente, no sólo en el número de individuos que la padecen, sino también en la notoria expansión por todos los países del mundo en proporciones pandémicas<sup>5,6,7</sup>. Hay que destacar que el incremento de la obesidad en niños y adolescentes resulta ser de vital importancia ya que permite realizar una predicción verosímil de cómo va a afectar esta patología a la población del futuro<sup>8</sup>.

Por tanto, teniendo en cuenta toda esta información acerca de la obesidad como enfermedad multifactorial crónica que se está convirtiendo en un problema de salud de primera magnitud, la investigación actual en este campo se centra en analizar los factores involucrados en la enfermedad con el fin de desarrollar tratamientos específicos y personalizados que ayuden a combatirla.

## 1.2. TRATAMIENTOS FRENTE A LA OBESIDAD: EFECTOS DE LOS FÁRMACOS Y LA CIRUGÍA BARIÁTRICA

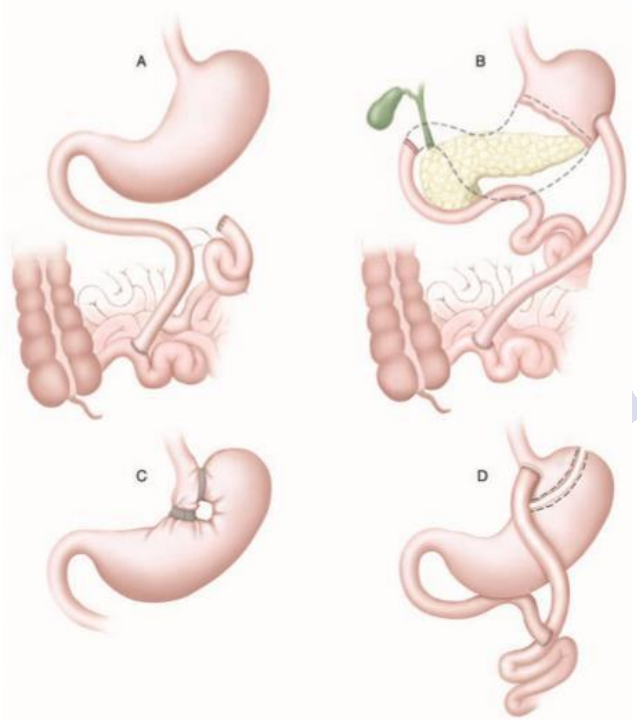
Los tratamientos más importantes que se han desarrollado en la actualidad para combatir la obesidad se agrupan en 2 bloques, los tratamientos farmacológicos y los tratamientos quirúrgicos.

En relación a los tratamientos farmacológicos, existen muchos tipos y normalmente permiten alcanzar el equilibrio energético supliendo las deficiencias hormonales (por ejemplo, tratamientos de leptina recombinante en humanos deficientes en esta hormona), antagonizando los inhibidores de las rutas moleculares que promueven el desarrollo de la obesidad<sup>9,10</sup> o bien activando determinadas moléculas capaces de regular mecanismos involucrados en la homeostasis energética<sup>11</sup>. En la actualidad el número de fármacos comercializados para el tratamiento de la obesidad es reducido, además algunos de ellos presentan efectos adversos no deseados lo cual hace necesario un estudio particular de cada individuo para poder llevar a cabo una terapia personalizada<sup>11</sup>.

A pesar del creciente número de fármacos en estudio para el tratamiento de la obesidad, la terapia más efectiva para tratar esta patología en la actualidad, la constituye el tratamiento quirúrgico. Este tratamiento consiste en llevar a cabo una cirugía bariátrica que permite la manipulación del tracto gastrointestinal que se traduce en una profunda pérdida de peso y una mejora de las condiciones fisiológicas. De esta manera, se producen cambios en las señales que envía el tracto gastrointestinal al hipotálamo en cuanto al tamaño de las comidas y en la regulación de la homeostasis energética a largo plazo<sup>12</sup>. Existen varios tipos de cirugías, entre las que destacan el *bypass* yeyunoileal, la derivación biliopancreática (DBP), la gastroplastia vertical con banda y el *bypass* gástrico (RYGB)<sup>11</sup> (Imagen 2).

El procedimiento de cirugía que se utiliza con mayor asiduidad y cuya efectividad es más alta, es el *bypass* gástrico (RYGB) que permite

disminuir la absorción de los alimentos permitiendo una saciedad precoz. Con este tipo de cirugía, se produce una pérdida de hasta un 75% de exceso de peso corporal a largo plazo y de masa grasa, restableciendo también la homeostasis de la glucosa, lo cual se traduce en una mejoría de la diabetes, hiperlipidemia, hipertensión y apnea obstructiva del sueño<sup>11,12,13,14</sup>.



---

**Imagen 2.** Los procedimientos quirúrgicos empleados en la cirugía bariátrica tratan de producir mala absorción como el *bypass* yeyunoileal (A), restricción y mala absorción como la derivación biliopancreática, DBP (B), restricción del volumen gástrico realizando una gastroplastia vertical con banda (C), y el *bypass* gástrico, RYGB (D). Esta última cirugía es la que más se realiza en la actualidad permitiendo un reajuste importante de las hormonas del tracto gastrointestinal. Imagen procedente de la referencia (11). Con el permiso de AAAS (“*The American Association for the Advancement of Science*”).

---

Los mecanismos que se activan tras la cirugía bariátrica incluyen la modulación de las señales periféricas que actúan centralmente para regular la homeostasis energética. De las señales periféricas moduladas por la reducción de la adiposidad, destaca la leptina que circula en proporción a la masa del tejido adiposo<sup>15,16</sup>. Además de las variaciones en los niveles de leptina tras la cirugía, se produce un incremento importante de los niveles de GLP-1 y PYY, entre otras variaciones hormonales<sup>17</sup>.

## **2. REGULACIÓN DE LA HOMEOSTASIS ENERGÉTICA POR EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL**

El Sistema Nervioso Central (SNC) utiliza tres mecanismos para llevar a cabo el control de la homeostasis energética, que son los siguientes<sup>2</sup>:

- Efectos en el comportamiento: estados de alimentación, ayuno, actividad física.
- Efectos en el Sistema Nervioso Autónomo (SNA) que regula numerosos aspectos metabólicos.
- Efectos en el sistema neuroendocrino como los que se producen con la secreción hormonal.

### **2.1. HIPOTÁLAMO: NÚCLEOS, FUNCIONES Y REGULACIÓN**

Una de las regiones más relevantes del SNC que se encarga de la regulación de procesos biológicos homeostáticos como el estado nutricional, el peso corporal, la termorregulación y la reproducción es el hipotálamo<sup>18</sup>. Este centro regulador va a ser capaz de recoger y procesar información acerca de las fluctuaciones que se produzcan en

el estatus energético gracias a las señales provenientes de los órganos periféricos<sup>19</sup>.

El hipotálamo está localizado por debajo del tálamo y formado por una red de núcleos compuestos por cuerpos neuronales que proyectan tanto hacia otras regiones del encéfalo como entre los diferentes núcleos hipotalámicos. Esta interconexión neuronal entre los núcleos permite responder a los cambios que se producen en el balance energético alterando la expresión de neuropéptidos específicos produciéndose así cambios en el consumo y el gasto de energía<sup>20,21,22</sup>. Su principal papel como centro regulador del apetito y del peso corporal se ha determinado gracias a estudios como el modelo experimental de lesiones hipotalámicas, en el que se pudo comprobar que por ejemplo, las lesiones en el núcleo ventromedial provocaban el desarrollo de la obesidad mientras que si se producían en el núcleo lateral disminuía la ingesta dando lugar a una pérdida de peso<sup>18</sup>.

Algunos de los núcleos hipotalámicos que se encuentran implicados en la regulación del balance energético son los siguientes: el núcleo Arcuato (ARC/AN), núcleo Paraventricular (PVH/PVN), núcleo Ventromedial (VMH/VMN), núcleo Dorsomedial (DMH/DMN) y núcleo Lateral (LHA) (Imagen 3), cuyas características consideramos a continuación:

El **núcleo Arcuato** (ARC/AN) localizado en la base del tercer ventrículo y junto con la eminencia media (ME) constituyen un órgano circumventricular con la barrera hematoencefálica (BBB) modificada, más permeable a la entrada de moléculas procedentes de los órganos periféricos<sup>23,24,25</sup>. Este núcleo está formado por dos tipos de poblaciones neuronales: las neuronas orexigénicas: Neuropéptido Y (NPY) y péptido similar a Agoutí (AgRP)<sup>26</sup> y las neuronas anorexigénicas: Proopiomelanocortina (POMC) y Transcrito regulado por cocaína y anfetamina (CART)<sup>27</sup>.

El núcleo **Paraventricular** (PVH/PVN) localizado en la parte superior del tercer ventrículo integra señales de numerosas regiones

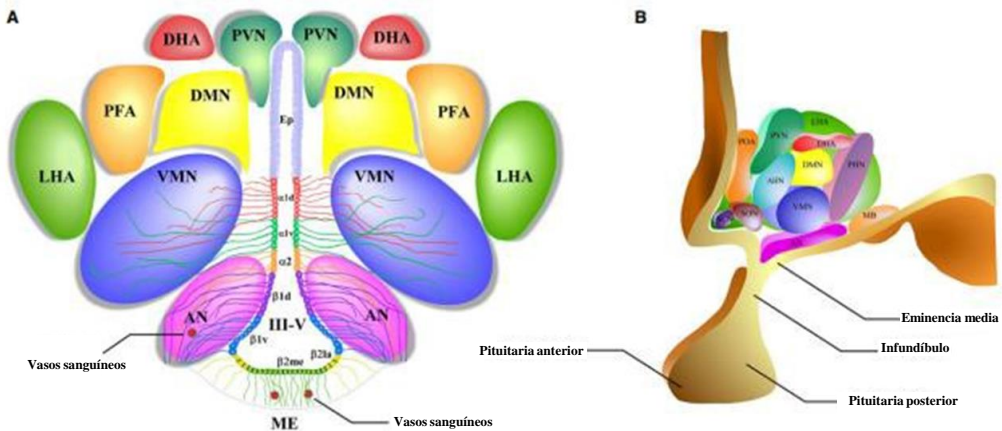
del SNC<sup>28</sup>. De tal manera, que las poblaciones de neuronas que expresan POMC/CART del ARC son capaces de potenciar la señalización del neurotransmisor inhibitorio ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) dando lugar a una respuesta anorexigénica mientras que las que expresan NPY y AgRP inhiben la señalización de GABA estimulando la ingesta<sup>29</sup>. Por tanto, este núcleo es también capaz de regular la ingesta y presenta funciones de respuesta al estrés.

El núcleo **Ventromedial** (VMH/VMN) es un núcleo normalmente asociado con la saciedad<sup>30</sup> que recibe proyecciones del ARC y a su vez dirige sus neuronas hacia los núcleos DMH, LHA y también hacia el tronco encefálico<sup>22</sup>. En este núcleo se expresan fundamentalmente dos factores: el factor neurotrófico derivado del cerebro (FNDC) y el factor esteroideogénico-1 (SF1) cuya función es regular el peso corporal<sup>31,32</sup>. Por último, es destacable el papel de este núcleo en la regulación de la termogénesis<sup>33,34,35</sup>.

El núcleo **Dorsomedial** (DMH/DMN) localizado en la región dorsal al VMH del que recibe sus proyecciones y presenta conexiones con otros núcleos (PVH y LHA) y con el tronco encefálico<sup>36</sup>. Contiene cuerpos celulares que expresan NPY causantes de la hiperfagia<sup>37</sup> y abundantes poblaciones neuronales que expresan el neuropéptido CART que probablemente actúan en respuesta al ayuno<sup>38</sup>.

El hipotálamo **Lateral** (LHA) también conocido como área hipotalámica lateral, es una región heterogénea que recibe gran cantidad de información<sup>39</sup>. Esta región limita medialmente con los núcleos DMH, VMH y ARC<sup>39</sup>. Anatómicamente, el hipotálamo lateral se puede dividir en porción anterior, porción tuberal y porción posterior<sup>40</sup>, y presenta un patrón de distribución en dos poblaciones neuronales distintas en las que unas expresan orexinas/hipocretinas (OX) y otras expresan la hormona concentradora de melanina (MCH)<sup>41</sup>. Ambas poblaciones neuronales reciben proyecciones procedentes del núcleo ARC de las neuronas AgRP/NPY y de las neuronas POMC/CART<sup>42</sup>. Además, estas poblaciones neuronales son

capaces de dirigirse a áreas extrahipotalámicas que regulan la ingesta y la actividad motora<sup>22</sup>.



**Imagen 3.** Representación esquemática de los núcleos hipotalámicos. Perspectiva coronal de la localización aproximada de los núcleos hipotalámicos (A). Vista sagital de la disposición de los núcleos hipotalámicos (B). Ep: ependimocitos; AN: núcleo arcuato; VMN: núcleo ventromedial; DMN: núcleo dorsomedial; PVN: núcleo paraventricular; DHA: área hipotalámica dorsal; PFA: área perifornical; LHA: área hipotalámica lateral; SCN: núcleo supraquiasmático; SON: núcleo supraóptico; POA: área preóptica; MB: cuerpos mamilares; ME: eminencia media; III-V: tercer ventrículo. Imagen procedente de la referencia (43). Licencia Creative Commons

## 2.2. SISTEMA NERVIOSO AUTÓNOMO: COMPOSICIÓN Y FUNCIONES

El Sistema Nervioso Autónomo (SNA) forma parte del sistema nervioso periférico capaz de regular procesos fisiológicos involuntarios como el ritmo cardíaco, la presión sanguínea, la digestión, la respiración, etc. De esta manera, se generan diversos circuitos entre los tejidos periféricos inervados por el SNA y el hipotálamo del SNC. Este sistema se subdivide en tres: Simpático, Parasimpático y Entérico<sup>44</sup>.

Los sistemas nerviosos simpático (SNS) y parasimpático (SNP) presentan fibras aferentes y eferentes capaces de transmitir la información al SNC para poder integrarla y así poder desarrollar una respuesta<sup>44</sup>. El SNS promueve la respuesta de lucha o huida siendo sus principales neurotransmisores la adrenalina y la noradrenalina<sup>45</sup>. Por el contrario, el SNP controla las funciones y actos involuntarios siendo el neurotransmisor principal de este sistema la acetilcolina<sup>45</sup>.

Por su parte el sistema nervioso entérico (SNE) es el responsable de la regulación de los procesos digestivos incluyendo las funciones de secreción y absorción, contracción y relajación, etc. Los neurotransmisores de este SNE son el óxido nítrico, la serotonina, y la acetilcolina, entre otros<sup>46,47</sup>. Este sistema se explicará más detalladamente en el apartado específico 3.1.

### **3. REGULACIÓN DE LA HOMEOSTASIS ENERGÉTICA POR LA ACCIÓN DE DIFERENTES ÓRGANOS**

Tanto el sistema gastrointestinal como diversos órganos incluyendo el hígado, el páncreas y los depósitos de tejidos adiposo permiten controlar la homeostasis energética mediante el envío de señales al SNC<sup>11</sup>.

#### **3.1. REGULACIÓN DE LA HOMEOSTASIS ENERGÉTICA POR EL TRACTO GASTROINTESTINAL: SISTEMA NERVIOSO ENTÉRICO Y SEÑALES HORMONALES**

El sistema nervioso autónomo (SNA) inerva el tracto gastrointestinal. Concretamente, la rama parasimpática presenta un efecto inhibitorio e incluye el nervio vago y los nervios pélvicos, mientras que la rama simpática presenta un efecto excitatorio a través los nervios

espláncnicos. Además, el tracto gastrointestinal posee su propio sistema nervioso denominado sistema nervioso entérico (SNE) que regula todas las funciones intestinales además de la motilidad del tracto gastrointestinal, la secreción exocrina pancreática y la liberación de las hormonas, entre otras<sup>11,48</sup>.

El SNE se va a encargar de integrar la información procedente del tracto gastrointestinal y proyectarla a través del SNA para que pueda llegar a las diversas áreas del SNC<sup>48</sup>.

El principal estímulo que recibe el tracto GI es la ingesta de alimentos que va a permitir estimular factores metabólicos, neuronales y endocrinos junto con factores visuales, olfatorios, emocionales y cognitivos para modificar y transformar el comportamiento con respecto a la ingesta<sup>20</sup>. Postprandialmente se van a incrementar los niveles de secreción de señales hormonales intestinales cuya función consiste en regular la saciedad a corto plazo alterando el tamaño y la frecuencia de las comidas.

Algunas de ellas se describen a continuación (Imagen 4):

**Ghrelina:** Se trata de una hormona clave en la regulación de la homeostasis energética que es secretada principalmente por las células oxínticas gástricas y por el intestino (células del duodeno, íleon, ciego y colon)<sup>49</sup>. Además, se ha detectado expresión de esta hormona en otros tejidos como testículos<sup>50</sup>, ovario<sup>51</sup>, corazón<sup>52</sup>, pituitaria<sup>53</sup> y placenta<sup>49</sup>. La administración central y periférica de la ghrelina en roedores produce un balance energético positivo que incrementa la ingesta produciendo una acumulación de los depósitos de grasa<sup>54,55,56</sup>. De esta manera, los niveles circulantes de ghrelina disminuyen tras la ingesta y se incrementan en situaciones de ayuno<sup>57,58</sup>. El efecto orexigénico de la ghrelina se lleva a cabo gracias a su unión con el receptor de secretagogos de la hormona de crecimiento (GHS-R)<sup>56</sup>. Se ha demostrado en experimentos realizados en roedores que la administración de ghrelina produce hiperfagia y genera obesidad<sup>59</sup>. Además, diversos estudios en humanos demuestran que la

administración intravenosa de esta hormona incrementa la ingesta<sup>60</sup>. La administración central de ghrelina actúa fundamentalmente en el núcleo ARC donde incrementa la expresión de los neuropéptidos NPY y AgRP expresados por las neuronas orexigénicas que también presentan el GHS-R<sup>54,55</sup>. Las acciones de la ghrelina también se encuentran reguladas por las neuronas del núcleo LHA que expresan OX y las neuronas del NTS del tronco encefálico<sup>54</sup>. En experimentos realizados en roedores deficientes (KO) en ghrelina o en su receptor (GHS-R) se demostró que, ante la presencia de una dieta alta en grasa, se encontraban protegidos frente al desarrollo de obesidad con un incremento del gasto energético y de la actividad locomotora<sup>61</sup>.

**Colecistoquinina (CCK):** Secretada por las células del duodeno y del yeyuno en respuesta a la ingesta de alimentos<sup>11,62</sup> presentando un efecto anorexigénico ya que cuando se bloquea el efecto de esta hormona mediante la administración farmacológica de un antagonista de CCK, se incrementa la ingesta en humanos<sup>63</sup>. Esta hormona se encuentra involucrada en el control a corto plazo en la ingesta regulando el tamaño y la duración de las comidas.

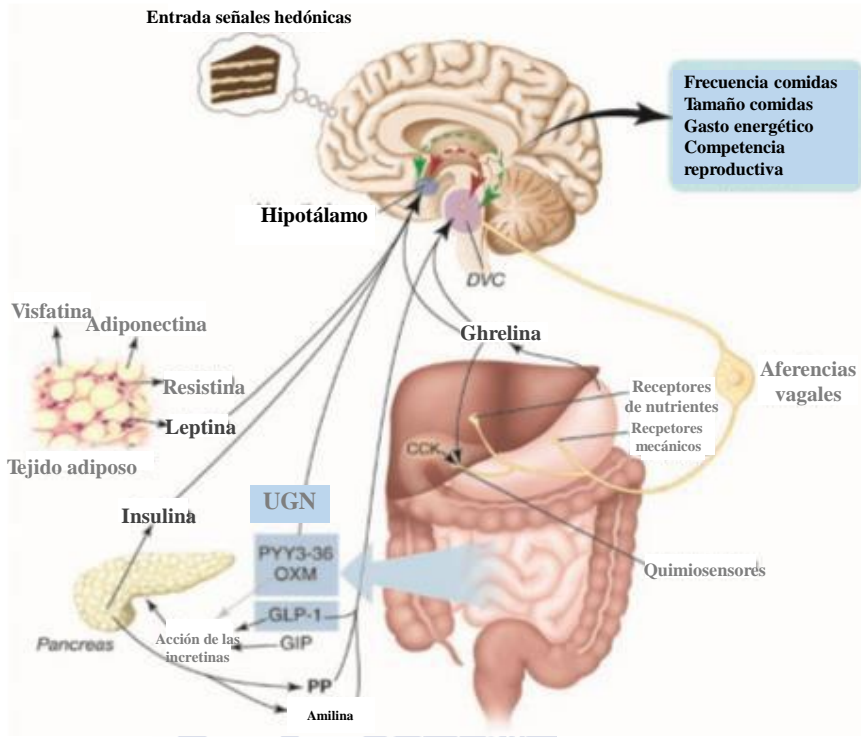
**Péptido similar al glucagón -1 (GLP-1) y oxintomodulina (OXM):** El gen preproglucagón es tejido específico, de tal manera que se procesa como glucagón en el páncreas, y, por otro lado, como los péptidos saciantes GLP-1 y la OXM en el intestino y en el NTS<sup>11,64</sup>. GLP-1 y OXM cuando son administrados de forma crónica disminuyen la ganancia de peso y la adiposidad en roedores<sup>65</sup>. Los efectos de estas hormonas se producen gracias a su unión con el receptor de GLP-1 presente en el hipotálamo y el tronco encefálico<sup>66</sup>.

**Péptido YY(PYY):** Secretado principalmente por las células de las partes distales del intestino, concretamente del íleon, colon y recto<sup>64</sup>. Su efecto anorexigénico se demuestra tras su administración periférica produciendo varios efectos como es el lento vaciado gástrico y el incremento de la absorción en el íleon promoviendo una reducción de la ingesta y del peso corporal<sup>67</sup>.

**Polipéptido inhibidor gástrico (GIP):** Secretado por las células duodenales en presencia de dietas con alto contenido en grasa. En experimentos realizados en roedores que no expresan el receptor de GIP se encuentran protegidos frente a la obesidad y la resistencia a insulina en presencia de una dieta alta en grasa. Este potencial resulta de vital importancia en el desarrollo de nuevos tratamientos antiobesidad<sup>68</sup>.

Además de todas estas hormonas que llevan a cabo la regulación de la ingesta a corto plazo, hay que destacar a la hormona gastrointestinal **uroguanilina (UGN)**, de gran importancia en el desarrollo del presente proyecto. En el punto 3.3. se van a presentar con más detalle las principales características y funciones de la UGN.

Por otro lado, es preciso destacar la acción de los sistemas de control a largo plazo que a través de determinadas señales periféricas se encargan de evaluar el estado en el que se encuentran los depósitos de energía almacenada<sup>2</sup>. Por ejemplo, la hormona insulina en el páncreas o las adipoquinas leptina, adiponectina o resistina producidas por el tejido adiposo (Imagen 4). Por último, es importante mencionar los estudios que demuestran que la manipulación genética o farmacológica de GLP-1 y PYY también tienen acciones de regulación a largo plazo. Por ejemplo, los ratones (KO) para PYY son obesos, y estos efectos se revierten con la administración de PYY<sup>69</sup>.



**Imagen 4.** El hipotálamo es capaz de integrar la información que recibe de las señales periféricas, ya sea para llevar a cabo una regulación tanto a corto plazo (GLP-1, CCK, UGN, Ghrelina) como la regulación a largo plazo (Insulina, Leptina). DVC: Complejo Vagal Dorsal; UGN: Uroguanilina; PYY3-36: Péptido YY; OXM: Oxintomodulina; GLP-1: Péptido tipo Glucagón-1; GIP: Polipéptido Inhibidor Gástrico; PP: Polipéptido Pancreático. Imagen procedente de la referencia (11). Con el permiso de AAAS (“The American Association for the Advancement of Science”).

### 3.2. REGULACIÓN DE LA HOMEOSTASIS ENERGÉTICA POR EL TEJIDO ADIPOSO: TIPOS, FUNCIÓN Y SEÑALES ENDOCRINAS

El estudio del tejido adiposo y de los adipocitos es fundamental para poder entender la disfunción metabólica que se produce en el estado patofisiológico de la obesidad. Es importante destacar que el adipocito actúa como una célula endocrina y funcional ya que es capaz de

integrar y enviar señales comunicándose con el SNC<sup>70</sup>. Las funciones principales de los adipocitos son: regular el metabolismo lipídico estableciendo un equilibrio entre los triglicéridos (TGs) que acumula y los ácidos grasos (FAs) que libera, catabolizar los TGs en FAs y glicerol necesarios en el metabolismo de la glucosa que realizan otros tejidos y secretar adipoquinas que llevan a cabo funciones biológicas específicas<sup>71</sup>. En la obesidad se produce un exceso de acumulación de masa grasa que genera una pérdida de funcionalidad del adipocito hipertrofiándose y desarrollando un desequilibrio entre los procesos de lipogénesis y lipólisis. Esta disfunción no se produce únicamente en los adipocitos, sino que el uso anormal de los ácidos grasos puede afectar a otros tejidos como el hígado, el páncreas o el corazón, entre otros<sup>70</sup>. Existen dos tipos de tejidos adiposos que presentan diferente estructura celular, localización, color, vascularización y función: el tejido adiposo blanco (*White Adipose Tissue*, WAT) y el tejido adiposo marrón (*Brown Adipose Tissue*, BAT).

### 3.2.1. Tejido adiposo blanco (WAT)

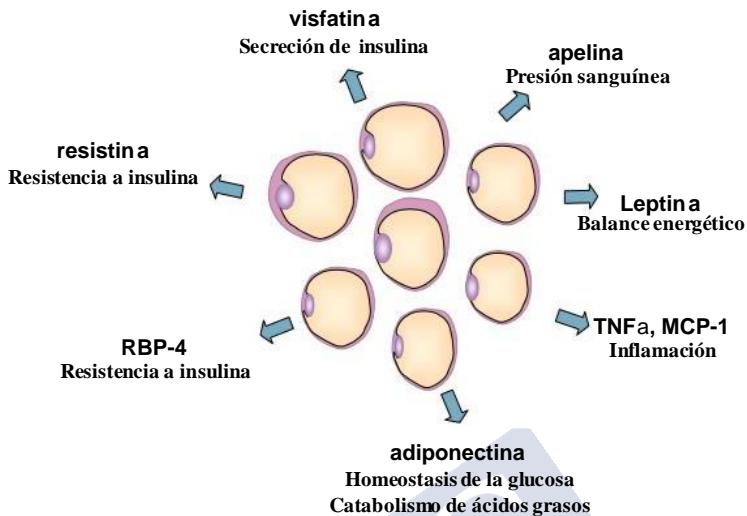
Los adipocitos que conforman el tejido adiposo blanco son capaces de liberar numerosas hormonas (Imagen 5), destacando la leptina, resistina, adiponectina, serpina, visfatina, quemerina, entre otras. Junto con ellas también se liberan citoquinas como TNF- $\alpha$ , IL-6, and MCP-1 participando en la migración celular y en procesos inflamatorios<sup>72</sup>.

De entre todas las adipoquinas secretadas, es necesario destacar de forma especial a la leptina.

#### **Leptina**

Descubierta por Friedman y cols. fue la primera adipoquina caracterizada y descrita codificada por el gen *ob*<sup>73</sup>. El producto proteico consta de 167 aminoácidos y de un peso molecular de 16 kDa y su función va a ser la de incrementar el gasto energético disminuyendo la ingesta. Esta función metabólica fue establecida a partir de estudios en los que se llevaban a cabo daños en diferentes

regiones hipotalámicas en ratones obesos<sup>74</sup>. Por lo tanto, esta hormona va a ser capaz de controlar el crecimiento del tejido adiposo a través de su acción en el SNC. Además, administraciones locales en determinadas regiones hipotalámicas dan lugar a una disminución de la ingesta y del peso corporal en modelos murinos<sup>75</sup>. Los estudios del mRNA (Ácido RiboNucleico mensajero) de la leptina la sitúan principalmente en el tejido adiposo, pero también se encuentra presente en otros tejidos como el ovario, el intestino y el hígado<sup>75</sup>. Los receptores de la leptina se encuentran en numerosas localizaciones entre las que destacan: diferentes regiones del hipotálamo, hígado, músculo esquelético, corazón, riñón y páncreas<sup>76,77,78</sup>. Es importante destacar que esta hormona presenta acciones endocrinas enviando señales al SNC, por un lado, pero también paracrinas y autocrinas gracias a la presencia de su receptor en los propios adipocitos que la secretan<sup>70</sup>. De tal manera que, en su función autocrina, la secreción de leptina permite activar la producción interna de mitocondrias adipocíticas que favorecen la oxidación de los lípidos acumulados. Además, esta hormona se encuentra involucrada en otros procesos como la hematopoyesis, la angiogénesis, la regulación de la respuesta inmune, etc<sup>79</sup>. En condiciones de obesidad en las que se produce un exceso de acumulación de lípidos en el tejido adiposo, se produce una resistencia a la acción de la leptina ya que la excesiva acumulación supera la capacidad de la hormona para activar el proceso de oxidación. En este punto, hay que destacar además el efecto que se produce en otros órganos como en el hígado, en el que el exceso de acumulación lipídica impide a la leptina activar los mecanismos de oxidación mediante la activación de PPAR $\alpha$ , generando por tanto esteatosis hepática. Además, el exceso de acumulación lipídica también afecta a otros órganos como el músculo esquelético, el corazón y el páncreas en los que la leptina no es capaz de ejecutar su acción<sup>80,81,82,83</sup>.



**Imagen 5.** Los adipocitos secretan numerosas moléculas con funciones endocrinas a las que se les denomina adipocinas, que son capaces de regular tanto el metabolismo de la glucosa y de los lípidos en tejidos periféricos como la homeostasis del gasto energético, la respuesta inflamatoria y la presión sanguínea, entre otras. En condiciones de obesidad y síndrome metabólico, se produce un desequilibrio en la secreción de algunas de las adipocinas que es capaz de secretar el adipocito. Imagen procedente de la referencia (70). Con permiso de Elsevier, número de licencia 4698231477313.

### 3.2.2. Tejido adiposo marrón (BAT)

En la búsqueda de los tratamientos para combatir la obesidad, se sugieren intervenciones que permitan incrementar el gasto energético que es una de las funciones llevada a cabo por el tejido adiposo pardo. Este tejido fue localizado inicialmente en embriones y adultos de ratón. Concretamente, en los animales adultos lo podemos encontrar en la zona dorsal interescapular, en las regiones subescapulares, en regiones axilares y también pequeños depósitos en la zona cervical del cuello entre la escápula y la cabeza, así como alrededor de la aorta y alrededor de los riñones<sup>84,85,86</sup>. El tejido adiposo pardo humano, se encuentra localizado en la región supraclavicular, en regiones cervicales, paravertebrales, mediastínicas y perirenales (región en la que también está presente en roedores)<sup>86,87,88</sup>.

La función principal de este tejido consiste en mantener la temperatura corporal de forma significativamente alta en relación con la temperatura ambiente gracias a la producción de calor mediante el proceso de termogénesis. Este proceso está mediado por la expresión de una proteína desacoplante específica del tejido, también denominada UCP1 (“*Uncoupling Protein-1*”) que se sitúa en la membrana interna de las mitocondrias que son las que le proporcionan esa tonalidad marrón. Por tanto, la función principal del BAT va a ser la de la termogénesis adaptativa mediante el desacoplamiento de la producción de ATP y la oxidación de sustrato, desembocando en una producción de calor y un incremento de la tasa metabólica<sup>89,90,91</sup>. Se ha comprobado que la actividad del BAT es cuatro veces mayor en individuos delgados que en individuos con sobrepeso u obesos<sup>92</sup>, lo que sugiere que el BAT presenta un control del peso corporal.

En general, se requiere la activación de todos los receptores adrenérgicos (*Adrenergic Receptors*, AR:  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\beta_3$ ) para integrar las señales de las catecolaminas procedentes del SNC e inducir la termogénesis, pero más exclusivamente del tipo  $\beta_3$ -AR que también se encuentra expresado en otros tejidos como en el músculo esquelético, liso o cardíaco, y en niveles bajos en el WAT<sup>93,94,95</sup>.

El efecto denominado *browning* o amarronamiento se ha comprobado en numerosos estudios en roedores, en los que determinados adipocitos del tejido adiposo blanco son UCP1 positivos y presentan propiedades muy similares a los adipocitos del BAT denominándose así, células beige o *brite* (*beige+white*). Este efecto es muy importante ya que supone que estos adipocitos adquieren un fenotipo termogénico ante estímulos como la exposición al frío, o a determinados factores endocrinos o incluso a compuestos químicos<sup>96,97,98,99</sup>. Además, se ha comprobado en diversos experimentos en roedores que el ejercicio induce el efecto *browning* en los depósitos del tejido adiposo blanco subcutáneo<sup>100</sup>. Hay que destacar, que en humanos adultos también se ha logrado caracterizar este tipo de tejido adiposo *brite*<sup>101</sup>.

Las diferencias estructurales importantes que existen entre el WAT, el tejido adiposo *brite* y el BAT (Imagen 6) son las siguientes: el WAT presenta adipocitos con gotas lipídicas extensas con núcleos periféricos; por otro lado, los adipocitos del BAT presentan un núcleo central, un citoplasma con pequeñas gotas lipídicas y gran cantidad de mitocondrias; y, por último, los adipocitos del *brite* presentan una mezcla de características entre las que tiene el WAT y el BAT<sup>102</sup>. Hay que destacar que el WAT y el *brite* se localizan principalmente en localizaciones viscerales (mesentérica, perigonadal u omental rodeando a los órganos) y subcutáneas<sup>103</sup>.



**Imagen 6.** Tipos de adipocitos. De izquierda a derecha; el adipocito característico del BAT, que presenta pequeñas gotas lipídicas y mitocondrias que dan el color pardo; en el centro el adipocito característico del tejido "*Brite*" que presenta características de los adipocitos del BAT y del WAT a la vez; a la derecha, el adipocito característico del WAT, con gotas lipídicas de gran tamaño.

### 3.3. HORMONA GASTROINTESTINAL UROGUANILINA (UGN)

En 1993, se descubrió la hormona uroguanilina (UGN) como ligando endógeno del receptor transmembrana GUCY2C (Guanilato Ciclasa 2C, también se denomina GC-C) que había sido identificado tres años antes en 1990<sup>104,105</sup>. La uroguanilina (UGN), también denominada GUCA2B (Activador del guanilato ciclasa 2B), es un péptido de 16

aminoácidos al que recientemente se ha atribuido un papel importante en la regulación de la homeostasis energética<sup>106</sup>.

La principal acción descrita hasta hace poco para la UGN era la natriuresis, de tal manera que una elevada ingesta de productos salados condicionaba la secreción endocrina de la hormona desde el intestino, actuando en los túbulos renales para ser capaz de regular el balance de los electrolitos<sup>107,108</sup>. Se ha descrito en roedores, que la administración tanto de proUGN como de UGN induce la excreción de sodio y, por el contrario los ratones deficientes en la hormona presentan hipertensión por poseer altas concentraciones del ion sodio que no son excretadas<sup>109</sup>. En los casos de los pacientes que poseen insuficiencia cardiaca podrían ser tratados con la UGN, ya que presentan funciones renales reducidas que consisten en una disminución del efecto natriurético y como consecuencia una reducida diuresis<sup>108,110</sup>.

Por otro lado, los efectos de la UGN sobre la homeostasis de la glucosa no se han esclarecido hasta el momento. Únicamente en el estudio de Begg y cols, se demostró que los ratones deficientes en UGN alimentados con dieta alta en grasa no mostraban alteración alguna en la tolerancia a glucosa. Sin embargo, cuando estos ratones se sometían a una prueba de tolerancia a alimentos mixtos (MMTT) mostraban niveles elevados de glucosa en sangre y resistencia a la insulina<sup>111</sup>.

En los siguientes puntos se llevará a cabo un estudio más pormenorizado sobre la función de la UGN en la regulación de la homeostasis energética.

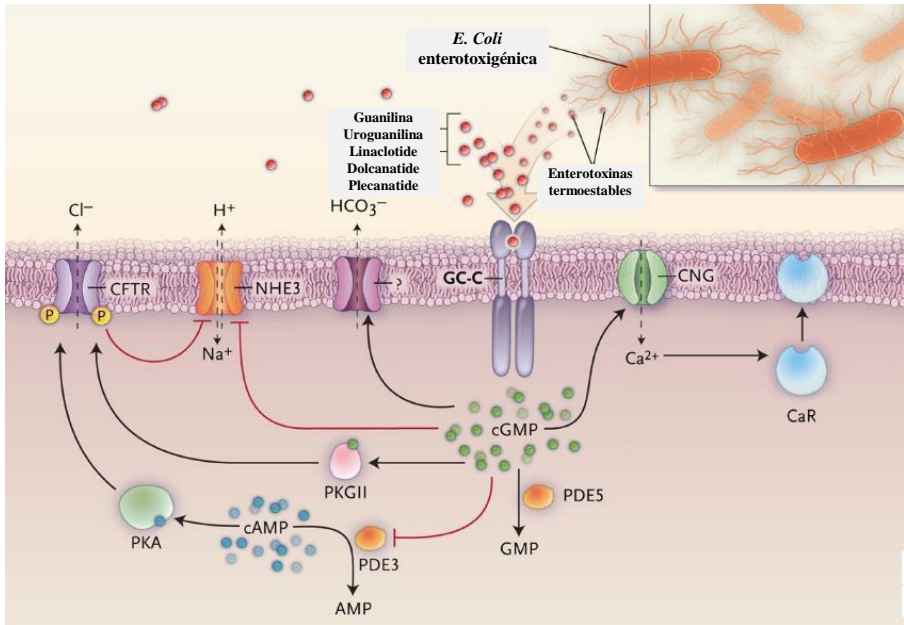
### **3.3.1. Mecanismo de acción de la uroguanilina**

La uroguanilina es secretada por las células epiteliales del duodeno como prohormona (proUGN) que sufre una conversión enzimática como UGN para unirse a su receptor GUCY2C y activar diversas cascadas intracelulares. Por su parte, el dominio catalítico del receptor es capaz de transformar el guanosín trifosfato en guanosín

monofosfato cíclico (cGMP) intracelular incrementando sus niveles. Diversos estudios en invertebrados demuestran que la señalización llevada a cabo por GUCY2C junto con el incremento de los niveles del cGMP son capaces de regular la ingesta de nutrientes<sup>112,113,114,115</sup>.

Las elevadas concentraciones de cGMP intracelular van a desencadenar las siguientes modificaciones en los enterocitos<sup>116,117,118,119</sup> (Imagen 7):

- Activación de la proteína quinasa dependiente de cGMP tipo 2 (PKGII), de la secreción de los iones bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ) por parte de los canales activados por cGMP hacia el lumen y de los canales iónicos de entrada de nucleótidos cíclicos (CNGs) que permiten el influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  cuyo incremento intracelular activa los receptores sensibles a calcio (CaR) promoviendo la diferenciación celular y la migración.
- Inhibición de la actividad de la fosfodiesterasa PDE3, lo que permite que se incrementen los niveles intracelulares de cAMP activando la proteína quinasa dependiente de cAMP (PKA). PKGII junto con PKA van a fosforilar y activar el regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística (CFTR) estimulando la secreción de iones cloruro ( $\text{Cl}^-$ ) hacia el lumen.
- Inhibición del intercambiador sodio hidrógeno (NHE) (comúnmente es NHE3 pero la única forma que no está presente en los enterocitos es NHE5) produciendo un gradiente osmótico electronegativo para mantener la homeostasis iónica.
- Por último, cGMP es capaz de hidrolizarse en GMP por la fosfodiesterasa dependiente de cGMP, PDE5.



**Imagen 7.** Representación del mecanismo de acción que permite activar el receptor GUCY2C/GC-C. Reproducido con permiso de (119). Copyright Massachusetts Medical Society.

En este punto, es importante destacar que una vez que se libera la forma inactiva de la hormona se llevan a cabo dos señalizaciones diferentes: una señalización paracrina y una señalización endocrina<sup>106</sup>. Por un lado, la señalización paracrina se realiza en el intestino donde la proUGN se convierte en UGN, para unirse al receptor GUCY2C presente en las células epiteliales del intestino desde el duodeno hasta el colon distal. Más allá de la secreción paracrina endoluminal en el intestino, la proUGN es capaz de realizar una secreción endocrina desde el intestino hacia la circulación sanguínea para llevar a cabo su acción en otros tejidos<sup>112</sup>. En experimentos realizados por Valentino y cols. demostraron que el receptor GUCY2C y la conversión enzimática de la hormona se llevaban a cabo también en el hipotálamo<sup>106,112</sup>. Por lo tanto, el receptor de la uroguanilina, GUCY2C, no se expresa únicamente en el intestino, sino que también se encuentra expresado en otros tejidos como el hipotálamo<sup>106,111,112,120,121,122</sup>.

### 3.3.2. Regulación de la producción intestinal de uroguanilina

Se ha descrito que la producción intestinal de UGN está regulada por el estado nutricional de forma directa correlacionando de esta manera con los niveles de UGN en plasma<sup>118,123</sup>. En ratones se ha encontrado que los niveles plasmáticos de proUGN se incrementan en respuesta a la ingesta de nutrientes<sup>112,118,123</sup>. Además, se ha demostrado que en estados de ayuno los niveles intestinales y plasmáticos de la hormona se encuentran disminuidos, y cuando estos animales son realimentados los niveles de UGN se reestablecen ya sea en presencia de dieta estándar como dieta alta en grasa<sup>123</sup>. En relación con la alimentación de estos animales, se ha comprobado en este estudio que los ratones alimentados con una dieta alta en grasa (hiperleptinémicos) presentan mayores niveles de UGN intestinales y plasmáticos comparando con los alimentados con dieta estándar<sup>123</sup>. Además, en este modelo de obesidad inducida por dieta hay que destacar que los niveles de expresión del receptor GUCY2C hipotalámicos no se encuentran alterados en el estado de obesidad<sup>118,123</sup>.

La regulación de la producción de UGN por el estado nutricional es dependiente de la leptina, una hormona que se produce en proporción al contenido en tejido adiposo del organismo y que presenta, al igual que la UGN, niveles bajos en estado de ayuno que son restaurados tras la realimentación<sup>118,123</sup>. Estudios experimentales en los que se refuerza la relación entre la producción de UGN y la leptina, describen que los ratones obesos *ob/ob* (deficientes en leptina) presentan una producción muy baja de UGN intestinal que se reestablece tras la administración de leptina<sup>123</sup>.

Por tanto, la producción de la hormona gastrointestinal UGN está regulada por el estado nutricional en función de los niveles de leptina.

Por otro lado, hay que destacar que estudios clínicos en individuos adultos que presentaban obesidad, demostraron que los niveles circulantes de proUGN se encontraban disminuidos en

relación con la adiposidad que presentaban los individuos<sup>124</sup>. Aquellos sujetos que fueron sometidos a cirugía bariátrica fueron capaces no solo de perder peso sino también de incrementar de forma significativa los niveles circulantes de la proUGN<sup>124</sup>. En relación concreta con los efectos de la cirugía bariátrica sobre la regulación de la proUGN en pacientes obesos, se destaca un estudio que define que los pacientes con obesidad asociada a diabetes tipo 2, presentan niveles de proUGN que se van a ver elevados una vez pasados sesenta minutos tras la cirugía bariátrica<sup>125</sup>. Además, en otro estudio se sugiere que el contenido calórico de los nutrientes que se ingieren podría variar las concentraciones de proUGN<sup>126</sup>.

### **3.3.3. Efectos farmacológicos de la administración de uroguanilina**

El eje intestino-cerebro, constituye una de las vías más relevantes en la regulación de la homeostasis energética. Se ha demostrado que la UGN juega un papel importante como un factor de saciedad formando parte de este eje, al ser capaz de regular la ingesta y el peso corporal<sup>106,112,115</sup>. Concretamente, la relevancia de la unión UGN endógena con GUCY2C en la regulación del peso corporal hasta hace poco era un tema controvertido. Por una parte, existe un trabajo que demuestra que ratones con deficiencia en el gen del receptor GUCY2C, los ratones *Gucy2c*<sup>-/-</sup> presentaban hiperfagia y exceso de adiposidad<sup>112</sup>. Sin embargo, un estudio posterior mostró que estos ratones no presentaban ningún tipo de alteración en cuanto al peso corporal, la adiposidad o la tolerancia a la glucosa<sup>111</sup>. Por último, hay que destacar que la administración sistémica de agonistas de GUCY2C reduce la ingesta en ratones control, sin embargo, este efecto no se aprecia en ratones deficientes en GUCY2C<sup>112</sup>.

Por otro lado, en el año 2016, un trabajo mostró por primera vez que el efecto anorexigénico descrito para la UGN a nivel central se producía cuando se administraba de forma crónica<sup>121</sup>. Estos estudios demostraron que la UGN administrada por vía central durante una

semana inducía una reducción en el peso corporal de ratones con obesidad inducida por dieta, un efecto que es independiente de la ingesta<sup>121</sup>. Además de esta disminución, se producía también una reducción en el contenido de grasa corporal como consecuencia de un incremento en el gasto energético. En concordancia con el incremento del gasto energético, se ha observado que la termogénesis en tejido adiposo pardo se encontraba activada tras el tratamiento con UGN<sup>121</sup>. También se ha descrito que la administración de la hormona ejercía efectos relevantes sobre el tejido adiposo blanco favoreciendo la movilización de lípidos desde los depósitos grasos subcutáneos. Más aun, esta administración central de UGN también inducía el fenómeno conocido como “*browning*” que consiste en la conversión del tejido adiposo blanco en tejido adiposo pardo lo cual contribuye al incremento de la termogénesis<sup>121</sup>.

El sistema nervioso simpático, con una función crucial en la comunicación entre el cerebro y el tejido adiposo, estaría mediando los efectos de la administración central de UGN, contribuyendo a la reducción en la grasa y el peso corporal en animales obesos tratados con la hormona. Sin embargo, los efectos de la UGN central no se limitan únicamente al tejido adiposo, ya que se ha demostrado también un incremento en la motilidad gástrica<sup>121</sup>. Este efecto se encuentra mediado por el sistema nervioso parasimpático y concretamente es el nervio vago el que se encarga de integrar este tipo de efectos gastrointestinales<sup>127</sup>. En este caso, se realizó una vagotomía a los ratones tratados con UGN a nivel central reduciendo de esta manera la motilidad gástrica como efecto independiente a los generados a nivel central por el tratamiento de la hormona y que se han descrito previamente<sup>121</sup>.

Una vez descrita la movilización de lípidos llevada a cabo en el tejido adiposo blanco gracias al tratamiento de la UGN por mecanismos centrales en modelos murinos, se ha comprobado que esta hormona es capaz de ejercer un efecto lipolítico en adipocitos viscerales humanos activando todas aquellas moléculas involucradas

en el proceso<sup>124</sup>. De esta manera, se puede considerar el tratamiento de la UGN para poder actuar frente al exceso de acumulación de grasa<sup>124</sup>.

Este estudio también presenta que los niveles circulantes de proUGN presentan un dimorfismo sexual en individuos obesos, ya que los sujetos masculinos poseen mayores niveles de la prohormona comparados con los femeninos. Sin embargo, no encuentran diferencias en los niveles de proUGN cuando estudian los sujetos delgados comparando entre los masculinos y los femeninos<sup>124</sup>.

Además, en este contexto de análisis en función del sexo de los pacientes, se destaca un estudio en niños que demuestra un dimorfismo sexual ya que existe una correlación negativa entre los niveles plasmáticos de proUGN y su IMC en niñas, y, por el contrario, esta correlación es positiva en niños. Además, existe una diferencia en la regulación de proUGN en función de la madurez sexual<sup>128</sup>.

### **3.3.4. Otros agonistas del receptor GUCY2C**

Además de la UGN, existen otras moléculas agonistas del receptor transmembrana GUCY2C que comparten una secuencia proteica común que es la que es reconocida por el receptor para su unión, al mismo tiempo que presentan conformaciones estructurales diferentes<sup>129,130</sup>. En primer lugar, hay que destacar a la guanilina (GN) o GUCA2A (Activador del Guanilato Ciclasa 2A) una hormona de 15 aminoácidos que se procesa siguiendo el mismo mecanismo de acción que la uroguanilina pero en este caso se secreta en el intestino grueso<sup>106,129,131</sup>. Por lo tanto, ambas hormonas suponen los ligandos endógenos de GUCY2C y su secreción luminal como propéptidos permite llevar a cabo una regulación del equilibrio electrolítico y de absorción de fluidos<sup>132</sup>. Además, las enterotoxinas bacterianas termoestables (STs) son capaces de unirse al receptor transmembrana y tras activarlo se produce una disminución de la absorción de fluidos generando diarrea aguda<sup>119,133,134</sup>.

Por otro lado, es necesario destacar a los agonistas sintéticos creados por parte de la industria farmacéutica, como el linaclotide que presenta una conformación estructural similar a la de la enterotoxina bacteriana termoestable<sup>130</sup> o el plecanatide y el dolcanatide que presentan características estructurales y funcionales más similares al ligando endógeno uroguanilina<sup>130,135,136</sup>.

Se han realizado numerosos estudios empleando tratamientos con estos agonistas sintéticos. Concretamente, estudios realizados en modelos preclínicos murinos demuestran que una administración oral de linaclotide de forma crónica provoca una reducción del peso corporal y de la adiposidad de forma independiente del tipo de dieta<sup>137</sup>. Además, es destacable que los ratones con obesidad inducida por dieta que eran tratados con linaclotide oral presentaban un elevado gasto energético que se veía reforzado por el incremento significativo de la temperatura interescapular del BAT acompañado de una reducción del tamaño de los adipocitos del WAT y una disminución de la esteatosis hepática<sup>137</sup>. Los efectos del linaclotide sobre el BAT y el peso corporal estaban mediados por el sistema nervioso simpático ya que los ratones tratados con el antagonista del receptor  $\beta_3$  adrenérgico eran capaces de revertir los efectos llevados a cabo por el linaclotide. Al mismo tiempo, se ha demostrado que la acción del linaclotide sobre la obesidad generada en los ratones que consumían una dieta alta en grasa, se interrumpía cuando el receptor GUCY2C hipotalámico, se encontraba parcialmente silenciado<sup>137</sup>.

### **3.3.5. Disfunciones en la señalización intestinal del receptor GUCY2C asociadas a enfermedades**

El epitelio del intestino se encuentra sometido a un proceso de renovación constante en el que los enterocitos siguen un eje criptavelloso con ciclos continuos de proliferación, migración, diferenciación, apoptosis y pérdida final de las células en el lumen. La señalización generada por GUCY2C permite mantener el equilibrio entre las células más diferenciadas localizadas en las vellosidades

próximas a la apoptosis y la regeneración por parte de las células situadas en la cripta. De hecho, el tratamiento llevado a cabo con dolcanatide permite mantener ese equilibrio celular disminuyendo la inflamación y la infiltración celular<sup>136,138</sup>.

Los pacientes con enfermedades inflamatorias intestinales crónicas (CIBD, Chronic Inflammatory Bowel Diseases) como son la enfermedad de Crohn y colitis ulcerativa presentan una disminución de la señalización de la ruta que es activada por el receptor de la uroguanilina, GUCY2C. Esta señalización juega un papel relevante en la regulación de balance de electrolitos que permiten una hidratación óptima de la mucosa intestinal secretando agua, cloruro sódico (NaCl) y bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ )<sup>139,140</sup>. Por lo tanto, la búsqueda de los tratamientos se centra en reactivar la señalización de la ruta<sup>140</sup>. En los casos en los que exista un exceso de inflamación pueden llegar a desarrollar cáncer de colon. De tal manera que, se considera que el receptor GUCY2C se va a encargar de mantener principalmente la integridad del intestino regulando su mecanismo de regeneración gracias a su acción como supresor de tumores<sup>141</sup>. Los roedores con una deficiencia en el gen *Gucy2c*, presentan cambios en la arquitectura de las criptas intestinales<sup>142</sup> conduciendo a una inestabilidad genómica y a una apoptosis atenuada<sup>141</sup>. Entre los tratamientos utilizados para tratar estas enfermedades destacan los agonistas sintéticos del receptor GUCY2C, como el linaclotide en el tratamiento de la enfermedad crónica de intestino irritable<sup>143</sup> o el plecanatide y el dolcanatide como tratamientos que suprimen la producción de citoquinas proinflamatorias en modelos murinos de colitis y también para que puedan controlar la patofisiología de la tumorigénesis colorectal<sup>135,136,144</sup>.

### **3.4. REGULACIÓN DE LA HOMEOSTASIS ENERGÉTICA POR EL HÍGADO: FUNCIONES Y METABOLISMO**

El hígado es el segundo órgano más grande después de la piel, representando entre un 1.5 y un 2.5 % de la masa corporal magra. Supone uno de los órganos más importantes ya que lleva a cabo una gran variedad de funciones, entre las que se encuentran funciones vasculares, inmunológicas, metabólicas, secretoras y excretoras. Centrándonos exclusivamente en las funciones metabólicas, el hígado juega un papel destacado en la regulación de la homeostasis energética gracias a su importante acción en el metabolismo de proteínas, glucosa, y lípidos<sup>145</sup>. Esta regulación varía dependiendo del estado nutricional del individuo.

#### **3.4.1. Regulación del metabolismo de la glucosa**

Los mecanismos involucrados en el metabolismo de la glucosa por parte del hígado son la glucólisis, la gluconeogénesis, la glucogenólisis y la glucogenogénesis<sup>146</sup>.

En condiciones normales de alimentación, todos los carbohidratos que se consumen son digeridos y procesados en el tracto gastrointestinal hasta convertirse en unidades de glucosa para posteriormente ser transportada como fuente de energía primaria a varios tejidos (Imagen 8), como por ejemplo el hígado, para generar energía en forma de ATP<sup>147</sup>. En la mayoría de los tejidos de los mamíferos y en concreto en los hepatocitos, se lleva a cabo el catabolismo de la glucosa (glucólisis) obteniendo como producto el piruvato. Posteriormente, en las mitocondrias, el piruvato va a transportarse al interior de la matriz mitocondrial y se convierte en acetil-CoA gracias a la reacción enzimática del complejo piruvato deshidrogenasa. Dentro de la mitocondria el acetil-CoA se va a incorporar al ciclo de ácidos tricarboxílicos o ciclo de Krebs, generando energía en forma de ATP. Además, también se va a generar nicotín adenín dinucleótido (NADH) y flavín adenín dinucleótido

(FADH<sub>2</sub>) que se incorporaran posteriormente a la cadena transportadora de electrones presente en la membrana interna mitocondrial que permite generar finalmente un aporte extra de energía en forma de ATP<sup>146</sup>. Cuando existe demanda energética en células que no presentan mitocondrias o están bajo condiciones de isquemia, el piruvato a partir de glicolisis anaeróbica da lugar al lactato, que finalmente también genera ATP<sup>146</sup>.

El exceso de carbohidratos en el hígado se va a acumular en forma de glucógeno gracias al mecanismo de glucogénesis<sup>148</sup>. Por el contrario, en condiciones de ayuno, el hígado se encarga principalmente de movilizar la glucosa para que esté disponible como principal fuente de energía para consumir por parte de tejidos como el cerebro o el músculo esquelético. Para ello, se produce un incremento de la hormona pancreática glucagón que inicia la cascada de quinasas que permite convertir el glucógeno en glucosa, gracias al mecanismo de la glucogenólisis<sup>147</sup>. Normalmente, este mecanismo se activa durante el período de ayuno nocturno para poder mantener la homeostasis de la glucosa. En los períodos de ayuno prolongado (más de 30 horas), los depósitos de glucógeno en el hígado se agotan y, por tanto, es necesario que otros precursores como el lactato (generado en el músculo esquelético) o el glicerol (liberado en la lipólisis del tejido adiposo en condiciones de ayuno), se presenten como una nueva fuente de generación de energía en forma de glucosa vía gluconeogénesis<sup>146</sup>.

### **3.4.2. Regulación del metabolismo de lípidos**

El hígado tiene un papel clave en la regulación del metabolismo lipídico y representa el eje de la síntesis de ácidos grasos y de lipoproteínas que permiten la circulación de los lípidos por el torrente sanguíneo. Disfunciones en estas rutas de síntesis y en las rutas moleculares relacionadas con la oxidación de ácidos grasos provocan la acumulación de gotas lipídicas en los hepatocitos originando la condición patológica de la esteatosis hepática. Esta patología, además,

se suele encontrar acompañada por un incremento de los niveles de ácidos grasos no esterificados (NEFAs) circulantes<sup>149</sup>.

### **3.4.2.1. Fuentes de energía hepática: origen y funciones principales**

Las fuentes de energía en el hígado son fundamentalmente los ácidos grasos y los triglicéridos (TGs). Las formas más comunes circulantes y de almacenamiento son los ácidos grasos mientras que los TGs son las formas más comunes no tóxicas de ácidos grasos, que se obtienen precisamente de la esterificación de los mismos junto con el glicerol-3-fosfato. Ambas fuentes de energía presentan su origen en varias vías moleculares como la lipogénesis *de novo* (LDN), los almacenes citoplásmicos de TGs, los ácidos grasos derivados de los restos de TGs unidos a lipoproteína o de los NEFAs circulantes que se liberan a partir del tejido adiposo (Imagen 8). Todo esto depende de la especie, del estado nutricional a corto o a largo plazo y del balance energético<sup>149,150</sup>.

El contenido de TGs en los hepatocitos se encuentra regulado por la actividad de determinadas rutas moleculares que facilitan la síntesis y esterificación de ácidos grasos, así como, la oxidación y la exportación a otros tejidos<sup>149</sup> (Imagen 8). Además, los TGs y los ésteres de colesterol (originados de la esterificación del colesterol con los ácidos grasos) son los que se almacenan en gotas lipídicas en los hepatocitos o se secretan a la circulación sanguínea como partículas de lipoproteínas de muy baja densidad (“*Very Low Density Lipoproteins*”, VLDL) (Imagen 8). Por otro lado, los ácidos grasos son capaces de incorporarse a los fosfolípidos que son las principales moléculas que componen las membranas celulares, y la capa superficial de las gotas lipídicas y de las partículas biliares. En las situaciones de ayuno, los ácidos grasos y los TGs almacenados son oxidados (Imagen 8) principalmente en la mitocondria generando tanto fuentes de energía que consumen las células como cuerpos cetónicos<sup>150</sup>.

### 3.4.2.2. Asimilación de ácidos grasos y transporte

Tras la ingesta de comida, la grasa que se consume es principalmente digerida en el intestino delgado y posteriormente absorbida por los enterocitos en los que los ácidos grasos se esterifican en TGs para ser secretados al sistema linfático intestinal en forma de quilomicrones (Imagen 8). Posteriormente viajan a través de la circulación sanguínea hasta alcanzar el hígado donde se liberan los NEFAs por lipólisis mediada por la lipoproteína lipasa (“*LipoProteinLipase*”, LPL) (Imagen 8). Algunos estudios en ratones que presentan una sobreexpresión de LPL específica de hígado, terminan desarrollando esteatosis hepática y resistencia a insulina<sup>150,151</sup>. Estos NEFAs entran en el hepatocito gracias a las proteínas de transporte de ácidos grasos, principalmente a través de CD36/FATP2 (“*Fatty Acid Transporter Protein2*”), FATP4 (“*Fatty Acid Transporter Protein4*”) y FATP5 (“*Fatty Acid Transporter Protein5*”). Curiosamente en estudios *in vivo* se ha comprobado que tanto la delección del gen *Fatp5* como la supresión parcial de *Fatp2* producen una disminución de la absorción de NEFAs por los hepatocitos, reduciendo de esta manera, la esteatosis hepática inducida por la dieta alta en grasa<sup>152,153</sup>. Además, los transportadores FATP2 y FATP4 son capaces de mediar el transporte de ácidos grasos de cadena larga (“*Long-Chain Fatty Acids*”, LCFAs)<sup>153,154</sup>. Estos LCFAs por su parte, se unen a las proteínas de unión a ácidos grasos que en el hígado específicamente son las L-FABP (“*Liver- Fatty Acid Binding Protein*”) que las transportan al núcleo para activar a una de las moléculas clave en el proceso de la  $\beta$ -oxidación que es PPAR $\alpha$ <sup>154,155</sup> (Imagen 9). En los ratones que con el gen *L-Fabp* deleccionado, presentan una disminución de la absorción de estos ácidos grasos suprimiéndose el mecanismo de  $\beta$ -oxidación, con una tendencia al incremento de los niveles de NEFAs y TGs<sup>155,156,157</sup>. Aunque hay estudios que demuestran que en estos ratones se produce un incremento de la expresión de la proteína transportadora de esteroides, SCP-2 (“*Sterol Carrier Protein-2*”) que se va a encargar de suplir

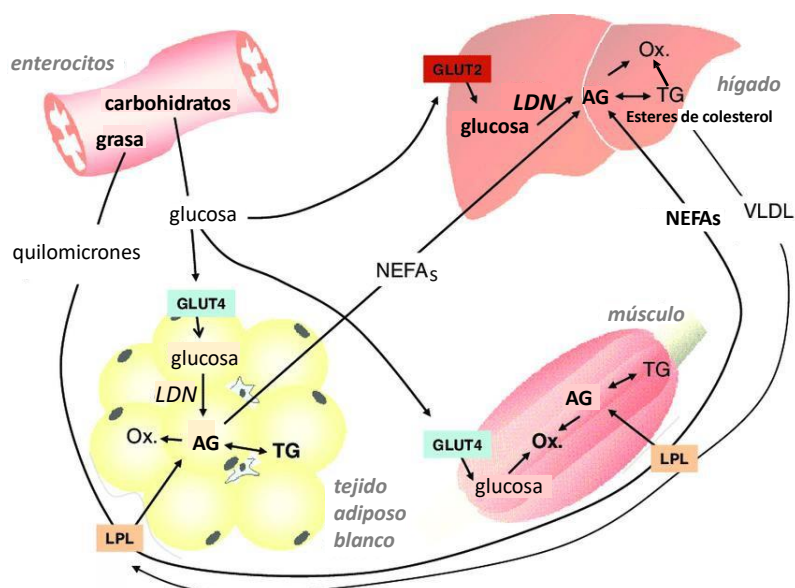
parcialmente la ausencia de L-FABP uniéndose a los LCFAs para incorporarlos al proceso de oxidación<sup>155</sup>.

### 3.4.2.3. Síntesis de ácidos grasos: lipogénesis *de novo* (LDN)

Para sintetizar ácidos grasos *de novo*, el hepatocito emplea la acetil-CoA procedente del catabolismo de la glucosa para convertirse gracias al enzima acetil-CoA carboxilasa (ACC, “*Acetyl-CoA Carboxilase*”) dando lugar a malonil-CoA<sup>150</sup> (Imagen 8). La inhibición transitoria de ACC produce una disminución de los niveles de malonil-CoA y por ende de la lipogénesis<sup>158</sup>.

Conjuntamente el compuesto malonil-CoA junto con el NADPH generado en el catabolismo de la glucosa actúan como precursores para formar el ácido palmítico de dieciséis carbonos, gracias a la actuación de la enzima sintasa de ácidos grasos, FAS (“*Fatty Acid Synthase*”)<sup>150</sup>. A partir de este momento, gracias a la presencia de determinadas enzimas se produciría la elongación del ácido palmítico dando lugar a LCFAs de mayor número de carbonos, además de otras enzimas cuya actuación va a permitir generar ácidos grasos mono y poliinsaturados<sup>150,159</sup>.

Otra vía por la que se incorporan LCFAs se produce en presencia de una dieta rica de carbohidratos, en la que un exceso de los mismos activa el mecanismo de lipogénesis generando nuevos ácidos grasos<sup>150</sup> (Imagen 8).



**Imagen 8.** Representación esquemática del metabolismo lipídico. La interacción entre el intestino, el hígado, el músculo esquelético y el tejido adiposo blanco en el contexto del metabolismo lipídico. LDN: Lipogénesis De Novo; AG: Ácidos Grasos; Ox.: Oxidación de ácidos grasos; TG: TriGlicéridos; NEFAs: Ácidos grasos no esterificados (“NonEsterified Fatty Acids”) GLUT: Transportador de glucosa (“GLUcose Transporter”); LPL: LipoProteinLipasa. Imagen procedente de la referencia (160). Con permiso de Elsevier, número de licencia 4803300660698.

#### 3.4.2.4. Oxidación de ácidos grasos y cetogénesis

El proceso de oxidación de ácidos grasos se lleva a cabo principalmente en la mitocondria, pero también, en los peroxisomas y en los microsomas. Concretamente en la mitocondria, este mecanismo va a proporcionar energía a los hepatocitos además de generar cuerpos cetónicos ( $\beta$ -hidroxibutirato, acetoacetato y acetona) que son exportados a la circulación para proporcionar las fuentes de energía metabólicas a los tejidos extrahepáticos<sup>150</sup>.

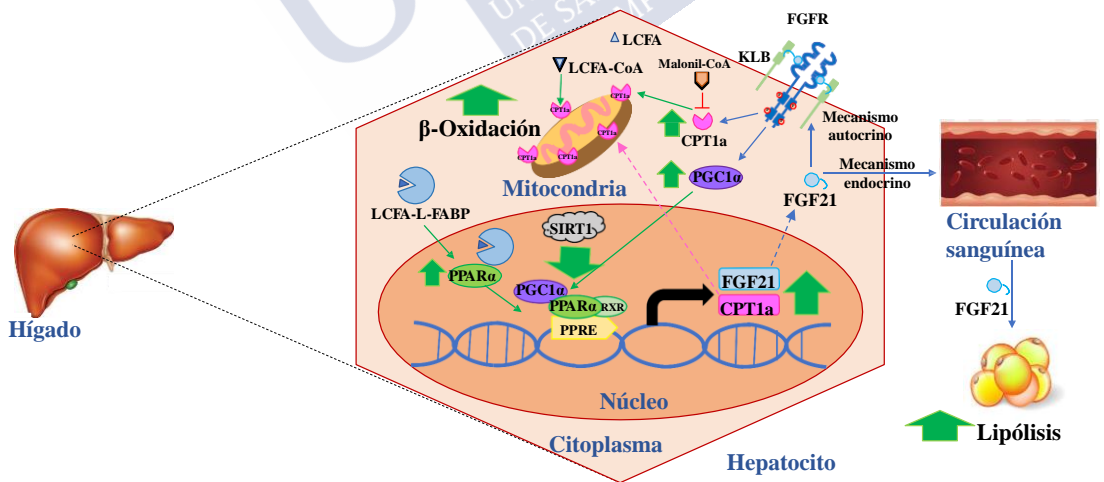
Una de las moléculas clave en el mecanismo de oxidación es PPAR $\alpha$  (“Peroxisome proliferator-activated receptor alpha”), que es capaz de regular este proceso tanto en la mitocondria como en los

peroxisomas<sup>161</sup>. La acción de esta molécula en la oxidación de ácidos grasos se va a desarrollar más adelante ya que supone una pieza fundamental en el desarrollo de este trabajo.

A continuación, es importante destacar las moléculas que actúan como coactivadores de PPAR $\alpha$ , como PGC-1 $\alpha$  (“*Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha*”) que es capaz de promover también la  $\beta$ -oxidación<sup>162</sup> (Imagen 9). Por encima de PPAR $\alpha$  y PGC-1 $\alpha$  situamos a SIRT-1 (Sirtuina-1) que es capaz de activarlos ya sea por interacción física, como ocurre con PPAR $\alpha$ , o por deacetilación como ocurre en PGC-1 $\alpha$ , promoviendo la activación del proceso de oxidación hepática<sup>163,164</sup> (Imagen 9). Estudios demuestran que la deleción específica del gen *SIRT1* en los hepatocitos disminuye la expresión de los genes que intervienen en la  $\beta$ -oxidación promoviendo un incremento de la acumulación de lípidos que da a lugar a la generación de una esteatosis hepática<sup>164</sup>. Otros coactivadores para destacar son PGC-1 $\beta$  (“*Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-betha*”) y TBL (“*Transducina beta tipo 1*”). La sobreexpresión específica en los hepatocitos murinos de PGC-1 $\beta$  va a incrementar la expresión de los genes  $\beta$ -oxidativos desarrollándose como factor de protección frente a la esteatosis hepática. Por otro lado, en el modelo de ratones KO para TBL en el hígado, se inhibe la actividad de PPAR $\alpha$ , disminuyendo de esta manera el proceso de oxidación y de cetogénesis, desarrollando esteatosis hepática<sup>165,166</sup>. También la lipina hepática 1 es capaz de unirse a PPAR $\alpha$  y PGC-1 $\alpha$  promoviendo la  $\beta$ -oxidación<sup>167</sup>.

Existen muchas moléculas que regulan la  $\beta$ -oxidación activadas por PPAR $\alpha$ . Entre ellas se encuentra FGF21 que a su vez es capaz de estimular la expresión de PGC-1 $\alpha$  en el hígado incrementando, por tanto, la oxidación de ácidos grasos (Imagen 9) y la cetogénesis<sup>168</sup>. Esta molécula presenta una expresión muy ligada al hígado ya que también es clave en la oxidación y, por tanto, se desarrollará en más profundidad, ya que resulta de especial interés en el desarrollo de este proyecto de tesis.

Los ácidos grasos presentan diferente longitud en sus cadenas. En general, se clasifican en ácidos grasos de cadena corta, de cadena media y de cadena larga (LCFAs). Todos ellos son metabolizados por  $\beta$ -oxidación hepática para poder eliminar dos carbonos del extremo carboxilo de la molécula por cada ciclo de oxidación. En concreto, cada LCFA va a ser activado uniéndose a la coenzima A formando el LCFA-CoA y de esta manera, va a ser posible que se transloque al interior de la mitocondria gracias al sistema Carnitina PalmitoilTransferasa (CPT) (Imagen 9). Por otro lado, la presencia de malonil-CoA (procedente del mecanismo de lipogénesis) es capaz de inhibir al sistema CPT, interrumpiendo de esta manera el proceso oxidativo<sup>169,170</sup> (Imagen 9). Por su parte, los ácidos grasos de cadena corta y media no necesitan ser activados por el sistema CPT para atravesar la doble membrana mitocondrial<sup>171</sup>. El sistema CPT resulta de bastante interés en el estudio de la  $\beta$ -oxidación ya que supone la entrada de los ácidos grasos para llevar a cabo su oxidación y, por tanto, su estudio se prolonga más adelante al resultar de vital importancia en este proyecto de tesis.



**Imagen 9.** Representación esquemática de las principales funciones llevadas a cabo por marcadores moleculares que intervienen en el proceso de  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos hepáticos.

### 3.4.2.4.1. Componentes clave en el desarrollo de la $\beta$ -oxidación

#### Receptores activados por proliferador de peroxisomas (PPARs)

Muchos estudios en diferentes campos han demostrado que los PPARs son receptores nucleares que participan en el metabolismo de nutrientes y de esta manera regulan la homeostasis energética celular y de todo el organismo en el metabolismo lipídico y de carbohidratos, en el crecimiento celular, en el desarrollo de cáncer, inflamación, etc. Por esta razón, los PPARs han resultado de gran importancia en la mejora de los síndromes metabólicos. Por tanto, el papel de los PPARs en las rutas metabólicas permite que estos factores estén en el primer plano de la investigación debido a sus potenciales efectos terapéuticos en futuras aplicaciones<sup>172</sup>.

#### Origen

El primer PPAR fue clonado a partir de hígado de ratón en 1990<sup>173</sup>, sin embargo, poco después, estos receptores fueron aislados por primera vez de *Xenopus laevis* e inducían la proliferación de peroxisomas en las células<sup>174</sup>.

#### Definición y tipos

Los PPARs son receptores nucleares que actúan como factores de transcripción y componen una superfamilia de receptores nucleares. Los tres isotipos de los receptores son PPAR $\alpha$  (NR1C1), PPAR $\beta/\delta$  (NR1C2) y PPAR $\gamma$  (NR1C3) y controlan diferentes funciones biológicas que modulan la homeostasis energética. Además, presentan diferentes patrones de expresión específicos de tejido<sup>175</sup>.

**PPAR $\alpha$**  : se expresa fundamentalmente en hígado, riñón, corazón, músculo y tejido adiposo marrón.

**PPAR $\beta/\delta$** : expresión fundamental en cerebro, tejido adiposo y piel.

**PPAR $\gamma$** : existen cuatro isoformas de esta proteína que se generan por *splicing* alternativo:

**$\gamma$ 1**: se expresa principalmente en todos los tejidos, incluyendo corazón, músculo, colon, riñón, páncreas y bazo.

**$\gamma$ 2**: se expresa fundamentalmente en el tejido adiposo.

**$\gamma$ 3**: se expresa en macrófagos, intestino grueso y tejido adiposo blanco.

**$\gamma$ 4**: se expresa fundamentalmente en células endoteliales.

### Estructura de los PPARs

La estructura modular que comparten los receptores nucleares PPARs es la siguiente<sup>176,177</sup>(Imagen 10):

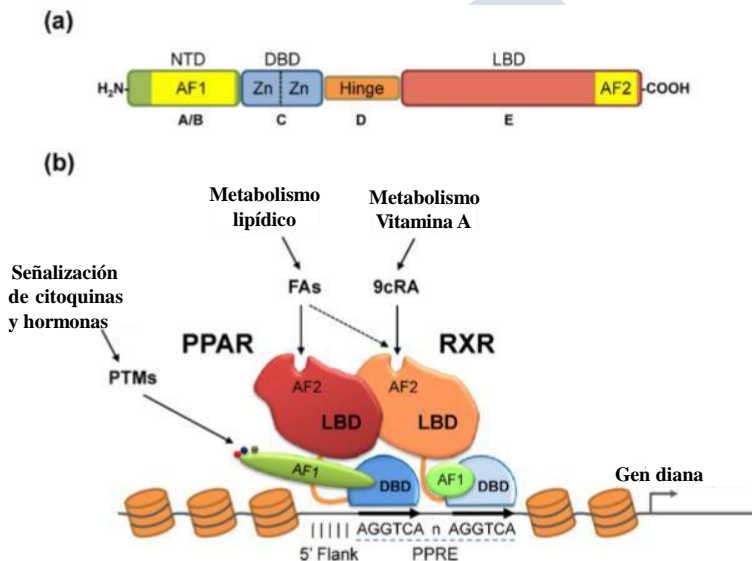
- Una región N-terminal, de gran variabilidad con una secuencia, denominada AF1 con capacidad intrínseca (independiente de ligando) de transactivación.

- Un dominio altamente conservado de unión al DNA (DBD, *DNA binding domain*), en la parte central que proporciona la especificidad de unión del receptor a regiones determinadas del promotor de los genes diana, que son conocidas como elementos de respuesta del proliferador de peroxisomas (PPRE, *Peroxisome Proliferator Response Element*). Este dominio presenta una mayor homología entre todos los receptores nucleares conocidos y está compuesto por dos estructuras típicas que son los denominados "dedos de zinc" (*zinc fingers*) que contienen secuencias de aminoácidos capaces de interactuar con átomos de zinc y adoptar una conformación espacial de tipo helicoidal para reconocer y adaptarse físicamente a secuencias específicas de DNA. De esta manera, se facilita la unión entre el receptor nuclear y las regiones específicas de promotores diana.

- Una región bisagra (*hinge*) que permite facilitar los cambios conformacionales permitiendo un correcto plegamiento del receptor cuando interactúa con elementos coactivadores o correpresores.

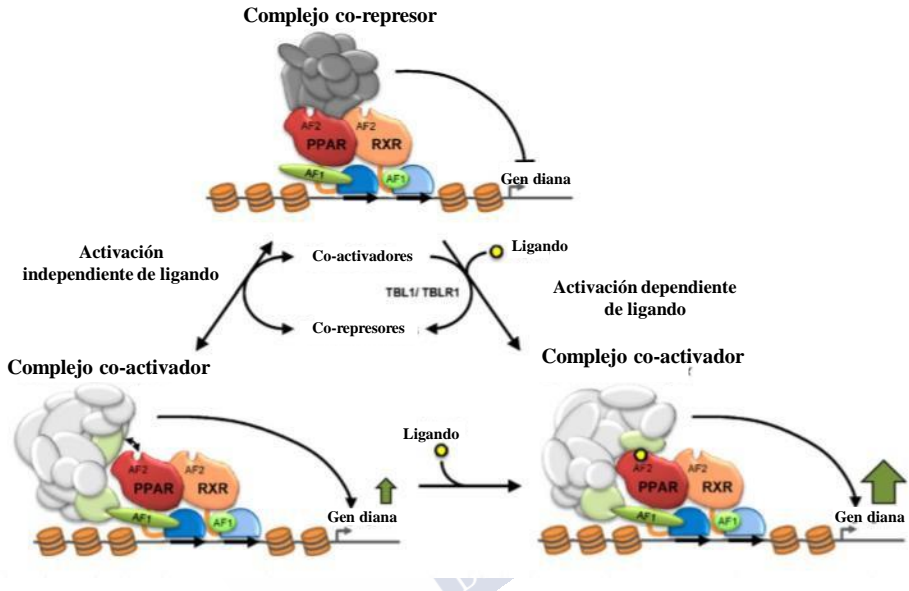
- Una región de unión al ligando (LBD, *ligand binding domain*), en el extremo C-terminal de la proteína que funciona como

un interruptor molecular. De tal manera que, en presencia de la molécula de ligando transforma al receptor de una forma transcripcionalmente inactiva a otra capaz de activar la maquinaria de transcripción celular. Esta región presenta una mayor variabilidad que la región de DBD. En la porción final de este extremo C-terminal se encuentra una secuencia de transactivación, la AF2, dependiente de ligando y capaz de interactuar con factores de coactivación necesarios para poner en marcha la maquinaria de traducción génica. Igualmente, en esta zona, así como en zonas adyacentes o superpuestas al DBD, se encuentran las secuencias causantes de la dimerización entre los diversos receptores nucleares.



**Imagen 10.** Los PPARs y su modo de acción. Estructura del dominio de los receptores nucleares. El dominio N terminal (NTD o dominio A/B) contiene la función de la activación independiente de ligando (AF1). El dominio altamente conservado de unión a DNA (DBD o dominio C) contiene dos dedos de Zinc. La región bisagra (dominio D) es altamente flexible. El dominio de unión a ligando (LBD o dominio E) contiene la función de activación dependiente de ligando (AF2) (a). Modelo simplificado del complejo transcripcional PPAR-RXR. Este complejo se une al elemento de respuesta al proliferador de peroxisomas (PPRE). La interacción entre la región bisagra de PPAR y la región 5'flanqueante de PPRE favorece esta polaridad (b). Imagen procedente de la referencia (176) Con permiso de Elsevier, número de licencia 4684230540333.

Para llevar a cabo la transactivación o la transrepresión de los genes diana por los receptores nucleares PPARs es necesario que se produzca una heterodimerización entre estos receptores y la familia de los receptores X retinoide (RXRs). Esta heterodimerización se produce entre los dominios LBDs y DBDs de ambos receptores<sup>177</sup>(Imagen 11).



**Imagen 11.** Los genes diana de los PPAR se activan de forma dependiente o independiente de ligando. Ante cualquier situación, el complejo PPAR-RXR se puede asociar tanto con complejos co-represores como con complejos co-activadores. La interacción con los complejos co-activadores se estabiliza gracias a los cambios conformacionales que lleva a cabo el dominio LBD de PPAR. TBL1, Transducina B tipo 1; TBLR1, Receptor de la TBL1. Imagen procedente de la referencia (176) Con permiso de Elsevier, número de licencia 4684230540333.

### Acción de los PPARs en el metabolismo

Los PPARs se encargan de llevar a cabo una regulación del metabolismo de nutrientes gracias al equilibrio que proporcionan en la regulación de la homeostasis de la glucosa, el metabolismo lipídico, metabolismo del colesterol y diversas rutas metabólicas activando un conjunto de genes que se encuentran implicados en estas rutas. Por lo

tanto, se consideran dianas terapéuticas muy importantes en el tratamiento de enfermedades metabólicas como es la diabetes tipo 2 o la enfermedad de hígado graso no alcohólico<sup>178</sup>.

### **PPARs en la homeostasis de la glucosa**

Los tres isotipos definidos de los PPARs llevan a cabo una función diferente en cuanto a la regulación del metabolismo glucídico y su mecanismo es dependiente de tejido. Por su parte, PPAR $\alpha$  va a promover una disminución de la glucólisis, favoreciendo la síntesis de glucógeno. Estos efectos se comprobaron en el músculo esquelético murino en presencia de elevados niveles de glucosa e insulina en plasma<sup>179,180</sup>. En el caso de PPAR $\gamma$ , se promueve la secreción de la insulina en las células  $\beta$  pancreáticas en respuesta al estímulo de glucosa y se incrementa la gluconeogénesis en el hígado<sup>181</sup>. Por último, PPAR $\beta/\delta$  se encarga de mejorar la glucólisis produciendo una disminución de la gluconeogénesis. También es capaz de reforzar la vía de las pentosas fosfato permitiendo una mejora de la sensibilidad a insulina<sup>182</sup>.

### **PPARS en metabolismo lipídico**

En general la función de los PPARs en el metabolismo lipídico es compleja y de suma importancia ya que son moléculas clave que favorecen la homeostasis lipídica. En concreto, PPAR $\alpha$  va a llevar a cabo una acción múltiple. Su función principal se centra en la oxidación de ácidos grasos acumulados en exceso en el hígado, favoreciendo un estado de protección frente a la lipotoxicidad. Además, en el tejido adiposo va a promover la activación de la lipólisis<sup>183,184</sup>. Por otro lado, PPAR $\gamma$  promueve el transporte de ácidos grasos al WAT para favorecer la síntesis y almacenamiento de lípidos<sup>185</sup>. En cuanto a PPAR $\beta/\delta$ , favorece el catabolismo de ácidos grasos en el músculo esquelético, inhibiendo la lipogénesis en el tejido adiposo<sup>186</sup>. Además, es capaz de activar los genes implicados en la termogénesis del BAT<sup>187</sup>.

Es importante destacar el papel de los PPARs en los modelos experimentales murinos que presentan obesidad inducida por dieta alta

en grasa. En esta situación fisiológica, la expresión de PPAR $\alpha$  se encuentra generalmente disminuida<sup>188</sup>. Las modificaciones que se producen en este receptor afectan al fenotipo de los modelos murinos. Por ejemplo, en ratones que presentan una delección de *Ppara* producen una acumulación de grasa en el tejido adiposo y en el hígado, además de presentar niveles elevados de triglicéridos en el suero<sup>189,190</sup>.

Por otro lado, en los modelos murinos de obesidad se ha comprobado que la expresión de PPAR $\gamma$  se encuentra elevada reduciendo el *browning* del tejido adiposo blanco inhibiendo el reclutamiento de SIRT1 a PPAR $\gamma$ <sup>191</sup>. Por último, PPAR $\beta/\delta$  se consideraba que no tenía ningún efecto sobre la homeostasis energética, sin embargo, se ha demostrado que es capaz de reducir los niveles de TGs, colesterol LDL y ácidos grasos libres en plasma<sup>192</sup>.

### **Acción de los PPARs en el hígado**

La expresión de los PPARs está presente en muchos órganos y son capaces de actuar como moduladores fisiológicos. De los tres isotipos de los PPARs la expresión proteica más elevada en hígado es la de PPAR $\alpha$ , aunque también los otros dos receptores presentan funciones importantes. Como ya se ha comentado anteriormente, su función principal es regular el metabolismo de ácidos grasos incluyendo el proceso de oxidación por parte de las mitocondrias y los peroxisomas y la remodelación de fosfolípidos<sup>193</sup>. Esta función es muy importante para hacerle frente al desarrollo de NAFLD y NASH, ya que se ha demostrado que al deleccionar el gen *Ppara* únicamente en el hígado, se genera un fenotipo de esteatosis hepática por lo tanto, se plantea que este receptor puede ser una diana potencial para el tratamiento de estas enfermedades metabólicas<sup>194,195,196</sup>. Por su parte, aunque la expresión de PPAR $\gamma$  en el hígado es baja, existen estudios que demuestran que su ausencia produce una reducción significativa del contenido en grasa y por el contrario, su sobreexpresión genera un estado de esteatosis hepática<sup>197</sup>. Por último, hay que destacar que PPAR $\beta/\delta$ , está presente en la regulación de los niveles de TGs y colesterol<sup>198</sup>.

### **Acciones de los PPARs en el estado de obesidad**

En los últimos 20 años, los PPARs han pasado de ser receptores desconocidos a poder tomar partido en los principales procesos fisiológicos y en diferentes situaciones, incluyendo las patológicas.

En el caso de la obesidad, estos receptores son capaces de interaccionar con las proteínas desacopladoras que van a participar en la regulación del gasto energético. Además, los co-activadores y los co-represores presentan funciones fisiológicas y moleculares relacionadas con el metabolismo energético del adipocito<sup>199</sup>. De los isotipos conocidos, el que más importancia cobra es PPAR $\alpha$  ya que es capaz de regular la dislipidemia reduciendo los niveles de TGs y HDL en plasma. Además, cabe destacar su potencial en la regulación de la oxidación de ácidos grasos ya descrito en lo relativo a la regulación del metabolismo hepático, que va a permitir menores niveles circulantes de TGs evitando de esta manera que se acumulen en el tejido adiposo. Sin embargo, hay que tener en cuenta que estos efectos se pueden ver afectados por la presencia de estrógenos lo que genera un dimorfismo sexual que permite una regulación diferencial del metabolismo lipídico en función del sexo. Con relación a la acción de los estrógenos, éstos son capaces de inhibir las acciones de PPAR $\alpha$  en la regulación del metabolismo lipídico en presencia de obesidad<sup>200</sup>.

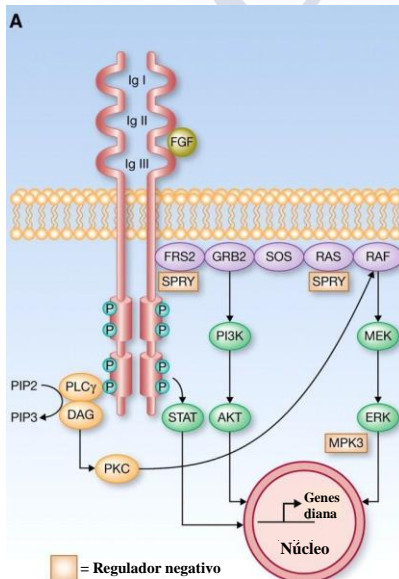
En cuanto al proceso de adipogénesis, los receptores participantes son PPAR $\beta/\delta$  y PPAR $\gamma$ . De tal manera, que el receptor PPAR $\gamma$  es el encargado de activar los genes que se encuentran principalmente involucrados en el proceso de crecimiento celular y la progresión del pre-adipocito hacia la generación de un adipocito maduro y diferenciado. Por su parte, PPAR $\beta/\delta$  promueve una estimulación de la diferenciación de los adipocitos<sup>201</sup>. Teniendo en cuenta estas acciones realizadas por ambos receptores, se propone la modulación de este mecanismo del tejido adiposo en el estado de obesidad.

### Familia de factores de crecimiento de fibroblastos (FGFs)

La superfamilia de FGFs (“*Fibroblast Growth Factors*”) está compuesta por 23 proteínas que a su vez se encuentran divididas en 7 subfamilias según su similitud filogenética. Las funciones que desarrollan son muy diversas entre las que se encuentran: crecimiento celular, organogénesis, diferenciación, supervivencia y metabolismo<sup>202</sup>.

### Estructura de los FGFs

Esta superfamilia está formada por dos grandes grupos. Por un lado, el grupo de 18 ligandos secretados que se pueden dividir a su vez en dos subfamilias: los FGF tipo hormona (FGF19, FGF21, FGF23) y los FGF canónicos (FGF1-10, FGF16-18, FGF20)<sup>203</sup>. Por otro lado, se encuentran los receptores de los FGFs (FGFRs) que son receptores transmembrana formados por 3 dominios extracelulares tipo inmunoglobulinas (D1-D3), y un dominio intracelular tipo tirosina quinasa. Estos receptores se encuentran codificados por 7 isoformas: 1b,1c,2b,2c,3b,3c y 4<sup>204,205</sup> (Imagen 12).



**Imagen 12.** Estructura y señalización de FGFR. Estructura básica de FGFR y su señalización molecular(A). FGFRs son receptores transmembrana de tipo tirosina quinasa que se componen de un dominio extracelular compuesto por tres dominios tipo inmunoglobulina (Igl-III) y un dominio tirosina quinasa intracelular. Su activación consiste en formar un complejo entre el ligando FGF, los proteoglicanos heparán sulfato o las proteínas transmembrana  $\beta$ -Klotho y FGFR para dar lugar a la dimerización y transfosforilación de varios residuos de tirosina en la porción intracelular de FGFR. Imagen procedente de la referencia (203). Con permiso de la American Association for Cancer Research.

### **Mecanismo de acción de los FGFs**

Los FGFs se encuentran secuestrados por proteoglicanos heparán sulfato (HPSGs) en la matriz extracelular. Para activarse, es necesaria la acción de las proteasas o proteínas específicas de unión a FGF que permiten liberarlos para que se puedan unir a la superficie de los receptores FGFRs formando el complejo ternario: FGF-FGFR-HPSG y se produzca la propagación de la señal<sup>206</sup>.

Los FGFs tipo hormona presentan mayor afinidad por las proteínas transmembrana  $\beta$ -Klotho que, por los HPSGs, para poder unirse a los receptores FGFRs y formar el complejo<sup>207</sup>.

La señalización se produce cuando se dimeriza el complejo ternario dando lugar a una modificación conformacional resultando en una transfosforilación intermolecular producida en el dominio tirosina quinasa intracelular<sup>208</sup>.

Como consecuencia, se produce la activación de la señalización de numerosas cascadas intracelulares como la de las MAPKs (“*Mitogen- Activated Protein Kinases*”), la ruta PI3K/Akt o también la ruta de señalización dependiente de STAT<sup>208</sup>. Además, existe una regulación muy estricta, lo que supone un sistema de señalización multifactorial y de formación del complejo que involucra a múltiples funciones biológicas<sup>203</sup>. A partir de este punto, se van a desarrollar más en profundidad los FGFs endocrinos, entre los cuales se encuentra FGF21 que resulta de interés en este trabajo.

### **FGFS endocrinos o tipo hormona**

Los FGFs endocrinos según se han descrito son FGF19, FGF21 y FGF23 y se encargan de jugar un papel muy importante en la regulación de la homeostasis metabólica. Los dos primeros, FGF19 (FGF15 en roedores) y FGF21 son los responsables del mantenimiento del peso corporal y la homeostasis metabólica gracias a la regulación del metabolismo de la glucosa y de los lípidos. Por su

parte, FGF23 se encarga de la regulación en el equilibrio de los minerales y la homeostasis de la vitamina D<sub>3</sub> en la salud ósea<sup>209</sup>. De estos tres, el que alcanza mayor relevancia en este proyecto es FGF21 por su papel en la regulación de la homeostasis energética.

### **Factor de crecimiento de fibroblastos 21 (FGF21)**

#### **Origen**

FGF21 fue descubierto por primera vez en el año 2000 por Nishimura y cols. que consiguió aislar el cDNA del gen codificante a partir de embriones murinos y de muestras humanas. En sus estudios pudo definir que la mayor expresión de mRNA de FGF21 se encontraba en el hígado, y también en niveles más bajos, en el timo<sup>210</sup>.

#### **Funciones fisiológicas de FGF21**

Existen numerosos estudios que demuestran la faceta multifactorial que presenta FGF21 cuando actúa como regulador metabólico. En experimentos de ratones que son KO para *Fgf21*, la falta de esta molécula sugiere acciones de regulación del metabolismo glucídico, lipídico y de la homeostasis energética de gran importancia<sup>211</sup>. Por otra parte, hay que destacar que los niveles circulantes de FGF21 son elevados en pacientes obesos, con diabetes tipo 2<sup>212</sup>, y también en pacientes que se encuentran afectados a nivel hepático desde etapas tempranas de esteatosis hepática, generando NAFLD por el exceso de acumulación lipídica y llegando a desarrollar cirrosis y cáncer hepático<sup>213</sup>. Además, en estudios con modelos de ratones DIO, ratones genéticamente obesos conocidos como *ob/ob* y los genéticamente diabéticos *db/db*, también presentan niveles elevados de FGF21. Por lo tanto, se trata de una característica fisiológica ligada al estado de obesidad, el hecho de presentar niveles endógenos de FGF21 elevados que no son capaces de activar los mecanismos moleculares que permitan una mejora de la condición fisiológica. Sin embargo, en los estudios con ratones obesos a los que se les administró posteriormente FGF21 a dosis farmacológicas se produjo una

activación molecular de los mecanismos que permitían una pérdida de peso corporal y una mejora de los parámetros metabólicos<sup>214</sup>.

Por tanto, se puede decir que en un estado de obesidad existe una resistencia a la acción de FGF21 sugiriendo que, su papel principal es llevar a cabo la restauración la homeostasis metabólica<sup>214</sup>.

Tras comprobar todos estos efectos podemos decir que FGF21 se trata de una molécula que se va a producir principalmente en el hígado, pero que también tiene presencia en el músculo esquelético, tejido adiposo blanco y pardo, intestino, corazón, riñones y páncreas<sup>215</sup>. Concretamente en el WAT, FGF21 es capaz de incrementar la expresión de GLUT1 y por tanto mejorar la absorción de glucosa<sup>216</sup>. Además, FGF21 se puede considerar como una adipoquina, ya que es sintetizada y liberada por el propio WAT, y también presenta acciones complementarias a la adiponectina<sup>217</sup>, incrementando la sensibilidad a la insulina, mejorando el perfil lipídico reduciendo de esta forma los niveles de glucosa y asegurando la disponibilidad de la energía en los períodos de ayuno<sup>218,219</sup>. Otro de los mecanismos de FGF21 que han tomado gran importancia, es la capacidad de inducir el proceso de “*browning*” en el WAT presentando un gran potencial para el tratamiento de enfermedades como la obesidad y la diabetes tipo 2<sup>220</sup>.

En los estados de resistencia a insulina en humanos, los niveles de FGF21 presentan una correlación positiva con el desarrollo del síndrome metabólico, el estrés oxidativo severo y la presencia de la diabetes tipo 2<sup>221,222,223</sup>. Otras condiciones fisiológicas capaces de incrementar los niveles circulantes de FGF21 son la lactancia<sup>224</sup>, el ejercicio<sup>225</sup>, el tratamiento con la hormona de crecimiento<sup>226</sup> y la anorexia nerviosa<sup>227</sup>.

De esta manera, FGF21 es considerado como una buena opción terapéutica en el tratamiento de enfermedades metabólicas. De hecho, existen numerosos análogos de FGF21 que se encuentran en ensayos clínicos en fase 2 y fase 3<sup>228,229</sup>.

## Sistema carnitina palmitoiltransferasa (CPT)

### Origen

En 1977, se llevaron a cabo estudios *in vitro* en los que se describió la inhibición de la oxidación de ácidos grasos por el sustrato malonil-CoA en mitocondrias aisladas y su correlación con la inhibición de la actividad del sistema CPT, que podía ser medida de forma intacta<sup>230,231</sup>. De esta manera, se pudo destacar el importante papel que ejerce el compuesto malonil-CoA que es el primer intermediario de la lipogénesis, para evitar que dos procesos como la síntesis y la oxidación de ácidos grasos se produzcan de forma simultánea<sup>232,233</sup>.

De esta manera, se logró estudiar el mecanismo del sistema CPT que se encuentra formado por dos enzimas (CPT1 en la membrana externa y CPT2 en la membrana interna) que son capaces de catalizar dos reacciones de transesterificación de tal forma que los LCFAs marcados con la coenzima A se convierten en ácidos grasos de cadena larga portando el grupo carnitina por la acción de CPT1. Gracias a este grupo, los ácidos grasos son capaces de atravesar la doble membrana mitocondrial para llegar a la matriz gracias a la acción de una acilcarnitina translocasa (CACT o CPT2) la cual elimina finalmente el grupo carnitina quedando el ácido graso de cadena larga con el grupo CoA que ya dentro de la mitocondria comenzaría su proceso de oxidación<sup>233</sup>.

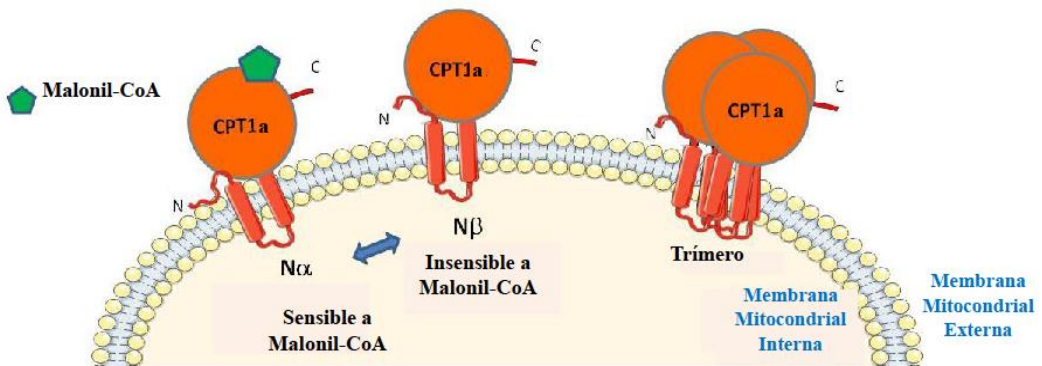
### Isoformas del sistema CPT-1

Los mamíferos expresan tres isoformas del sistema CPT1: CPT1a, CPT1b y CPT1c codificadas por diferentes genes y que presentan diferentes características bioquímicas y una distribución tejido dependiente. De las tres la más ampliamente distribuida es CPT1a ya que está presente en las mitocondrias de los siguientes tejidos: hígado, pulmones, páncreas, intestino, riñones, ovarios y cerebro<sup>233</sup>. El gen que codifica para CPT1a se localiza en el

cromosoma 11 y codifica una proteína con un peso molecular de 88kDa<sup>234,235</sup> (Imagen 13).

Por su parte, CPT1b se trata de la isoforma que no está presente en el cerebro, pero sí se puede encontrar en el músculo esquelético, el corazón, los testículos, el tejido adiposo blanco y el tejido adiposo pardo<sup>236</sup>. El gen que codifica a la proteína se encuentra en el cromosoma 22.

La última isoforma, CPT1c, se expresa fundamentalmente en el cerebro, pero también está presente en los testículos. El gen que codifica a la proteína se encuentra en el cromosoma 19<sup>237,238</sup>. A diferencia de las otras dos isoformas, CPT1c se encuentra incrustado en el retículo endoplasmático y presenta una baja actividad catalítica de transesterificación *in vitro*<sup>238</sup>.



**Imagen 13.** Mecanismo conformacional de CPT1a. La conformación de CPT1a se va a encontrar modificada en función a su sensibilidad al malonil-CoA, ya que los residuos localizados en el extremo N-terminal actúan como determinantes positivos o negativos en función de su sensibilidad a este metabolito<sup>239,240,241</sup>. Además, estos cambios de la sensibilidad también se han asociado con la homo-oligomerización o heteroasociación con otras proteínas<sup>242</sup>. Pero también su conformación va a depender de la composición y la curvatura de la membrana<sup>243</sup>. Imagen procedente de la referencia (244). Con permiso de Elsevier, número de licencia 4706060928396.

A continuación, de las tres isoformas se va a desarrollar la función que lleva a cabo la isoforma CPT1a en el proceso de oxidación de ácidos grasos hepáticos, ya que su estudio resulta de bastante interés en este proyecto de tesis.

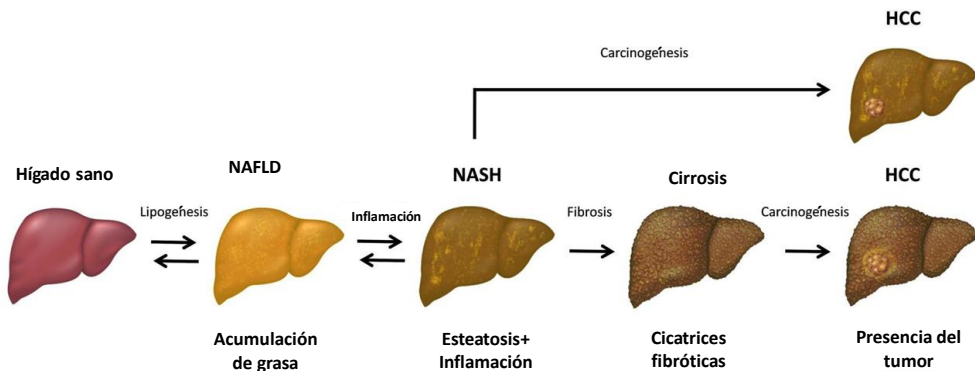
### **Función principal de CPT1A en la $\beta$ -oxidación de ácidos grasos e impacto en el metabolismo hepático**

En general, el sistema CPT ocupa una posición importante en la regulación del metabolismo. Centrándonos en la actividad de la isoforma CPT1a, su acción consiste en mantener el equilibrio de los ácidos grasos ya que es capaz de regular la concentración de LCFAs presentes en el citosol, gracias a que les facilita su procesamiento introduciéndolos en la mitocondria<sup>232</sup>.

De hecho, en condiciones en las que existen disfunciones en la mitocondria se produce un escaso o deficiente mecanismo de oxidación, dando lugar, por ejemplo, a una acumulación de esteres de cadena corta y media en el músculo generando una condición de resistencia a la insulina<sup>245</sup>.

La esteatosis hepática consiste en una acumulación de lípidos en el citoplasma de los hepatocitos. En el hígado al menos el 5% de su peso o el 5% de los hepatocitos contienen vacuolas lipídicas en ausencia de factores secundarios como un exceso en la ingesta de alcohol, infección viral o tratamiento de fármacos<sup>246</sup>. Inicialmente una acumulación de grasa intrahepática suele provocar hepatoprotección, pero el exceso de grasa puede suponer un factor de riesgo<sup>247</sup>.

Para evaluar la gravedad de esta enfermedad existe un sistema de grados: grado 0 (hígado con menos del 5% de grasa), grado 1 (entre un 5% y un 33% de grasa), grado 2 (entre un 34% y un 66% de grasa) y grado 3 (más del 66% de grasa)<sup>248</sup>. Por tanto, se puede evolucionar desde un hígado graso no alcohólico (NAFLD) hasta una esteatohepatitis no alcohólica (NASH), y en casos más severos hasta una fibrosis, cirrosis e incluso llegar a generar hepatocarcinoma (Imagen 14)<sup>246</sup>.



**Imagen 14. La progresión y las etapas del NAFLD.** A partir del estado de esteatosis se puede evolucionar hacia un estado de NASH que finalmente desemboca en cirrosis y hepatocarcinoma celular (HCC) o directamente HCC. Imagen procedente de la referencia (254). Con permiso de *Frontiers in Physiology*.

El NAFLD se suele desarrollar en presencia de obesidad lo que conlleva una resistencia a insulina, diabetes tipo 2, hiperlipidemia, hiperglicemia y una hipertensión arterial. Algunos estudios demuestran una asociación entre el hígado graso no alcohólico y la resistencia a insulina no necesariamente en presencia de obesidad, al igual que también se asocia a un incremento de la gluconeogénesis<sup>246,249</sup>.

Actualmente no existe ningún fármaco aprobado para el tratamiento de NAFLD. En la actualidad, se están estudiando nuevas terapias que se encuentran en el estado de ensayo clínico en humanos. Entre ellas, el agente GS-9450 (Inhibidor de la caspasa: permite inhibir la apoptosis que se produce en los hepatocitos mejorando las condiciones fisiológicas), el agente GFT-505 (Agonistas de PPAR $\alpha$  y PPAR  $\beta/\delta$  que en modelos animales han mostrado una reducción en la esteatosis y en la expresión de los genes proinflamatorios)<sup>250</sup>.

Por último, en los casos en los que los tratamientos farmacológicos no permitan una mejora en los pacientes con una condición avanzada de la enfermedad, se puede llevar a cabo la cirugía bariátrica. Muchos estudios mostraron que una cirugía bariátrica provoca una pérdida de peso que permitió resolver hasta un 75% los casos que presentaban esteatosis, hasta un 90% los casos con esteatohepatitis y un rango de 30-50% en los casos en los que existía fibrosis, dependiendo del grado en el que se situaba la patología<sup>251,252,253</sup>.

# **OBJETIVOS**

---





Los objetivos que se plantean en este proyecto de tesis se dividen en función de la naturaleza de los experimentos:

**Estudios experimentales *in vitro* empleando un modelo celular humano**

1. Estudiar el efecto del tratamiento con la hormona gastrointestinal uroguanilina en un modelo celular de esteatosis hepática y los mecanismos moleculares implicados.
2. Determinar el papel del receptor GUCY2C y de PPAR $\alpha$  en el mecanismo de  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos activado por el tratamiento con uroguanilina en el modelo celular hepático.

**Estudios experimentales *in vivo* empleando modelos murinos**

3. Investigar el efecto producido por el tratamiento con el agonista del receptor GUCY2C, linaclotide, sobre el peso corporal y la adiposidad en los modelos murinos.
4. Estudiar el efecto del tratamiento con linaclotide en la regulación del metabolismo lipídico hepático murino y los mecanismos moleculares implicados.
5. Determinar el papel del receptor GUCY2C y de PPAR $\alpha$  en el mecanismo de  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos activado por el tratamiento con linaclotide en los hígados murinos.



# **MATERIALES Y MÉTODOS**

---





Para desarrollar este proyecto de tesis doctoral, se llevaron a cabo dos vías complementarias.

Por un lado, se comenzó el proyecto con una experimentación *in vitro* en la que se desarrollaron una serie de experimentos empleando la línea celular hepática humana HepG2.

Por otro lado, en base a los experimentos realizados en las células, se desarrolló una experimentación *in vivo* empleando el modelo experimental murino, *Mus musculus*

## **1. PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTACIÓN *IN VITRO***

### **1.1. CULTIVOS CELULARES**

La línea celular utilizada en los procedimientos de experimentación *in vitro* se denomina HepG2, *Human Caucasian Hepatocyte Carcinoma*. (la línea celular se obtuvo de la ECACC, a través de *Sigma-Aldrich*, Misuri, USA). Se trata de una línea celular inmortalizada derivada de una biopsia de tejido hepático de un niño de quince años caucásico que presentaba un hepatocarcinoma celular bien diferenciado. Esta línea celular presenta una morfología epitelial, y un crecimiento en grupos o colonias con capacidad adherente a la superficie de la placa de cultivo.

Estas células se crecieron en medio de cultivo DMEN, (*BE-12-741F*, *Dulbecco's Modified Eagle Medium*, Lonza, Pontevedra, España) y suplementado con un 10% de Suero Bovino Fetal, (*99610270106*, *FBS*, *Fetal Bovine Serum South America*, *Gibco Thermo Fisher Scientific*, Massachusetts, USA), y un 1% de Penicilina/Streptomycin (*15140122*, *Gibco Thermo Fisher Scientific*, Massachusetts, USA).

Las células se crecieron en condiciones de 37°C con un 5% de CO<sub>2</sub>. Cuando alcanzaban una confluencia del 70-80% se llevaba a cabo un pase 1:2 o 1:4 usando tripsina/EDTA 0.05% en rojo fenol (101525300054, *Gibco Thermo Fisher Scientific*, Massachusetts, USA). Para la congelación de estas células en Nitrógeno líquido se utilizó DMSO (D8418, *DiMetilSulfóxido*, *Sigma-Aldrich*, Misuri, USA) preparado al 10% en medio de cultivo.

## 1.2. TRATAMIENTOS CELULARES

### 1.2.1. Tratamiento con ácido oleico

Para llevar a cabo un tratamiento que induzca la acumulación de ácidos grasos citoplasmáticos en las células hepáticas se utilizó el ácido oleico (O1383, *OA, Oleic Acid*, *Sigma-Aldrich*, Misuri, USA).

En todos los experimentos en los que se llevó a cabo este tipo de tratamiento se utilizó a una concentración de 1mM unido a BSA (A-7906, *Bovine Serum Albumine*, *Sigma-Aldrich*, Misuri, USA) siguiendo una proporción 2:1. En el grupo control las células únicamente se trataron con BSA. El tratamiento de ácido oleico se llevaba a cabo durante 24 horas en un incubador a 37°C y un 5% de CO<sub>2</sub>. La tinción que se realizó para poder observar la acumulación de grasa citoplasmática es la tinción Oil Red O de tipo diazol con solubilidad lipídica y es capaz de teñir lípidos neutros y ésteres de colesterol. Esta técnica se explicará con más detalle en el punto 3.4 de Material y métodos.

### 1.2.2. Tratamiento con el antagonista de PPAR $\alpha$ (GW6471)

Para llevar a cabo el tratamiento con el antagonista de PPAR $\alpha$ , GW6471 (4618, *CAS Number: 880635-03-0*, *ToCris Bioscience*, Bristol, UK) en los cultivos celulares HepG2, este compuesto fue disuelto en DMSO para ser preparado a una concentración de 2  $\mu$ M.

Este tratamiento se realizó en aquellos grupos de células en los que se quería antagonizar la expresión de esta proteína ya que se considera principal en el metabolismo concretamente, en el proceso de  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos. El tratamiento se realizó durante 24 horas en un incubador a 37°C y un 5% de CO<sub>2</sub> y normalmente al mismo tiempo que el tratamiento con ácido oleico. Posteriormente para comprobar el efecto del tratamiento, se realizaron experimentos de análisis proteico por Western Blot y de tinción de ácidos grasos utilizando la tinción de Oil Red O.

### **1.2.3. Tratamiento con la hormona uroguanilina (UGN)**

El tratamiento con la hormona gastrointestinal uroguanilina (421661000, UGN, Bachem Holding, Bubendorf, Suiza) se llevó a cabo sobre los grupos de células HepG2, en los que se quería estudiar la acción de esta hormona en el metabolismo lipídico. Los grupos de células tratados con UGN presentaban el medio DMEN libre de FBS con una concentración de la hormona de 100nM. Tras el tiempo de tratamiento, se realizaba un doble lavado con PBS y posteriormente, se llevaba a cabo la experimentación correspondiente para estudiar el efecto que producía esta hormona en las células, ya sea con estudios de análisis proteico por Western-Blot o de tinción de ácidos grasos con Oil Red O para determinar su efecto sobre la acumulación lipídica.

## **1.3. DISEÑOS EXPERIMENTALES *IN VITRO***

Los tratamientos descritos en el punto 1.2 fueron desarrollados en diversos experimentos en los que se combinaron varios tratamientos dentro de un mismo diseño experimental. Por tanto, los diseños experimentales que se desarrollaron fueron los siguientes:

### 1.3.1. Efecto del tratamiento con la uroguanilina en un modelo de esteatosis hepática y mecanismos moleculares implicados

#### 1.3.1.1. Establecimiento de un modelo de esteatosis hepática en la línea celular humana, HepG2

En primer lugar, quisimos reproducir el exceso de acumulación lipídica en los hepatocitos empleando el ácido oleico. Por ello el primer experimento se llevó a cabo en los siguientes grupos experimentales: grupo vehículo (V) y grupo ácido oleico (OA). Se empleó la técnica de tinción Oil Red O para poder analizar la acumulación lipídica citoplásmica.

#### *DISEÑO EXPERIMENTAL descrito en la Tabla 1*

Tinción Oil Red O	DÍA 0	DÍA 1	DÍA 2
V	Siembra de células	Tratamiento Vehículo OA	Lavado y fijación Tinción ORO
OA	Siembra de células	Tratamiento OA [1mM]	Lavado y fijación Tinción ORO

Tabla 1: Diseño experimental modelo esteatosis hepática *in vitro*.

#### 1.3.1.2. Efecto del tratamiento de la hormona gastrointestinal uroguanilina sobre el modelo de esteatosis hepática *in vitro*

Tras haber establecido el modelo de esteatosis hepática *in vitro* en la línea celular hepática HepG2, se llevó a cabo un experimento con varios grupos experimentales para poder estudiar el efecto de la hormona gastrointestinal uroguanilina sobre la esteatosis hepática. Por ello se aplicaron tratamientos de uroguanilina (100nM) durante tres tiempos diferentes: treinta minutos, noventa minutos y ciento ochenta minutos. Posteriormente se realizó la tinción Oil Red O para teñir los lípidos citoplásmicos.

**DISEÑO EXPERIMENTAL** descrito en la **Tabla 2**

Tinción Oil Red O	DÍA 0	DÍA 1	DÍA 2	
OA (30 mins)	Siembra de células	Tratamiento OA [1mM]	Tratamiento Vehículo UGN durante 30 mins	Lavado y fijación Tinción ORO
OA+UGN (30 mins)	Siembra de células	Tratamiento OA [1mM]	Tratamiento UGN [100nM] durante 30 mins	Lavado y fijación Tinción ORO
OA (90 mins)	Siembra de células	Tratamiento OA [1mM]	Tratamiento Vehículo UGN durante 90 mins	Lavado y fijación Tinción ORO
OA+UGN (90 mins)	Siembra de células	Tratamiento OA [1mM]	Tratamiento UGN [100nM] durante 90 mins	Lavado y fijación Tinción ORO
OA (180 mins)	Siembra de células	Tratamiento OA [1mM]	Tratamiento Vehículo UGN durante 180 mins	Lavado y fijación Tinción ORO
OA+UGN (180 mins)	Siembra de células	Tratamiento OA [1mM]	Tratamiento UGN [100nM] durante 180 mins	Lavado y fijación Tinción ORO

Tabla 2: Diseño experimental del tratamiento de la uroguanilina [100nM] a distintos tiempos.

### 1.3.1.3. Estudio de los mecanismos moleculares involucrados en la acción de la uroguanilina sobre el metabolismo lipídico hepático

Una vez se ha comprobado que el efecto lipolítico de la hormona gastrointestinal uroguanilina (100nM) se produce a los 90 minutos sobre las gotas lipídicas acumuladas en el citoplasma de las células, realizamos un estudio de las dianas moleculares que participan en el metabolismo lipídico hepático, para comprobar cuáles de ellas presentaban cambios en la expresión proteica en presencia del tratamiento con uroguanilina. Para poder estudiar la expresión proteica se utiliza la técnica de Western-Blot que se describe con más detalle en el punto 3.1 de este apartado de Material y métodos.

**DISEÑO EXPERIMENTAL** descrito en la Tabla 3

Expto Western-Blot	DÍA 0	DÍA 1	DÍA 2	
V	Siembra de células	Tratamiento Vehículo OA	Tratamiento Vehículo UGN durante 90 mins	Lisis celular y Western-Blot
OA	Siembra de células	Tratamiento OA [1mM]	Tratamiento Vehículo UGN durante 90 mins	Lisis celular y Western-Blot
OA+UGN	Siembra de células	Tratamiento OA [1mM]	Tratamiento UGN [100nM] durante 90 mins	Lisis celular y Western-Blot

Tabla 3: Diseño experimental para evaluar el efecto del tratamiento de la uroguanilina sobre los marcadores moleculares del metabolismo lipídico hepático.

### 1.3.2. Papel del receptor GUCY2C hepático en el efecto de la UGN sobre la esteatosis hepática.

#### 1.3.2.1. Tratamiento del silenciamiento parcial del receptor GUCY2C con un siRNA específico

Para estudiar el efecto que producía la uroguanilina a través de su unión con el receptor GUCY2C, se decidió bloquear parcialmente la expresión del receptor y estudiar el efecto que producía en la ruta molecular que era capaz de activar. Para poder interferir en la expresión del gen que codifica para el receptor utilizamos un siRNA (“*small interference RNA*”, Ácido RiboNucleico de interferencia). En la Tabla 4 se detallan las características de los siRNAs empleados.

siRNA	Concentración	Composición	Referencia y casa comercial
siControl negativo	5 nM	Pool de cuatro siRNAs que no se dirigen a una secuencia específica	D-001810-1005, GE Healthcare Dharmacon Inc., Colorado, USA
siGUCY2C ON-TARGET plus	5 nM	siRNA que interfiere en la secuencia GUCY2C	L-0053 28000005, GE Healthcare Dharmacon Inc., Colorado, USA

Tabla 4: RNAs de interferencia empleados en los experimentos *in vitro*

Los siRNA fueron transfectados en las células HepG2 con Lipofectamina 2000(10151166830, *Invitrogen*<sup>TM</sup>, California, USA). A partir de este punto de transfección, se realizaron diversos tratamientos en función de los objetivos de los experimentos, pero en todos garantizando una actuación de los siRNA de 48 horas. Tras ese

tiempo, las células fueron procesadas de diversas maneras según la finalidad de los experimentos: ya sea para experimentos de tinción de lípidos con Oil Red O, análisis génico por Q-PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa Cuantitativa) o proteico por Western Blot.

En primer lugar, para comprobar el silenciamiento génico de la expresión del receptor GUCY2C se llevó a cabo un estudio mediante PCR Cuantitativa (Q-PCR) por SYBR Green cuyo método completo se describe más adelante en el punto 3.2.

***DISEÑO EXPERIMENTAL descrito en la Tabla 5***

Expto Q-PCR	DÍA 0	DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3
V	Siembra de células	Transfección siRNA (Control negativo) [100nM]	Lavado y cambio de medio	Extracción RNAm y Q-PCR
siGUCY2C	Siembra de células	Transfección siGUCY2C [100nM]	Lavado y cambio de medio	Extracción RNAm y Q-PCR

Tabla 5: Diseño experimental de la comprobación del silenciamiento parcial del receptor GUCY2C por la acción del siRNA.

**1.3.2.2. Efecto del silenciamiento parcial del receptor GUCY2C en el mecanismo molecular activado por la UGN en la línea celular hepática HepG2**

Una vez comprobado el silenciamiento producido por el siRNA del receptor GUCY2C, se realizó una tinción de ácidos grasos Oil Red O para estudiar este efecto sobre la acumulación de gotas lipídicas.

***DISEÑO EXPERIMENTAL descrito en la Tabla 6***

TINCIÓN OIL RED O	DÍA 0	DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3
V	Siembra de células	Transfección Vehículo siRNA	Lavado y cambio de medio	Lavado y fijación Tinción ORO
si (-)	Siembra de células	Transfección si (-) [100nM]	Lavado y cambio de medio	Lavado y fijación Tinción ORO
siGUCY2C	Siembra de células	Transfección siGUCY2C [100nM]	Lavado y cambio de medio	Lavado y fijación Tinción ORO

Tabla 6: Diseño experimental del efecto del silenciamiento parcial del receptor GUCY2C sobre la acumulación lipídica citoplasmática.

A continuación, teniendo en cuenta el efecto del silenciamiento del receptor GUCY2C sobre las gotas lipídicas que se acumulaban en el citoplasma de las células tras el tratamiento con ácido oleico, se quería determinar si el efecto observado para la UGN sobre la acumulación de lípidos estaba mediado por el receptor GUCY2C. Para ello, se realizó una tinción Oil Red O.

Paralelamente se llevó a cabo un experimento para estudiar el efecto de estos tratamientos sobre la expresión proteica de los marcadores activados por la UGN que intervienen en el proceso de oxidación de ácidos grasos. Por ello, empleamos la técnica de Western-Blot (descrito en el punto 3.1.) para estudiar la expresión proteica de las dianas moleculares.

**DISEÑO EXPERIMENTAL** descrito en la **Tabla 7**

Tinción Oil Red O Expto Western-Blot	DÍA 0	DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3		
	V	Siembra de células	Transfección Vehículo siRNA	Tratamiento Vehículo OA	Tratamiento Vehículo UGN durante 90 mins	Lavado y fijación Tinción ORO
OA	Siembra de células	Transfección Vehículo siRNA	Tratamiento OA [1mM]	Tratamiento Vehículo UGN durante 90 mins	Lavado y fijación Tinción ORO	Lisis celular y Western Blot
si(-)+OA	Siembra de células	Transfección si(-) [100nM]	Tratamiento OA [1mM]	Tratamiento Vehículo UGN durante 90 mins	Lavado y fijación Tinción ORO	Lisis celular y Western Blot
siGUCY2C+OA	Siembra de células	Transfección siGUCY2C [100nM]	Tratamiento OA [1mM]	Tratamiento Vehículo UGN durante 90 mins	Lavado y fijación Tinción ORO	Lisis celular y Western Blot
OA+UGN	Siembra de células	Transfección Vehículo siRNA	Tratamiento OA [1mM]	Tratamiento UGN [100nM] durante 90 mins	Lavado y fijación Tinción ORO	Lisis celular y Western Blot
siGUCY2C+OA+UGN	Siembra de células	Transfección siGUCY2C [100nM]	Tratamiento OA [1mM]	Tratamiento UGN [100nM] durante 90 mins	Lavado y fijación Tinción ORO	Lisis celular y Western Blot

Tabla 7: Diseño experimental del efecto del tratamiento del siGUCY2C y también del tratamiento con uroguanilina sobre la acumulación lipídica citoplasmática y la activación de los mecanismos moleculares implicados en presencia de ácido oleico.

### 1.3.3. Papel de PPAR $\alpha$ sobre la oxidación de ácidos grasos activada por la hormona uroguanilina

Dentro de las vías moleculares analizadas en los experimentos anteriores, una de las dianas moleculares que interviene en la cascada de oxidación de ácidos grasos es PPAR $\alpha$ . Por tanto, se planteó antagonizar farmacológicamente esta molécula para poder estudiar su implicación cuando queda bloqueada en presencia del tratamiento con UGN en el contexto del metabolismo lipídico hepático.

Para ello, se realizaron estudios basados en el efecto de la UGN cuando la vía PPAR $\alpha$  se encuentra bloqueada tanto sobre la acumulación de lípidos citoplasmáticos (tinción Oil Red O) como sobre la expresión proteica de las dianas moleculares que participan en la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos hepáticos (Western-Blot).

#### *DISEÑO EXPERIMENTAL descrito en la Tabla 8*

Tinción Oil Red O  Expto Western-Blot	DÍA 0	DÍA 1	DÍA 2		
	V	Siembra de células	Tratamiento Vehículos (OA y GW6471)	Tratamiento Vehículo UGN durante 90 mins	Lavado y fijación Tinción ORO
OA	Siembra de células	Tratamiento OA [1mM] + Vehículo (GW6471)	Tratamiento Vehículo UGN durante 90 mins	Lavado y fijación Tinción ORO	Lisis celular y Western-Blot
OA+UGN	Siembra de células	Tratamiento OA [1mM] + Vehículo (GW6471)	Tratamiento UGN [100nM] durante 90 mins	Lavado y fijación Tinción ORO	Lisis celular y Western-Blot
OA+GW6471	Siembra de células	Tratamiento OA [1mM] + Antagonista PPAR $\alpha$ (GW6471) [2 $\mu$ M]	Tratamiento Vehículo UGN durante 90 mins	Lavado y fijación Tinción ORO	Lisis celular y Western-Blot
OA+GW6471+UGN	Siembra de células	Tratamiento OA [1mM] + Antagonista PPAR $\alpha$ (GW6471) [2 $\mu$ M]	Tratamiento UGN [100nM] durante 90 mins	Lavado y fijación Tinción ORO	Lisis celular y Western-Blot

Tabla 8: Diseño experimental del efecto del tratamiento con el antagonista de PPAR $\alpha$ (GW6471) y también del tratamiento con uroguanilina sobre la acumulación lipídica citoplasmática y la activación de los mecanismos moleculares implicados en presencia de ácido oleico.

## **2. PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTACIÓN *IN VIVO***

### **2.1. LEGISLACIÓN Y ÉTICA EN LOS PROCEDIMIENTOS CON ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN**

Todos los procedimientos experimentales y protocolos de manipulación de animales que se realizaron en este proyecto de tesis han sido aprobados por el jefe de servicio provincial de ganadería del departamento territorial de la Consellería do Medio Rural e do Mar de la provincia de A Coruña, siendo responsable la Dra. Luisa María Seoane Camino y el Prof. Rubén Nogueiras Pozo. Los experimentos se realizaron bajo el número de procedimiento 15010/17/007 (Prof. Rubén Nogueiras Pozo), según la legislación vigente, el Real Decreto 53/2013 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<sup>255</sup>; la Directiva Europea 2010/63/UE del Parlamento Europeo y del Consejo de 22 de Septiembre de 2010 relativa a la protección de animales utilizados para fines científicos<sup>256</sup>. Dentro de la Comunidad Autónoma de Galicia, la Consellería do Medio Rural ha establecido las condiciones de manipulación animal en el Decreto 296/2008, de 30 de diciembre, de protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos, incluida la docencia<sup>257</sup>, y por el que se crea el Registro de los centros de cría, de suministradores y usuarios y la Comisión Gallega de Bienestar de los Animales de Experimentación. Además, hay que destacar la ejecución del concepto de las tres erres<sup>258</sup> que establecieron William Russel y Rex Burch en 1959, y en el que se establecen tres normas básicas:

- **Reemplazamiento:** aplicar siempre que sea posible un método alternativo para evitar el uso de animales.

- **Reducción:** en el caso de que se lleve a cabo experimentación con animales, evitar utilizar un número excesivo sin que ello comprometa a la investigación científica.

- **Refinamiento:** evitar el sufrimiento producido en los animales para mejorar su bienestar y la calidad de los resultados.

Todos los procedimientos experimentales y protocolos de manipulación de animales llevados a cabo durante la realización de esta tesis han sido revisados y aprobados previamente por el comité ético de la Universidad de Santiago de Compostela. Con todo ello, podemos garantizar que los procedimientos experimentales desarrollados en este proyecto de tesis son los adecuados y los procedentes y nos han permitido desarrollar un trabajo de investigación óptimo y de calidad.

## **2.2. MODELO DE EXPERIMENTACIÓN ANIMAL UTILIZADO EN LOS PROCEDIMIENTOS. CONDICIONES DE MANTENIMIENTO Y CUIDADO**

En este proyecto de tesis se utilizó como modelo de experimentación animal, el ratón (*Mus musculus*) de la cepa C57BL/6 procedente del Animalario General de la Universidad de Santiago de Compostela. Todos los ratones eran del género macho con un peso aproximado de 20-25 gramos, con 3-4 semanas de edad y fueron estabulados a su llegada en jaulas acondicionadas en la sala de SPF (*Specific Pathogen Free*) de las instalaciones del Animalario de la Facultad de Medicina de la Universidad de Santiago de Compostela con número de registro REGA: ES150780263401.

Los animales se repartieron en grupos de cinco por jaula teniendo en cuenta el comportamiento social de la especie y tuvieron un período de aclimatación de siete días tras su llegada, con acceso libre a agua y

comida estándar del Animalario en condiciones controladas de humedad, temperatura ( $21\pm 2$  °C) y con ciclos alternos de luz/oscuridad (12 horas luz/12 horas de oscuridad). Tras la realización de todos los procedimientos experimentales, los animales fueron sacrificados garantizando las consideraciones éticas de generación del menor sufrimiento, dolor y angustia.

Todos los procedimientos experimentales se llevaron a cabo en las instalaciones del Animalario, concretamente en las salas destinadas para la realización de procedimientos que disponen de las instalaciones adecuadas que permiten una mayor facilidad de trabajo para todo el personal del Animalario. Estas condiciones quedan descritas en el RD 53/2013 y la Directiva Europea 2010/63/UE<sup>255,256</sup>.

## **2.3. PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES**

### **2.3.1. Vías de administración de sustancias**

Las vías de administración de sustancias empleadas en los procedimientos y los tratamientos fueron las siguientes:

#### **2.3.1.1. Vía intraperitoneal (IP)**

La administración de sustancias por esta vía no requiere de anestesia. Para llevar a cabo esta vía de administración es necesario inmovilizar al animal agarrando la piel con los dedos pulgar e índice por la base de la cabeza, y posteriormente permitiendo inmovilizar toda la espalda y la cola con el resto de los dedos de la mano. Una vez inmovilizado, se gira la mano para situar el abdomen de frente a nosotros, se inclina al animal ligeramente hacia abajo para minimizar el riesgo de desgarro en vísceras. En esa posición, se trazaría imaginariamente la línea alba del abdomen, y a partir de esa línea hacia la región izquierda del animal, en concreto, hacia la zona ventro-caudal del ratón y por debajo del peritoneo se insertaría la aguja (*BD*

*Microlance<sup>TM</sup>, 25G 5/8" 0,5x16mm, BD Medical Surgical Systems, Nebraska, USA*). La aguja se encuentra acoplada a una jeringa de 1 mL (*BD slip-tip siringe, bulk, non-sterile, BD Medical Surgical Systems, Nebraska, USA*) y se debe insertar con un ángulo aproximadamente de 30° con respecto a la superficie del abdomen y con una profundidad de medio centímetro. Una vez insertada, se procede a la inyección de la muestra de forma moderada. Posteriormente se retira la aguja cuidadosamente y se presiona ligeramente la zona de inyección. Tras la administración es recomendable observar el estado del animal para asegurarse que no presenta ningún tipo de signo dañino. En este proyecto de tesis, se administraron por esta vía tanto el antagonista de PPAR $\alpha$ , GW6471(4618, *Tocris Bioscience, Bristol, UK*) a una dosis de 1 mg/kg como su vehículo.

#### **2.3.1.2. Vía intravenosa por la vena de la cola (IV)**

Los vectores lentivirales se administran eficientemente en el hígado de los ratones empleando la vía intravenosa a través de la vena lateral de la cola, TVI ("*Tail Vein Injection*"). En nuestro proyecto de tesis, se administraron vectores lentivirales que portaban shRNAs específicos para interferir en la expresión génica y silenciarla parcialmente.

Para llevar a cabo la administración de vectores lentivirales, era necesaria la inmovilización del animal mediante un cepo (*Tailveiner, TV-150-STD, BiosebLab, Vitrolles, France*) sin utilizar anestesia. El cepo presenta una forma cilíndrica, abierto por las dos bases de tal manera que se introduce al animal por el cilindro y la cola se hace pasar por un orificio superior para que una vez se encuentre colocado el animal, se pueda introducir la cola por el agujero de la base que la aísla del cuerpo del ratón. En la zona opuesta se cierra el cilindro colocando un tope enfrente de la cabeza del ratón y ajustándolo para poder mantenerlo inmovilizado.

Posteriormente, se procedió a dilatar la vena para facilitar la inyección de los vectores lentivirales. Para ello, se utilizó luz infrarroja a la que expusimos la cola durante un período corto de tiempo y deslizamos una gasa empapada en etanol al 70% sobre la zona de inoculación. Una vez visualizábamos la vena dilatada, se procedía a la inyección del vector lentiviral con una aguja (1112678990, *BD Plastipak™ syringe 27G x 3/8"* (0.40mm x 10mm), Nebraska, USA) acoplada a una jeringa de 500  $\mu$ L (324825 320927 *BD Micro-Fine™*, Nebraska, USA). La inyección en la vena de la cola se realiza de forma prácticamente paralela a la superficie (como máximo un ángulo de 25°) y eficientemente si al presionar el émbolo, no existe ningún tipo de resistencia. Tras la inyección, se retira suavemente la aguja y se presiona con un algodón la zona donde se había inoculado para detener la hemorragia.

Los vectores lentivirales empleados en este proyecto fueron elaborados por el grupo "*Stem Cells and Human Diseases*" liderado por Miguel Fidalgo Pérez perteneciente al Centro de Investigación en Medicina Molecular y Enfermedades Crónicas (CiMUS, USC). En esta ocasión, se utilizaron dos tipos de vectores lentivirales que nos permitieron dividir a los ratones en dos grupos. Por un lado, el grupo al que se inyectó el vector lentiviral portador del shRNA *Luciferasa* que actuaría como grupo vehículo. Por otro lado, el grupo al que se le inyectó el vector lentiviral portador del shRNA *Gucy2c*, *shGucy2c*, para interferir en la secuencia del receptor de la uroguanilina, *GUCY2C* y silenciarla parcialmente. La dosis que se inyectó de cada uno de los lentivirus por ratón fue de  $1 \times 10^9$  UV/mL.

### 2.3.1.3. Vía oral

La administración de sustancias por vía oral no requería del uso de anestesia. En la administración de sustancias por esta vía, es necesario llevar a cabo una inmovilización del ratón de la misma manera que se describe en la vía intraperitoneal en el punto 2.3.1.1. En este caso, nos aseguramos de la correcta inmovilización del cuello del

ratón para mantenerlo con el hocico y la boca hacia arriba. En este tipo de administración se va a emplear una cánula que debe ser flexible para evitar causar cualquier tipo de daño en el esófago o en el estómago del ratón y de una longitud de 5 centímetros correspondiente a la distancia entre la boca y el estómago. Esta cánula se acopla a una jeringa de 1 mL (*BD slip-tip syringe, bulk, non-sterile, BD Medical Surgicals Systems, Nebraska, USA*). Posteriormente, se introduce la cánula cuidadosamente por la boca del ratón a través del esófago hasta alcanzar el estómago. Es necesario que no exista ningún tipo de resistencia al introducir la cánula para evitar daños al animal. La administración de la sustancia se debe liberar lentamente modulando la salida con el émbolo de la jeringa para minimizar el riesgo de reflujo del estómago y posteriormente, se retiraría la cánula con cuidado para no generar ningún tipo de daño. Tras la administración es recomendable observar el estado del animal para asegurarse de su bienestar.

En este proyecto de tesis, se administró por esta vía tanto el fármaco linaclotide (*Constella® 290 microgramos, 28 cápsulas duras Allergan Pharmaceuticals International Limited Clonshaugh Business & Technology Park, Dublín, Irlanda*) a una dosis de 5 mg/kg como su vehículo.

#### **2.3.1.4. Vía subcutánea (SC)**

En este caso, la administración subcutánea no requiere de anestesia y además no supone una inmovilización total del ratón, asegurando de esta manera el bienestar del animal.

Por tanto, para realizar la administración es necesario colocar al animal sobre la rejilla favoreciendo que pueda agarrarse a ella por las patas y de esta manera, levantar la piel de la región interescapular con los dedos pulgar e índice. A continuación, se introduce la aguja (*BD Microlance™, 25G 5/8" 0,5x16mm, BD Medical Surgicals Systems, Nebraska, USA*) en la base de la zona de la piel que se está agarrando, manteniéndola paralela al cuerpo del ratón y así evitar inocular en capas inferiores a la piel. La aguja se encuentra acoplada a

una jeringa de 1 mL (*BD slip-tip syringe, bulk, non-sterile, BD Medical Surgical Systems, Nebraska, USA*) a la que se le presiona el émbolo inyectando el volumen de la muestra a una velocidad moderada. Tras la inyección, se retira suavemente la aguja, soltando la piel que se había agarrado y se presiona con un algodón la zona de inyección para evitar el retroceso del fluido inoculado. Posteriormente, hay que asegurarse de que no se produce sangrado y a continuación se realiza un masaje en la zona que se encuentra alrededor de la inoculación para ayudar a dispersar el fluido inyectado subcutáneamente.

En este caso, el fármaco administrado de esta forma fue tanto el antagonista del receptor  $\beta_3$  adrenérgico SR59230A (*1511, CAS Number: 1135278-41-9, ToCris Bioscience, Bristol, UK*) a una dosis de 3 mg/kg como su vehículo.

### **2.3.2. Monitorización del peso corporal, la ingesta y la composición corporal**

Tras el período de aclimatación, se llevó a cabo un período de mantenimiento y seguimiento semanal de peso corporal e ingesta grupal en el que tuvieron acceso libre a agua y comida. En este caso, la ingesta colectiva corresponde a la ingesta total por jaula, y, por tanto, se realizó el promedio correspondiente en función del número de animales por jaula, para poder obtener el dato aproximado de la ingesta por animal. Por otro lado, esta monitorización de peso e ingesta se llevó a cabo diariamente durante el período de tratamiento. Las medidas de peso corporal e ingesta se determinaron con una balanza de precisión.

Para la composición corporal se utilizó un equipo de resonancia magnética de imagen (*Whole Body Composition Analyzer EchoMRI 500, EchoMRI, Texas USA*) que permitía obtener valores de masa grasa y magra antes y después de los tratamientos.

### **2.3.3. Sacrificio, extracción de tejidos y recogida de las muestras**

El punto final de todos los experimentos realizados en animales es el del sacrificio y la extracción de los tejidos y muestras que posteriormente se van a analizar por diversas técnicas según proceda el estudio que se esté realizando en el proyecto. Los ratones que se utilizaron en estos experimentos fueron sacrificados por decapitación de modo que padecieran el menor dolor y sufrimiento. En primer lugar, se recogió la sangre troncal en tubos (368171 080.909.6498 7.2 mg EDTA K<sub>2</sub>, 13x75mm, 4.0 mL, BD Vacutainer® New Jersey, USA). Los tubos de sangre fueron posteriormente centrifugados a 3500 revoluciones por minuto (r.p.m) durante 15 minutos, y tras la centrifugación se recogió el plasma que se sitúa en el sobrenadante en tubos de polipropileno de 1.5mL (11326144, Axygen™ MCT-150-C-S, Corning Inc., New York, USA) y fue guardado a -80°C para posteriores análisis bioquímicos.

Para la obtención de tejidos, se llevó a cabo la disección del animal con una incisión siguiendo la línea alba del abdomen. Los tejidos recolectados obtenidos fueron entre otros, el tejido adiposo pardo, el tejido adiposo blanco (omental, gonadal) y el hígado. Los tejidos extraídos se lavaron en tampón Krebs-Ringer-HEPES (KRH), descrito en la tabla 9. Se pesaron en la balanza de precisión el hígado, el tejido adiposo pardo, el tejido adiposo blanco omental y gonadal y posteriormente, todos fueron congelados en hielo seco (CO<sub>2</sub> sólido o nieve carbónica) para almacenarlos a -80°C. De todos los tejidos extraídos, algunos fueron elegidos para realizar el estudio histológico, y por ello, se guardó un trozo de tejido en cassettes de inclusión sumergido en formaldehído al 4%.

<b>COMPOSICIÓN TAMPÓN KREBS-RINGER-HEPES (KRH) pH 7.4</b>	
<b>Reactivo</b>	<b>Concentración</b>
NaCl	125 mM
KCl	5 mM
MgSO <sub>4</sub>	1.2 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.3 mM
CaCl <sub>2</sub>	2 mM
Glucosa	6 mM
HEPES	25 mM
Penicilina	100 U/mL
Estreptomina	100 U/mL

Tabla 9: Composición tampón de lavado KRH

## 2.4. DISEÑOS EXPERIMENTALES

### 2.4.1. Modelo *in vivo* de obesidad inducida por dieta (DIO)

El modelo de obesidad inducida por dieta (DIO) permite reflejar la condición fisiológica de carácter patológico, que es la obesidad. Este proyecto de tesis implica el estudio de las causas fisiológicas que provocan la esteatosis hepática asociada a la obesidad y una vez generada, comprobar el efecto de aquellos tratamientos que permiten activar los mecanismos fisiológicos necesarios para combatirla.

Tras el proceso de aclimatación de los animales en las instalaciones del animalario, se sometieron a la alimentación de una dieta rica en grasa al 60% (HFD, *High Fat Diet, Rodent Diet With 60 kcal% Fat, D12492, Research Diets Inc., New Jersey, USA*) cuya composición se describe en la Tabla 10. De esta manera, los animales desarrollaron obesidad debido al consumo de la dieta hipercalórica. Los animales se mantuvieron con esta alimentación durante todo el período de experimentación hasta su sacrificio y a la vez, se llevó a cabo un seguimiento del peso corporal e ingesta.

En la tabla 10 se describe tanto la composición de la dieta estándar (SD) de Animalario como la alta en grasa (HFD) al 60%.

COMPOSICIÓN DIETAS RATONES			
Tipo de dieta	Componentes	Información Calórica (%kcal)	Densidad Energética (kcal/g)
Dieta Estándar (SD)	Proteína	23	3.3
	Carbohidrato	55	
	Grasa	22	
Dieta alta en grasa (HFD) al 60 %	Proteína	20	5.21
	Carbohidrato	20	
	Grasa	60	

Tabla 10: Composición de las dietas de los ratones

#### 2.4.2. Efecto de la administración del fármaco linaclotide (oral) y del antagonista del receptor $\beta_3$ -adrenérgico (SC) en modelos murinos

Hemos demostrado previamente que el efecto del tratamiento de la hormona gastrointestinal uroguanilina en un modelo celular de esteatosis hepática activa el mecanismo de  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos cuando es capaz de unirse a su receptor GUCY2C. Esto supone un avance importante en el tratamiento de esta patología y por tanto resulta de interés llevar a cabo un experimento en modelos murinos con un fenotipo obeso inducido por dieta (ratones DIO) en los que se pueda estudiar el efecto que tiene el tratamiento farmacológico linaclotide (agonista del receptor GUCY2C).

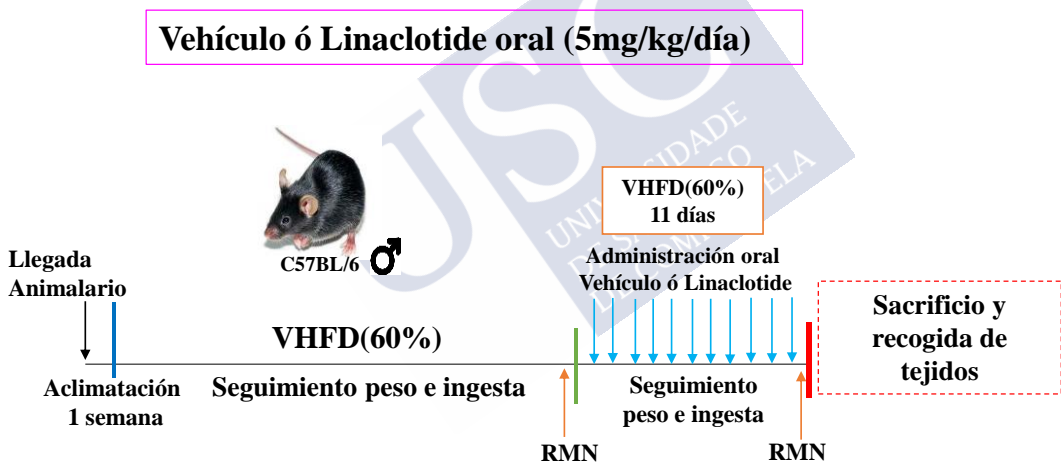
Por tanto, se emplearon ratones C57BL/6 macho adultos que fueron alimentados con dieta alta en grasa (composición descrita en la tabla 10) y durante todo este tiempo de alimentación se realizó una toma de datos del peso corporal de todos los individuos y de la ingesta hasta que desarrollaron el fenotipo obeso. En este momento, los ratones se individualizaron y se dividieron en dos grupos, a los que se

les administró oralmente el linaclotide o el vehículo del linaclotide durante 11 días seguidos en los que se hizo un seguimiento del peso corporal y la ingesta. El primer día antes de comenzar el tratamiento y el último día tras el tratamiento se midió la composición corporal de los animales por EchoMRI.

En este caso, se generaron directamente 2 grupos experimentales que fueron los siguientes:

- Vehículo (Oral)
- Linaclotide (Oral)

### *DISEÑO EXPERIMENTAL*



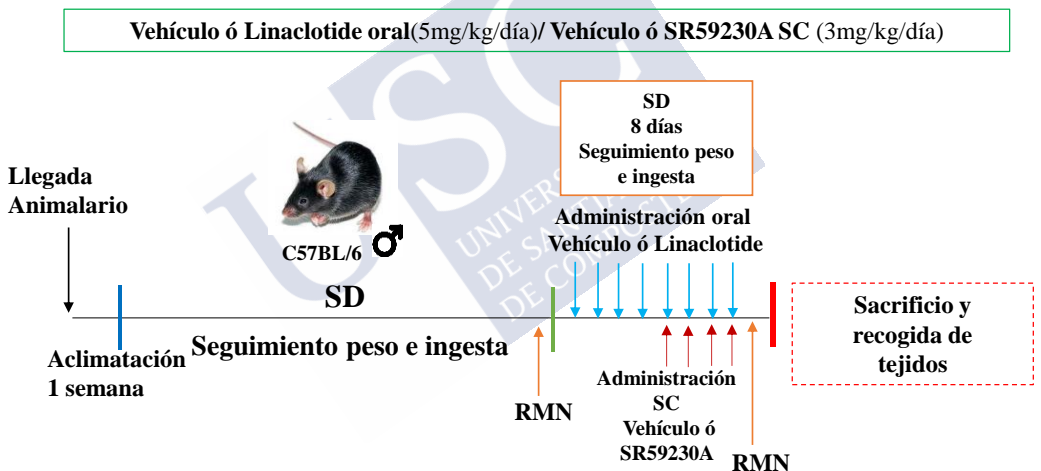
En el caso del experimento realizado en ratones C57BL/6 macho adultos alimentados con dieta SD (composición de la dieta en la tabla 10), se realizó primeramente un seguimiento durante todo el tiempo de alimentación, tomando datos del peso corporal de todos los individuos y de la ingesta. Concretamente en estos ratones, se quería estudiar si el efecto del linaclotide en el peso corporal estaba mediado por el SNS, de forma independiente a la dieta. Para ello, se llevó a cabo un tratamiento empleando el antagonista del receptor  $\beta_3$ -AR para poder

bloquear la acción del linaclo t ide mediada por el SNS. En este caso, se hizo un seguimiento de peso corporal e ingesta durante el periodo completo de tratamiento y además el primer día antes de comenzar el tratamiento y el último día tras el tratamiento se midió la composición corporal de los animales por EchoMRI.

Por lo tanto, se generaron tres grupos experimentales:

- Vehículo (Oral y SC)
- Linaclo t ide (Oral)+ Vehículo (SC)
- Linaclo t ide (Oral)+antagonista del  $\beta_3$ -AR(SC)

## DISEÑO EXPERIMENTAL



Al final de los períodos de tratamiento en ambos experimentos, se llevó a cabo el sacrificio de los animales recolectando todos los tejidos de interés para realizar posteriormente en ellos estudios bioquímicos, moleculares (Western Blot, Q-PCR) e histológicos junto con el análisis del efecto sobre el peso corporal y la ingesta. Durante este último período de tratamiento, se comprobó el estado de salud en el que se encontraban los ratones para asegurar que los efectos observados se debían a la administración de los tratamientos y no

existían otros efectos que pudieran influir de forma negativa sobre el bienestar de los animales o sobre los resultados.

### **2.4.3. Efecto del silenciamiento del receptor GUCY2C (IV) y del tratamiento oral con linaclotide sobre el modelo de experimentación *in vivo*, DIO**

Con el fin de reconfirmar *in vivo* los resultados obtenidos en los estudios *in vitro*, los cuales se determinaba que el receptor GUCY2C hepático está mediando el efecto de la UGN sobre la esteatosis hepática, se diseñó un experimento donde se silenciaba la expresión génica del receptor GUCY2C en el hígado murino DIO y se sometía a los animales al tratamiento con linaclotide para determinar su efecto sobre la acumulación de lípidos en el hígado.

Se emplearon ratones C57BL/6 macho adultos que generaron obesidad tras ser alimentados con dieta alta en grasa (composición descrita en la tabla 10) junto con un seguimiento durante todo el tiempo de alimentación en el que se tomaron datos del peso corporal y de la ingesta de todos los individuos. Posteriormente, se individualizaron y se les administró a través de la vena de la cola los vectores lentivirales. Por ello se dividieron inicialmente, en 2 grupos experimentales:

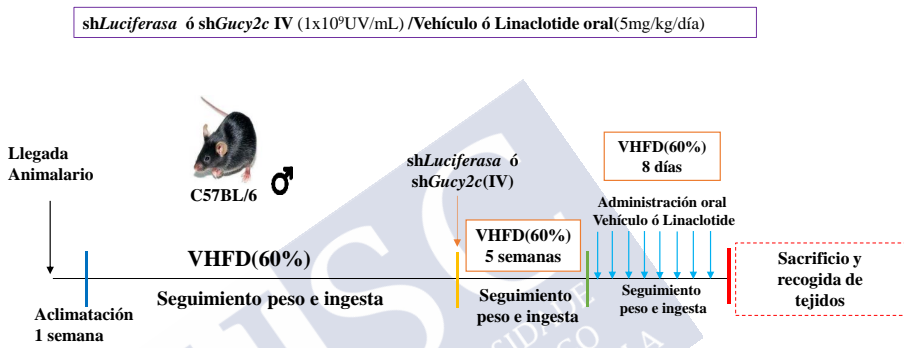
- sh*Luciferasa*(IV)(grupo control)
- sh*Gucy2c*(IV) (grupo “GUCY2C knockdown”)

Al ser vectores lentivirales presentaban un período de infección largo y por tanto para procurar su efecto esperamos 5 semanas hasta el comienzo del posterior tratamiento. Durante este período se prosiguió con la obtención de datos de peso corporal e ingesta de los individuos.

Tras ese tiempo, se comenzó con la administración oral del linaclotide, o del vehículo del linaclotide durante 8 días junto con el seguimiento del peso corporal y de la ingesta. Por ello, los ratones de cada grupo a la vez se dividieron en 2 subgrupos experimentales, dando lugar en total a 4 grupos experimentales:

- shLuciferasa(IV)+ Vehículo (Oral)
- shLuciferasa(IV)+ Linaclotide(Oral)
- shGucy2c(IV)+ Vehículo (Oral)
- shGucy2c(IV)+ Linaclotide (Oral)

## DISEÑO EXPERIMENTAL



Al final del periodo de tratamiento con linaclotide se llevó a cabo el sacrificio de los animales recolectando todos los tejidos de interés para realizar posteriormente en ellos estudios bioquímicos, moleculares (Western Blot, Q-PCR) e histológicos junto con el análisis del efecto sobre el peso corporal y la ingesta. Durante este último período de tratamiento, se comprobó el estado de salud en el que se encontraban los ratones para asegurar que los efectos observados se debían a la administración de los tratamientos y no existían otros efectos que pudieran influir de forma negativa sobre el bienestar de los animales o sobre los resultados.

#### **2.4.4. Efecto del tratamiento con el antagonista (GW6471) de PPAR $\alpha$ (IP) y del tratamiento oral con linacotide sobre el modelo de experimentación *in vivo* DIO**

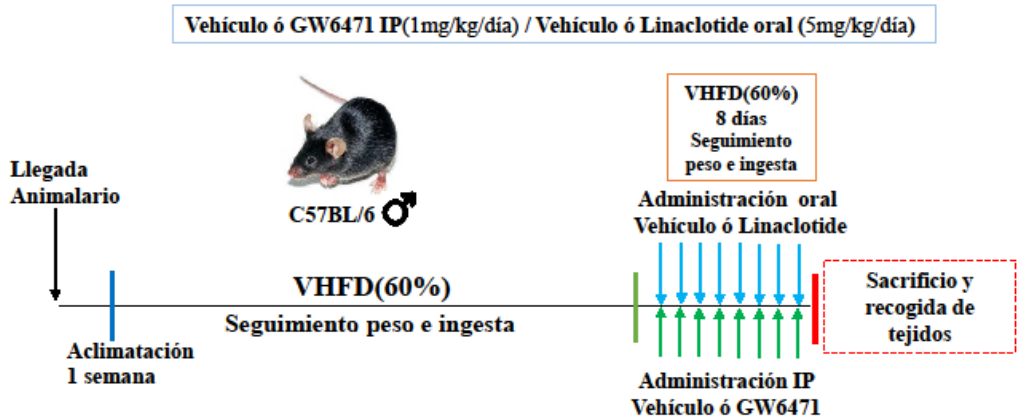
Este experimento trata de mimetizar en un modelo de experimentación *in vivo* los experimentos realizados *in vitro* relacionados con el papel del factor PPAR $\alpha$  en el efecto del tratamiento con uroguanilina sobre la acumulación lipídica citoplasmática y sobre el metabolismo lipídico de los hepatocitos.

De la misma manera que el experimento descrito anteriormente, se emplearon ratones C57BL/6 macho adultos que fueron alimentados con dieta alta en grasa (composición descrita en la tabla 10) y se tomaron datos del peso corporal de todos los individuos y de la ingesta durante todo el período de alimentación hasta que generaron un fenotipo obeso. Luego, se individualizaron y se llevó a cabo una doble administración de sustancias. Por un lado, se administró por vía intraperitoneal (IP) el antagonista de PPAR $\alpha$  (GW6471) o el vehículo del antagonista, y por otro lado se administró oralmente el linacotide como agonista del receptor GUCY2C, o el vehículo del linacotide. Este doble tratamiento se llevó a cabo durante 8 días seguidos junto con la toma de datos del peso corporal y la ingesta de todos los individuos.

Por tanto, en este caso, se generaron directamente 4 grupos experimentales que fueron los siguientes que se describen a continuación:

- Vehículo (IP) + Vehículo (oral)
- Vehículo (IP) + Linacotide (oral)
- GW6471(IP) + Vehículo (oral)
- GW6471(IP) + Linacotide (oral)

## DISEÑO EXPERIMENTAL



Al final del periodo del doble tratamiento, se llevó a cabo el sacrificio de los animales recolectando todos los tejidos de interés para analizar posteriormente en ellos estudios bioquímicos, moleculares (Western Blot, Q-PCR) e histológicos junto con el análisis del efecto sobre el peso corporal y la ingesta. Durante este último período de tratamiento, se comprobó el estado de salud en el que se encontraban los ratones para asegurar que los efectos observados se debían a la administración de los tratamientos y no existían otros efectos que pudieran influir de forma negativa sobre el bienestar de los animales o sobre los resultados.

### 3. TÉCNICAS ANALÍTICAS

#### 3.1. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN PROTEICA: WESTERN BLOT

Para estudiar la expresión proteica de los marcadores moleculares de interés se utilizó la técnica de Western Blot que requiere de varias fases:

- 3.1.1.- Extracción de proteína.
- 3.1.2.- Cuantificación de proteínas.
- 3.1.3.- Preparación de las muestras.
- 3.1.4.- Electroforesis SDS-PAGE.
- 3.1.5.- Transferencia húmeda.
- 3.1.6.- Tinción Rojo Ponceau.
- 3.1.7.- Inmunodetección.

##### 3.1.1. Extracción de proteína

Para llevar a cabo la extracción de proteína total se emplearon distintos métodos en función del tipo de muestras, ya sean cultivos celulares o tejidos.

En el caso de los cultivos celulares, la extracción de la proteína citoplásmica se producía al final del experimento cuando culminaba el período de tratamiento correspondiente. Por tanto, se llevaba a cabo el siguiente protocolo:

1.- Se retiraba por aspiración el medio de cultivo en el que se habían tratado las células.

2.- Se realizaron dos lavados con tampón de lavado (PBS) a 4°C en todos los pocillos de las placas.

3.- Se situaron las placas sobre hielo y se añadió el tampón de lisis cuya composición se encuentra descrita en la Tabla 11.

4.- Se incubaron las placas con el tampón durante 10 minutos en hielo y se agitaron para extender el tampón por toda la base de la placa.

5.- Posteriormente con una rascador o scraper (353089, Corning™ BD Falcon, Massachusetts, USA) se despegaron las células y se recogió el lisado en tubos de polipropileno 1,5 mL (11326144, Axygen™ MCT-150-C-S, Corning Inc., New York, USA)

6.- Se centrifugaron los lisados a máxima velocidad (18000 RCF) a 4°C durante 30 minutos.

7.- Se recogió el sobrenadante cuidadosamente y sin tocar el pellet precipitado, en una nueva tanda de tubos y se almacenó a -80°C o en el caso de que se vaya a seguir el protocolo del Western-Blot mantenerlos a 4°C en hielo.

Para los tejidos animales el protocolo a llevar a cabo es el siguiente:

1.- A partir de los tejidos almacenados a -80°C, se cortó un trozo del tejido en frío para que no se degrade y se introdujo en un tubo de polipropileno de 2 mL con cierre de seguridad (T2795, Safe Lock tubes 2.0 mL, Eppendorf, Hamburg, Germany) dejándolo en frío. Sobre esos tubos se agregó posteriormente una bolita de acero y tampón de lisis (composición Tabla 11) que se encontraba a 4°C. A partir de este momento todo el protocolo se ejecutó con los tubos a 4°C.

2.- Una vez añadido el tampón de lisis, se comienza la extracción de proteína mediante el proceso químico de lisis celular realizado por los detergentes presentes en el tampón de lisis. Pero este proceso resulta insuficiente y el tejido necesita de un proceso mecánico para la disrupción de toda la matriz celular. Por ello se emplea un aparato

específico que es el TissueLyser (85300, *TissueLyser II*, Qiagen, Maryland, USA) en el que se homogenizan los lisados proteicos a 30 Hz durante 3 minutos.

3.- Tras comprobar que en todos los tubos la disgregación mecánica se había producido correctamente, se centrifugaron a 18000 RCF 30 minutos a 4°C.

4.- Se recogió el sobrenadante obtenido donde se va a encontrar el extracto proteico de las muestras y se transfirió cuidadosamente evitando la capa de lípidos superficial y sin tocar el pellet precipitado en la base, a una nueva tanda de tubos de polipropileno de 1.5 mL (11326144, *Axygen™MCT-150-C-S*, Corning Inc., New York, USA). Posteriormente, se almacenaron a -80°C o en el caso de que se vaya a seguir el protocolo del Western-Blot mantenerlos a 4°C en hielo.

COMPOSICIÓN TAMPÓN DE LISIS	
Reactivo	Concentración
Tris-HCl pH 7.4	200 mM
NaCl	130 mM
Glicerol	10% V/V
Tritón X-100	1% V/V
Sodio-Dodecil-Sulfato(SDS)	0.1% V/V
MgCl <sub>2</sub>	10 mM
Inhibidores Proteasas	1 µL/mL
Inhibidores Fosfatasas	1 µL/mL

Tabla 11. Composición del tampón de lisis

### 3.1.2. Cuantificación de proteínas

Tras la extracción de la proteína total, el siguiente paso es el de la cuantificación de proteínas para conocer la concentración de proteína total extraída por muestra, y posteriormente poder ajustar todas las muestras a la misma concentración de proteína. Para medir la concentración de la proteína total se empleó el Kit de cuantificación colorimétrico RC DC™ *protein assay* (5000122, Biorad, California,

USA). Para llevar a cabo la cuantificación de proteínas, se siguió el siguiente protocolo:

1.- A partir de los lisados de proteína total que se encuentran en los tubos de 1,5mL, se realizan diluciones de factor 1:20 para los lisados celulares o 1:50 para los lisados procedentes del tejido hepático en agua MQ.

2.- Por otro lado, se procedió a preparar la recta patrón que consistía en una serie de diluciones seriadas a partir del reactivo estándar que provenía el kit y siguiendo el protocolo del fabricante.

3.- Posteriormente, se cargaron primero las muestras por duplicado de las diluciones seriadas de la recta patrón de mayor a menor concentración, y seguidamente las muestras diluidas de los lisados de estudio por duplicado en una microplaca de poliestireno transparente de 96 pocillos.

4.- Por último, siguiendo las instrucciones del fabricante se cargaron los reactivos del kit que permitían el desarrollo de la reacción colorimétrica y se procedió a la lectura de la absorbancia a 750 nm y a temperatura ambiente, en un lector de placas (*Epoch 2 microplate reader, Biotek Instruments Inc., Vermont, USA*).

5.-Tras la lectura de la absorbancia, se determinaron las concentraciones de proteína a partir de la extrapolación de la absorbancia obtenida por cada una de las muestras a la concentración de proteína que le correspondía según la recta patrón.

6.- A partir de las concentraciones de proteína total, se prepararon nuevas tandas de tubos para realizar las alícuotas de las muestras a la concentración óptima dependiendo de la prevalencia de la proteína de interés y de la sensibilidad del anticuerpo primario que se vaya a emplear. Los tubos que mantenían el resto del lisado de proteína total se guardaron a -80°C para futuras experimentaciones.

### 3.1.3. Preparación de las muestras

Previamente a la realización de la electroforesis, las alícuotas preparadas de las muestras se combinaron con tampón de carga o Laemmli cuya composición se encuentra descrita en la Tabla 12.

COMPOSICIÓN DEL TAMPÓN DE CARGA 5x			
Reactivo	Concentración	Propósito	Casa Comercial
Tris-HCl pH 6,8	400 mM	<b>Solución tamponante</b> que permite mantener el pH adecuado	<b>Tris:</b> Trizma base (T1503, Sigma-Aldrich, Misuri, USA); <b>HCl:</b> Ácido hidroc্লórico para análisis 37% (131020, Panreac Applichem, Germany)
SDS	10% (P/V)	<b>Detergente desnaturizante:</b> - Se une a la proteína de forma regular, aportando carga negativa de forma proporcional al tamaño de la proteína. - Su cola hidrofóbica va a rodear a todo el esqueleto peptídico. - De esta manera, se evitan las interacciones hidrofóbicas y es capaz de romper los enlaces de hidrógeno. - Es capaz de destruir la estructura cuaternaria/terciaria para linearizar la proteína.	<b>SDS:</b> Sodium-Dodecyl-Sulfato (L3771, Sigma-Aldrich, Misuri, USA)
Glicerol	50% (V/V)	Sustancia <b>viscosa y densa</b> que arrastra la muestra al fondo del pocillo para evitar que se extienda a los pocillos adyacentes.	<b>Glicerol:</b> Glycerol (G9012, Sigma-Aldrich, Misuri, USA)
$\beta$ -Mercaptoetanol	5% (V/V)	Actúa como <b>agente reductor:</b> - Evitando la oxidación de cisteínas. - Completando la linearización de la proteína al romper los puentes disulfuro.	<b><math>\beta</math>-Mercaptoetanol:</b> 2-Mercaptoethanol (M6250, Sigma-Aldrich, Misuri, USA)
Azul de bromofenol	0,5% (P/V)	Se trata de una molécula <b>colorante</b> pequeña: - Da color a la muestra. - Migra por delante de las proteínas, generando un frente para poder hacer el seguimiento del movimiento de las muestras en el gel.	<b>Azul de bromofenol:</b> Bromophenol blue (114391, Sigma-Aldrich, Misuri, USA)

Tabla 12: Composición del tampón de carga o tampón Laemmli

Como la electroforesis SDS-PAGE requiere unas condiciones desnaturizantes o reductoras, después de añadir el tampón de carga, las muestras se calentaron en un termobloque a 95°C durante 5 minutos para ser cargadas en el gel de poliacrilamida y poder comenzar con la electroforesis.

### **3.1.4. Electroforesis SDS-PAGE**

La electroforesis SDS-PAGE en gel de poliacrilamida en presencia de SDS consiste en la migración de proteínas desnaturalizadas y con carga negativa gracias al SDS. La separación de las proteínas por su peso molecular se produce gracias a la generación de un campo eléctrico que obliga a la migración de estas proteínas hacia el cátodo de polo positivo. En este caso, todas las proteínas presentan una misma carga negativa inicial, por tanto, la tasa de migración está determinada por su peso molecular. De tal manera, que las proteínas de menor peso molecular migran más rápidamente hacia el polo positivo que aquellas que presentan un peso molecular mayor.

Para comenzar con la electroforesis, necesitamos tanto las muestras a la concentración deseada en tampón de carga como los geles de poliacrilamida que se vayan a utilizar.

#### **3.1.4.1. Elaboración de los geles de poliacrilamida**

Los geles son estructuras que forman una matriz gelatinosa fruto de la reacción de polimerización con dos reactivos fundamentales: la acrilamida y la bis-acrilamida. Los componentes químicos que forman parte de un gel para la electroforesis SDS-PAGE son los que se describen en la Tabla 13.

COMPOSICIÓN GELES POLIACRILAMIDA		
<i>Reactivo</i>	<i>Propósito</i>	<i>Casa Comercial</i>
<b>Acrilamida</b>	Las moléculas de acrilamida se unen formando un homopolímero para dar lugar a los geles de poliacrilamida	<b>Acrilamida:</b> acrilamida para electroforesis $\geq 99\%$ (A8887, <i>Sigma-Aldrich</i> , Misuri, USA)
<b>Bisacrilamida</b>	Las moléculas de bisacrilamida se unen a las cadenas que forman las moléculas de acrilamida para dar lugar a la matriz gelatinosa	<b>Bisacrilamida:</b> Bisacrylamide (V3141, <i>Promega</i> , Wisconsin, USA)
<b>SDS</b>	<b>Detergente desnaturante:</b> - Es capaz de mantener la carga negativa y la linealidad de las proteínas en la electroforesis	<b>SDS:</b> Sodium-Dodecyl-Sulfato (L3771, <i>Sigma-Aldrich</i> , Misuri, USA)
<b>Tampón Tris</b>	<b>Solución tamponante</b> que permite mantener el pH adecuado	<b>Tris:</b> Trizma base (T1503, <i>Sigma-Aldrich</i> , Misuri, USA)
<b>APS</b>	Compuesto que genera <b>radicales libres</b> para catalizar la reacción de polimerización de los geles	<b>APS:</b> Amonio PerSulfato para electroforesis $\geq 98\%$ (A3678, <i>Sigma-Aldrich</i> , Misuri, USA)
<b>TEMED</b>	Compuesto que permite <b>incrementar</b> la producción de <b>radicales libres</b> por el APS	<b>TEMED:</b> N,N,N',N'-Tetrametilenediamina para electroforesis (T9281, <i>Sigma-Aldrich</i> , Misuri, USA)

Tabla 13: Descripción de los componentes químicos de los geles de poliacrilamida

Los geles de electroforesis se elaboran sobre una estructura que se comporta como soporte de los cristales en los que se va a introducir la mezcla de los reactivos para poder polimerizar de forma conveniente y en vertical. Hay que tener en cuenta que los geles de poliacrilamida constan de dos fases:

- **Gel concentrador/de apilamiento/ *Stacking gel*:** es la fase superior en la que se van a situar los pocillos de carga que se forman gracias a la colocación de los peines. El porcentaje de acrilamida de esta fase es del 5% y tiene un pH 6,8. Una vez cargadas las muestras en los pocillos y aplicar un campo eléctrico las proteínas empiezan a migrar todas juntas apiladas hacia el electrodo positivo. La composición de esta fase se describe en la tabla 14.

- **Gel separador/Resolving gel:** es la fase inferior en la que las proteínas se van separando por su peso molecular. En este caso, el porcentaje del gel no es fijo, sino que se realiza de un porcentaje u otro dependiendo del peso molecular de las proteínas de interés. Las proteínas que se han estudiado en este proyecto han requerido porcentajes del 8%, 10% y 12% y un pH 8,8. La composición de esta fase en función del porcentaje se describe en la tabla 15.

<i>Stacking gel 5% (V<sub>TOTAL</sub>: 3 mL)</i>	
<i>Reactivo</i>	<i>Volumen</i>
H <sub>2</sub> O MQ	2.1 mL
Acrilamida-Bisacrilamida 30%	0.5 mL
Tris-HCl 1M pH 6,8	0.38 mL
SDS 10%	0.03mL
APS 10%	0.03mL
TEMED	0.003mL

Tabla 14: Gel concentrador

<i>Resolving gel (V<sub>TOTAL</sub>: 10 mL)</i>			
<i>Reactivo</i>	<i>Volumen (Gel 8%)</i>	<i>Volumen (Gel 10%)</i>	<i>Volumen (Gel 12%)</i>
H <sub>2</sub> O MQ	4.6 mL	4 mL	3.3 mL
Acrilamida-Bisacrilamida 30%	2.7 mL	3.3 mL	4 mL
Tris-HCl 1.5 M pH 8,8	2.5 mL	2.5 mL	2.5 mL
SDS 10%	0.1 mL	0.1 mL	0.1 mL
APS 10%	0.1 mL	0.1 mL	0.1 mL
TEMED	0.006 mL	0.004 mL	0.004 mL

Tabla 15: Gel separador

### 3.1.4.2. Electroforesis SDS-PAGE

Tras la elaboración de los geles, se lleva a cabo la electroforesis SDS-PAGE. Para ello se colocan los geles de forma vertical en un soporte con electrodos superiores que conectan con la fuente de alimentación a través de la tapadera de la cubeta. Este soporte con los geles se coloca en una cubeta y se rellena ésta con tampón de electroforesis. La composición del tampón de electroforesis se describe en la Tabla 16.

COMPOSICIÓN TAMPÓN ELECTROFORESIS			
Reactivo	Concentración	Propósito	Casa Comercial
Tampón Tris	25 mM	Solución tamponante que permite mantener el pH adecuado	Tris: Trizma base (T1503, Sigma-Aldrich, Misuri, USA)
Glicina	192 mM	Aminoácido esencial que permite movilidad de proteínas por el gel	Glicina: Glicina para electroforesis $\geq 99\%$ (G8898, Sigma-Aldrich, Misuri, USA)
SDS	0,1% (P/V)	Detergente desnaturalizante: Es capaz de mantener la carga negativa y la linealidad de las proteínas en la electroforesis	SDS: Sodium-Dodecyl Sulfato (L3771, Sigma-Aldrich, Misuri, USA)

Tabla 16: Composición del tampón de electroforesis

En el primer pocillo se situó un marcador de peso molecular (mezcla de proteínas purificadas y teñidas de peso molecular conocido; *1610374 Precision Plus Protein<sup>TM</sup> -Dual Color Standards*, Bio-Rad, California, USA). En el resto de los pocillos, se cargaron 25  $\mu$ L de cada muestra. Todas las muestras cargadas por gel representan a todos los grupos experimentales para poder obtener resultados comparables entre los distintos grupos de estudio. A continuación, se iniciaba la electroforesis y las muestras comenzaban a migrar por ambas fases de los geles hasta que el frente de migración se situaba a los últimos centímetros del final del gel, momento en el cual finalizaba el proceso.

### 3.1.5. Transferencia húmeda

Una vez terminada la electroforesis, el siguiente paso consiste en transferir las proteínas presentes en la fase separadora del gel a una membrana de PVDF (*IPVH00010, PVDF Immobilon-P membrane*, Millipore, Massachusetts, USA). De esta manera, podemos tener un soporte sólido en el que se encuentran las proteínas inmovilizadas para que el anticuerpo pueda detectarlas.

En primer lugar, es necesario activar la membrana de PVDF siguiendo el siguiente procedimiento: se embebe la membrana en metanol durante 5 minutos, posteriormente se lava en agua destilada

otros 5 minutos y finalmente 5 minutos en tampón de transferencia húmeda pre-enfriado (composición del tampón en la Tabla 17).

COMPOSICIÓN TAMPÓN TRANSFERENCIA HÚMEDA			
Reactivo	Concentración	Propósito	Casa Comercial
Tampón Tris	25 mM	Solución tamponante que permite mantener el pH adecuado	Tris: Trizma base (T1503, Sigma-Aldrich, Misuri, USA)
Glicina	192 mM	Aminoácido esencial que permite movilidad de proteínas por el gel	Glicina: Glicina para electroforesis $\geq 99\%$ (G8898, Sigma-Aldrich, Misuri, USA)
Metanol	20% (V/V)	Alcohol que actúa eliminando todas las moléculas de SDS que se han unido a las proteínas en la electroforesis e incrementa su hidrofobicidad permitiendo una mejor fijación de las proteínas en la membrana, evitando que se difundan.	Metanol: Metanol para análisis (1060091000, Merck Millipore, Massachusetts, USA)

Tabla 17: Composición del tampón de transferencia

Una vez activada la membrana, ésta se mantiene en el tampón de transferencia mientras se empieza a preparar la estructura a la que llamamos “sándwich de transferencia”. Por otro lado, se abren los cristales del gel y éste se mantiene también húmedo en la solución tampón de transferencia pre-enfriada.

Para preparar el sándwich de transferencia, necesitamos mantener en tampón de transferencia frío todo el material que se va a emplear, por tanto, las bases, las esponjas y los papeles de filtro *Whatman* se encuentran sumergidos en este tampón. Para comenzar a construir el “sándwich” de transferencia, abrimos una base que presenta una cara de color negro y otra cara transparente. Sobre la cara negra se colocará una esponja, seguido de dos papeles de filtro *Whatman*, el gel de electroforesis, la membrana de PVDF activada, otros dos papeles de filtro *Whatman* y finalmente una esponja, cerrando la base. Se sitúa la cubeta sobre un agitador magnético, ya que se añade un imán en el fondo. A continuación, se coloca el soporte de transferencia y se rellena con tampón de transferencia húmeda la cubeta. Posteriormente se encaja el sándwich dentro del soporte, se añade un frigolín para mantener todo el proceso en frío y se coloca la tapadera sobre los electrodos del soporte de transferencia. Finalmente, se enciende el

agitador magnético ajustando las revoluciones con una rueda y se conectan los electrodos a la fuente de alimentación. Las condiciones establecidas en la transferencia son de 200 mA por cubeta y el tiempo de duración depende según el tamaño de la proteína. De tal manera que, proteínas de peso molecular inferior a 25 kDa se transferían en 1 hora; proteínas de un peso molecular que se encontraban en un rango desde 25 kDa hasta un peso de 250kDa se transferían en 1 hora y 30 minutos; por último, proteínas que presentaban un peso molecular por encima de 250 kDa se transferían en 2 horas 30 minutos.

### 3.1.6. Comprobación de la transferencia gel-membrana: Tinción rojo Ponceau

La solución de Ponceau S preparada al 0.1% P/V en ácido acético 5% (*Pounceau S Red Solution, P7170, Sigma-Aldrich, Misuri, USA*) permite teñir la membrana tras la transferencia para comprobar que el proceso se haya producido correctamente y las proteínas del gel estén presentes en la membrana. Se trata de una tinción reversible, por lo tanto, una vez teñida, la membrana se lavaba con solución de lavado de Ponceau, (ácido acético al 1%) para eliminar el exceso de reactivo y poder distinguir mejor las bandas en la membrana. Posteriormente, para terminar de desteñir las membranas se empleó la solución de lavado TBS-T (*Tris Buffer Saline-Tween*) que se describe en la Tabla 18.

COMPOSICIÓN TAMPÓN DE LAVADO (TBS-T)		
Reactivo	Concentración	Propósito
Tris-HCl pH 7.6	20 mM	Solución tamponante que permite mantener el pH adecuado
NaCl	146 mM	Cloruro sódico que permite mantener la concentración de iones de la solución de lavado
Tween-20	0,1% (V/V)	Detergente surfactante cuya función va a ser la de impedir uniones no específicas del anticuerpo.

Tabla 18: Composición del tampón de lavado TBS-T

### **3.1.7. Inmunodetección**

#### **3.1.7.1. Bloqueo**

El bloqueo de la membrana consiste en la incubación de ésta en una solución de BSA (Albúmina de Suero Bovino) en TBS-T al 5% P/V durante 1 hora a temperatura ambiente. En este caso, la solución de BSA va a bloquear los lugares de unión inespecíficos del anticuerpo, favoreciendo una unión de éste a su antígeno específico y evitando niveles de ruido de fondo.

#### **3.1.7.2. Hibridación de los anticuerpos**

Tras el bloqueo de la membrana, se lleva a cabo la incubación de ésta con el anticuerpo primario que es específico para reconocer el epítipo de la proteína de estudio que queda en la membrana en su estructura lineal en condiciones desnaturizantes y reductoras. Esta incubación se realizó a 4°C en agitación durante toda la noche. Las diluciones de los anticuerpos primarios se realizaron en solución de bloqueo BSA al 5%. En este caso, se utilizaron anticuerpos de naturaleza monoclonal y policlonal. Los anticuerpos primarios utilizados en este proyecto se describen en detalle en la Tabla 19.

TABLA ANTICUERPOS PRIMARIOS						
<i>Anticuerpo</i>	<i>Peso Molecular</i>	<i>Dilución</i>	<i>Origen</i>	<i>Especie hospedadora</i>	<i>Referencia</i>	<i>Casa Comercial</i>
ACC	280kDa	1:1000	Policlonal	Conejo	3662	<i>Cell Signaling Technology Inc., Massachusetts, USA</i>
pACC (Ser79)	280kDa	1:1000	Policlonal	Conejo	3661	<i>Cell Signaling Technology Inc., Massachusetts, USA</i>
FAS (G-11)	270kDa	1:1000	Monoclonal	Ratón	sc-48357	<i>Santa Cruz Biotechnology, Texas, USA</i>
GUCY2C	123kDa	1:1000	Policlonal	Conejo	ABIN5997862	<i>Antibodies-online.com, Germany</i>
CPT1A	88kDa	1:1000	Monoclonal	Ratón	ab-128568	<i>Abcam, Cambridge, UK</i>
HSL	90kDa	1:1000	Policlonal	Conejo	ab-45422	<i>Abcam, Cambridge, UK</i>
pHSL (Ser 660)	83kDa	1:1000	Policlonal	Conejo	4126	<i>Cell Signaling Technology Inc., Massachusetts, USA</i>
PPAR $\gamma$	57kDa	1:1000	Policlonal	Conejo	ab-59256	<i>Abcam, Cambridge, UK</i>
LPL (F-1)	56kDa	1:1000	Monoclonal	Ratón	sc-373759	<i>Santa Cruz Biotechnology, Texas, USA</i>
PPAR $\alpha$ (H-2)	55kDa	1:1000	Monoclonal	Ratón	sc-398394	<i>Santa Cruz Biotechnology, Texas, USA</i>
$\beta$ -Actina	42kDa	1:5000	Monoclonal	Ratón	A5316	<i>Sigma Aldrich, Misuri, USA</i>
FGF21	20 kDa	1:1000	Policlonal	Conejo	ab-64857	<i>Abcam, Cambridge, UK</i>

Tabla 19: Anticuerpos primarios empleados en este proyecto de tesis

Tras la incubación con el anticuerpo primario, se retira de la membrana y se realizan 3 lavados de 10 minutos cada uno en agitación a temperatura ambiente con TBS-T para eliminar el excedente.

Posteriormente, se incuba la membrana con el anticuerpo secundario contra la especie del anticuerpo primario reconociendo la parte constante de éste y que presenta un marcaje detectable de peroxidasa. Por lo tanto, mediante este método indirecto de detección, se van a unir múltiples anticuerpos secundarios a cada anticuerpo primario permitiendo una amplificación de la señal y por lo tanto una detección mejor de las proteínas de estudio.

La incubación con el anticuerpo secundario se lleva a cabo durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación. Posteriormente, se retira el anticuerpo secundario y se realizan 3 lavados de 10 minutos cada uno en agitación con TBS-T. Los anticuerpos secundarios utilizados en este proyecto se describen en la tabla 20.

TABLA ANTICUERPOS SECUNDARIOS						
Anticuerpo	Dilución	Origen	Especie hospedadora	Conjugado	Referencia	Casa Comercial
Anti-Conejo	1:5000	Policlonal	Cabra	Peroxidasa de rábano (HorseRadish Peroxidase, HRP)	111-035-144	Peroxidase AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) Jackson ImmunoResearch Europe Ltd., Cambridgeshire, UK
Anti-Ratón	1:10000	Policlonal	Cabra	Peroxidasa de rábano (HorseRadish Peroxidase, HRP)	115-035-003	Peroxidase AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG (H+L) Jackson ImmunoResearch Europe Ltd., Cambridgeshire, UK

Tabla 20: Anticuerpos secundarios utilizados en este proyecto de tesis

### 3.1.7.3. Detección

El último paso consiste en detectar la señal procedente del anticuerpo secundario que determinará la presencia de la conjugación epítipo-anticuerpo primario-anticuerpo secundario y por tanto el resultado final de la expresión proteica por muestra de estudio.

El método de detección utilizado es el de quimioluminiscencia ya que los anticuerpos secundarios se encuentran conjugados con peroxidasa HRP (*Horsedish Peroxidase*). Por tanto, para detectar la señal se emplea un kit (*Pierce<sup>TM</sup> Western Blotting Substrate, 32106, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA*) de dos reactivos que incluyen, por un lado, el sustrato del enzima peroxidasa que se encuentra en el anticuerpo secundario y el luminol que es un potenciador de quimioluminiscencia. La reacción catalizada

por la peroxidasa produce una emisión de luz que va a ser detectada por autorradiografía de rayos X en películas.

La membrana se incubaba con la mezcla de ambos reactivos a volúmenes iguales (proporción 1:1) durante 5 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Tras los 5 minutos se elimina el exceso de reactivo y se coloca la membrana cubierta por una lámina de acetato transparente dentro de un cassette de autorradiografía. En una sala oscura se procede a la exposición de las películas radiográficas Mamoray (*Película RX Agfa MAMORAY HT 18x24 cms,351KY, Agfa Gevaert, Mortsel, Belgium*) introduciéndolas en el cassette encima de las membranas que se encuentran cubiertas por una lámina de acetato transparente para evitar el contacto directo de los reactivos con la película. Se cierra el cassette y se lleva a cabo la exposición. Las exposiciones de las proteínas podían llegar a durar desde segundos a minutos dependiendo de la proteína a detectar y el anticuerpo empleado. Tras el tiempo de exposición, se sacaba la película del cassette y se introducía en una máquina de revelado automática (*Procesador de películas CURIX 60, Agfa Gevaert, Mortsel, Belgium*) en la que las películas atravesaban a través de un sistema de rodillos 3 bandejas: una bandeja que contenía líquido revelador, una segunda bandeja con líquido fijador y una última bandeja con agua destilada. Finalmente, las películas se secaban mediante un secador infrarrojo y se obtenían las proteínas reveladas correspondientes a la exposición realizada.

Tras la obtención de las imágenes, las membranas podían ser tratadas de nuevo para la detección de otra proteína diferente de estudio o la proteína referente utilizada como control de carga, que en nuestro proyecto de tesis resulta ser la  $\beta$ -actina.

#### **3.1.7.4. Análisis de las bandas proteicas detectadas**

Tras el revelado de las proteínas en las películas radiográficas, se llevaron a cabo las imágenes digitalizadas de las

bandas proteicas en alta resolución mediante un escáner (*G4010 HP Scanjet*, California, USA). Para llevar a cabo el análisis de cuantificación de las bandas se utilizó el *software* de procesamiento de imagen Image J (*Image J versión 1.50i programado en Java, NIH*, Bethesda, Maryland, USA). La medición de la cantidad de proteína por muestra se lleva a cabo ajustando un área rectangular que es el mismo para todas las muestras y permite detectar el número de píxeles por área que presenta cada muestra por cada película radiográfica. Cada medida obtenida por muestra debe ser corregida con respecto a la medida obtenida del fondo de la membrana. Posteriormente esos valores se relativizan con las medidas de cuantificación proteica obtenidas de la proteína utilizada como control de carga, y éstas a su vez se normalizan y se llevan a porcentaje con respecto al grupo vehículo en cada experimento.

Estos valores obtenidos se presentan gráficamente representando la media por grupo  $\pm$  desviación estándar del conjunto de datos porcentuales por grupo.

En todos los experimentos de Western-Blot se empleó un número representativo de muestras procedentes de diferentes grupos experimentales. De tal manera, que en cada experimento podíamos analizar la expresión proteica de todos los grupos de estudio.

### **3.2. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA: PCR CUANTITATIVA (Q-PCR)**

Para poder determinar los niveles de expresión génica de las muestras de estudio se llevaron a cabo las siguientes fases:

#### **3.2.1. Extracción de RNA: método Tiocianato de Guanidina-Fenol-Cloroformo**

Para llevar a cabo la extracción de RNA total se emplearon distintos métodos en función del tipo de muestra, ya sean cultivos

celulares o tejidos. Todos los pasos se realizaron manteniendo las muestras en frío para evitar la degradación del RNA.

En el caso de los cultivos celulares, la extracción del RNA se producía una vez se culminaba con el período de tratamiento correspondiente. Por tanto, se llevaba a cabo el siguiente protocolo:

1.- Se retiraba por aspiración el medio de cultivo en el que se habían tratado las células y se realizaron dos lavados con el tampón de lavado PBS a 4°C en todos los pocillos de las placas.

2.- Se situaron las placas sobre hielo y se añadió el reactivo TRIzol (15596026, *TRIzol™ Reagent, Invitrogen™*, California, USA). El TRIzol es un reactivo que contiene, por un lado, tiocianato de guanidina que permite desnaturalizar las proteínas y, por otro lado, fenol para separar los ácidos nucleicos de las proteínas y de los lípidos.

3.- Se incubaron las placas con el TRIzol durante 10 minutos en hielo y se agitaron para recoger lo máximo posible del lisado. Esa suspensión celular en TRIzol se recogió en tubos de polipropileno 1,5mL rotulados (11326144, *Axygen™MCT-150-C-S A Corning Brand, Corning Inc.*, New York, USA). Posteriormente, se agitaron vigorosamente todos los tubos.

4.- Se centrifugaron los tubos a 12000 RCF a 4°C durante 10 minutos.

5.- Se recogió el sobrenadante en una nueva tanda de tubos de 1.5 mL rotulados y se añadió cloroformo (131252.1611, *Triclorometano estabilizado con etanol para análisis, ACS, ISO, Riqueza mínima (C.G.):99%, Panreac Applichem, ITW Reagents*, Illinois, USA), se agitaron los tubos por inversión y se incubaron cinco minutos a temperatura ambiente para diferenciar bien las dos fases.

6.- Tras ese tiempo, se centrifugaron a 12000 RCF durante 15 minutos a 4°C en la que se separan las siguientes fases: una fase

orgánica con lípidos y proteínas, una interfase de color blanquecino en la que se encuentra el DNA y la última fase acuosa en la que se encuentra el RNA.

7.- Se recogió cuidadosamente el sobrenadante con RNA en una nueva tanda de tubos de 1.5 mL rotulados a la que se añadió isopropanol (*MFCD00011674, 2-Propanol (Certified ACS), Fisher Chemical, Fisher Scientific, New Hampshire, USA*) para favorecer la precipitación del RNA, se agitaron los tubos vigorosamente y se incubaron 10 minutos a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

8.- Se centrifugaron los tubos a 12000 RCF 10 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ , se descartó el sobrenadante por decantación.

9.- Se añadió etanol al 75% diluido en agua DEPC (agua bidestilada con dietilpirocarbonato 0.1%), se agitaron los tubos y se centrifugaron a 7500 RCF durante 5 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ .

10.- Se eliminó el sobrenadante por decantación de forma cuidadosa y se dejó secar el pellet.

11.- Por último, una vez se había secado bien, el pellet se resuspendió en agua DEPC. En el caso de que no se logre disolver el pellet en agua, se realizaron 3 ciclos a  $60^{\circ}\text{C}$  durante 3 minutos y con agitaciones intermedias entre ciclos para asegurar la resuspensión.

En el caso de los tejidos de los animales de experimentación, el protocolo se realizó con los tejidos que se encontraban guardados a  $-80^{\circ}\text{C}$  y fue el siguiente:

1.- Se toma un pequeño fragmento por muestra del tejido y se colocan en frío en tubos de polipropileno de 2 mL rotulados con cierre de seguridad (*Safe Lock tubes 2.0 ml, Eppendorf, Hamburg, Germany*).

2.- Una vez preparados todos los tubos con las muestras de tejido cortadas, se les añade una bolita de acero y el reactivo TRIzol.

3.- Posteriormente, se llevó a cabo una homogeneización mecánica mediante el empleo del TissueLyser II (85300, *TissueLyser II*, Qiagen, Maryland, USA), a 30 Hz durante 3 minutos.

A partir de este punto, los siguientes pasos del protocolo realizado se corresponden con los desarrollados en las muestras celulares descritos desde el punto 4 hasta el punto 11.

### **3.2.2. Cuantificación del RNA aislado de las muestras**

A partir de este momento, se siguió el mismo protocolo para todas las muestras independientemente de su origen, ya sean cultivos celulares o tejidos.

Tras la resuspensión del pellet de RNA en agua DEPC, se llevó a cabo la cuantificación del RNA en un espectrofotómetro de microvolumen (*NanoDrop<sup>TM</sup> 2000c*, *ND-2000C*, *Thermo Fisher Scientific*, Massachusetts, USA). Con esta cuantificación, podemos determinar la concentración del RNA a través del valor de su absorbancia a 260 nm y su grado de pureza mediante la relación de absorbancias A260/280 y A260/230. La relación A260/280, nos indica el grado de contaminación por proteínas, se considerará una pureza óptima si el valor se encuentra en el rango 2.0-2.2 y si el valor se sitúa por encima de 1.7 se considera pureza aceptable. Por otro lado, la relación A260/230 nos indica la contaminación de fenoles, se considera en general una pureza aceptable si el valor es superior a 1.5.

Tras la medición de las concentraciones de todas las muestras, se procedió a preparar una nueva tanda de tubos rotulados para preparar diluciones de todas ellas a la concentración de 0.01 µg/ µL para realizar la retrotranscripción.

### 3.2.3. Retrotranscripción

Esta fase consiste en la amplificación mediante la técnica de PCR, del RNA extraído en forma de DNA complementario (cDNA) gracias a la transcriptasa reversa.

Para poder llevar a cabo la RT-PCR es necesario preparar el mix de reactivos de 20  $\mu\text{L}$  para cada muestra y añadir a ese mix un volumen de 10  $\mu\text{L}$  de RNA de la muestra.

En la Tabla 21 se describen los reactivos empleados en la RT-PCR

MIX REACTIVOS RT-PCR		
Reactivo	Volumen( $\mu\text{L}$ )	Casa Comercial
Agua DEPC	3.58	Agua DEPC: DEPC Treated Water (AM9916, Invitrogen <sup>TM</sup> , Life technologies, California, USA)
Tampón de retrotranscripción (5X First Strand Buffer)	6	5x First Strand Buffer: M-MLV RT Buffer (18057-018, Invitrogen <sup>TM</sup> , Life technologies, California, USA)
Mezcla de dNTPs 100 mM (dTTP, dCTP, dGTP, dATP)	6	100mM dNTP Set, PCR Grade (10297-018, Invitrogen <sup>TM</sup> , Life technologies, California, USA)
MgCl <sub>2</sub> 25 mM	3	Magnesium Chloride 25 mM (R0971, Invitrogen <sup>TM</sup> , Life technologies, California, USA)
Cebadores aleatorios (Random Primers) 3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	0.17	Random Primers (48190-011, Invitrogen <sup>TM</sup> , Life technologies, California, USA)
Inhibidor de RNasas (RNase OUT: 40U/ $\mu\text{L}$ )	0.25	RNase OUT <sup>TM</sup> Recombinant Ribonuclease Inhibitor (10777019, Invitrogen <sup>TM</sup> , Life technologies, California, USA)
Transcriptasa Reversa (M-MLV RT: 200 U/ $\mu\text{L}$ )	1	M-MLV Reverse Transcriptase (200U/ $\mu\text{L}$ ) (28025013, Invitrogen <sup>TM</sup> , Life technologies, California, USA)
Muestra de RNA (10 $\mu\text{L}$ )		

Tabla 21: Mix de reactivos empleados en la RT-PCR

Las condiciones del termociclador para que se lleve a cabo la reacción de retrotranscripción:

- 1.- 25°C durante 10 minutos.
- 2.- 37°C durante 120 minutos.

3.- 85°C durante 5 minutos.

4.- 4°C hasta la recogida de los tubos del termociclador.

### 3.2.4. PCR en tiempo real (Q-PCR)

La PCR cuantitativa (Q-PCR) es una técnica que nos va a permitir amplificar y a la vez, cuantificar de forma absoluta o relativa el producto de amplificación de la RT-PCR que es el cDNA. Tras cuantificarlo, se lleva a cabo el estudio del cambio de expresión génica entre las muestras tratadas y las muestras control tanto del gen control como de los genes de interés y posteriormente, se normalizan los valores para poder comparar la expresión del gen control con respecto la expresión de cada gen de interés.

Debido a que es posible cuantificar el producto mediante la detección de su fluorescencia al final de cada ciclo de amplificación para determinar cuánto DNA se ha amplificado, se utilizaron dos técnicas para llevar a cabo este proceso, que fueron SYBR-Green y Taqman. Para realizar esta Q-PCR ya sea por SYBR Green o por Taqman se utilizaron las placas de 96 pocillos (*N8010560 Applied Biosystems™ MicroAmp™ Optical 96-Well Reaction Plate, 10411785, Applied Biosystems™, Fisher Scientific, Thermo Scientific, New Hampshire, USA*) .

**SYBR Green:** se trata de un colorante fluorescente o fluorocromo que va a ser capaz de intercalarse en las moléculas de DNA de doble cadena de forma inespecífica. De tal manera, que va a servir de etiqueta para permitir identificar todo el producto de PCR mediante la emisión fluorescente. La longitud de onda a la que se excita el compuesto de SYBR Green es de 494 nm y la longitud de onda de emisión es de 521nm. Por tanto, cuanto más producto de cDNA de doble cadena se amplifique, el compuesto SYBR Green se unirá generando más fluorescencia que aumentará de forma proporcional al producto de PCR.

La mezcla de reactivos para SYBR Green se describe en la Tabla 22.

MIX REACTIVOS SYBR Green (Q-PCR)		
Reactivo	Volumen( $\mu$ L)	Casa Comercial
Agua Milli-Q	3.1	Agua Milli-Q: Sistema de purificación y control de agua Milli-Q® (ZRXQ003WW, Merck-Millipore Corporation, Massachusetts, USA)
Master Mix de SYBR Green	6	Brilliant II SYBR® Green QPCR Master Mix (600828, Agilent Technologies, California, USA)
ROX Dye (1:500)	0.18	ROX Dye: Passive Reference Dye (ROX) (600536, Agilent Technologies, California, USA)
Cebador Directo (Primer Forward) 10 $\mu$ M	0.36	Primers Forward and Reverse: Primers para Humano y Ratón (Eurofins Genomics, Ebersberg, Germany)
Cebador Inverso (Primer Reverse) 10 $\mu$ M	0.36	
Muestra de cDNA (2 $\mu$ L)		

Tabla 22: Mix de reactivos empleados en la Q-PCR de SYBR Green.

Los primers que se utilizaron en SYBR Green se describen con más detalle en la Tabla 23.

PRIMERS SYBR Green	
Nombre Primer	Secuencia (5'->3')
Hs HPRT FW	ACCCACGAAGTGTGGATA
Hs HPRT RV	AAGCAGATGGCCACAGAACT
Hs GUCY2C FW	AGTGGGCACAAGGAGTATGG
Hs GUCY2C RV	CACCGCATCTTCCAAGTTTT
Mm Hprt FW	AAGCTTGCTGGTGAAAAGGA
Mm Hprt RV	TTGCGCTCATCTTAGGCTTT
Mm Ppara FW	TCTGTGGGCTCACTGTCTG
Mm Ppara RV	AACTACCTGCTCAGGGCTCA

Tabla 23: Cebadores utilizados para la Q-PCR por SYBR Green. Hs, *Homo sapiens*, Humano; Mm, *Mus musculus*, Ratón; FW, Forward (Directo); RV, Reverse (Reverso).

En SYBR Green se cargan 10  $\mu$ L en cada pocillo del mix de reactivos a los que se añaden 2  $\mu$ L del cDNA obtenido de la RT-PCR. Todas las muestras se cargan por duplicado ya sea el gen control o el gen de interés.

Las condiciones de la Q-PCR por SYBR Green fueron las siguientes:

- 1.- 1 ciclo de 95°C durante 3 minutos.
- 2.- 40 ciclos: (95°C durante 5 segundos + 60°C durante 32 segundos) x 40 ciclos.
- 3.- Fase de disociación: 95°C durante 15 segundos+60°C durante 1 minuto + 95°C durante 15 segundos+95°C durante 15 segundos.

**Taqman:** Esta técnica consiste en el empleo de sondas Taqman o de hidrólisis que están formadas por un fluoróforo unido de forma covalente al extremo 5' de la sonda (también se denomina reportero, del inglés “*reporter*”) y un supresor de la fluorescencia en el extremo 3' (también llamado en inglés “*quencher*”). El método de actuación en la Q-PCR es el siguiente:

- 1.- En el inicio de la reacción de la PCR, se eleva la temperatura que permite la desnaturalización del cDNA bicatenario, y en este momento la señal fluorescente del extremo reportero se encuentra suprimida por el “*quencher*” del extremo 3'.

- 2.- Posteriormente baja la temperatura, y se produce la unión de la sonda Taqman y de los “*primers forward y reverse*” a las cadenas de DNA.

- 3.- Por último, la *Taq* polimerasa reconoce los primers y empieza a sintetizar nuevas cadenas complementarias a las cadenas molde del DNA. Cuando este enzima alcanza una sonda Taqman por el extremo 5', escinde la sonda gracias a su actividad exonucleasa, liberandose el fluoróforo del extremo 5'. Esta escisión del reportero produce la emisión de fluorescencia que se libera de forma proporcional según se va incrementando la cantidad del producto durante los ciclos de PCR. Por tanto, la fluorescencia producida va a ser directamente proporcional al fluoróforo liberado.

La principal ventaja de este tipo de técnica es que aumenta la especificidad y la sensibilidad de la detección cuyo objetivo es

cuantificar la expresión génica. La mezcla de reactivos para Taqman se describe en la Tabla 24.

MIX REACTIVOS Taqman (Q-PCR)		
Reactivo	Volumen( $\mu$ L)	Casa Comercial
Agua Milli-Q	2.92	Agua Milli-Q: Sistema de purificación y control de agua Milli-Q® (ZRXQ003WW, Merck-Millipore Corporation, Massachusetts, USA)
Master Mix de Taqman	6	Taqman™ Universal PCR Master Mix (4364338, Applied Biosystems, California, USA)
Cebador Directo (Primer Forward) 10 $\mu$ M	0.36	Primer Directo (Applied Biosystems, California, USA)
Cebador Inverso (Primer Reverse) 10 $\mu$ M	0.36	Primer Reverso (Applied Biosystems, California, USA)
Sonda 5 $\mu$ M	0.36	Sonda TaqMan® (Applied Biosystems, California, USA)
Muestra de cDNA (2 $\mu$ L)		

Tabla 24: Mix de reactivos empleados en la Q-PCR de Taqman

Los primers y las sondas Taqman empleadas se describen en la Tabla 25.

PRIMERS TAQMAN	
Nombre Primer	Secuencia (5'->3')
Rn/Mm Hprt FW	Cebadores comerciales adquiridos de Applied Biosystems (Rn01527840_m1; Mm01545399_m1)
Rn/Mm Hprt RV	
Rn/Mm Sonda Hprt	
Rn Gucy2c FW	Cebadores comerciales adquiridos de Applied Biosystems (Rn00565895_m1)
Rn Gucy2c RV	
Rn Sonda Gucy2c	
Mm Fgf21 FW	CACTCTGGTACCCAGGACCAATAA
Mm Fgf21 RV	CCCTCAACTTTTCTCTGCCTAGGT
Mm Sonda Fgf21	ACAAGAGTAGAGGTGGTGGGCAGAATGCC

Tabla 25: Cebadores utilizados para la Q-PCR por Taqman. Rn, *Rattus norvegicus*, Rata; Mm, *Mus musculus*, Ratón; FW, Forward (Directo); RV, Reverse (Reverso).

En Taqman, se cargan 10  $\mu\text{L}$  en cada pocillo del mix de reactivos final a los que se añaden 2  $\mu\text{L}$  del cDNA obtenido de la RT-PCR. Todas las muestras se cargan por duplicado ya sea el gen control o el gen de interés.

Las condiciones de la Q-PCR para Taqman fueron las siguientes:

- 1.- 40 ciclos: (50°C durante 2 minutos) x40.
- 2.- 95°C durante 10 minutos.
- 3.- 95°C durante 10 minutos.
- 4.- 95°C durante 15 segundos.
- 5.- 60°C durante 1 minuto.

El equipo que se empleó para realizar la Q-PCR tanto por SYBR Green como por Taqman fue *StepOnePlus™ Real-Time PCR System (437660, Applied Biosystems™ Fisher Scientific, Thermo Scientific, New Hampshire, USA)*.

Para determinar la concentración de cDNA se emplea el término de  $C_T$  que refleja el número del ciclo en el que la señal de fluorescencia supera los niveles de fondo. Este valor es inversamente proporcional a la concentración de cDNA. Los niveles de expresión de los genes de interés se normalizaron con respecto a los niveles de expresión del gen control *HPRT* en humanos o *Hprt* en roedores. Los resultados se expresan como unidades arbitrarias relativas al valor medio del grupo control. En ocasiones, estos valores también se han expresado en porcentaje.

### **3.3. ANÁLISIS DEL PERFIL LIPÍDICO EN SANGRE Y EN HÍGADO**

Para determinar cuantitativamente los niveles plasmáticos de ácidos grasos libres (NEFAS en inglés: *Non Esterified Fatty Acids*) y los

niveles de triglicéridos plasmáticos y hepáticos (los triglicéridos hepáticos a partir de las muestras de extracción de lípidos de los hígados murinos), se utilizaron kits (**NEFAS: HR Series NEFA-HR (2)**, FUJIFILM Wako Diagnostics, USA; **Triglicéridos: 1001310**, Triglycerides GPO-POD. Enzymatic-colorimetric, SpinReact, Girona, Spain) comerciales con protocolos descritos por el fabricante. El principio del método se basa en una serie de reacciones enzimáticas dependientes de temperatura (37°C) cuya reacción final libera una coloración detectada por un espectrofotómetro (*Epoch 2 microplate reader*, Biotek Instruments Inc., Vermont, USA). Por lo tanto, la intensidad del color formado es proporcional a la concentración presente en la muestra ensayada.

#### **3.4. TÉCNICA DE TINCIÓN DE ÁCIDOS GRASOS *IN VITRO*: OIL-RED-O**

Se colocaron unos cubreobjetos previamente esterilizados sobre los pocillos de las placas multipocillo de 24 pocillos (*CLS3527*, Corning® Costar® *TC-Treated Multiple Well Plates*, Corning Inc., New York, USA) y posteriormente estos cubreobjetos se trataron con Poli-L-Lisina (*P4707*, Sigma Aldrich, Misuri, USA) durante 5 minutos a 37°C para poder asegurar la adherencia de las células a ellos. Posteriormente, se recuperaba la Poli-L-Lisina y se realizaron 2 lavados con tampón de lavado PBS y se dejó secar la placa en el incubador durante 3 horas a 37°C. Después, se sembraron las células en los pocillos y se cultivaron en el incubador a 37°C y un 5% de CO<sub>2</sub>. Cuando existía una confluencia cercana al 70% se llevaron a cabo los tratamientos correspondientes. Tras finalizar estos tratamientos se realizó el siguiente protocolo:

- Se aspiró el medio de tratamiento y se realizaron dos lavados con tampón de lavado PBS.
- Se fijaron las células con formaldehído 4% a temperatura ambiente. Posteriormente, se realizaron 3 lavados con PBS para finalmente llevar a cabo la tinción con Oil Red O.
- Tratamiento para tinción Oil Red O: las muestras de células fijadas en los cubreobjetos fueron incubadas con el compuesto Oil Red-O durante 10 minutos. Posteriormente se lavaron con agua destilada y se contratiñeron con hematoxilina durante tres minutos y se montaron sobre un portaobjetos con medio de montaje acuoso.
- Análisis gotas lipídicas con software de imagen FRIDA (*FRamework for Image Dataset Analysis*, Johns Hopkins University, Maryland, USA).

### 3.5. ESTUDIOS HISTOLÓGICOS

En la experimentación *in vivo* se llevaron a cabo estudios de las histologías del hígado que nos permitieron comprobar la morfología y la estructura de los hepatocitos, además del estado de esteatosis hepática. Para ello, se utilizaron distintas técnicas de tinción de tejidos que permitieron apreciar estas características y que se desarrollan a continuación:

#### 3.5.1. Tinción de hematoxilina y eosina (H&E)

Esta tinción se emplea fundamentalmente para el estudio de la morfología, ya que permite visualizar de forma bastante clara las estructuras, por un lado, la hematoxilina de naturaleza básica va a teñir estructuras ácidas (basófilas) como es el núcleo de tonos azul y púrpura y, por otro lado, la eosina de naturaleza ácida va a teñir

componentes básicos (acidófilos) de color rosa como por ejemplo el citoplasma. Para llevar a cabo el protocolo de tinción, el trozo tejido que fue extraído del animal y guardado en un cassette de inclusión, fue inmerso en formaldehído al 4%. Posteriormente, tras ser fijado, el tejido se incluye en un bloque de parafina. Sobre ese bloque se realizan cortes y posteriormente se sumergen en xilol para eliminar el exceso de parafina. Luego se pasan por una serie de alcoholes de concentración decreciente para rehidratar la muestra (100°, 96° y 70°). Se realiza un lavado con agua destilada para eliminar el exceso de alcohol y se sumergen 10 minutos en hematoxilina. Posteriormente se lavan con agua destilada para eliminar el exceso y se pasan por un alcohol ácido. Se lavan de nuevo con agua destilada y se sumergen 30 segundos en eosina. Después se pasan por una serie de alcoholes en orden creciente (70°, 95°, 100°) que permiten deshidratar las muestras para poder realizar el montaje. Finalmente, se dejan remojar 10 minutos en xilol y se montan las preparaciones empleando medio de montaje. Una vez secas, ya estarían listas para ser observadas por el microscopio óptico (*Axio Lab.A1, Zeiss, Oberkochen, Germany*) que se encuentra conectado a una cámara para poder realizar fotos de las preparaciones.

### **3.5.2. Tinción de Oil Red O**

Esta solución de tinción permite detectar lípidos neutrales en cortes de tejido congelados ya que, el colorante Oil Red O es de naturaleza lipófila y puede difundirse hacia los lípidos del tejido tiñéndolos de color rojo. Por tanto, una vez se lleva a cabo la extracción de los tejidos del animal, se reserva un trozo para congelar inmediatamente y se emplea para esta tinción. El protocolo consiste en el corte de secciones de tejido congelado de uno 5-10  $\mu\text{m}$  de espesor que se fijan al portaobjetos. Se dejan secar durante 60 minutos a temperatura ambiente y se fijan con formaldehído al 4% en frío durante 5-10 minutos. Posteriormente se dejan secar durante 60 minutos, se lavan con agua destilada y se vuelven a dejar secar. Se

colocan en isopropanol al 60% durante 20 segundos, luego en solución Oil Red O durante 10 minutos y de nuevo en isopropanol al 60% durante 30 segundos. Se enjuagan las preparaciones con agua destilada y se aplica la contratinción con hematoxilina durante 5 minutos para poder teñir de azul los núcleos. De nuevo se realiza un lavado con agua destilada y se montan en medio de montaje. Se dejan secar y ya estarían listas para ser observadas por el microscopio óptico (*Axio Lab.A1, Zeiss, Oberkochen, Germany*) que se encuentra conectado a una cámara para poder realizar fotos de las preparaciones. Finalmente, las fotos fueron analizadas empleando el *software ImageJ (Image J versión 1.50i programado en Java, NIH, Bethesda, Maryland, USA)*, en el que se cuantificaron las gotas lipídicas teñidas de rojo.

### 3.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos obtenidos de todos los experimentos se representaban como el valor promedio del grupo de individuos  $\pm$  la desviación típica. El tamaño muestral de los grupos en cada experimento se detalla en los pies de figura de los resultados.

En primer lugar, se llevó a cabo un estudio de la normalidad de los datos mediante el test de Shapiro-Wilk según nuestro tamaño muestral. Después, se llevó a cabo un análisis de la homogeneidad de varianzas (ANOVA). Si era homogénea se llevaba a cabo test post-hoc Tukey. Pero si era “no homogénea” se realizaban los test no paramétricos, el de Krustal-Wallis junto con el test Mann-Whitney.

Para el estudio de la significancia, se consideraba que un p-valor por debajo de 0.05 ya era estadísticamente significativo, y se indicaba de esta manera: \*  $p < 0.05$ . En ocasiones el p-valor era menor de 0.01 o incluso menor de 0.001, por lo tanto, en estos casos, se indicaba de esta manera: \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ .

# RESULTADOS

---





# ESTUDIOS *IN VITRO*

## 1. EFECTO DEL TRATAMIENTO CON LA HORMONA UROGUANILINA EN UN MODELO CELULAR DE ESTEATOSIS HEPÁTICA Y MECANISMOS MOLECULARES IMPLICADOS

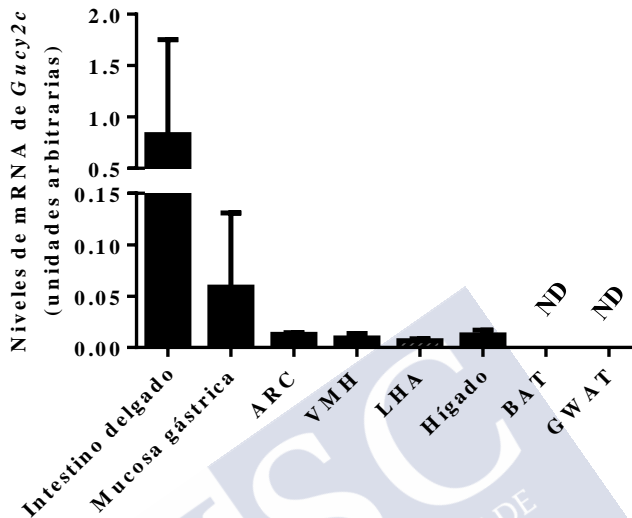
### 1.1. IDENTIFICACIÓN DEL RECEPTOR DE LA UROGUANILINA, GUCY2C EN EL HÍGADO

Como ya hemos descrito en el apartado de introducción, la hormona uroguanilina (UGN) forma parte del eje hipotálamo-intestino de gran importancia en la regulación de la homeostasis energética. Si bien para poder efectuar su acción, es necesario que se una a su receptor transmembrana GUCY2C presente en ambos tejidos<sup>106,112,115,118,121</sup>. Con el fin de conocer la localización de dicho receptor se llevó a cabo el estudio de la expresión génica de *Gucy2c* en diversos tejidos de rata (Figura 1).

Como se puede observar en la figura 1, la mayor expresión del receptor se encuentra en el intestino delgado y en la mucosa gástrica ya que es donde la hormona uroguanilina lleva a cabo su función principalmente. Por otro lado, hay que destacar la presencia del receptor en algunos núcleos del hipotálamo (ARC, VMH y LHA) y en el hígado.

Precisamente, fijamos nuestra atención en la expresión génica del receptor en el hígado ya que, no existe ningún estudio acerca del efecto que puede producir esta hormona una vez lleva a cabo su unión con el receptor GUCY2C a este nivel. Por ello, nuestra investigación

comienza enfocándose en el estudio del efecto de la acción de la uroguanilina en el hígado y los mecanismos metabólicos involucrados.

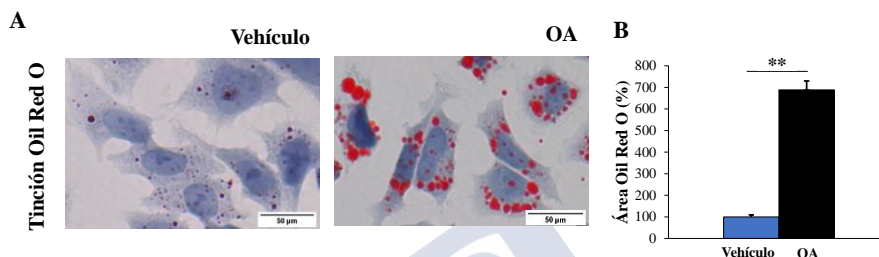


**Figura 1.** Estudio de la expresión génica del receptor transmembrana *Gucy2c* en varios tejidos de rata. Los valores se representan como Media  $\pm$  Error Estándar de la Media (SEM). Valor “n” por grupo es de 3-5 muestras. mRNA: Ácido RiboNucleico mensajero; ARC: Núcleo Hipotalámico Arcuato; VMH: Núcleo Hipotalámico Ventromedial, LHA: Núcleo Hipotalámico Lateral, BAT: Tejido Adiposo Pardo (“*Brown Adipose Tissue*”); GWAT: Tejido Adiposo Blanco Gonadal (“*Gonadal White Adipose Tissue*”); ND: no detectable.

## 1.2. ESTABLECIMIENTO DE UN MODELO DE ESTEATOSIS HEPÁTICA EN LA LÍNEA CELULAR HUMANA, HEPG2

Se ha descrito recientemente el efecto lipolítico de la uroguanilina en adipocitos humanos regulando el peso corporal y la adiposidad<sup>124</sup>. Dado que en este trabajo se demuestra la presencia de receptor GUCY2C en el hígado junto con la capacidad lipolítica que presenta la UGN en el estudio de adipocitos, se planteó la idea de estudiar el efecto de esta hormona en un modelo de esteatosis hepática empleando la línea celular humana, HepG2.

Con este fin, en las líneas celulares se realizaron dos grupos experimentales: el grupo vehículo (vehículo del ácido oleico) y el grupo experimental tratado con ácido oleico (OA) 1mM, durante 24 horas. Posteriormente, se realizó una tinción Oil Red O de ácidos grasos y se cuantificaron las gotas lipídicas (Figura 2).



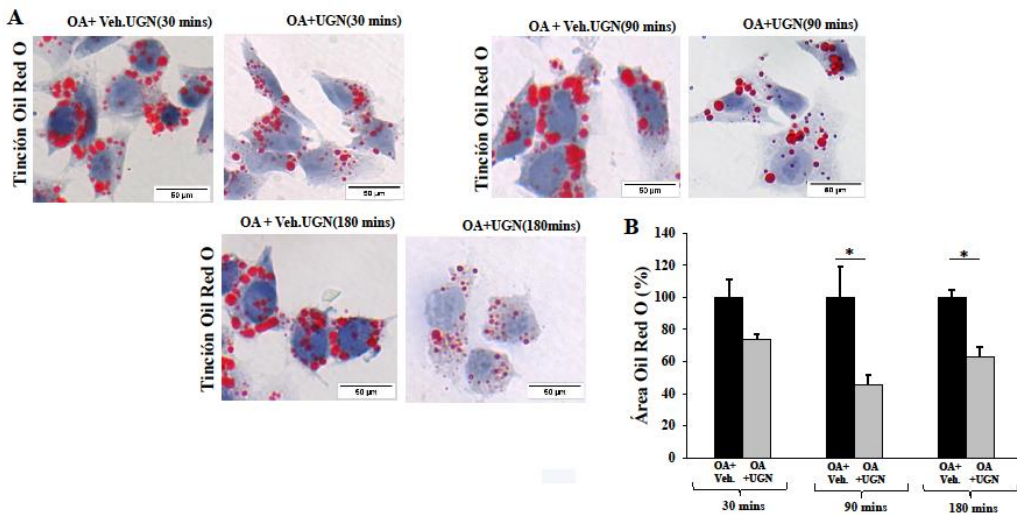
**Figura 2.** Modelo de esteatosis hepática en la línea celular humana HepG2. Tinción Oil Red O en los dos grupos experimentales: grupo Vehículo y grupo ácido oleico (OA). Barra de escala 50  $\mu$ m(A). Cuantificación de las gotas lipídicas de ambos grupos(B). Los valores se representan como Media  $\pm$  Error Estándar de la Media (SEM). Valor "n" por grupo es de 5 muestras. \*\*p<0.01 frente a Vehículo. OA: Ácido oleico ("Oleic Acid").

Como podemos comprobar en las imágenes y la cuantificación lipídica de la tinción, las células tratadas con ácido oleico presentan una elevada acumulación lipídica en el citoplasma estadísticamente significativa en comparación con el grupo vehículo. Por tanto, de esta forma se puede confirmar que ha sido posible generar un modelo de esteatosis hepática *in vitro* gracias al tratamiento con ácido oleico.

### 1.3. EFECTO DEL TRATAMIENTO CON LA HORMONA GASTROINTESTINAL UROGUANILINA EN UN MODELO DE ESTEATOSIS HEPÁTICA *IN VITRO*

En este momento se llevó a cabo el estudio del efecto del tratamiento con la uroguanilina sobre la esteatosis generada en el modelo celular HepG2. Para ello, se realizó un experimento que se

caracterizaba por llevar a cabo el tratamiento de la hormona a tres tiempos diferentes para poder determinar aquel en el que la uroguanilina va a ejercer su acción y mantenerlo para los experimentos subsiguientes.



**Figura 3.** Efecto del tratamiento de la hormona gastrointestinal uroguanilina en el modelo celular de esteatosis hepática HepG2. Tinción Oil Red O en los grupos experimentales: tres grupos OA y tres grupos OA+UGN, a 30 minutos, 90 minutos y 180 minutos. Barra de escala 50  $\mu$ m(A). Cuantificación de las gotas lipídicas de todos los grupos(B). Los valores se representan como Media  $\pm$  Error Estándar de la Media (SEM). Valor “n” por grupo es de 4-5 muestras. \* $p < 0.05$  frente a OA. OA: Ácido oleico (“Oleic Acid”); Veh.: Vehículo; UGN: Uroguanilina; mins: minutos.

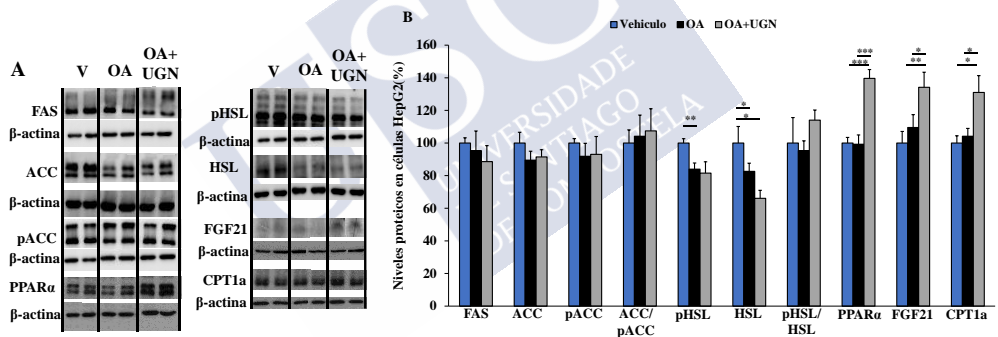
El tratamiento con la hormona uroguanilina(100nM) en el modelo *in vitro* de esteatosis hepática disminuye el contenido lipídico en el citoplasma de los hepatocitos, según se observa en las micrográficas de la figura 3A. En la figura 3B, se puede observar que la disminución del contenido lipídico producido por la uroguanilina (100nM) es estadísticamente significativo a partir de los 90 minutos y a los 180 minutos en comparación con sus respectivos controles OA.

Además hay que destacar que a partir de este resultado, se establece que el tratamiento con una dosis de UGN a 100 nM durante

90 minutos es el que se va a emplear para los próximos experimentos celulares que se desarrollan en este proyecto.

#### 1.4. ESTUDIO DE LOS MECANISMOS MOLECULARES INVOLUCRADOS EN LA ACCIÓN DE LA UROGUANILINA SOBRE EL METABOLISMO LIPÍDICO HEPÁTICO

El siguiente paso consistió en descifrar cual era la ruta molecular que se activaba por el tratamiento con la uroguanilina produciendo este efecto de disminución de gotas lipídicas en el citoplasma de los hepatocitos. Para ello, se estudió la expresión proteica de marcadores moleculares involucrados en el metabolismo lipídico hepático en el modelo de esteatosis hepática *in vitro* tras el tratamiento con UGN (Figura 4).

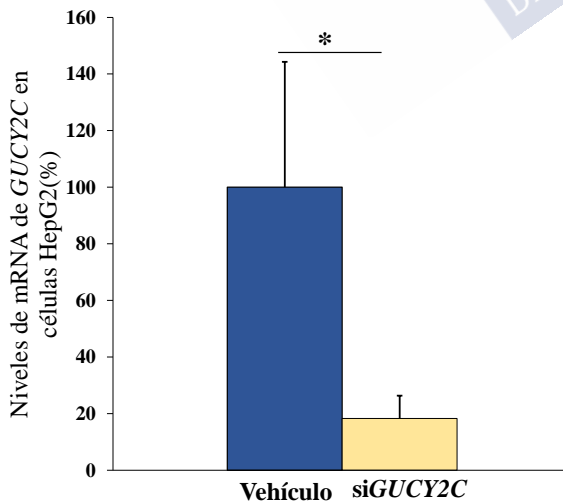


**Figura 4.** Estudio del efecto del tratamiento de la hormona gastrointestinal UGN en el modelo celular de esteatosis hepática HepG2 sobre la expresión proteica de los marcadores moleculares que intervienen en el metabolismo lipídico. Bandas de Western-Blot representativas de las proteínas FAS, ACC, pACC, pHSL, HSL, PPAR $\alpha$ , FGF21, CPT1a y  $\beta$ -actina en los grupos V, OA, OA+UGN(A). Niveles proteicos en los grupos de células V, OA y OA+UGN de los marcadores descritos en la figura 4A. Se utilizó la proteína  $\beta$ -actina para normalizar los niveles de proteína(B). Los valores se representan como Media  $\pm$  Error Estándar de la Media (SEM). Valor “n” por grupo es de 7-9 muestras \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ . V: Vehículo; OA: Ácido oleico (“Oleic Acid”); UGN: Uroguanilina; FAS: Ácido graso sintasa, ACC: Acetil-CoA carboxilasa, pACC: FosfoAcetil-CoA carboxilasa; pHSL: Fosfolipasa sensible a hormonas; HSL: Lipasa sensible a hormonas; PPAR $\alpha$ : Receptor activado por proliferador de peroxisomas alfa; FGF21: Factor de crecimiento de fibroblastos 21; CPT1a: Carnitina palmitoiltransferasa 1a.

El tratamiento con uroguanilina (100 nM, 90 minutos) incrementa la expresión proteica de forma significativa de las moléculas PPAR $\alpha$ , FGF21 y CPT1a que intervienen en el proceso de  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos. Una vez establecido el mecanismo molecular que es activado por la UGN se van a llevar a cabo experimentos más concretos, relacionados con estos marcadores oxidativos.

### 1.5. PAPEL DEL RECEPTOR GUCY2C HEPÁTICO EN LA ACUMULACIÓN DE LÍPIDOS CITOPLASMÁTICOS EN LA LÍNEA CELULAR HUMANA, HEPG2

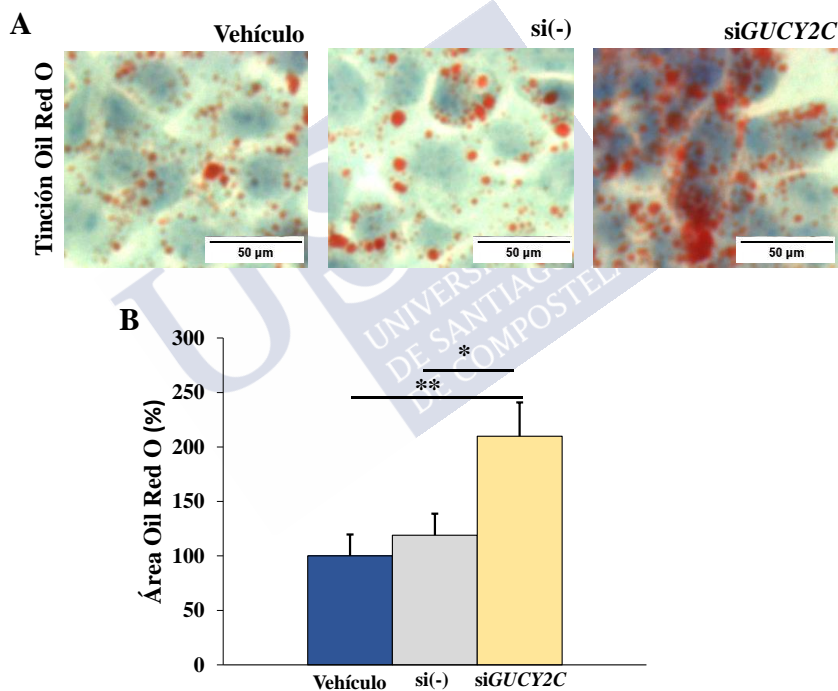
Se ha descrito que la uroguanilina ejerce su acción en diversos tejidos a través de la activación del receptor GUCY2C<sup>112,115,118</sup>. Teniendo en cuenta que en los resultados descritos en el apartado 1.1. encontramos que este receptor está presente en el hígado, decidimos silenciar la expresión de dicho receptor a nivel hepático mediante un siRNA específico para determinar si la unión de la UGN a su receptor es necesaria para que ejerza su acción sobre el contenido lipídico en los hepatocitos.



**Figura 5.** Comprobación del efecto del tratamiento con siGUCY2C en células HepG2. En la gráfica se muestran los niveles de expresión del RNAm de GUCY2C en dos grupos de células HepG2: el grupo vehículo tratado con un siRNA que funciona como control negativo (100nM) y el grupo tratado con el siRNA de GUCY2C (siGUCY2C) (100nM). Los niveles de expresión del gen de estudio GUCY2C se normalizaron con respecto a los niveles de expresión del gen control HPRT. Los valores se representan como Media  $\pm$  Error Estándar de la Media (SEM). Valor "n" por grupo es de 7 muestras \*p<0.05 frente a vehículo.

En primer lugar, como control de que la administración del siRNA era efectivo en las células se estudiaron los niveles de expresión de RNAm del gen *GUCY2C*, observándose que el grupo de células transfectadas con el siRNA presentaba su expresión disminuida hasta un 80% comparada con el grupo vehículo.

Para estudiar el efecto que produce el silenciamiento parcial del receptor *GUCY2C* por sí mismo sobre la acumulación lipídica en las células HepG2, se realizó la técnica de tinción con Oil Red O para poder identificar los lípidos acumulados en el citoplasma de las células pertenecientes a los distintos grupos experimentales.

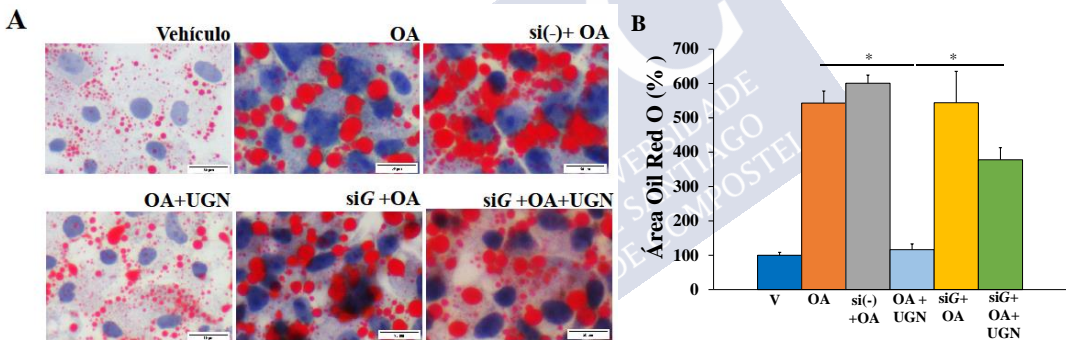


**Figura 6.** Efecto del tratamiento con siGUCY2C sobre la acumulación de gotas lipídicas citoplasmáticas en células HepG2. Tinción Oil Red O en los tres grupos experimentales: grupo vehículo, grupo si(-)(siRNA control negativo)(100nM) y grupo siGUCY2C(100nM). Barra de escala 50 μm(A). Cuantificación de las gotas lipídicas de los tres grupos(B). Los valores se representan como Media ± Error Estándar de la Media (SEM). Valor “n” por grupo es de 6 muestras \*p<0.05, \*\*p<0.01.

La cuantificación de las gotas lipídicas indica que el silenciamiento del receptor GUCY2C induce por sí mismo una acumulación de lípidos hepáticos (Figura 6).

### 1.6. EFECTO DEL SILENCIAMIENTO PARCIAL DEL RECEPTOR GUCY2C EN EL MECANISMO MOLECULAR ACTIVADO POR LA UROGUANILINA EN PRESENCIA DEL TRATAMIENTO CON ÁCIDO OLEICO

A continuación, se estudió el efecto de la uroguanilina sobre la acumulación de lípidos y las vías moleculares implicadas en la oxidación de ácidos grasos, que se produce como consecuencia de la administración de ácido oleico en aquellas células que presentan el receptor GUCY2C parcialmente silenciado.

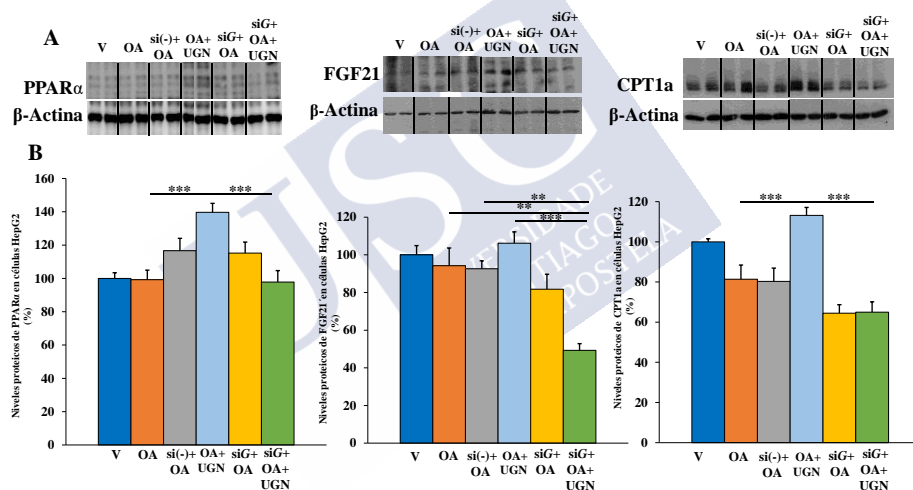


**Figura 7.** Efecto del tratamiento con siGUCY2C sobre la acumulación de gotas lipídicas citoplasmáticas en células HepG2 en presencia de ácido oleico. Tinción Oil Red O en los grupos experimentales: V, OA, si(-)+OA, OA+UGN, siG+OA, siG+OA+UGN. Barra de escala 50  $\mu$ m(A). Cuantificación de las gotas lipídicas de los grupos descritos en 7A (B). Los valores se representan como Media  $\pm$  Error Estándar de la Media (SEM). Valor “n” por grupo es de 4 muestras \*p<0.05. V: Vehículo; OA: Ácido Oleico; si(-)+OA: siRNA control negativo + Ácido Oleico; OA+UGN: Ácido Oleico + Uroguanilina; siG+OA: siGUCY2C+Ácido Oleico; siG+OA+UGN: siGUCY2C+ Ácido Oleico+Uroguanilina.

Según se observa en la figura 7 con la tinción Oil Red O, la administración de OA induce una potente acumulación de ácidos grasos, un efecto que se revierte tras el tratamiento con uroguanilina. Los grupos que fueron transfectados con siGUCY2C van a favorecer

la acumulación de lípidos en el citoplasma un efecto que, en este caso, no se revierte tras la administración de la hormona sugiriendo, por tanto, que la hormona requiere el receptor GUCY2C para disminuir el contenido lipídico en el hepatocito.

A continuación, se llevó a cabo el estudio molecular del efecto que ejerce la uroguanilina sobre el exceso de lípidos producido en la esteatosis. Para ello, se analizó en los mismos grupos experimentales, las variaciones de expresión proteica de los principales marcadores oxidativos (PPAR $\alpha$ , FGF21, CPT1a) en presencia de los tratamientos con uroguanilina y con el siGUCY2C (Figura 8).

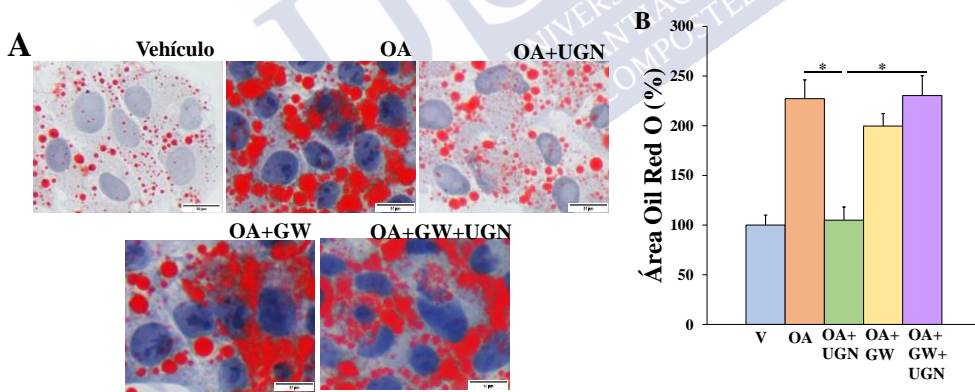


**Figura 8.** Efecto del tratamiento con siGUCY2C sobre los marcadores moleculares que conforman la oxidación de ácidos grasos en células HepG2 en presencia de ácido oleico. Bandas de Western-Blot representativas de las proteínas PPAR $\alpha$ , FGF21, CPT1a y  $\beta$ -actina en los grupos V, OA, si(-)+OA, OA+UGN, siG+OA, siG+OA+UGN (A). Niveles proteicos en los grupos de células V, OA, si(-)+OA, OA+UGN, siG+OA, siG+OA+UGN en los marcadores proteicos descritos en la 8A. Se utilizó la proteína  $\beta$ -actina para normalizar los niveles de proteína(B). Los valores se representan como Media  $\pm$  Error Estándar de la Media (SEM). Valor "n" por grupo es de 6-9 muestras \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001. V: Vehículo; OA: Ácido Oleico; si(-)+OA: siRNA control negativo + Ácido Oleico; OA+UGN: Ácido Oleico+ Uroguanilina; siG+OA: siGUCY2C+Ácido Oleico; siG+OA+UGN: siGUCY2C+ Ácido Oleico+Uroguanilina; PPAR $\alpha$ : Receptor activado por proliferador de peroxisomas alfa; FGF21: Factor de crecimiento de fibroblastos 21; CPT1a: Carnitina palmitoiltransferasa 1a.

Como se observa en la Figura 8, los niveles de expresión proteica de las moléculas PPAR $\alpha$ , FGF21 y CPT1a se encuentran elevados en las células tratadas con UGN, sin embargo, este efecto no ocurre en aquellas células que han sido tratadas con el siGUCY2C, que presentan el receptor silenciado. Por tanto, el silenciamiento del receptor GUCY2C no permite la activación de la ruta de oxidación de ácidos grasos inducida por UGN.

### 1.7. PAPEL DE PPAR $\alpha$ SOBRE LA OXIDACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS ACTIVADA POR UROGUANILINA

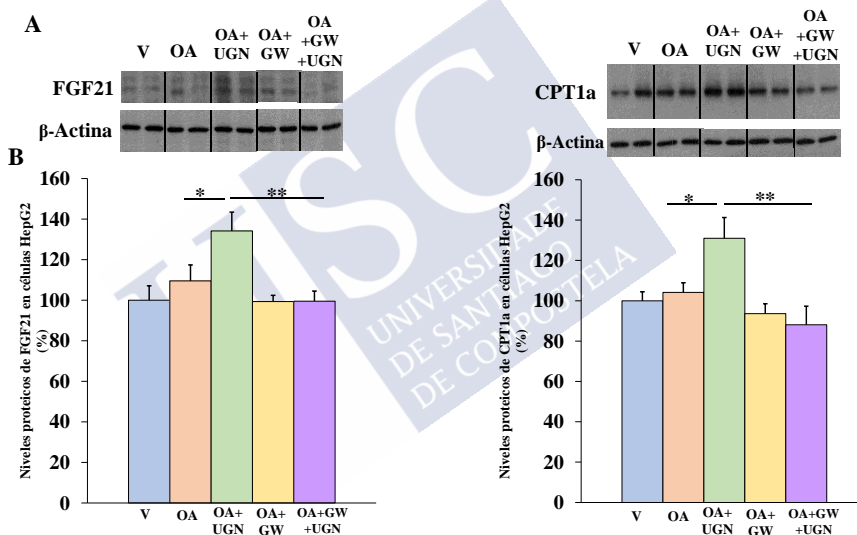
Los marcadores moleculares activados por el tratamiento con uroguanilina son PPAR $\alpha$ , FGF21 y CPT1a. De los tres destacados, nos centramos en el estudio de PPAR $\alpha$ . Con el fin de determinar si PPAR $\alpha$  es clave en la acción de la UGN sobre el metabolismo lipídico hepático, se trató el modelo celular de esteatosis hepática con UGN en presencia de un antagonista farmacológico de PPAR $\alpha$ , GW6471. En primer lugar, se estudió el efecto de este antagonista sobre la acumulación lipídica citoplasmática mediante la tinción de Oil Red O (Figura 9).



**Figura 9.** Efecto del tratamiento con el antagonista de PPAR $\alpha$  sobre la acumulación de gotas lipídicas citoplasmáticas en células HepG2 en presencia de ácido oleico. Tinción Oil Red O en los grupos experimentales: V, OA, OA+UGN, OA+GW, OA+GW+UGN. Barra de escala 50  $\mu$ m(A). Cuantificación de las gotas lipídicas de los grupos descritos en 9A (B). Los valores se representan como Media  $\pm$  Error Estándar de la Media (SEM). Valor "n" por grupo es de 4-5 muestras \*p<0.05. V: Vehículo; OA: Ácido Oleico; OA+UGN: Ácido Oleico+ Uroguanilina; OA+GW: Ácido Oleico+GW6471; OA+GW+UGN: Ácido Oleico+ GW6471+Uroguanilina.

Según se puede observar en la figura 9, el bloqueo de PPAR $\alpha$  con la administración del antagonista farmacológico por sí solo no presenta efecto alguno, sin embargo, anula la acción de la hormona sobre la acumulación lipídica, indicando que el bloqueo de PPAR $\alpha$  impide el efecto de la uroguanilina.

Consecuentemente, el segundo experimento que se planteó fue el estudio de la variación de expresión proteica de los marcadores moleculares FGF21 y CPT1a mediante Western-Blot los cuales se encuentran por debajo de PPAR $\alpha$  en la vía de señalización intracelular en los grupos experimentales descritos (Figura 10).



**Figura 10.** Efecto del tratamiento con el antagonista de PPAR $\alpha$  sobre los marcadores moleculares que conforman la oxidación de ácidos grasos en células HepG2 en presencia de ácido oleico. Bandas de Western-Blot representativas de las proteínas FGF21, CPT1a y  $\beta$ -actina en los grupos V, OA, OA+UGN, OA+GW, OA+GW+UGN (A). Niveles proteicos en los grupos de células V, OA, OA+UGN, OA+GW, OA+GW+UGN en los marcadores proteicos descritos en la figura 10A. Se utilizó la proteína  $\beta$ -actina para normalizar los niveles de proteína (B). Los valores se representan como Media  $\pm$  Error Estándar de la Media (SEM). Valor "n" por grupo es de 7-10 muestras \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ . V: Vehículo; OA: Ácido Oleico; OA+UGN: Ácido Oleico+ Uroguanilina; OA+GW: Ácido Oleico+GW6471; OA+GW+UGN: Ácido Oleico+ GW6471+Uroguanilina; FGF21: Factor de crecimiento de fibroblastos 21; CPT1a: Carnitina palmitoiltransferasa 1a.

Como se describe en la Figura 10, los niveles de expresión proteica de las moléculas FGF21 y CPT1a se encuentran elevados en las células con un doble tratamiento OA+UGN sin embargo estos niveles se revierten a los niveles basales de vehículo en aquellas células que han sido tratadas con el ácido oleico, el antagonista de PPAR $\alpha$  (GW6471) y la UGN. Por tanto, el bloqueo de PPAR $\alpha$ , impide el incremento de la expresión proteica de FGF21 y de CPT1a en presencia de la UGN.



## ESTUDIOS IN VIVO

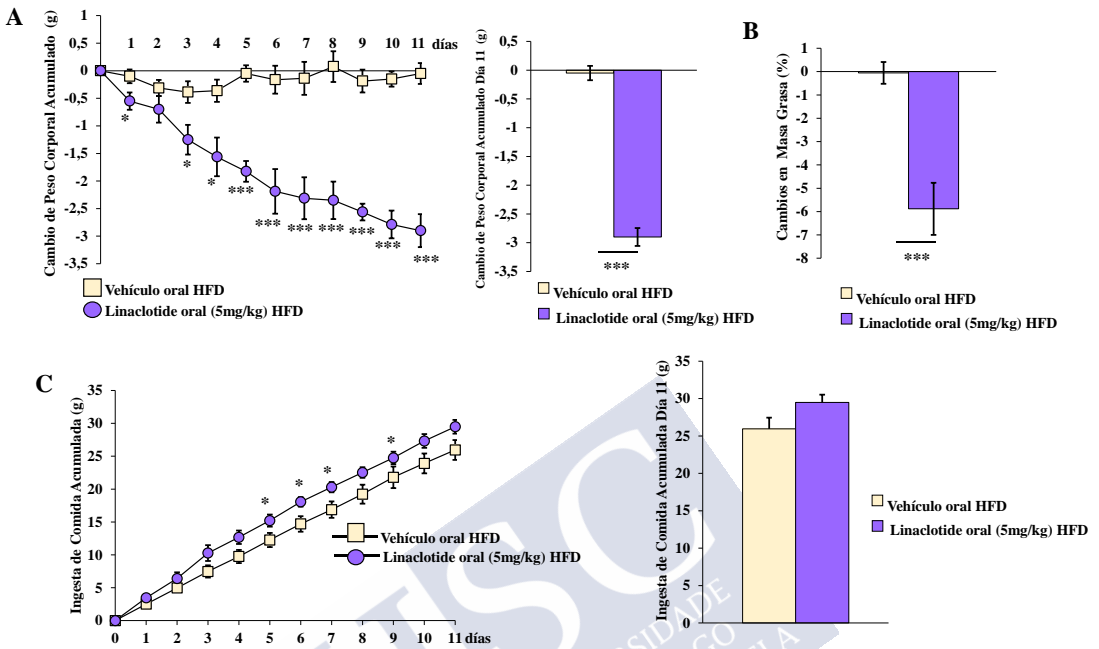
### 2. EFECTO DEL TRATAMIENTO ORAL CON UN AGONISTA DE GUCY2C SOBRE EL HÍGADO DE RATONES Y MECANISMOS MOLECULARES IMPLICADOS

#### 2.1. EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN ORAL DEL FÁRMACO LINACLOTIDE SOBRE EL FENOTIPO DE RATONES DIO

Los estudios realizados *in vitro* han sido de gran importancia para poder determinar la función de la hormona gastrointestinal uroguanilina sobre el modelo celular de esteatosis hepática y los mecanismos moleculares implicados. Con el fin de determinar si la vía de la UGN-GUCY2C podría constituir una potencial diana terapéutica para la esteatosis hepática, nos planteamos estudiar en modelos *in vivo* el efecto de la administración oral del fármaco linaclotide (agonista de GUCY2C) sobre la esteatosis hepática inducida en respuesta a la ingesta de una dieta alta en grasa.

Los grupos experimentales, dosis y tiempos de tratamiento se recogen en el apartado de 2.4.2. de material y métodos.

En la Figura 11, se observa cómo los ratones tratados con linaclotide presentaban una disminución de peso corporal significativa en el primer día de tratamiento con respecto al grupo vehículo, que se mantiene hasta el día 11 previo a sacrificio (Figura 11A). Además, esta pérdida de peso corporal va acompañada de una disminución del porcentaje de grasa corporal (Figura 11B), unos efectos que son independientes de ingesta (Figura 11C).



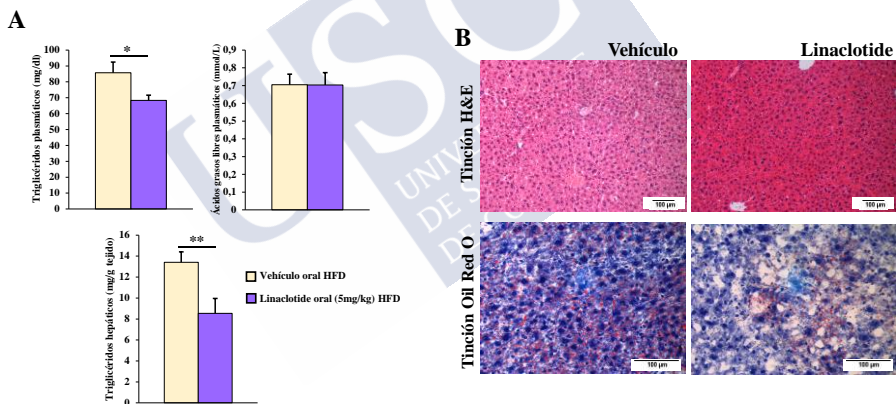
**Figura 11.** Efecto de la administración oral del tratamiento con linaclotide (agonista del receptor GUCY2C) sobre los cambios fisiológicos en modelos murinos que presentan obesidad inducida por una dieta alta en grasa. Efecto del tratamiento oral con linaclotide (5mg/kg) o su vehículo en el cambio de peso corporal acumulado durante 11 días (A), los cambios en masa grasa(B) y la ingesta de comida acumulada durante 11 días (C). Los valores se representan como Media  $\pm$  Error Estándar de la Media (SEM). Valor “n” por grupo es de 7 ratones \*p<0.05, \*\*\*p<0.001. HFD: Dieta alta en grasa (“High Fat Diet”).

El día 11 de tratamiento se sacrificaron los animales y se llevó a cabo la extracción de tejidos. Con las muestras extraídas de ambos grupos se analizaron los triglicéridos plasmáticos y hepáticos y también, los ácidos grasos libres (NEFAs) en el plasma. Además, se llevó a cabo un estudio más pormenorizado de los cambios característicos que se habían producido en los hígados de ambos grupos durante el periodo de tratamiento.

## 2.2. EFECTO DEL TRATAMIENTO CON LINACLOTIDE SOBRE LA ESTEATOSIS HEPÁTICA Y SOBRE LOS NIVELES DE ÁCIDOS GRASOS LIBRES Y DE TRIGLICÉRIDOS

Como podemos observar los niveles de triglicéridos tanto plasmáticos como hepáticos disminuyen de forma significativa en el grupo de ratones tratado con linaclotide (Figura 12A). Sin embargo, no existen cambios en los niveles de ácidos grasos libres circulantes.

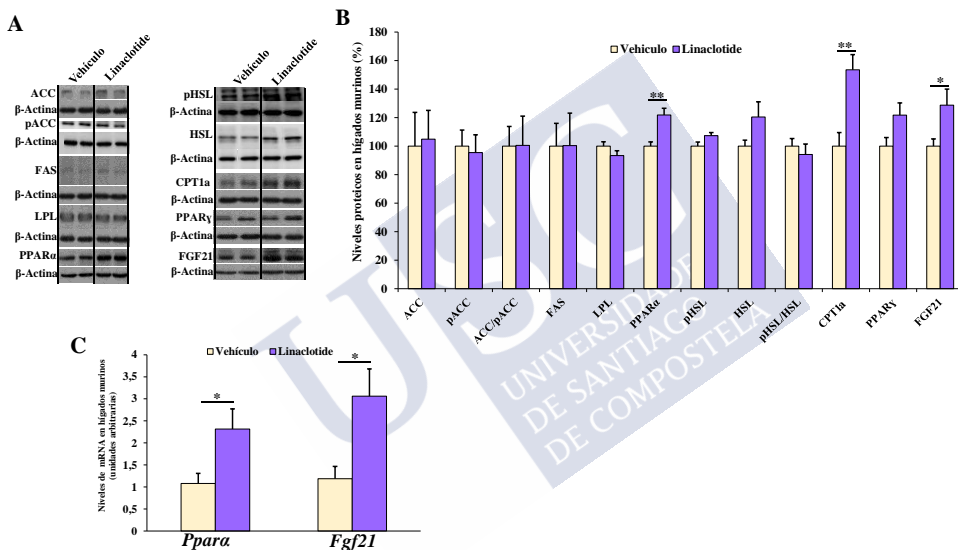
Por otro lado, centrándonos en el estado hepático que presentan estos animales, se llevó a cabo un estudio de la acumulación lipídica mediante la técnica de tinción Oil Red O. En este caso, se puede comprobar que el tratamiento oral con linaclotide es capaz de reducir la esteatosis hepática en relación con el grupo de ratones vehículo (Figura 12B).



**Figura 12.** Efecto de la administración oral del tratamiento con linaclotide (agonista del receptor GUCY2C) sobre la acumulación de lípidos intrahepáticos y sobre los niveles plasmáticos y hepáticos de triglicéridos y ácidos grasos libres plasmáticos. Efecto del tratamiento oral con linaclotide (5mg/kg) o su vehículo sobre los niveles circulantes de triglicéridos, ácidos grasos libres y sobre los niveles de triglicéridos hepáticos(A) y también, sobre la acumulación de lípidos en los hepatocitos presente en la micrografías inferiores de las histologías con la tinción Oil Red O. Barra de escala 100 µm (B). Las micrografías superiores muestran la morfología de los hepatocitos por la tinción con H&E. Barra de escala 100 µm(B). Los valores se representan como Media ± Error Estándar de la Media (SEM). Valor “n” por grupo es de 7 ratones \*p<0.05, \*\*p<0.01. HFD: Dieta alta en grasa (“High Fat Diet”); H&E: Hematoxilina y Eosina.

### 2.3. EFECTO DEL TRATAMIENTO CON LINACLOTIDE SOBRE LA ACTIVACIÓN DE LOS MECANISMOS MOLECULARES QUE FORMAN PARTE DEL METABOLISMO LIPÍDICO HEPÁTICO

El tratamiento con linaclotide produce un aumento significativo de los niveles proteicos de PPAR $\alpha$ , FGF21 y CPT1a en el hígado (Figuras 13A y 13B). Además, complementando este estudio se llevó a cabo un análisis de expresión génica de *Ppara* y *Fgf21*, que demostró que los niveles de expresión también aumentaban en los ratones tratados oralmente con linaclotide (Figura 13C).



**Figura 13.** Efecto de la administración oral del tratamiento con linaclotide sobre los mecanismos moleculares del metabolismo lipídico hepático. Bandas de Western-Blot representativas de las proteínas ACC, pACC, FAS, LPL, PPAR $\alpha$ , pHSL, HSL, CPT1a, PPAR $\gamma$  FGF21 y  $\beta$ -actina en los grupos vehículo y linaclotide (A). Niveles proteicos en los grupos de ratones vehículo y linaclotide en los marcadores proteicos descritos en la figura 13A. Se utilizó la proteína  $\beta$ -actina para normalizar los niveles de proteína (B). Niveles de expresión del mRNA de *Ppara* y *Fgf21* en dos grupos ratones DIO: grupo vehículo y grupo linaclotide. Los niveles de expresión de los genes de estudio (*Ppara* y *Fgf21*) se normalizaron con respecto a los niveles de expresión del gen control *Hprt* (C). Los valores se representan como Media  $\pm$  Error Estándar de la Media (SEM). Valor "n" por grupo se de 7 ratones \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ . ACC: Acetil-CoA carboxilasa, pACC: Fosfoacetil-CoA carboxilasa; FAS: Ácido graso sintasa; LPL: Lipoproteinlipasa; PPAR $\alpha$ : Receptor activado por proliferador de peroxisomas alfa; pHSL: Fosfolipasa sensible a hormonas; HSL: Lipasa sensible a hormonas; CPT1a: Carnitina palmitoiltransferasa 1a; PPAR $\gamma$ : Receptor activado por proliferador de peroxisomas gamma; FGF21: Factor de crecimiento de fibroblastos 21; mRNA: Ácido ribonucleico mensajero.

Por lo tanto, se puede concluir que el tratamiento con el agonista de GUCY2C, linaclotide es capaz de disminuir el peso corporal y la masa grasa de ratones obesos, además de mejorar la condición de esteatosis presente en los hígados, reduciendo la grasa intrahepática acumulada y activando el mecanismo oxidativo de ácidos grasos.

### **3. PAPEL DEL RECEPTOR GUCY2C HEPÁTICO EN EL EFECTO DEL LINACLOTIDE SOBRE EL METABOLISMO LIPÍDICO**

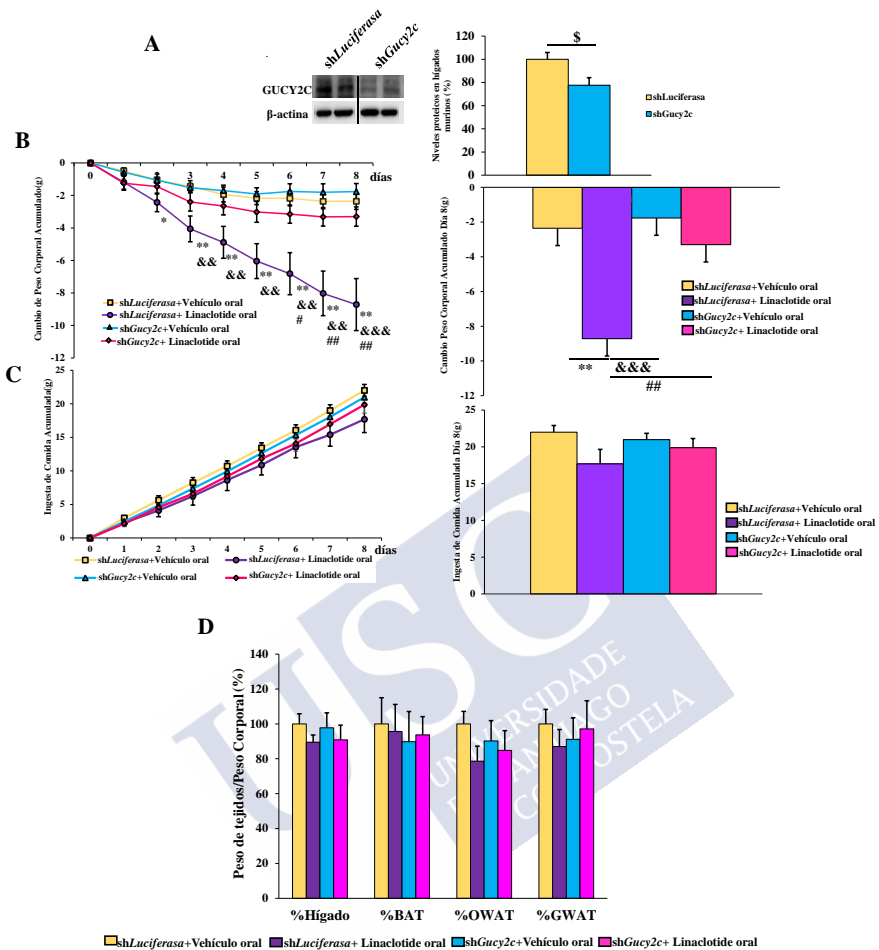
#### **3.1. EFECTO DEL SILENCIAMIENTO POR EL VECTOR LENTIVIRAL SHGUCY2C SOBRE EL FENOTIPO DE RATONES DIO**

Con el fin de determinar si el receptor GUCY2C hepático podría ser el responsable de los efectos del linaclotide sobre el mecanismo oxidativo de lípidos hepáticos, se silenció dicho receptor en hígado mediante la administración intravenosa de sh*Gucy2c*. De esta manera, este vector lentiviral interfiere en la expresión del gen que codifica para el receptor GUCY2C en ratones con obesidad inducida por dieta.

Para comprobar que la administración del sh*Gucy2c* era efectiva, se estudiaron los niveles de expresión proteica del receptor GUCY2C hepático tras el sacrificio de los ratones. En la figura 14A se observa que, la expresión proteica del receptor se encuentra silenciada hasta un 22% en los hígados de los ratones que fueron tratados con sh*Gucy2c*.

Como se observa además en la figura 14, la administración de linaclotide produce una bajada de peso corporal (figura 14B) acompañado de una disminución en el porcentaje de grasa visceral corporal (OWAT) en animales obesos (Figura 14D). Sin embargo, estos efectos no se observan en el caso de los animales que presentan un silenciamiento del receptor GUCY2C a nivel hepático.

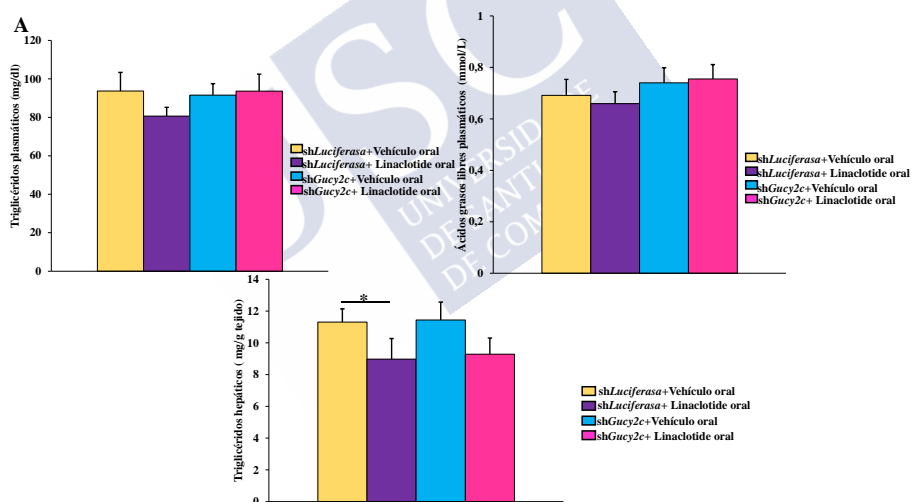
Por su parte, es importante destacar que no existen diferencias significativas en la ingesta en ninguno de los grupos experimentales durante el periodo de tratamiento (Figura 14C).



**Figura 14.** Efecto del silenciamiento por el vector lentiviral *shGucy2c* sobre el fenotipo de ratones DIO. Comprobación del efecto del tratamiento intravenoso con los vectores lentivirales *shLuciferasa* ( $1 \times 10^9$  UV/mL) (shRNA control) y *shGucy2c* ( $1 \times 10^9$  UV/mL) sobre la expresión proteica del receptor transmembrana GUCY2C en los hígados de los ratones DIO tratados. Se utilizó la proteína  $\beta$ -actina para normalizar los niveles de proteína (A). Efecto del tratamiento intravenoso con el vector lentiviral *shGucy2c* ( $1 \times 10^9$  UV/mL) o su control *shLuciferasa* ( $1 \times 10^9$  UV/mL) seguido del tratamiento oral con linaclotide (5mg/kg) o su vehículo en el cambio de peso corporal acumulado (B), en la ingesta de comida acumulada (C) durante 8 días y en el cambio de peso de los tejidos: hígado, grasa parda (BAT), grasa blanca omental (OWAT) y grasa blanca gonadal (GWAT) (D). Los valores se representan como Media  $\pm$  Error Estándar de la Media (SEM). Valor “n” por grupo es de 6-9 ratones. Los cambios representativos entre grupos se representan con los siguientes símbolos: \**shLuciferasa*+Vehículo oral vs. *shLuciferasa*+ Linaclotide oral; & *shLuciferasa*+ Linaclotide oral vs. *shGucy2c*+Vehículo oral; # *shLuciferasa*+Linaclotide oral vs. *shGucy2c*+Linaclotide oral; \$ *shLuciferasa* vs. *shGucy2c*; \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ . UV: Unidades Virales.

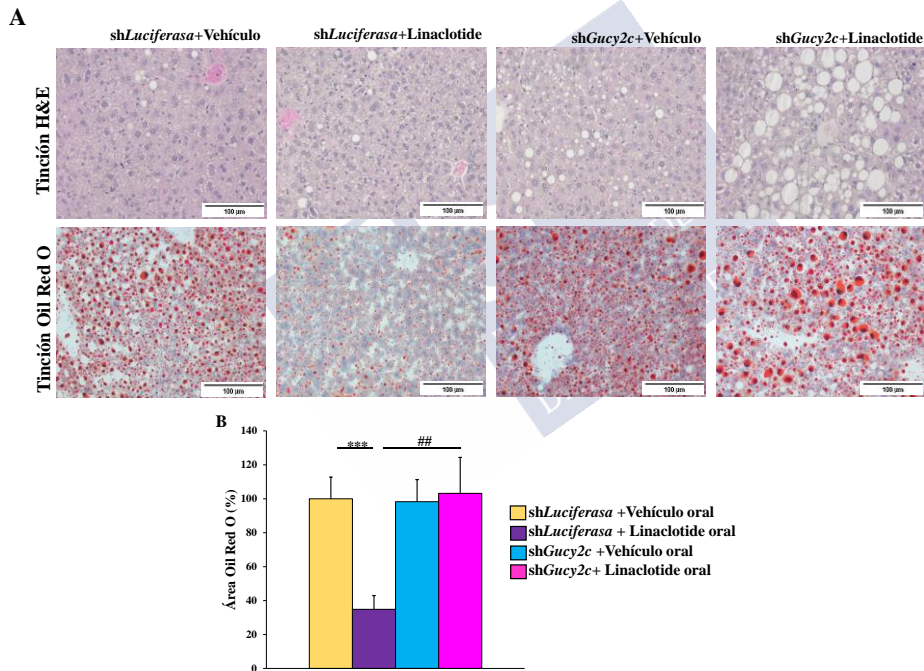
### 3.2. ESTUDIO DEL EFECTO DEL LINACLOTIDE Y DEL SILENCIAMIENTO DEL RECEPTOR GUCY2C HEPÁTICO SOBRE LA ESTEATOSIS HEPÁTICA Y SOBRE LOS NIVELES DE TRIGLICÉRIDOS Y ÁCIDOS GRASOS LIBRES

En los modelos experimentales se llevó a cabo un estudio de los niveles circulantes y hepáticos de triglicéridos y de los niveles circulantes de los ácidos grasos libres (NEFAs). Como ocurría en el experimento anterior el tratamiento con linaclotide inducía una disminución de los triglicéridos plasmáticos y hepáticos, siendo significativa en éstos últimos. Sin embargo, no encontramos cambios significativos en los niveles de ácidos grasos libres circulantes en los grupos experimentales (Figura 15A).



**Figura 15.** Efecto del linaclotide y del silenciamiento del receptor GUCY2C por el vector lentiviral shGucy2c sobre los niveles plasmáticos y hepáticos de triglicéridos y ácidos grasos libres plasmáticos. Efecto del tratamiento intravenoso con el vector lentiviral shGucy2c ( $1 \times 10^9$  UV/mL) o su control shLuciferasa ( $1 \times 10^9$  UV/mL) seguido del tratamiento oral con linaclotide (5mg/kg) o su vehículo en los niveles de triglicéridos plasmáticos y hepáticos y ácidos grasos libres plasmáticos(A). Los valores se representan como Media  $\pm$  Error Estándar de la Media (SEM). Valor “n” por grupo es de 6-9 ratones. Los cambios representativos entre grupos se representan con los siguientes símbolos: \*shLuciferasa + Vehículo oral vs. shLuciferasa + Linaclotide oral \* $p < 0.05$ . UV: Unidades Virales.

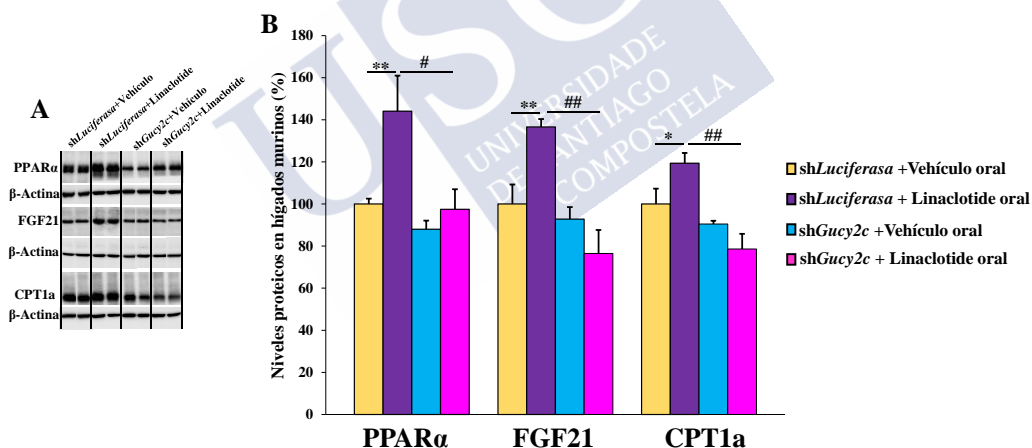
Con el fin de determinar si el papel del receptor GUCY2C a nivel hepático es crucial para que la administración de linaclotide sea efectiva en el tratamiento de la esteatosis hepática, se estudió la acumulación de lípidos intrahepáticos. Por ello, se llevó a cabo la tinción de hematoxilina y eosina para comprobar el estado morfológico de los hepatocitos y la tinción de Oil Red O para estudiar la acumulación de lípidos en el hígado. Como se puede observar, el tratamiento con linaclotide oral produce una mejora en la esteatosis sin embargo este efecto no se observa cuando el receptor GUCY2C se encuentra silenciado (Figura 16 A y B).



**Figura 16.** Papel del receptor GUCY2C hepático en el efecto del linaclotide sobre la esteatosis hepática de ratones DIO. Micrografías de histologías hepáticas de la morfología con la tinción H&E (paneles de arriba) y del contenido de ácidos grasos con la tinción Oil Red-O (paneles de abajo). Barra de escala 100  $\mu$ m(A). Cuantificación del área de Oil Red-O en el gráfico de barras (B). Valores representados como la Media  $\pm$  Error Estándar de la Media (SEM). Valor “n” por grupo es de 6-9 ratones. Cambios representativos entre grupos se representan con los siguientes símbolos: \* shLuciferasa+Vehículo oral vs. shLuciferasa + Linaclotide oral; # shLuciferasa+Linaclotide oral vs. shGucy2c+Linaclotide oral. \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001. H&E: Hematoxilina y eosina.

### 3.3. PAPEL DEL RECEPTOR GUCY2C HEPÁTICO EN EL EFECTO DEL LINACLOTIDE SOBRE LA ACTIVACIÓN DE MECANISMOS MOLECULARES ASOCIADOS AL METABOLISMO LIPÍDICO

Por último, se llevó a cabo el estudio molecular de la expresión proteica de los marcadores que eran activados por el linaclotide una vez se unía al receptor transmembrana GUCY2C en el hígado. Para ello, se realizó un Western-Blot de las proteínas que forman parte de la oxidación de ácidos grasos y que también hemos estudiado su expresión en la experimentación *in vitro*. Estas moléculas son: PPAR $\alpha$ , FGF21 y CPT1a. Según podemos observar en la Figura 17, el tratamiento con linaclotide oral muestra un incremento de la expresión proteica en los tres marcadores. Este incremento en las proteínas implicadas en la oxidación de ácidos grasos no se observa cuando el receptor GUCY2C se encuentra silenciado.



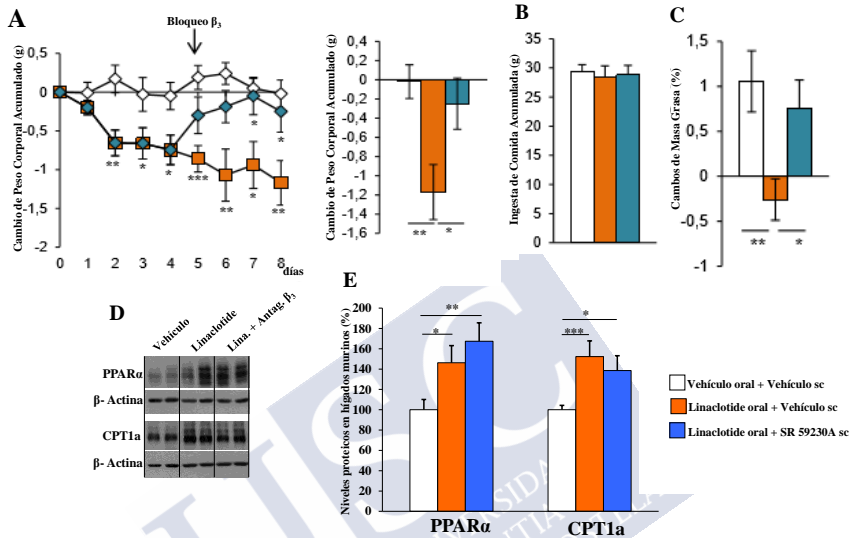
**Figura 17.** Papel del receptor GUCY2C hepático en el efecto del linaclotide sobre la activación de mecanismos moleculares asociados al metabolismo lipídico. Bandas de Western-Blot representativas de las proteínas PPAR $\alpha$ , FGF21, CPT1a, y  $\beta$ -actina en los grupos shLuciferasa+Vehículo oral, shLuciferasa+ Linaclotide oral, shGucy2c+ Vehículo oral y shGucy2c+Linaclotide oral (A). Niveles proteicos de PPAR $\alpha$ , FGF21, CPT1a en los grupos de ratones descritos en la figura 17A. Se utilizó la proteína  $\beta$ -actina para normalizar los niveles de proteína (B). Valores representados como la Media  $\pm$  Error Estándar de la Media (SEM). Valor "n" por grupo es de 6-7 ratones. Cambios representativos entre grupos se representan con los siguientes símbolos: \*shLuciferasa+Vehículo oral vs. shLuciferasa+ Linaclotide oral; # shLuciferasa+Linaclotide oral vs. shGucy2c+Linaclotide oral; \*p<0.05; \*\* p<0.01. PPAR $\alpha$ : Receptor activado por proliferador de peroxisomas alfa; FGF21: Factor de crecimiento de fibroblastos 21; CPT1a: Carnitina palmitoiltransferasa 1a.

Por tanto, en este punto podemos confirmar que el linaclotide es capaz de activar el mecanismo de oxidación de ácidos grasos sobre el exceso de acumulación lipídica en los hepatocitos que se encuentra mediado por su unión con el receptor transmembrana GUCY2C.

#### **3.4. EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN ORAL DEL LINACLOTIDE EN LA REGULACIÓN DEL PESO CORPORAL Y DE LOS MECANISMOS MOLECULARES HEPÁTICOS EN PRESENCIA DEL BLOQUEO FARMACOLÓGICO DEL RECEPTOR $\beta_3$ -AR**

Estudios recientes en modelos experimentales de ratón, demuestran que el tratamiento oral con linaclotide actúa llevando a cabo una regulación del metabolismo gracias a su unión con el receptor GUCY2C en el hipotálamo provocando una pérdida de peso corporal y adiposidad de forma independiente a la ingesta (Figura 18 A, B y C)<sup>137</sup>. Además, estos ratones presentan una activación de la termogénesis del BAT estimulando de esta manera, el gasto energético<sup>137</sup>. Para determinar si los efectos del tratamiento con linaclotide sobre el peso corporal y la actividad termogénica del BAT estaban mediados por el SNS en este estudio, se emplea un antagonista específico del receptor  $\beta_3$  adrenérgico en un grupo de ratones tratados con linaclotide. De tal manera, que este bloqueo del receptor logró revertir las acciones llevadas a cabo por el linaclotide tanto en el peso corporal como en la adiposidad sin afectar a la ingesta (Figura 18 A, B y C)<sup>137</sup>. En el contexto de este proyecto de tesis, se tomaron muestras de los hígados de todos los grupos de ratones de este experimento para analizar aquellos mecanismos moleculares que se encontraban modificados por los tratamientos. Por ello en las figuras 18D y 18E, se puede observar que el tratamiento con linaclotide incrementa los niveles de expresión proteica de las moléculas participantes en el proceso de  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos (PPAR $\alpha$  y CPT1a). En el caso del grupo de ratones que son tratados además con el antagonista del receptor  $\beta_3$  se observa que los niveles de

expresión proteica de estos marcadores oxidativos se mantienen elevados. Por lo tanto, estos resultados demuestran que la acción del linaclotide en el hígado es independiente del tratamiento con el antagonista del  $\beta_3$ -AR.



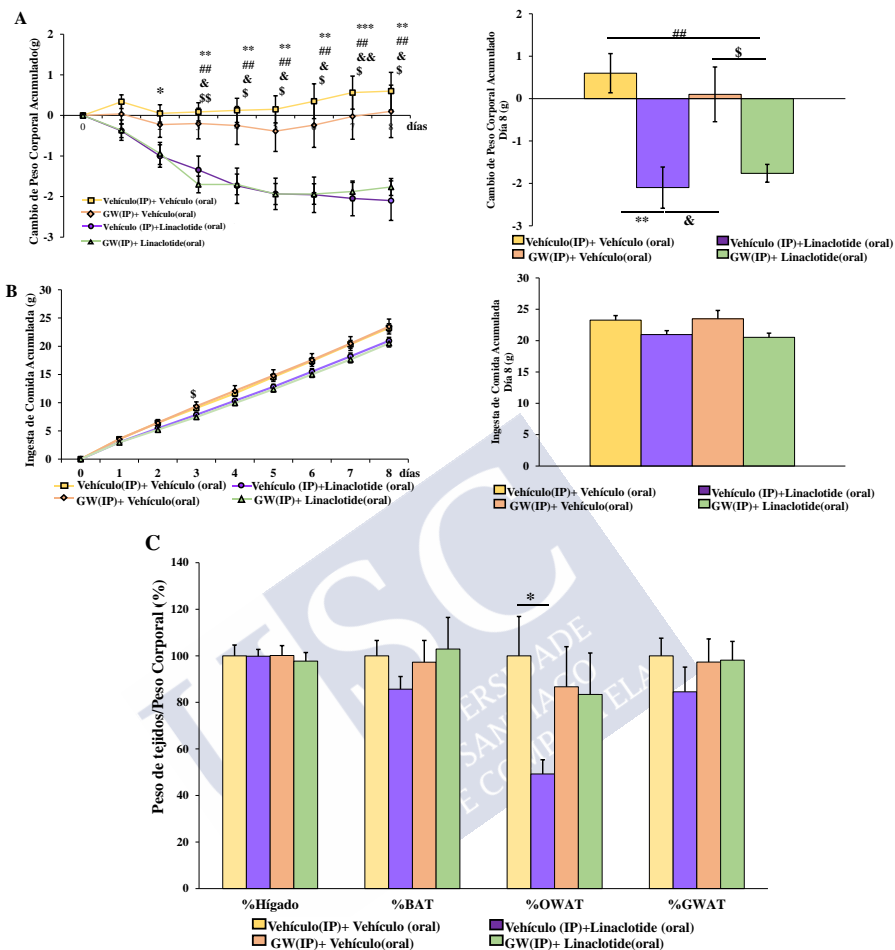
**Figura 18.** Estudio del efecto de los tratamientos con linaclotide y con el antagonista del receptor  $\beta_3$  adrenérgico sobre el peso corporal y sobre los mecanismos moleculares hepáticos en modelos murinos. Efecto de los tratamientos oral con linaclotide (5mg/kg) o su vehículo y subcutáneo con SR59230A (3mg/kg) o su vehículo en el cambio de peso corporal acumulado (A), en la ingesta de comida acumulada(B) durante 8 días y en los cambios de masa grasa (C). Bandas de Western-Blot representativas de las proteínas PPAR $\alpha$ , CPT1a y  $\beta$ -actina en los grupos Vehículo, Linaclotide y Linaclotide + Antagonista  $\beta_3$ (D). Niveles proteicos de PPAR $\alpha$  y CPT1a en los grupos de ratones descritos en la figura 18D. Se utilizó la proteína  $\beta$ -actina para normalizar los niveles de proteína (E). Valores representados como la Media  $\pm$  Error Estándar de la Media (SEM). Valor “n” por grupo es de 7-10 ratones. \*p<0.05; \*\* p<0.01; \*\*\*p<0.001. sc: Administración subcutánea; Lina.: Linaclotide; Antag.  $\beta_3$ : Antagonista  $\beta_3$  (SR59230A); PPAR $\alpha$ : Receptor activado por proliferador de peroxisomas alfa; CPT1a: Carnitina palmitoiltransferasa 1a.

### **3.5. ESTUDIO DEL PAPEL DE PPAR $\alpha$ COMO MEDIADOR DEL EFECTO DE LINACLOTIDE SOBRE EL FENOTIPO DE RATONES DIO**

En este apartado se planteó poder mimetizar los experimentos *in vitro* relativos al estudio del papel de PPAR $\alpha$  para estudiar si el tratamiento de linaclotide a nivel hepático estaba mediado por él en los animales de experimentación. Para ello, los ratones con obesidad inducida por dieta se trataron con el antagonista de PPAR $\alpha$  y posteriormente se les administró linaclotide oral.

Como se observa en la figura 19, el peso corporal de los ratones se encuentra disminuido en los animales tratados con linaclotide, tanto en aquellos que presentan la vía de PPAR $\alpha$  bloqueada como en aquellos que la presentan intacta (Figura 19A). En lo relativo a la ingesta no se recogen cambios al final del tratamiento con ninguno de los grupos experimentales (Figura 19B).

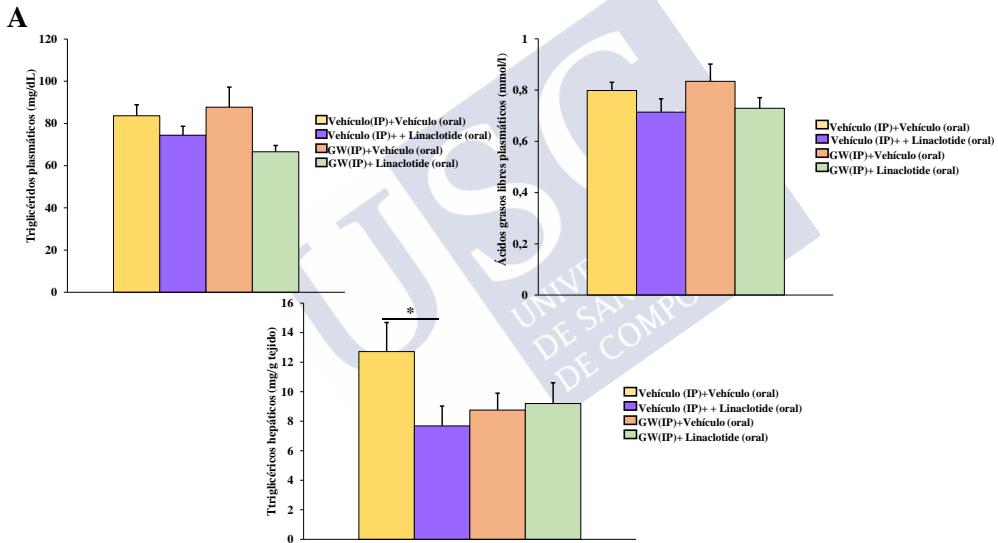
En cuanto al peso de los distintos tejidos tras el sacrificio, se observa que el grupo tratado con linaclotide presenta una disminución significativa del porcentaje del tejido adiposo blanco visceral (OWAT) que no se produce cuando la vía de PPAR $\alpha$  está bloqueada por el tratamiento farmacológico con el antagonista (Figura 19C).



**Figura 19.** Estudio del papel de PPAR $\alpha$  como mediador del efecto de linaclotide sobre el fenotipo de ratones DIO. Efecto del tratamiento intraperitoneal (IP) con el antagonista de PPAR $\alpha$  (GW6471) (1mg/kg) o su vehículo seguido del tratamiento oral con linaclotide (5mg/kg) o su vehículo en el cambio de peso corporal acumulado(A), en la ingesta de comida acumulada(B) durante 8 días y en el cambio de peso de los tejidos: hígado, grasa parda (BAT), grasa blanca omental (OWAT), grasa blanca gonadal (GWAT) (C). Los valores se representan como Media  $\pm$  Error Estándar de la Media (SEM). Valor “n” por grupo es de 8-11 ratones. Los cambios representativos entre grupos se representan con los siguientes símbolos: \* Vehículo(IP)+Vehículo(oral) vs. Vehículo(IP) + Linaclotide (oral); & Vehículo(IP) + Linaclotide (oral) vs. GW(IP)+Vehículo (oral); # Vehículo(IP)+Vehículo (oral) vs. GW(IP)+Linaclotide (oral) ; \$ GW(IP)+Vehículo (oral) vs. GW(IP)+Linaclotide (oral); \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001. GW: GW6471; Antagonista de PPAR $\alpha$ ; IP: Administración intraperitoneal.

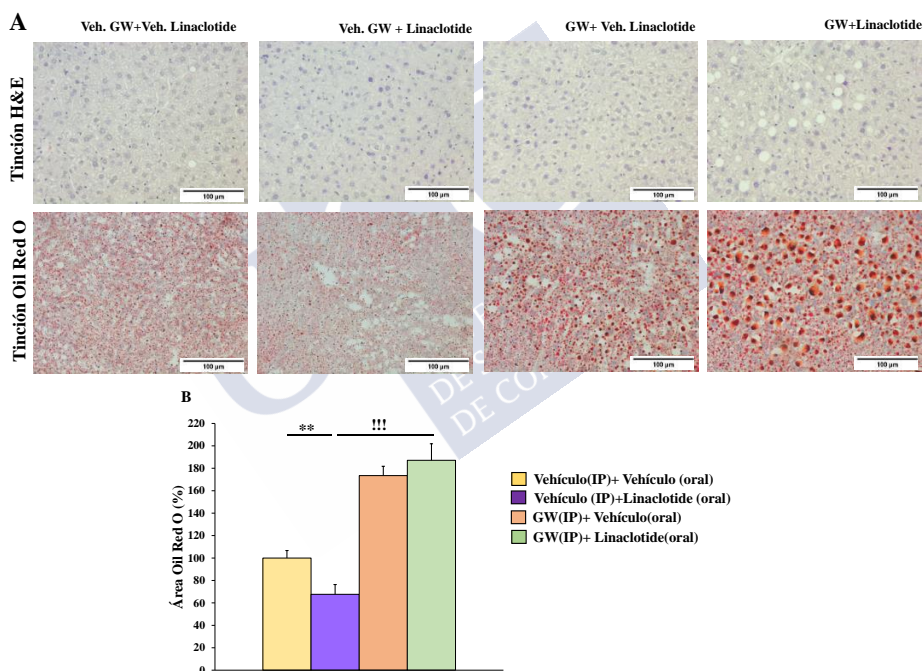
### 3.6. ESTUDIO DEL PAPEL DE PPARα COMO MEDIADOR DEL EFECTO DE LINACLOTIDE SOBRE LA ESTEATOSIS HEPÁTICA Y SOBRE LOS NIVELES DE ÁCIDOS GRASOS LIBRES Y TRIGLICÉRIDOS

Primeramente, en los triglicéridos circulantes no observamos cambios significativos entre los grupos experimentales, sin embargo, existen cambios significativos en los triglicéridos hepáticos disminuyendo los niveles en el grupo de animales tratados con linaclotide oral comparando con el grupo vehículo. En cuanto a los NEFAs, se puede destacar que en los niveles circulantes no hay diferencias significativas entre los grupos (Figura 20).



**Figura 20.** Estudio del papel de PPAR $\alpha$  como mediador del efecto de linaclotide sobre los niveles plasmáticos y hepáticos de triglicéridos y ácidos grasos libres plasmáticos. Efecto del tratamiento intraperitoneal (IP) con el antagonista de PPAR $\alpha$  (GW6471) (1mg/kg) o su vehículo seguido del tratamiento oral con linaclotide (5mg/kg) o su vehículo en los niveles de ácidos grasos libres circulantes y en los niveles de triglicéridos plasmáticos y hepáticos (A). Los valores se representan como Media  $\pm$  Error Estándar de la Media (SEM). Valor “n” por grupo es de 8-11 ratones. Los cambios representativos entre grupos se representan con los siguientes símbolos: \* Vehículo (IP)+Vehículo(oral) vs. Vehículo (IP) + Linaclotide (oral) \* $p$ <0.05. GW:GW6471: Antagonista de PPAR $\alpha$  IP: Administración intraperitoneal.

Para determinar el papel de PPAR $\alpha$  en el efecto de la administración de linaclotide sobre la acumulación lipídica hepática, se utilizaron técnicas de tinción histológicas. El grupo de animales tratados con linaclotide oral presenta una clara disminución del contenido lipídico hepático comparado con el resto de los grupos. Hay que destacar, que este efecto del linaclotide no ocurre cuando la vía de PPAR $\alpha$  está bloqueada por el tratamiento con su antagonista farmacológico GW6471. Por lo tanto, el tratamiento con linaclotide es capaz de ejercer su acción oxidativa sobre los ácidos grasos siempre que el sistema PPAR $\alpha$  se encuentre operativo (Figuras 21A y B).

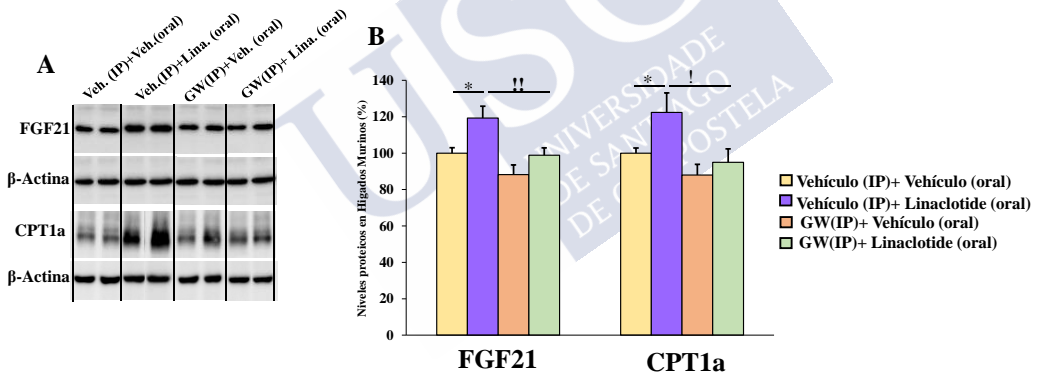


**Figura 21.** Estudio del papel de PPAR $\alpha$  como mediador del efecto de linaclotide sobre la esteatosis hepática. Micrografías de histologías hepáticas de la morfología con la tinción H&E (paneles de arriba) y del contenido de ácidos grasos con la tinción Oil Red-O (paneles de abajo). Barra de escala 100  $\mu$ m(A). Cuantificación del área de Oil Red-O en el gráfico de barras (B). Valores representados como la Media  $\pm$  Error Estándar de la Media (SEM). Valor "n" por grupo es de 8-11 ratones. Cambios representativos entre grupos se representan con los siguientes símbolos: \* Vehículo (IP)+Vehículo(oral) vs. Vehículo (IP) + Linaclotide (oral); ! Vehículo (IP) + Linaclotide (oral) vs. GW(IP)+Linaclotide (oral). \*\* p<0.01; \*\*\*p<0.001. Veh.: Vehículo; GW:GW6471; Antagonista de PPAR $\alpha$  IP: Administración intraperitoneal; H&E: Hematoxilina y eosina.

Por lo tanto, el tratamiento con el fármaco linaclotide mejora la condición de esteatosis inducida por obesidad.

### 3.7. ESTUDIO DEL PAPEL DE PPAR $\alpha$ COMO MEDIADOR DEL EFECTO DE LINACLOTIDE EN LA ACTIVACIÓN DE MECANISMOS MOLECULARES ASOCIADOS AL METABOLISMO LIPÍDICO HEPÁTICO

Finalmente, se analizaron las modificaciones de los niveles proteicos de FGF21 y CPT1a con los diferentes tratamientos en los cuatro grupos experimentales. Como podemos observar en la figura 22, la expresión proteica de FGF21 y CPT1a se encuentra elevada en el grupo tratado con linaclotide oral, pero no en aquellos que presentan bloqueada la vía de PPAR $\alpha$ . (Figura 22A y B).



**Figura 22.** Estudio del papel de PPAR $\alpha$  como mediador del efecto de linaclotide sobre la activación de mecanismos moleculares asociados al metabolismo lipídico hepático. Bandas de Western-Blot representativas de las proteínas FGF21 y CPT1a y  $\beta$ -actina en los grupos Vehículo GW(IP)+Vehículo linaclotide(oral), Vehículo GW(IP) + Linaclotide (oral), GW(IP)+Vehículo linaclotide (oral), GW(IP)+Linaclotide (oral) (A). Niveles proteicos de FGF21 y CPT1a en los grupos de ratones descritos en la figura 22A. Se utilizó la proteína  $\beta$ -actina para normalizar los niveles de proteína(B). Valores representados como la Media  $\pm$  Error Estándar de la Media (SEM). Valor "n" por grupo es de 7-10 ratones. Cambios representativos entre grupos se representan con los siguientes símbolos: \* Vehículo (IP)+Vehículo (oral) vs. Vehículo (IP) + Linaclotide (oral); ! Vehículo (IP) + Linaclotide (oral) vs. GW(IP)+Linaclotide (oral). \* $p$ <0.05; \*\*  $p$ <0.01. Veh.: Vehículo; GW:GW6471; Antagonista de PPAR $\alpha$ ; Lina.: Linaclotide; IP: Administración intraperitoneal. FGF21: Factor de crecimiento de fibroblastos 21; CPT1a: Carnitina palmitoiltransferasa 1a.

# DISCUSIÓN

---





Los resultados obtenidos en el presente estudio muestran que el sistema UGN-GUCY2C está implicado en la regulación de ácidos grasos a nivel hepático. El tratamiento con uroguanilina de una línea celular hepática en la cual se había inducido esteatosis, provoca la disminución de la acumulación de lípidos hepáticos, activando las principales vías de señalización que promueven la oxidación lipídica. Además, en modelos *in vivo* de obesidad inducida por dieta se ha demostrado que la administración oral del linacotide, agonista del receptor GUCY2C, a través de su acción sobre los receptores hepáticos, activa la vía de señalización implicada en procesos de oxidación de ácidos grasos lo que da como resultado final una menor acumulación de lípidos hepáticos.

El sistema UGN-GUCY2C se ha propuesto recientemente como un factor fundamental dentro del eje cerebro-tracto gastrointestinal implicado en la regulación del balance energético y peso corporal<sup>115,118</sup>. Se ha mostrado que la administración central de UGN en ratones obesos estimula la actividad termogénica en el tejido adiposo pardo, incrementando el gasto energético y causando pérdida de peso y disminución de la adiposidad, un efecto que es independiente de la ingesta<sup>121</sup>.

Una de las patologías más frecuentes asociada a la ingesta de una dieta alta en grasa y a la obesidad es la esteatosis hepática. Poco se sabe hasta el momento sobre un posible efecto de la uroguanilina a nivel hepático. Por lo tanto, el tratamiento de esta hormona gastrointestinal en el hígado se convierte en una de las principales propuestas de estudio en la patología de la esteatosis hepática en este proyecto.

En el presente trabajo se llevó a cabo un estudio de la expresión génica de *Gucy2c* en varios tejidos de rata, observándose que la máxima expresión del receptor se localizaba en el tracto gastrointestinal. Además, también encontramos expresión de este receptor en los núcleos hipotalámicos y en el hígado, mientras que, por otro lado, esta expresión era indetectable en el tejido adiposo

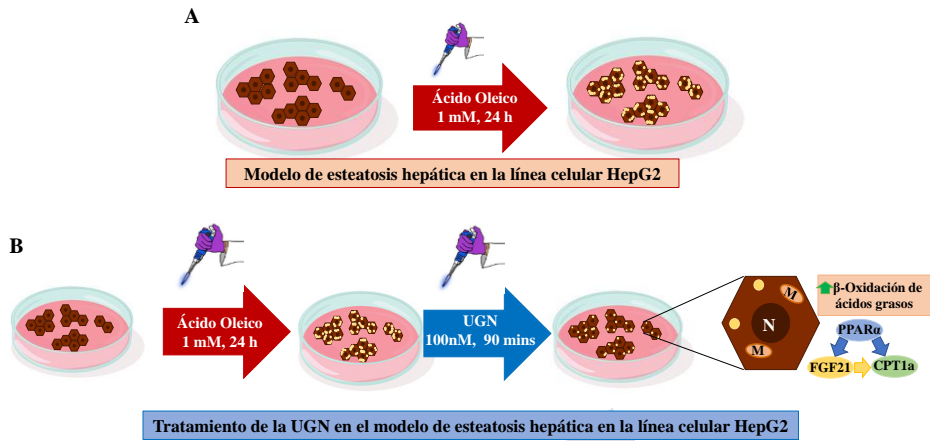
pardo y en el tejido adiposo blanco gonadal. Dado que el receptor GUCY2C se expresa en hígado se planteó la hipótesis de que la uroguanilina pudiese estar jugando algún papel en el metabolismo lipídico hepático. En este contexto, nos centramos en la enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD) con el fin de estudiar si la uroguanilina tras la unión a su receptor era capaz de ejercer un efecto concreto en los hepatocitos en condición de esteatosis, y si eso se producía, estudiar el mecanismo molecular por el cual era capaz de llevarlo a cabo.

En este contexto, primeramente, se generó una condición que mimetizaba la esteatosis hepática en la línea celular humana de hepatocitos HepG2 (Figura 23A). Los datos recogidos demostraron que el tratamiento con UGN (100nM) reducía el exceso de acumulación de grasa citoplasmática inducida por el ácido oleico en los hepatocitos a partir de los 90 minutos de tratamiento (Figura 23B). Estos resultados van en la misma línea que los obtenidos en un trabajo previo publicado en adipocitos humanos que demostró que esta misma dosis de UGN inducía un efecto lipolítico<sup>124</sup>. Por tanto, en líneas generales los datos sugieren que la UGN activa la movilización de lípidos tanto en los adipocitos como en los hepatocitos.

Con el fin de determinar el mecanismo molecular que podría estar involucrado en este efecto lipolítico a nivel hepático, se realizó un estudio de la expresión proteica de las moléculas que forman parte y regulan el metabolismo lipídico hepático. Como resultado, comprobamos que la UGN incrementaba la expresión proteica en las células hepáticas de las principales moléculas implicadas en procesos de  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos (PPAR $\alpha$ , FGF21 y CPT1a) (Figura 23B). Una de estas moléculas afectadas era PPAR $\alpha$  que actúa como un regulador de vital importancia en el mantenimiento del equilibrio lipídico de los hepatocitos. Se trata de un receptor nuclear con un papel importante en el catabolismo de ácidos grasos hepáticos, evitando de esta manera que, el exceso de acumulación de grasa llegue a desarrollar un estado de lipotoxicidad<sup>184,193,259</sup>. Existen varios estudios en ratones que demuestran que la ausencia del gen *Ppara* en

el hígado, permite el desarrollo de un hígado graso lo que supone que se haya planteado esta molécula como potencial terapia para tratar el hígado graso no alcohólico<sup>194,196,260</sup>. Su función principal es la de actuar como un factor de transcripción que se une a los promotores de genes diana para favorecer el incremento de su expresión, en el mecanismo oxidativo de ácidos grasos. Dentro de la vía de señalización intracelular de PPAR $\alpha$  otra molécula importante en la regulación de la homeostasis lipídica hepática es FGF21<sup>219,261,262</sup>, además de CPT1a, que permite transportar los ácidos grasos a través de la membrana externa de la mitocondria para su oxidación<sup>263</sup>.

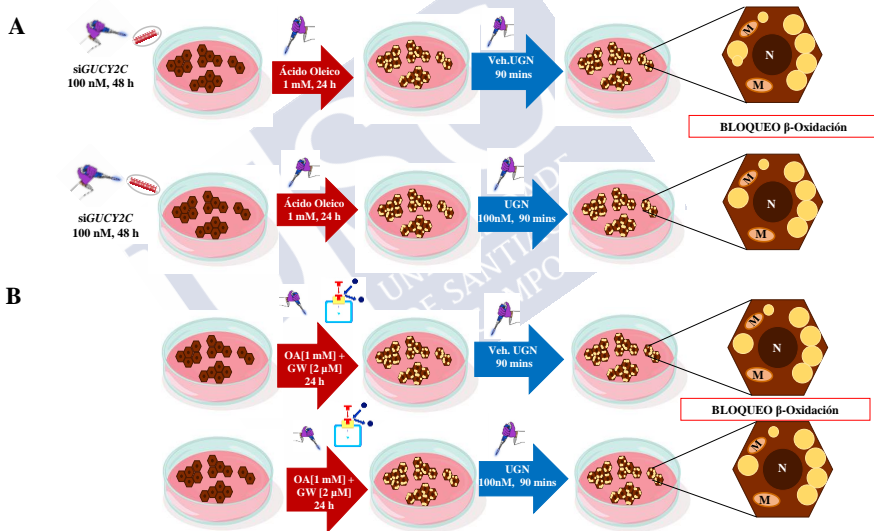
Existen numerosas evidencias científicas que definen la relación de PPAR $\alpha$  con FGF21. Estos estudios demuestran que la activación de PPAR $\alpha$  induce directamente un incremento en los niveles hepáticos de FGF21 en ratones para activar la oxidación de ácidos grasos (Imagen 9), la gluconeogénesis y mejorar la sensibilidad a insulina<sup>219,261,264,265,266</sup>. En relación con las funciones que se desarrollan, encontramos que FGF21, lleva a cabo mecanismos autocrinos/paracrinos en los hepatocitos estimulando la expresión de otras moléculas involucradas en el mecanismo de  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos, así como mecanismos endocrinos en dianas distantes como el tejido adiposo promoviendo la lipólisis<sup>219,261</sup> (Imagen 9). Además de todas estas funciones, se puede comprobar en estudios más recientes que FGF21 ejerce un papel clave en el mecanismo de oxidación de ácidos grasos, disminuyendo los triglicéridos e inhibiendo la lipogénesis<sup>211,262,267</sup>. En los experimentos en los que el gen *Fgf21* está ausente se produce hepatoesteatosis, debido a que la ruta de oxidación de ácidos grasos no se encuentra activada<sup>211</sup>. Como ya se ha comentado anteriormente, algunos estudios demuestran que FGF21 es el responsable directo del incremento de la expresión de otros genes claves en la oxidación de ácidos grasos hepáticos, entre ellos hay que destacar CPT1a (Imagen 9), que se trata de una enzima reguladora de ácidos grasos, con un papel importante en la mitocondria<sup>268,269</sup>.



**Figura 23.** Representación gráfica y esquemática en el modelo celular HepG2. Generación del modelo celular de esteatosis hepática HepG2 (A). Efecto del tratamiento de la UGN sobre el modelo de esteatosis celular generado. Incremento de la expresión de los marcadores (PPAR $\alpha$ , FGF21 y CPT1a) que intervienen en el mecanismo de  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos (B). UGN: Uroguanilima, N: Núcleo del hepatocito, M: Mitocondria del hepatocito.

Dado que los datos muestran un efecto directo de la UGN a nivel hepático que coincide con la expresión de su receptor en este órgano, con el fin de determinar si el efecto que la hormona está ejerciendo sobre la acumulación de lípidos a nivel hepático esta mediado por el receptor GUCY2C utilizamos un RNA de interferencia (siRNA) del receptor GUCY2C (siGUCY2C) para bloquear su expresión. En el estudio de la expresión génica de GUCY2C pudimos comprobar que las células tratadas con siGUCY2C presentaban una reducción de la expresión de un 80% comparado con las células vehículo. Los datos muestran que este silenciamiento en la línea celular hepática bloquea el efecto de la UGN sobre el incremento de la expresión de las moléculas involucradas en el mecanismo de oxidación de ácidos grasos hepáticos (PPAR $\alpha$ , FGF21 y CPT1a) en las células que se había inducido un estado de esteatosis por el tratamiento con ácido oleico. Más aún, el bloqueo del receptor *per se* también incrementó la cantidad de gotas lipídicas en el citoplasma (Figura 24A).

Teniendo en cuenta que hemos demostrado que el tratamiento con UGN induce un incremento en los niveles de PPAR $\alpha$  en la línea celular hepática, quisimos determinar si este receptor nuclear podría estar mediando el efecto de la UGN sobre la acumulación de lípidos hepáticos. En los experimentos realizados, se observa que cuando bloqueamos farmacológicamente PPAR $\alpha$ , el efecto de la UGN desaparece favoreciendo la acumulación de las gotas lipídicas en el citoplasma (Figura 24B). Además, en las células tratadas con el antagonista de PPAR $\alpha$  la UGN no fue capaz de incrementar los niveles proteicos de FGF21 y CPT1a, lo cual indica que PPAR $\alpha$  es un factor crucial para que la UGN pueda activar el proceso de oxidación.

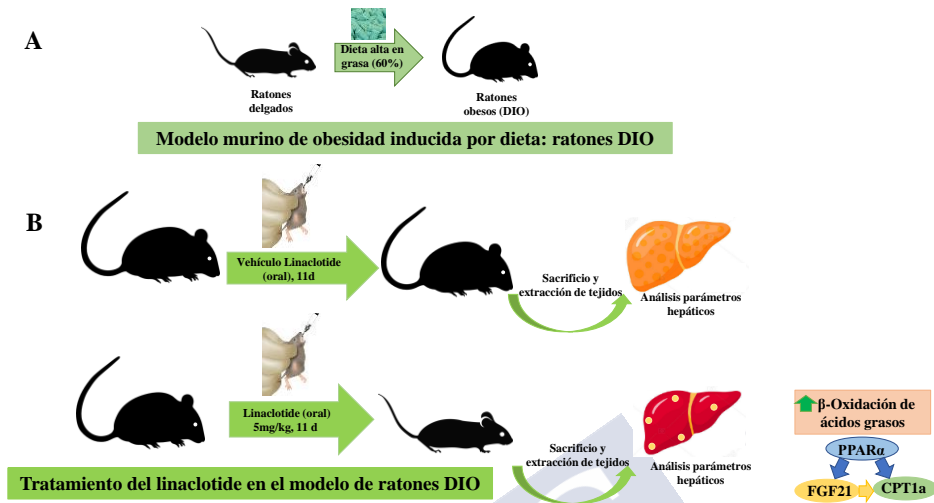


**Figura 24.** Representación gráfica y esquemática de las modificaciones moleculares en el modelo celular de esteatosis HepG2. Tratamiento para silenciar la expresión del receptor GUCY2C utilizando el siGUCY2C en el modelo celular de esteatosis con o sin el tratamiento con la UGN desemboca en una elevada acumulación lipídica citoplasmática bloqueando el mecanismo de  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos(A). Tratamiento farmacológico con el antagonista de PPAR $\alpha$  (GW6471) en el modelo celular de esteatosis con o sin el tratamiento con la UGN también produce el bloqueo de la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos favoreciendo su acumulación en el citoplasma(B). GW: GW6471; OA: Ácido Oleico (“Oleic Acid”); UGN:Uroguanilima; N:Núcleo del hepatocito, M:Mitocondria.

Nuestro trabajo muestra por primera vez la acción directa de la UGN a nivel hepático. Las acciones descritas hasta el momento en la bibliografía para la uroguanilina sobre el metabolismo se producen a nivel central o gastrointestinal. Así, la administración central de UGN ha demostrado ser efectiva en el tratamiento de la obesidad al disminuir el peso corporal como consecuencia de un incremento en el gasto energético y de la actividad termogénica del BAT, todo ello mediado a través de su acción sobre el receptor GUCY2C en el hipotálamo<sup>121</sup>. Por tanto, ésta es la primera vez que se descubre un nuevo efecto de la hormona mostrando la importancia que presenta la acción oxidativa del sistema UGN-GUCY2C directamente en el hepatocito.

Como se describe en el apartado de introducción, el receptor GUCY2C presenta numerosos agonistas entre los que se encuentran agentes patógenos (enterotoxina termoestable, ST), hormonas endógenas (guanilina y uroguanilina) y fármacos sintéticos (linaclotide, dolcanatide, plecanatide)<sup>118,270</sup>. Todos ellos presentan similitudes funcionales y estructurales, destacando la presencia de una secuencia específica que es la que les va a permitir la unión al receptor GUCY2C<sup>271,272</sup>. Si bien, los compuestos sintéticos han sido aprobados para utilizarse fundamentalmente en el tratamiento de enfermedades como la enfermedad crónica del intestino irritable y enfermedades asociadas<sup>118,271</sup>. Sin embargo, estos compuestos suponen una nueva propuesta para poder regular rutas involucradas en la homeostasis energética debido a que comparten el mismo mecanismo de acción que las hormonas endógenas<sup>273</sup>. Con toda esta información y teniendo en cuenta los resultados obtenidos *in vitro*, se planteó la posibilidad de realizar el tratamiento con uno de los agonistas sintéticos, concretamente el linaclotide, en un modelo *in vivo* de esteatosis hepática. Para ello, el modelo más utilizado es el modelo de ratón con obesidad inducida por dieta alta en grasa (Figura 25A)<sup>274,275,276</sup>. Los datos del presente trabajo demuestran que los animales con dieta alta en grasa tratados oralmente con linaclotide presentan un menor peso

corporal y menor masa grasa respecto al grupo vehículo y sin cambios significativos en la ingesta total. Estos datos vienen a reforzar los datos recientemente publicados donde se demuestra que la administración de linacotide oral induce una disminución del peso y grasa corporal en animales independientemente de la dieta<sup>137</sup>. Además, este efecto terapéutico del linacotide se debe a un aumento del gasto energético y una activación del programa termogénico en el BAT. Pero el mismo trabajo ha demostrado que el efecto sobre el peso corporal producido por la administración oral de linacotide está mediado por los receptores GUCY2C en el hipotálamo<sup>137</sup>. En este contexto, los datos en el presente trabajo de tesis muestran que además de los efectos sobre el peso corporal los ratones tratados con linacotide, también presentan una clara disminución en los niveles circulantes y hepáticos de triglicéridos debido a una disminución de la acumulación lipídica intrahepática. Este efecto lipolítico hepático se produce como consecuencia de una activación del proceso de oxidación de ácidos grasos como indica el incremento en la expresión de los principales marcadores oxidativos (PPAR $\alpha$ , FGF21 y CPT1a) en el hígado. Con estos resultados, podemos concluir que el linacotide como agonista del receptor GUCY2C es capaz de activar el mismo mecanismo oxidativo que la UGN en los modelos celulares estudiados, permitiendo finalmente la reducción del exceso de lípidos acumulados en los hepatocitos en la condición patológica de la esteatosis (Figura 25B).



**Figura 25.** Representación gráfica y esquemática en el modelo de ratones DIO. Generación del modelo de ratones con obesidad inducida por dieta (DIO) (A). Efecto del tratamiento del linaclotide y de su vehículo sobre el modelo murino DIO generado. El linaclotide produce un incremento de la expresión de los marcadores (PPAR $\alpha$ , FGF21 y CPT1a) que intervienen en el mecanismo de  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos hepáticos(B). d: días

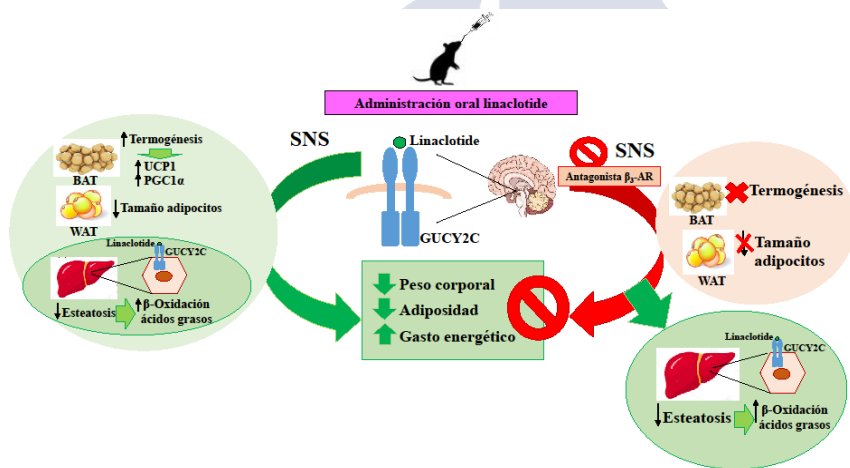
Los datos *in vitro* obtenidos en el presente trabajo en la línea celular humana demuestran que la modulación del receptor GUCY2C directamente en células hepáticas es la responsable del efecto de la UGN sobre la acumulación de lípidos en hepatocitos. Este hecho nos hizo plantearnos si el efecto descrito del linaclotide oral sobre la esteatosis hepática era un efecto directo sobre los receptores GUCY2C en hígado o si como ocurría con los efectos sobre el peso corporal, estos se producían a través de la activación de GUCY2C a nivel hipotalámico.

Con el fin de determinar cómo estaban mediados estos efectos del linaclotide en modelos *in vivo* sobre la esteatosis hepática se silenció específicamente en hígado el receptor GUCY2C mediante la administración intravenosa en la cola del vector lentiviral con el shRNA de *Gucy2c* (sh*Gucy2c*) en ratones con obesidad inducida por dieta. Esta administración se combinó con la realizada vía oral con linaclotide. Tras la administración del lentivirus los niveles de expresión proteica de

GUCY2C hepático disminuyeron hasta un 22%. Con este silenciamiento parcial del receptor encontramos que el linaclotide no era capaz de desarrollar su efecto reduciendo el peso corporal. En el análisis particular del hígado, comprobamos que, en los ratones con el receptor silenciado, el tratamiento con linaclotide no disminuyó significativamente los niveles de triglicéridos hepáticos, efecto que sí se producía en los animales controles tratados con linaclotide. El análisis histológico del tejido hepático demostró que la disminución de la acumulación de gotas lipídicas que ocurría tras el tratamiento con linaclotide no se producía en los animales con el receptor GUCY2C silenciado en hígado (Figura 27A). Además, los marcadores oxidativos hepáticos (PPAR $\alpha$ , FGF21 y CPT1a) que se incrementaban en respuesta al tratamiento con linaclotide, permanecen inalterados o disminuídos en comparación con el grupo vehículo cuando se inhibió el receptor GUCY2C en el hígado.

A la vista de estos datos todo parece indicar que el efecto del linaclotide sobre la esteatosis hepática es un efecto directo del fármaco a nivel hepático. A diferencia de los trabajos previos publicados describiendo un efecto del linaclotide sobre el peso corporal en animales obesos donde su acción en los tejidos adiposos pardo y blanco estaba mediada por la activación de los receptores GUCY2C en el cerebro, el tratamiento de la esteatosis hepática podría realizarse con una terapia dirigida al hígado evitando así otros efectos no deseados consecuencia de la activación del receptor en distintos órganos. Sin embargo, llama la atención el dato que demuestra que al silenciar el receptor GUCY2C a nivel hepático se bloquea también el efecto del linaclotide sobre el peso corporal, cuando ha sido demostrado en la bibliografía que este efecto tiene lugar mediado por los receptores GUCY2C hipotalámicos<sup>137</sup>. Aunque la inyección del lentivirus se ha realizado en la vena de la cola, no se puede excluir la posibilidad de que una cierta carga del lentivirus via sistémica alcance los receptores GUCY2C hipotalámicos y por ello impida la bajada de peso corporal característica del tratamiento con linaclotide. Con el fin de reconfirmar que el efecto del linaclotide sobre la esteatosis hepática tiene lugar como consecuencia de la activación de

GUCY2C en el hígado se llevó a cabo un experimento en el que se administró un antagonista del receptor  $\beta_3$  adrenérgico, interrumpiendo de esta manera la actividad del sistema nervioso simpático. Este bloqueo farmacológico permitió observar que el efecto de la disminución de peso corporal y de la masa grasa que se producía en el grupo de ratones tratado con linaclotide oral se revertía de forma independiente a la ingesta. Sin embargo, a nivel hepático el efecto del linaclotide no se veía afectado por el tratamiento con el antagonista del  $\beta_3$ -AR ya que, se demuestra que los niveles de expresión de los marcadores oxidativos PPAR $\alpha$  y CPT1a se mantienen elevados. De esta manera, se puede concluir que, a nivel hepático, el tratamiento con linaclotide activa la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos de forma independiente al bloqueo del sistema nervioso simpático (Figura 26).

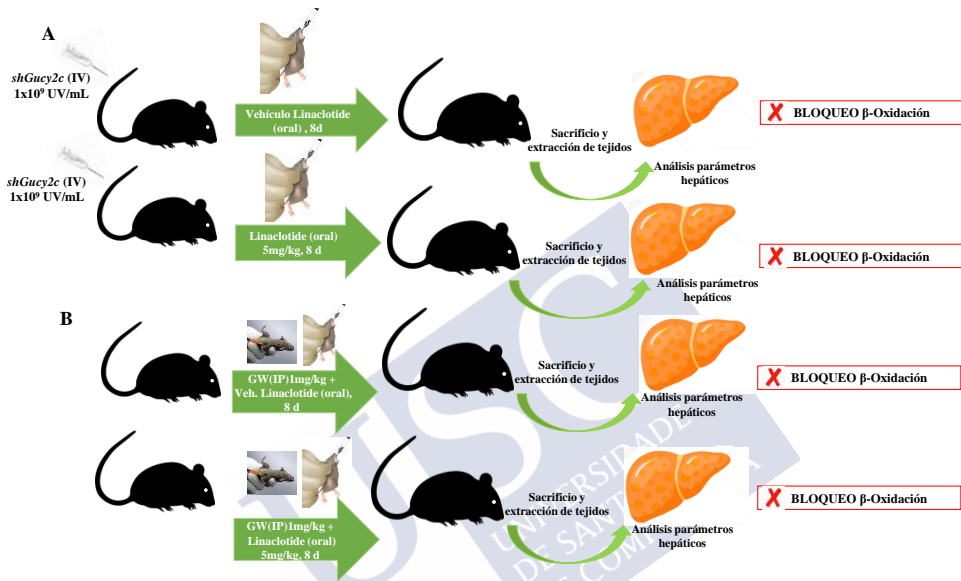


**Figura 26.** Representación gráfica y esquemática de las vías activadas por el tratamiento con linaclotide oral. La administración de linaclotide permite la activación del programa termogénico en el tejido adiposo pardo (BAT), la disminución del tamaño de los adipocitos del tejido adiposo blanco (WAT) y la activación del proceso de  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos en el hígado que promueve la disminución de esteatosis. Todos estos efectos en conjunto permiten una disminución del peso corporal y la adiposidad, al igual que un incremento del gasto energético. Por otro lado, cuando se bloquea farmacológicamente el sistema nervioso simpático (SNS) con el antagonista del receptor  $\beta_3$  adrenérgico ( $\beta_3$ -AR), en presencia de linaclotide, todos estos efectos anteriormente descritos no se producen, sin embargo, sí que se mantiene la activación del mecanismo de  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos hepáticos de forma independiente a este bloqueo y gracias a la unión específica del linaclotide a su receptor GUCY2C en los hepatocitos.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en este trabajo con la línea celular HepG2, en los que se muestra que las acciones de la UGN están mediadas por el receptor nuclear PPAR $\alpha$ , y que *in vivo* el linaclotide incrementa la expresión de este receptor, investigamos si PPAR $\alpha$  era también importante para las acciones *in vivo* del linaclotide. El tratamiento con linaclotide disminuyó el peso corporal en ratones obesos, tanto en aquellos que presentaban bloqueada la vía de PPAR $\alpha$  como en los que la tenían operativa. Sin embargo, cuando nos centramos en los efectos del fármaco sobre la esteatosis hepática, observamos que la disminución de los niveles de triglicéridos hepáticos que se produce en respuesta al tratamiento con linaclotide no era significativa cuando la vía de PPAR $\alpha$  estaba bloqueada. Consecuentemente tampoco se observaba un menor contenido de lípidos en el hígado de ratones tratados con linaclotide cuando la vía PPAR $\alpha$  estaba bloqueada, lo cual se explica porque en esta situación el linaclotide no activa los marcadores moleculares participantes en la oxidación de ácidos grasos hepáticos (FGF21 y CPT1A) (Figura 27B). Por tanto, podemos deducir que la vía de PPAR $\alpha$  representa un papel fundamental en los efectos de linaclotide a nivel hepático, pero no sobre el peso corporal.

Nuestros datos del papel del sistema UGN-GUCY2C sobre PPAR $\alpha$  y el contenido lipídico, resultan de especial interés para poder llevar a cabo futuros experimentos en los que poder estudiar en profundidad la condición de esteatohepatitis no alcohólica (NASH) que es la siguiente condición más severa que puede presentar el hígado patológico tras la NAFLD. En este sentido resulta importante destacar el papel del mecanismo de oxidación de ácidos grasos en la condición de NASH. Un estudio demuestra que en pacientes que padecen NASH la expresión génica de PPAR $\alpha$  es significativamente baja según se incrementa la severidad de la patología. Por tanto, se plantea como posible tratamiento de la condición de NASH el empleo de fármacos que activen PPAR $\alpha$ . Además, refuerzan esta hipótesis comprobando que el incremento de la expresión de los genes diana de PPAR $\alpha$

(*FGF21*, *CPT1a* y *PDK4*) se desarrolla en paralelo con la disminución del NASH<sup>277</sup>. Por tanto, será interesante para investigaciones futuras estudiar el posible papel del linaclotide en modelos de NASH y su efecto mediando la expresión proteica de los marcadores oxidativos que pertenecen al metabolismo lipídico hepático.



**Figura 27.** Representación gráfica y esquemática de las modificaciones moleculares en el modelo murino de ratones DIO. Tratamiento que silencia la expresión del receptor GUCY2C utilizando el *shGucy2c* en el modelo murino DIO con o sin el tratamiento con linaclotide desemboca en una elevada acumulación lipídica intrahepática bloqueando el mecanismo de  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos(A). Tratamiento farmacológico con el antagonista de PPAR $\alpha$  (GW6471) en el modelo murino DIO con o sin el tratamiento con el linaclotide también produce el bloqueo de la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos favoreciendo su acumulación (B). IV: Administración intravenosa; UV: Unidades Virales; IP: Administración intraperitoneal; d: días.

# CONCLUSIONES

---





Los resultados obtenidos en el presente proyecto de tesis doctoral permiten establecer las siguientes conclusiones:

1. El tratamiento con la hormona gastrointestinal uroguanilina, a través de su receptor GUCY2C, incrementa la expresión de PPAR $\alpha$ , FGF21 y CPT1a, activadores de  $\beta$ -oxidación, y disminuye el contenido lipídico en una línea celular de hepatocitos humanos. El silenciamiento genético de *GUCY2C* impide este efecto oxidativo de la hormona sobre las células hepáticas.
2. El antagonista de PPAR $\alpha$  (GW6471) es capaz de bloquear los efectos de la uroguanilina sobre el mecanismo de  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos hepáticos.
3. La administración oral de linaclotide, agonista del receptor GUCY2C, incrementa la expresión de PPAR $\alpha$ , FGF21 y CPT1a en el hígado de ratones DIO, favoreciendo de esta manera una disminución del contenido de lípidos en los hepatocitos, y estos efectos se bloquean tras la inhibición genética de *Gucy2c* en el hígado.
4. El antagonista de PPAR $\alpha$  (GW6471) bloquea los efectos del linaclotide sobre el mecanismo de  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos hepáticos, mientras que el bloqueo farmacológico del receptor  $\beta_3$  adrenérgico revierte los efectos del linaclotide sobre la masa corporal pero no afecta a sus efectos hepáticos.



# **BIBLIOGRAFÍA**

---





1. Waterson MJ., Horvath TL. Neuronal regulation of energy homeostasis: beyond the hypothalamus and feeding. *Cell Metabolism*.22(6):962-970 (2015).
2. Spiegelman B.M., Flier J.S. Obesity and the regulation of energy balance. *Cell*.104(4):531-543 (2001).
3. World Health Organization. Noncommunicable diseases progress monitor, 2017. WHO <https://www.who.int/nmh/publications/ncd-progress-monitor-2017/en/> (2017).
4. Bray, G. A.,Kim K.K., Wilding J.P.H.; World Obesity Federation. Obesity: a chronic relapsing progressive disease process. A position statement of the World Obesity Federation. *Obes. Rev.* 18, 715–723 (2017).
5. World Health Organization. Obesity and overweight. WHO <https://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/> (2016).
6. World Health Organization. International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems 10th revision. WHO <http://apps.who.int/classifications/icd10/browse/2010/en> (2010).
7. NCD Risk Factor Collaboration (NCD- RiskC). Worldwide trends in body- mass index, underweight, overweight, and obesity from 1975 to 2016: a pooled analysis of 2416 population- based measurement studies in 128.9 million children, adolescents, and adults. *Lancet* 390, 2627–2642 (2017).
8. Geserick, M., Vogel M., Gausche R., Lipek T., Spielau U., Keller E., Pfäffle R., Kiess W., Körner A. BMI acceleration in early childhood and risk of sustained obesity. *N. Engl. J. Med.* 379, 1303–1312 (2018).
9. Ettinger M.P., Littlejohn T.W., Schwartz S.L., Weiss S.R., McIlwain H.H., Heymsfield S.B., Bray G.A., Roberts W.G., Heyman E.R., Stambler N., Heshka S., Vicary C., Guler H.P. Recombinant variant of ciliary neurotrophic factor for weight loss in obese adults: a randomized, dose-ranging study. *JAMA*. 289(14):1826-1832(2003).
10. Bays H.E. Current and investigational antiobesity agents and obesity therapeutic treatment targets. *Obes Res*. 12(8):1197-1211(2004).

11. Badman, M.K. & Flier, J.S. The gut and energy balance: visceral allies in the obesity wars. *Science* 307, 1909–1914 (2005).
12. Barja-Fernández S., Folgueira C., Castela C., Leis R., Casanueva F.F., Seoane L.M. Peripheral signals mediate the beneficial effects of gastric surgery in obesity. *Gastroenterol Res Pract.* 2015:560938 (2015).
13. Hatoum I. J., Greenawalt D. M., Cotsapas C., Reitman M. L., Daly M. J. and Kaplan L. M. Heritability of the weight loss response to gastric bypass surgery. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 96(10):E1630–E1633 (2011).
14. Auguet T., Terra X., Hernández M. Sabench F., Porrás J.A., Orellana-Gavaldà J.M., Llutart J., Guiu-Jurado E., Berlanga A., Martínez S., Aguilar C., Castillo D.D., Richart C. Clinical and adipocytokine changes after bariatric surgery in morbidly obese women. *Obesity* 22(1):188–194 (2014).
15. Hankir M.K., Al-Bas S., Rullmann M., Chakaroun R., Seyfried F., Pleger B. Homeostatic, reward and executive brain functions after gastric bypass surgery. *Appetite* 2019: 104419 (2019).
16. Beutler L.R., Chen Y., Ahn J.S., Lin Y.C., Essner R.A., Knight Z.A. Dynamics of gut-brain communication. underlying hunger. *Neuron* 96, 461-475.e5 (2017).
17. Korner J., Bessler M., Cirilo L.J., Conwell I.M., Daud A., Restuccia N.L., Wardlaw S.L. Effects of Roux-en-Y gastric bypass surgery on fasting and postprandial concentrations of plasma ghrelin, peptide YY, and insulin. *J Clin Endocrinol Metab.* 90(1):359-365 (2005).
18. Elmquist J.K., Elias C.F. & Saper C.B. From lesions to leptin: hypothalamic control of food intake and body weight. *Neuron.* 22(2):221-232 (1999).
19. Kim K.S., Seeley R.J., Sandoval D.A. Signalling from the periphery to the brain that regulates energy homeostasis. *Nat. Rev. Neurosci.* 19(4):185-196 (2018).
20. Schwartz M.W., Woods S.C., Porte D.Jr., Seeley R.J. & Baskin D.G. Central nervous system control of food intake. *Nature* 404, 661–671 (2000).

21. Morton G.J., Cummings D.E., Baskin D.G., Barsh G.S. & Schwartz M.W. Central nervous system control of food intake and body weight. *Nature* 443, 289–295 (2006).
22. López M., Tovar S., Vázquez M.J., Williams L.M., Diéguez C. Peripheral tissue-brain interactions in the regulation of food intake. *Proc Nutr Soc.* 66(1):131-155 (2007).
23. Banks W.A. Leptin transport across the blood-brain barrier: implications for the cause and treatment of obesity. *Current Pharmaceutical Design* 7, 125–133 (2001).
24. Kastin A.J., Akerstrom V. & Pan W. Interactions of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) with the blood-brain barrier. *Journal of Molecular Neuroscience* 18, 7–14 (2002).
25. Woods S.C., Seeley R.J., Baskin D.G. & Schwartz M.W. Insulin and the blood-brain barrier. *Current Pharmaceutical Design* 9, 795–800 (2003).
26. Hahn T.M., Breininger J.F., Baskin D.G. & Schwartz M.W. Coexpression of Agrp and NPY in fasting-activated hypothalamic neurons. *Nature Neuroscience* 1, 271–272 (1998).
27. Kristensen P., Judge M.E., Thim L., Ribel U., Christjansen K.N., Wulff B.S., Clausen J.T., Jensen P.B., Madsen O.D., Vrang N., Larsen P.J., Hastrup S. Hypothalamic CART is a new anorectic peptide regulated by leptin. *Nature* 393, 72–76 (1998).
28. Sawchenko P.E. & Swanson L.W. The organization and biochemical specificity of afferent projections to the paraventricular and supraoptic nuclei. *Progress in Brain Research* 60, 19–29 (1983).
29. Cowley M.A., Pronchuk N., Fan W., Dinulescu D.M., Colmers W.F. & Cone R.D. Integration of NPY, AGRP, and melanocortin signals in the hypothalamic paraventricular nucleus: evidence of a cellular basis for the adipostat. *Neuron* 24, 155–163 (1999).
30. Hecherington A. & Ranson S. The spontaneous activity and food intake of rats with hypothalamic lesions. *American Journal of Physiology* 136, 609–617 (1942).
31. Xu B., Goulding E.H., Zang K., Cepoi D., Cone R.D., Jones K.R., Tecott L.H. & Reichardt L.F. Brain-derived neurotrophic factor

- regulates energy balance downstream of melanocortin-4 receptor. *Nature Neuroscience* 6, 736–742 (2003).
32. Majdic G., Young M., Gomez-Sanchez E., Anderson P., Szczepaniak L.S., Dobbins R.L., McGarry J.D. & Parker K.L. Knockout mice lacking steroidogenic factor 1 are a novel genetic model of hypothalamic obesity. *Endocrinology* 143, 607–614 (2002).
  33. Lopez M., Varela L., Vazquez M.J., Rodriguez Cuenca S., Gonzalez C.R., Velagapudi V.R., Morgan D.A., Schoenmakers E., Agassandian K., Lage R. Hypothalamic AMPK and fatty acid metabolism mediate thyroid regulation of energy balance. *Nature Medicine* 16:1001–1008 (2010).
  34. Kim K.W., Zhao L., Donato J.Jr., Kohno D., Xu Y., Elias C.F., Lee C., Parker K.L., Elmquist J.K. Steroidogenic factor 1 directs programs regulating diet-induced thermogenesis and leptin action in the ventral medial hypothalamic nucleus. *PNAS* 108, 10673–10678 (2011).
  35. Martinez de Morentin P.B., Whittle A.J., Ferno J., Nogueiras R., Dieguez C., Vidal-Puig A., López M. Nicotine induces negative energy balance through hypothalamic AMP-activated protein kinase. *Diabetes* 61, 807–817(2012).
  36. Bellinger L.L. & Bernardis L.L. The dorsomedial hypothalamic nucleus and its role in ingestive behavior and body weight regulation: lessons learned from lesioning studies. *Physiology and Behavior* 76, 431–442 (2002).
  37. García M.C., López M., Gualillo O., Seoane L., Diéguez C. & Señarís R. Hypothalamic levels of NPY, MCH, and prepro-orexin mRNA during pregnancy and lactation in the rat: role of prolactin. *FASEB Journal* 17, 1392–1400 (2003).
  38. Henry B.A., Rao A., Ikenasio B.A., Mountjoy K.G., Tilbrook A.J. & Clarke I.J. Differential expression of cocaine- and amphetamine-regulated transcript and agouti related-protein in chronically food-restricted sheep. *Brain Research* 918, 40–50 (2001).
  39. Berthoud H.R. & Münzberg H. The lateral hypothalamus as integrator of metabolic and environmental needs: from electrical self-stimulation to opto-genetics. *Physiol. Behav.* 104(1):29-39 (2011).

40. Saper C.B., Swanson L.W., Cowan W.M. An autoradiographic study of the efferent connections of the lateral hypothalamic area in the rat. *J Comp Neurol.* 183(4):689–706 (1979).
41. Swanson L.W., Sanchez-Watts G., Watts A.G.. Comparison of melanin-concentrating hormone and hypocretin/orexin mRNA expression patterns in a new parceling scheme of the lateral hypothalamic zone. *Neurosci Lett.* 387(2):80–84 (2005).
42. Horvath T.L., Diano S. & van den Pol A.N. Synaptic interaction between hypocretin (orexin) and neuropeptide Y cells in the rodent and primate hypothalamus: a novel circuit implicated in metabolic and endocrine regulations. *Journal of Neuroscience* 19, 1072–1087 (1999).
43. Elizondo-Vega R., Cortes-Campos C., Barahona M.J., Oyarce K.A., Carril C.A., García-Robles M.A.. The role of tanycytes in hypothalamic glucosensing. *J Cell Mol Med.* 19(7),1471-1482 (2015).
44. Karemaker J.M. An introduction into autonomic nervous function. *Physiol Meas.* 38(5):R89-R118 (2017).
45. Koopman F.A., Stoof S.P., Straub R.H., Van Maanen M.A., Vervoordeldonk M.J., Tak P.P. Restoring the balance of the autonomic nervous system as an innovative approach to the treatment of rheumatoid arthritis. *Mol Med.* 17(9-10):937-948 (2011).
46. Lake J.I., Heuckeroth R.O. Enteric nervous system development: migration, differentiation, and disease. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2013;305(1):G1-24 (2013).
47. McConalogue K., Furness J.B. Gastrointestinal neurotransmitters. *Baillieres Clin. Endocrinol. Metab.* 8(1): 51-76 (1994).
48. Konturek S.J., Konturek J.W., Pawlik T. & Brzozowski T. Brain-gut axis and its role in the control of food intake. *Journal of Physiology and Pharmacology* 55, 137–154 (2004).
49. Gualillo O., Caminos J., Blanco M., García-Caballero T., Kojima M., Kangawa K., Diéguez C. & Casanueva F. Ghrelin, a novel placental-derived hormone. *Endocrinology* 142, 788-794 (2001).
50. Tena-Sempere M., Barreiro M.L, González L.C., Gaytan F., Zhang F.P., Caminos J.E., Pinilla L., Casanueva F.F., Diéguez C & Aguilar E.

- Novel expression and functional role of ghrelin in rat testis. *Endocrinology* 143, 717-725 (2002).
51. Caminos J.E., Tena-Sempere M., Gaytan F., Sánchez-Criado J.E., Barreiro M.L., Nogueiras R., Casanueva F.F., Aguilar E. & Diéguez C. Expression of ghrelin in the cyclic and pregnant rat ovary. *Endocrinology* 144, 1594-1602 (2003).
  52. Iglesias M.J., Pineiro R., Blanco M., Gallego R., Diéguez C., Gualillo O., González-Juanatey J.R. & Lago F. Growth hormone releasing peptide (ghrelin) is synthesized and secreted by cardiomyocytes. *Cardiovascular Research* 62, 481-488 (2004).
  53. Caminos J.E., Nogueiras R., Blanco M., Seoane L.M., Bravo S., Alvarez C.V., Garcia-Caballero T., Casanueva F.F. & Dieguez C. Cellular distribution and regulation of ghrelin messenger ribonucleic acid in the rat pituitary gland. *Endocrinology* 144(11)5089-5097 (2003).
  54. Nakazato M., Murakami N., Date Y., Kojima M., Matsuo H., Kangawa K. & Matsukura S. A role for ghrelin in the central regulation of feeding. *Nature* 409, 194-198 (2001).
  55. Seoane L.M., López M., Tovar S., Casanueva F.F., Señarís R. & Diéguez C. Agouti-related peptide, neuropeptide Y, and somatostatin-producing neurons are targets for ghrelin actions in the rat hypothalamus. *Endocrinology* 144, 544-551 (2003).
  56. Tschop M., Smiley D.L. & Heiman M.L. Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature* 407, 908-913 (2000).
  57. Cummings D.E., Purnell J.Q., Frayo R.S., Schmidova K., Wisse B.E. & Weigle D.S. A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans. *Diabetes* 50, 1714-1719 (2001).
  58. Tschop M., Wawarta R., Riepl R.L., Friedrich S., Bidlingmaier M., Landgraf R. & Folwaczny C. Post-prandial decrease of circulating human ghrelin levels. *Journal of Endocrinological Investigation* 24, RC19-RC21 (2001).
  59. Wren A.M., Small C.J., Abbott C.R., Dhillon W.S., Seal L., Cohen M., Batterham R.L., Taheri S., Stanley S.A., Ghatei M.A. & Bloom S.R.G. Ghrelin causes hyperphagia and obesity in rats. *Diabetes* 50, 2540-2547 (2001).

60. Wren A.M., Seal L.J., Cohen M.A., Brynes A.E., Frost G.S., Murphy K.G., Dhillo W.S., Ghatei M.A. & Bloom S.R. Ghrelin enhances appetite and increases food intake in humans. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 86, 5992 (2001).
61. Grove K.L. & Cowley M.A. Is ghrelin a signal for the development of metabolic systems? *Journal of Clinical Investigation* 115, 3393–3397 (2005).
62. Halford J.C. & Blundell J.E. Pharmacology of appetite suppression. *Progress in Drug Research* 54,25-58 (2000).
63. Beglinger C., Degen L., Matzinger D., D'Amato M. & Drewe J. Loxiglumide, a CCK-A receptor antagonist, stimulates calorie intake and hunger feelings in humans. *American Journal of Physiology* 280, R1149–R1154 (2001).
64. Stanley S., Wynne K., McGowan B. & Bloom S. Hormonal regulation of food intake. *Physiological Reviews* 85, 1131–1158 (2005).
65. Dakin C.L., Small C.J., Batterham R.L., Neary N.M., Cohen M.A., Patterson M., Ghatei M.A. & Bloom S.R. Peripheral oxyntomodulin reduces food intake and body weight gain in rats. *Endocrinology* 145, 2687–2695 (2004).
66. Bullock B.P., Heller R.S. & Habener J.F. Tissue distribution of messenger ribonucleic acid encoding the rat glucagon-like peptide-1 receptor. *Endocrinology* 137, 2968–2978 (1996).
67. Moran T.H., Smedh U., Kinzig K.P., Scott K.A., Knipp S. & Ladenheim E.E. Peptide YY(3–36) inhibits gastric emptying and produces acute reductions in food intake in rhesus monkeys. *American Journal of Physiology* 288, R384–R388 (2005).
68. Miyawaki K., Yamada Y., Ban N., Ihara Y., Tsukiyama K., Zhou H., Fujimoto S., Oku A., Tsuda K., Toyokuni S., Hiai H., Mizunoya W., Fushiki T., Holst J.J., Makino M., Tashita A., Kobara Y., Tsubamoto Y., Jinnouchi T., Jomori T., Seino Y. Inhibition of gastric inhibitory polypeptide signaling prevents obesity. *Nature Medicine* 8, 738–742 (2002).
69. Batterham, R. L., Heffron H, Kapoor S, Chivers JE, Chandarana K, Herzog H, Le Roux CW, Thomas EL, Bell JD, Withers DJ. Critical

- role for peptide YY in protein-mediated satiation and body-weight regulation. *Cell Metab.* 4, 223–233 (2006) .
70. Vázquez-Vela M.E., Torres N., Tovar A.R. White adipose tissue as endocrine organ and its role in obesity. *Arch. Med. Res.* 39(8):715-728 (2008).
  71. Morrison R.F., Farmer S.R. Hormonal signaling and transcriptional control of adipocyte differentiation. *J. Nutr.* 130,3116S-3121S (2000).
  72. MacDougald O.A., Burant C.F. The rapidly expanding family of adipokines. *Cell Metab.* 6,159-161 (2007).
  73. Zhang Y., Proenca R., Maffei M., Barone M., Leopold L., Friedman J.M.. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372,425-432 (1994).
  74. Maffei M., Fei H., Lee G.H., Dani C., Leroy P., Zhang Y., Proenca R., Negrel R., Ailhaud G., Friedman J.M. Increased expression in adipocytes of ob RNA in mice with lesions of the hypothalamus and with mutations at the db locus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92,6957-6960 (1995).
  75. Campfield L.A., Smith F.J., Guisez Y., Devos R., Burn P. Recombinant mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. *Science* 269,546-549 (1995).
  76. Hoggard N., Mercer J.G., Rayner D.V., Moar K., Trayhurn P., Williams L.M. Localization of leptin receptor mRNA splice variants in murine peripheral tissues by RT-PCR and in situ hybridization. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 232,383-387 (1997).
  77. Lollmann B., Gruninger S., Stricker-Krongrad A., Chiesi M. Detection and quantification of the leptin receptor splice variants Ob-Ra, b, and e

- in different mouse tissues. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 238:648-652 (1997).
78. Morioka T., Asilmaz E., Hu J., Dishinger J.F., Kurpad A.J., Elias C.F., Li H., Elmquist J.K., Kennedy R.T., Kulkarni R.N. Disruption of leptin receptor expression in the pancreas directly affects beta cell growth and function in mice. *J. Clin. Invest.* 117,2860-2868 (2007).
79. Kershaw E.E., Flier J.S. Adipose tissue as an endocrine organ. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 89,2548-2556 (2004).
80. Unger R.H. Lipid overload and overflow: metabolic trauma and the metabolic syndrome. *Trends Endocrinol. Metab.* 14,398-403 (2003).
81. Nadler S.T., Attie A.D. Please pass the chips: genomic insights into obesity and diabetes. *J. Nutr.* 131,2078-2081 (2001).
82. Unger R.H., Zhou Y.T., Orci L. Regulation of fatty acid homeostasis in cells: novel role of leptin. *PNAS* 96,2327-2332 (1999).
83. Wilson-Fritch L., Nicoloso S., Chouinard M., Lazar M.A., Chui P.C., Leszyk J., Straubhaar J., Czech M.P., Corvera S. Mitochondrial remodeling in adipose tissue associated with obesity and treatment with rosiglitazone. *J. Clin. Invest.* 114,1281-1289 (2004).
84. Frontini A., Cinti S. Distribution and development of brown adipocytes in the murine and human adipose organ. *Cell Metab.* 11(4):253–256 (2010).
85. de Jong J.M., Larsson O., Cannon B., Nedergaard J. A stringent validation of mouse adipose tissue identity markers. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 308(12):E1085–E1105 (2015).

86. Park, A., Kim, W. K., and Bae, K. H. Distinction of white, beige and brown adipocytes derived from mesenchymal stem cells. *World J. Stem Cells* 6, 33–42 (2014).
87. Nedergaard J., Bengtsson T., Cannon B. Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 293(2):E444-452 (2007).
88. Cypess A.M., Lehman S., Williams G., Tal I., Rodman D., Goldfine A.B., Kuo F.C., Palmer E.L., Tseng Y.H., Doria A., Kolodny G.M., Kahn C.R. Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. *N. Engl. J. Med.* 360(15):1509–1517 (2009).
89. Heaton G.M., Wagenvoord R.J., Kemp A. Jr., Nicholls D.G. Brown adipose-tissue mitochondria: photoaffinity labelling of the regulatory site of energy dissipation. *Eur. J. Biochem.* 82(2):515–521 (1978).
90. Ricquier D., Kader J.C. Mitochondrial protein alteration in active brown fat: a sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoretic study. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 73(3):577–583 (1976)
91. Marlatt K.L., Ravussin E. Brown Adipose Tissue: an Update on Recent Findings. *Curr. Obes. Rep.* 6(4):389-396 (2017).
92. van Marken Lichtenbelt W.D., Vanhommerig J.W., Smulders N.M., Drossaerts J.M., Kemerink G.J., Bouvy N.D., Schrauwen P., Teule G.J. Cold-activated brown adipose tissue in healthy men. *N. Engl. J. Med.* 360(15):1500–1508 (2009).
93. Cannon B., Nedergaard J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol. Rev.* 84(1): 277–359 (2004).
94. Cinti S. Transdifferentiation properties of adipocytes in the adipose organ. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 297(5): E977–E986 (2009).

95. Collins S., Surwit R.S. The beta-adrenergic receptors and the control of adipose tissue metabolism and thermogenesis. *Recent. Prog. Horm. Res.* 56: 309–328 (2001).
96. Kiefer F.W. Browning and thermogenic programming of adipose tissue. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 30(4):479–485 (2016).
97. Barquissau V., Beuzelin D., Pisani D.F., Beranger G.E., Mairal A., Montagner A., Roussel B., Tavernier G., Marques M.A., Moro C., Guillou H., Amri E.Z., Langin D. White-to-brite conversion in human adipocytes promotes metabolic reprogramming towards fatty acid anabolic and catabolic pathways. *Mol. Metab.* 5(5):352–365 (2016).
98. Harms M., Seale P. Brown and beige fat: development, function and therapeutic potential. *Nat. Med.* 19(10):1252–1263 (2013).
99. Kim S.H., Plutzky J. Brown fat and browning for the treatment of obesity and related metabolic disorders. *Diabetes Metab. J.* 40(1):12–21 (2016).
100. Stanford K.I., Middelbeek R.J., Goodyear L.J. Exercise effects on white adipose tissue: beiging and metabolic adaptations. *Diabetes* 64(7):2361–2368 (2015).
101. Jespersen, N. Z., Larsen, T. J., Peijs, L., Dagaard, S., Homoe, P., Loft, A., de Jong J., Mathur N., Cannon B., Nedergaard J., Pedersen B.K., Møller K., Scheele C. A classical brown adipose tissue mRNA signature partly overlaps with brite in the supraclavicular region of adult humans. *Cell Metab.* 17(5):798–805 (2013).
102. Wu, J., Cohen, P., and Spiegelman, B. M. Adaptive thermogenesis in adipocytes: is beige the new brown? *Genes Dev.* 27, 234–250 (2013).

103. Sanchez-Gurmaches, J., and Guertin, D. A. Adipocytes arise from multiple lineages that are heterogeneously and dynamically distributed. *Nat. Commun.* 5:4099 (2014).
104. Forte L.R. Jr. Uroguanylin and guanylin peptides: pharmacology and experimental therapeutics. *Pharmacol Ther.* 104(2):137–162 (2004).
105. Sindic A., Schlatter E. Cellular effects of guanylin and uroguanylin. *J Am Soc Nephrol.* 17,607-616 (2006).
106. Seeley R.J. & Tschöp M.H. Uroguanylin: how the gut got another satiety hormone. *J Clin Invest.* 121(9):3384-3386 (2011).
107. Hamra F.K., Fan X., Krause W.J., Freeman R.H., Chin D.T., Smith C.E., Currie M.G. & Forte L.R. Prouroguanylin and proguanylin: purification from colon, structure, and modulation of bioactivity by proteases. *Endocrinology* 137, 257-265 (1996).
108. Qian X., Moss N.G., Fellner R.C. & Goy M.F. Circulating prouroguanylin is processed to its active natriuretic form exclusively within the renal tubules. *Endocrinology* 149, 4499-4509 (2008).
109. Fellner R.C., Moss N.G. & Goy M.F. Dietary salt regulates uroguanylin expression and signaling activity in the kidney, but not in the intestine. *Physiol. Rep.* 4(9). pii: e12782 (2016)
110. Narayan H., Mohammed N., Quinn P.A., Squire I.B., Davies J.E. & Ng L.L. Activation of a novel natriuretic endocrine system in humans with heart failure. *Clin. Sci. (Lond.)* 118, 367-374 (2010).
111. Begg D.P., Steinbrecher K.A., Mul J.D., Chambers A.P., Kohli R., Haller A., Cohen M.B., Woods S.C., and Seeley R.J. Effect of guanylate cyclase-C activity on energy and glucose homeostasis. *Diabetes* 63:3798–3804 (2014).

112. Valentino M.A., Lin J.E., Snook A.E., Li P., Kim G.W., Marszalowicz G., Magee M.S., Hyslop T., Schulz S., Waldman S.A. A uroguanylin-GUCY2C endocrine axis regulates feeding in mice. *J. of Clin. Invest.* 121(9): 3578-3588 (2011).
113. You Y.j., Kim J., Raizen D.M., Avery L. Insulin, cGMP, and TGF- $\beta$  signals regulate food intake and quiescence in *C. elegans*: A model for satiety. *Cell Metabolism* 7(3):249–257 (2008).
114. Kaun K.R., Riedl C.A., Chakaborty-Chatterjee M., Belay A.T., Douglas S.J., Gibbs A.G., Sokolowski M.B. Natural variation in food acquisition mediated via a *Drosophila* cGMP-dependent protein kinase. *J. Exp. Biol.* 210(pt 20):3547–3558 (2007).
115. Fruhbeck G. Gastrointestinal hormones: uroguanylin-a new gut-derived weapon against obesity? *Nat. Rev. Endocrinol.* 8 5-6 (2011).
116. Kim Y., Jun I., Shin D.H., Yoon J.G., Piao H., Jung J., Park H.W., Cheng M.H., Bahar I., Whitcomb D.C., Lee M.G. Regulation of CFTR Bicarbonate Channel Activity by WNK1: Implications for Pancreatitis and CFTR-Related Disorders. *Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol.* pii: S2352-345X(19)30121-3 (2019).
117. Gurney M.A., Laubitz D., Ghishan F.K., Kiela P.R. Pathophysiology of Intestinal Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange. *Cell. Mol. Gastroenterol Hepatol.* 3(1):27-40 (2017).
118. Folgueira C., Barja-Fernandez S., Gonzalez-Saenz P., Pena-Leon V., Castelao C., Ruiz-Piñon M., Casanueva F.F., Nogueiras R., Seoane L.M. Uroguanylin: a new actor in the energy balance movie. *J. Mol. Endocrinol.* 60(2):R31-R38 (2018).
119. Fiskerstrand T., Arshad N., Haukanes B.I., Tronstad R.R., Pham K.D., Johansson S., Havik B., Tonder S.L., Levy S.E., Brackman D., Boman H., Biswas K.H., Apold J., Hovdenak N., Visweswariah S.S., Knappkog P.M. Familial diarrhea syndrome caused by an activating GUCY2C mutation. *N. Engl. J. Med.* 366(17):1586-1595 (2012).
120. Kim G.W., Lin J.E., Snook A.E., Aing A.S., Merlino D.J., Li P. & Waldman SA. Calorie-induced ER stress suppresses uroguanylin satiety signaling in diet-induced obesity. *Nutr. Diabetes* 6:e211 (2016).

121. Folgueira C., Beiroa D., Callon A., Al-Massadi O., Barja-Fernandez S., Senra A., Ferno J., López M., Diéguez C., Casanueva F.F., Rohner-Jeanrenaud F., Seoane L.M., Nogueiras R. Uroguanylin action in the brain reduces weight gain in obese mice via different efferent autonomic pathways. *Diabetes* 65:421–432 (2016a).
122. Gong R., Ding C., Hu J., Lu Y., Liu F., Mann E., Xu F., Cohen M.B., and Luo M. Role for the membrane receptor guanylyl cyclase-C in attention deficiency and hyperactive behavior. *Science* 333:1642–1646 (2011).
123. Folgueira C., Sanchez-Rebordelo E., Barja-Fernandez S., Leis R., Tovar S., Casanueva F.F., Dieguez C., Nogueiras R. & Seoane L.M. Uroguanylin levels in intestine and plasma are regulated by nutritional status in a leptin-dependent manner. *Eur. J. Nutr.* 55: 529-536 (2016b);
124. Rodríguez A., Gómez-Ambrosi J., Catalán V., Ezquerro S., Méndez-Giménez L., Becerril S., Ibáñez P., Vila N., Margall M.A., Moncada R., Valentí V., Silva C., Salvador J., Frühbeck G. Guanylin and uroguanylin stimulate lipolysis in human visceral adipocytes. *Int. J. Obes. (Lond.)*.40(9):1405-1415 (2016).
125. Torquati A., Shantavasinkul P.C., Omotosho P., Corsino L., Spagnoli A. Perioperative changes in prouroguanylin hormone response in severely obese subjects after bariatric surgery. *Surgery.* 166(4):456-459 (2019).
126. Patterson M, Ward H, Halvai D, Holm Nilsen HA, Reeves S. Postprandial regulation of prouroguanylin in humans of a healthy weight and those who are overweight or with obesity. *Peptides.* 123:170179 (2020).

127. Seoane L.M., Al-Massadi O., Caminos J.E., Tovar S.A., Dieguez C. & Casanueva F.F. Sensory stimuli directly acting at the central nervous system regulate gastric ghrelin secretion. an ex vivo organ culture study. *Endocrinology* 148 3998-4006 (2007).
128. Folgueira C., Barja-Fernández S., Gonzalez-Saenz P., Castelao C., Vázquez-Cobela R., Pena-Leon V., Ruiz-Piñon M., Casanueva F.F., Dieguez C., Leis R., Nogueiras R., Seoane L.M. Circulating Pro-Uroguanylin Levels In Children And Their Relation To Obesity, Sex And Puberty. *Sci Rep.* 8(1):14541 (2018).
129. Currie M.G., Fok K.F., Kato J., Moore R.J., Hamra F.K., Duffin K.L. & Smith C.E. Guanylin: an endogenous activator of intestinal guanylate cyclase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 89 947-951 (1992).
130. Waldman S.A., Camilleri M. Guanylate cyclase-C as a therapeutic target in gastrointestinal disorders. *Gut* 67(8): 1543-1552 (2018).
131. Forte L.R., Currie M.G. Guanylin: a peptide regulator of epithelial transport. *FASEB J.* 1995;9(8):643-650 (1995).
132. Vaandrager A.B., Bot A.G., De Jonge H.R. Guanosine 3',5'-cyclic monophosphate-dependent protein kinase II mediates heat-stable enterotoxin-provoked chloride secretion in rat intestine. *Gastroenterology* 112(2):437-443 (1997).
133. Schulz S., Green C.K., Yuen P.S., Garbers D.L. Guanylyl cyclase is a heat-stable enterotoxin receptor. *Cell* 63(5):941-948 (1990).
134. Field M., Graf L.H.Jr, Laird W.J. & Smith P.L. Heat-stable enterotoxin of Escherichia coli: in vitro effects on guanylate cyclase activity, cyclic GMP concentration, and ion transport in small intestine. *PNAS* 75(6): 2800-2804 (1978).
135. Shailubhai K., Comiskey S., Foss J.A., Feng R., Barrow L., Comer G.M. & Jacob G.S. Plecanatide, an oral guanylate cyclase C agonist acting locally in the gastrointestinal tract, is safe and welltolerated in single doses. *Dig. Dis. Sci.* 58: 2580-2586 (2013).

136. Shailubhai K., Palejwala V., Arjunan K.P., Saykhedkar S., Nefsky B., Foss J.A., Comiskey S., Jacob G.S. & Plevy S.E. Plecanatide and dolcanatide, novel guanylate cyclase-C agonists, ameliorate gastrointestinal inflammation in experimental models of murine colitis. *World J. Gastrointest. Pharmacol. Ther.* 6: 213-222 (2015).
137. Folgueira C., Torres-Leal F.L., Beiroa D., Pena-León V., Da Silva Lima N., Milbank E., Senra A., Al-Massadi O., López M., Diéguez C., Seoane L.M., Nogueiras R. Oral pharmacological activation of hypothalamic guanylate cyclase 2C receptor stimulates brown fat thermogenesis to reduce body weight. *Neuroendocrinology.* (2020).
138. Lin J. E., Valentino M., Marszalowicz G., Magee M. S., Li P., Snook A. E., Stoecker B. A., Chang C., Waldman S. A. Bacterial heat-stable enterotoxins: translation of pathogenic peptides into novel targeted diagnostics and therapeutics. *Toxins* 2: 2028-2054 (2010).
139. Brenna O., Bruland T., Furnes M.W., Granlund A., Drozdov I., Emgard J., Bronstad G., Kidd M., Sandvik A.K. & Gustafsson B.I. The guanylate cyclase-C signaling pathway is down-regulated in inflammatory bowel disease. *Scand. J. Gastroenterol.* 50, 1241-1252 (2015).
140. Lan D., Niu J., Miao J., Dong X., Wang H., Yang G., Wang K. & Miao Y. Expression of guanylate cyclase-C, guanylin, and uroguanylin is downregulated proportionally to the ulcerative colitis disease activity index. *Sci. Rep.* 6, 25034 (2016).
141. Li P., Schulz S., Bombonati A., Palazzo J.P., Hyslop T.M., Xu Y., Baran A.A., Siracusa L.D., Pitari G.M., Waldman S.A.. Guanylyl cyclase C suppresses intestinal tumorigenesis by restricting proliferation and maintaining genomic integrity. *Gastroenterology* 133(2):599–607 (2007).

142. Li P., Lin J.E., Chervoneva I., Schulz S., Waldman S.A., Pitari G.M. Homeostatic control of the crypt-villus axis by the bacterial enterotoxin receptor guanylyl cyclase C restricts the proliferating compartment in intestine. *Am. J. Pathol.* 171(6):1847–1858 (2007).
143. Ahsan M.K., Tchernychev B., Kessler M.M., Solinga R.M., Arthur D., Linde C.I., Silos-Santiago I., Hannig G. & Ameen N.A. Linaclotide activates guanylate cyclase-C/cGMP/protein kinase-II dependent trafficking of CFTR in the intestine. *Physiol. Rep.* 5(11). pii: e13299 (2017).
144. Li P., Lin J. E., Schulz S., Pitari G. M., Waldman S. A. Can colorectal cancer be prevented or treated by oral hormone replacement therapy? *Curr. Mol. Pharmacol.* 2, 285-292 (2009).
145. Mitra V., Metcalf J. Metabolic functions of the liver. *Anaesthesia & Intensive Care Medicine* 10(7): 334-335 (2009).
146. Han H.S., Kang G., Kim J.S., Choi B.H., Koo S.H. Regulation of glucose metabolism from a liver-centric perspective. *Exp Mol Med.* 48,e218 (2016).
147. Nordlie R.C., Foster J.D., Lange A.J. . Regulation of glucose production by the liver. *Annul. Rev. Nutr.* 19,379–406 (1999).
148. Towle H.C., Kaytor E.N., Shih H.M . Regulation of the expression of lipogenic enzyme genes by carbohydrate. *Annu. Rev. Nutr.* 17, 405–433 (1997).
149. Nguyen P., Leray V., Diez M., Serisier S., Le Bloc'h J., Siliart B., Dumon H. Liver lipid metabolism. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl).* 92(3):272-283 (2008).
150. Rui L. Energy Metabolism in the Liver. *Compr. Physiol.* 4(1): 177–197 (2014).

151. Kim J.K., Fillmore J.J., Chen Y., Yu C., Moore I.K., Pypaert M., Lutz E.P., Kako Y., Velez-Carrasco W., Goldberg I.J., Breslow J.L., Shulman G.I. Tissue-specific overexpression of lipoprotein lipase causes tissue-specific insulin resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98,7522–7527 (2001).
152. Doege H., Baillie R.A., Ortegon A.M., Tsang B., Wu Q., Punreddy S., Hirsch D., Watson N., Gimeno R.E., Stahl A. Targeted deletion of FATP5 reveals multiple functions in liver metabolism: alterations in hepatic lipid homeostasis. *Gastroenterology* 130,1245–1258 (2006).
153. Falcon A., Doege H., Fluit A., Tsang B., Watson N., Kay M.A., Stahl A. FATP2 is a hepatic fatty acid transporter and peroxisomal very long-chain acyl-CoA synthetase. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 299,E384–393 (2010).
154. Storey S.M., McIntosh A.L., Huang H., Martin G.G., Landrock K.K., Landrock D., Payne H.R., Kier A.B., Schroeder F. Loss of intracellular lipid binding proteins differentially impacts saturated fatty acid uptake and nuclear targeting in mouse hepatocytes. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology* 303,G837–850 (2012).
155. Martin G.G., Danneberg H., Kumar L.S., Atshaves B.P., Erol E., Bader M., Schroeder F., Binas B. Decreased liver fatty acid binding capacity and altered liver lipid distribution in mice lacking the liver fatty acid-binding protein gene. *J. Biol. Chem.* 278,21429–21438 (2003).
156. Newberry E.P., Xie Y., Kennedy S., Han X., Buhman K.K., Luo J., Gross R.W., Davidson N.O. Decreased hepatic triglyceride accumulation and altered fatty acid uptake in mice with deletion of the liver fatty acid-binding protein gene. *J. Biol. Chem.* 278,51664–51672 (2003).
157. Newberry E.P., Xie Y., Kennedy S.M., Luo J., Davidson N.O. Protection against Western diet-induced obesity and hepatic steatosis in liver fatty acid-binding protein knockout mice. *Hepatology* 44,1191–1205 (2006).
158. Savage D.B., Choi C.S., Samuel V.T., Liu Z.X., Zhang D., Wang A., Zhang X.M., Cline G.W., Yu X.X., Geisler J.G., Bhanot S., Monia

- B.P., Shulman G.I. Reversal of diet-induced hepatic steatosis and hepatic insulin resistance by antisense oligonucleotide inhibitors of acetyl-CoA carboxylases 1 and 2. *J. Clin. Invest.* 116: 817–824 (2006).
159. Cohen P., Miyazaki M., Socci N.D., Hagge-Greenberg A., Liedtke W., Soukas A.A., Sharma R., Hudgins L.C., Ntambi J.M., Friedman J.M. Role for stearoyl-CoA desaturase-1 in leptin-mediated weight loss. *Science* 297,240–243 (2002).
160. Bonet M.L., Ribot J., Palou A. Lipid metabolism in mammalian tissues and its control by retinoic acid. *Biochim Biophys Acta.*1821(1):177-189 (2012).
161. Kersten S., Seydoux J., Peters J.M., Gonzalez F.J., Desvergne B., Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha mediates the adaptive response to fasting. *J. Clin. Invest.* 103,1489–1498 (1999).
162. Vega R.B., Huss J.M., Kelly D.P. The coactivator PGC-1 cooperates with peroxisome proliferator-activated receptor alpha in transcriptional control of nuclear genes encoding mitochondrial fatty acid oxidation enzymes. *Molecular and Cellular Biology* 20,1868–1876 (2000).
163. Rodgers J.T., Lerin C., Haas W., Gygi S.P., Spiegelman B.M., Puigserver P. Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1alpha and SIRT1. *Nature* 434,113–118 (2005).
164. Purushotham A., Schug T.T., Xu Q., Surapureddi S., Guo X., Li X. Hepatocyte-specific deletion of SIRT1 alters fatty acid metabolism and results in hepatic steatosis and inflammation. *Cell Metab.* 9,327–338 (2009).
165. Bellafante E., Murzilli S., Salvatore L., Latorre D., Villani G., Moschetta A. Hepatic-specific activation of peroxisome proliferator-

- activated receptor gamma coactivator-1beta protects against steatohepatitis. *Hepatology* 57,1343–1356 (2013).
166. Kulozik P., Jones A., Mattijssen F., Rose A.J., Reimann A., Strzoda D., Kleinsorg S., Raupp C., Kleinschmidt J., Muller-Decker K., Wahli W., Sticht C., Gretz N., von Loeffelholz C., Stockmann M., Pfeiffer A., Stohr S., Dallinga-Thie G.M., Nawroth P.P., Berriel Diaz M., Herzig S. Hepatic deficiency in transcriptional cofactor TBL1 promotes liver steatosis and hypertriglyceridemia. *Cell Metab.* 13,389–400 (2011).
  167. Finck B.N., Gropler M.C., Chen Z., Leone T.C., Croce M.A., Harris T.E., Lawrence J.C., Jr., Kelly D.P. Lipin 1 is an inducible amplifier of the hepatic PGC-1alpha/PPARalpha regulatory pathway. *Cell Metab.* 4,199–210 (2006).
  168. Potthoff M.J., Inagaki T., Satapati S., Ding X., He T., Goetz R., Mohammadi M., Finck B.N., Mangelsdorf D.J., Kliewer S.A., Burgess S.C. FGF21 induces PGC-1alpha and regulates carbohydrate and fatty acid metabolism during the adaptive starvation response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 106,10853–10858 (2009).
  169. Abu-Elheiga L., Brinkley W.R., Zhong L., Chirala S.S., Woldegiorgis G., Wakil S.J. The subcellular localization of acetyl-CoA carboxylase 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 97,1444–1449 (2000).
  170. Abu-Elheiga L., Matzuk M.M., Abo-Hashema K.A., Wakil S.J. Continuous fatty acid oxidation and reduced fat storage in mice lacking acetyl-CoA carboxylase 2. *Science* 291,2613–2616 (2001).
  171. Berlanga A., Guiu-Jurado E., Porras J.A., Auguet T. Molecular pathways in non-alcoholic fatty liver disease. *Clin. Exp. Gastroenterol.* 7,221-239 (2014).

172. Hong F., Pan S., Guo Y., Xu P., Zhai Y. PPARs as Nuclear Receptors for Nutrient and Energy Metabolism. *Molecules*. 24(14) pii: E2545 (2019).
173. Issemann I., Green S. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature*. 347(6294),645-650 (1990).
174. Dreyer C., Krey G., Keller H., Givel F., Helftenbein G., Wahli W. Control of the peroxisomal beta-oxidation pathway by a novel family of nuclear hormone receptors. *Cell*. 68(5),879-887 (1992).
175. Braissant O., Fougère F., Scotto C, Dauça M., Wahli W. Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR-alpha, -beta, and -gamma in the adult rat. *Endocrinology* 137,354–366 (1996).
176. Poulsen L.I., Siersbæk M.; Mandrup S., PPARs: fatty acid sensors controlling metabolism. *Semin. Cell. Dev. Biol.* 23(6),631-639 (2012).
177. Rochel N., Ciesielski F., Godet J., Moman E., Roessle M., Peluso-Iltis C., Moulin M., Haertlein M., Callow P., Mély Y., Svergun D.I., Moras D. Common architecture of nuclear receptor heterodimers on DNA direct repeat elements with different spacings. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 18(5),564-570 (2011).
178. Dubois V., Eeckhoutte J., Lefebvre P., Staels B. Distinct but complementary contributions of PPAR isotypes to energy homeostasis. *J. Clin. Invest.* 127(4),1202-1214 (2017).
179. Peeters A., Baes M. Role of PPAR $\alpha$  in hepatic carbohydrate metabolism. *PPAR Res.* 572405 (2010).
180. Finck B.N., Bernal-Mizrachi C., Han D.H., Coleman T., Sambandam N., LaRiviere L.L., Holloszy J.O., Semenkovich C.F., Kelly D.P. A potential link between muscle peroxisome proliferator- activated receptor-alpha signaling and obesity-related diabetes. *Cell Metab.* 1, 133–144 (2005).
181. Ahmadian M., Suh J.M., Hah N., Liddle C., Atkins A.R., Downes M., Evans R.M. Ppargamma signaling and metabolism: The good, the bad and the future. *Nat. Med.* 19, 557–566 (2013).

182. Lee C.H., Olson P., Hevener A., Mehl I., Chong L.W., Olefsky J.M., Gonzalez F.J., Ham J., Kang H., Peters J.M., Evans R.M. Ppardelta regulates glucose metabolism and insulin sensitivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 3444–3449 (2006).
183. Schoonjans K., Peinado-Onsurbe J., Lefebvre A.M., Heyman R.A., Briggs M., Deeb S., Staels B., Auwerx J. Pparalpha and PPARgamma activators direct a distinct tissue-specific transcriptional response via a ppre in the lipoprotein lipase gene. *EMBO J.* 15, 5336–5348 (1996).
184. Pawlak M., Lefebvre P., Staels B. Molecular mechanism of PPAR $\alpha$  action and its impact on lipid metabolism, inflammation and fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease. *J. Hepatol.* 62, 720–733 (2015).
185. Gross B., Pawlak M., Lefebvre P., Staels B. PPARs in obesity-induced T2DM, dyslipidaemia and NAFLD. *Nat. Rev. Endocrinol.* 13, 36–49 (2017).
186. Derosa G., Sahebkar A., Maffioli P. The role of various peroxisome proliferator-activated receptors and their ligands in clinical practice. *J. Cell. Physiol.* 233, 153–161 (2018).
187. Corrales P., Vidal-Puig A., Medina-Gomez G. PPARs and metabolic disorders associated with challenged adipose tissue plasticity. *Int. J. Mol. Sci.* 19, 2124 (2018).
188. Goto T., Lee J.Y., Teraminami A., Kim Y.I., Hirai S., Uemura T., Inoue H., Takahashi N., Kawada T. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha stimulates both differentiation and fatty acid oxidation in adipocytes. *J. Lipid Res.* 52, 873–884 (2011).
189. Guerre-Millo M., Rouault C., Poulain P., Andre J., Poitout V., Peters J.M., Gonzalez F.J., Fruchart J.C., Reach G., Staels B. Ppar-alpha-null mice are protected from high-fat diet-induced insulin resistance. *Diabetes* 50,2809–2814 (2001).
190. Rachid T.L., Penna-de-Carvalho A., Bringhenti I., Aguila M.B.,Mandarim-de-Lacerda C.A., Souza-Mello V. Fenofibrate (PPAR $\alpha$  agonist) induces beige cell formation in subcutaneous white adipose tissue from diet-induced male obese mice. *Mol. Cell Endocrinol.* 402, 86–94 (2015).

191. Qiang L., Wang L., Kon N., Zhao W., Lee S., Zhang Y., Rosenbaum M., Zhao Y., Gu W., Farmer S.R., Accili D. Brown remodeling of white adipose tissue by sirt1-dependent deacetylation of PPAR $\gamma$ . *Cell* 150, 620–632 (2012).
192. Bays H.E., Schwartz S., Littlejohn T.,<sup>3rd</sup>, Kerzner B., Krauss R.M., Karpf D.B., Choi Y.J., Wang X., Naim S., Roberts B.K. Mbx-8025, a novel peroxisome proliferator receptor-delta agonist: Lipid and other metabolic effects in dyslipidemic overweight patients treated with and without atorvastatin. *J.Clin. Endocrinol. Metab.* 96, 2889–2897 (2011).
193. Regnier M., Polizzi A., Lippi Y., Fouche E., Michel G., Lukowicz C., Smati S., Marrot A., Lasserre F., Naylies C., Batut A., Viars F., Bertrand-Michel J., Postic C., Loiseau N., Wahli W., Guillou H., Montagner A. Insights into the role of hepatocyte PPAR $\alpha$  activity in response to fasting. *Mol. Cell. Endocrinol.* 471, 75–88 (2018).
194. Costet P., Legendre C., More J., Edgar A., Galtier P., Pineau T. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha-isoform deficiency leads to progressive dyslipidemia with sexually dimorphic obesity and steatosis. *J. Biol. Chem.* 273, 29577–29585 (1998).
195. Ip E., Farrell G.C., Robertson G., Hall P., Kirsch R., Leclercq I. Central role of PPAR $\alpha$ -dependent hepatic lipid turnover in dietary steatohepatitis in mice. *Hepatology* 38, 123–132 (2003).
196. Montagner A., Polizzi A., Fouche E., Ducheix S., Lippi Y., Lasserre F., Barquissau V., Regnier M., Lukowicz C., Benhamed F., Iroz A., Bertrand-Michel J., Al Saati T., Cano P., Mselli-Lakhal L., Mithieux G., Rajas F., Lagarrigue S., Pineau T., Loiseau N., Postic C., Langin D., Wahli W., Guillou H. Liver PPAR $\alpha$  is crucial for whole-body fatty acid homeostasis and is protective against NAFLD. *Gut* 65, 1202–1214 (2016).
197. Moran-Salvador E., Lopez-Parra M., Garcia-Alonso V., Titos E., Martinez-Clemente M., Gonzalez-Periz A., Lopez-Vicario C., Barak Y., Arroyo V., Claria J. Role for PPAR $\gamma$  in obesity-induced hepatic steatosis as determined by hepatocyte- and macrophage-specific conditional knockouts. *FASEB J.* 25, 2538–2550 (2011).

198. Sanderson L.M., Boekschoten M.V., Desvergne B., Muller M., Kersten S. Transcriptional profiling reveals divergent roles of PPAR $\alpha$  and PPARbeta/delta in regulation of gene expression in mouse liver. *Physiol.Genom.* 41, 42–52 (2010).
199. Badr M.Z. PPAR Research: Successful Launching and Promising Future. *PPAR Res.* 54358 (2009).
200. Jeong S., Yoon M. Inhibition of the actions of peroxisome proliferator-activated receptor alpha on obesity by estrogen. *Obesity (Silver Spring)*. 15(6),1430-1440 (2007).
201. Matsusue K., Peters J.M., González F. J. PPAR  $\beta/\delta$  potentiates PPAR $\gamma$  stimulated adipocyte differentiation. *FASEB* 18,1477-1479(2004).
202. Ornitz D.M. ,Itoh N. The Fibroblast Growth Factor signaling pathway. *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.* 4, 215–266 (2015).
203. Brooks A.N., Kilgour E. & Smith P.D. Molecular Pathways: Fibroblast Growth Factor Signaling: A New Therapeutic Opportunity in Cancer. *Clin. Cancer Res.* 18(7):1855-1862 (2012).
204. Martínez-Garza U., Torres-Oteros D., Yarritu-Gallego A., Marrero P.F., Haro D., & Relat J. Fibroblast Growth Factor 21 and the Adaptive Response to Nutritional Challenges. *Int. J. Mol. Sci.* 20(19). pii: E4692 (2019).
205. Zhang J. & Li Y. Fibroblast growth factor 21 analogs for treating metabolic disorders. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. 6,168(2015).
206. Beenken A., Mohammadi M. The FGF family: biology, pathophysiology and therapy. *Nat. Rev. Drug Discov.* 8,235–253 (2009).
207. Kuro-o M. Endocrine FGFs and Klothos: emerging concepts. *Trends Endocrinol. Metab.* 19(7):239-245 (2008).
208. Eswarakumar V.P., Lax I., Schlessinger J. Cellular signaling by fibroblast growth factor receptors. *Cytokine Growth Factor Rev.* 16,139–149 (2005).
209. Dolegowska K., Marchelek-Mysliwiec M., Nowosiad-Magda M., Slawinski, M., Dolegowska B. FGF19 subfamily members: FGF19 and FGF21. *J. Physiol. Biochem.* 75, 229–240 (2019)

210. Nishimura T., Nakatake Y., Konishi M., Itoh N. Identification of a novel FGF, FGF-21, preferentially expressed in the liver. *Biochim. Biophys. Acta* 1492, 203–206 (2000).
211. Badman M.K., Koester A., Flier J.S., Kharitonov A., Maratos-Flier E. Fibroblast growth factor 21-deficient mice demonstrate impaired adaptation to ketosis. *Endocrinology* 150,4931–4940 (2009).
212. Mraz M., Bartlova M., Lacinova Z., Michalsky D., Kasalicky M., Haluzikova D., Matoulek M., Dostalova I., Humenanska V., Haluzik M. Serum concentrations and tissue expression of a novel endocrine regulator fibroblast growth factor-21 in patients with type 2 diabetes and obesity. *Clin. Endocrinol.* 71,369–375 (2009).
213. Yilmaz Y., Eren F., Yonal O., Kurt R., Aktas B., Celikel C.A., Ozdogan O., Imeryuz N., Kalayci C., Avsar E. Increased serum FGF21 levels in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Eur. J. Clin. Invest.* 40,887–892 (2010).
214. Fisher F.M., Chui P.C., Antonellis P.J., Bina H.A., Kharitonov A., Flier J.S., Maratos-Flier E. Obesity is a fibroblast growth factor 21 (FGF21)-resistant state. *Diabetes.* 59(11),2781-2789 (2010).
215. Fon Tacer K., Bookout A.L., Ding X., Kurosu H., John G.B., Wang L., Goetz R., Mohammadi M., Kuro-o M., Mangelsdorf D.J., Klierer S.A. Research resource: Comprehensive expression atlas of the fibroblast growth factor system in adult mouse. *Mol. Endocrinol.* 24, 2050–2064 (2010).
216. Kharitonov A., Shiyanova T. L., Koester A., Ford A. M., Micanovic R., Galbreath E. J., Sandusky G.E., Hammond L.J., Moyers J.S., Owens R.A., Gromada J., Brozinick J.T., Hawkins E.D., Wroblewski V.J., Li D.S., Mehrbod F., Jaskunas S.R., Shanafelt A.B. FGF-21 as a novel metabolic regulator. *J. Clin. Invest.* 115, 1627–1635(2005).
217. Lin Z., Tian H., Lam K. S., Lin S., Hoo R. C., Konishi M., Itoh N, Wang Y, Bornstein SR, Xu A, Li X. Adiponectin mediates the metabolic effects of FGF21 on glucose homeostasis and insulin sensitivity in mice. *Cell Metab.* 17, 779–789 (2013).

218. Inagaki T., Lin V. Y., Goetz R., Mohammadi M., Mangelsdorf D. J., & Kliewer, S. A. Inhibition of growth hormone signaling by the fasting-induced hormone FGF21. *Cell Metab.* 8, 77–83 (2008).
219. Badman M. K., Pissios P., Kennedy A. R., Koukos G., Flier J. S., & Maratos-Flier, E. Hepatic fibroblast growth factor 21 is regulated by PPAR- $\alpha$  and is a key mediator of hepatic lipid metabolism in ketotic states. *Cell Metab.* 5, 426–437 (2007).
220. Fisher F. M., Kleiner S., Douris N., Fox E. C., Mepani R. J., Verdegue F., Wu J., Kharitonov A., Flier J.S., Maratos-Flier E., Spiegelman B.M. FGF21 regulates PGC-1 $\alpha$  and browning of white adipose tissues in adaptive thermogenesis. *Genes Dev.* 26, 271–281 (2012).
221. Zhang X., Yeung D. C., Karpisek M., Stejskal D., Zhou Z. G., Liu F., Wong R.L., Chow W.S., Tso A.W., Lam K.S., Xu A. Serum FGF21 levels are increased in obesity and are independently associated with the metabolic syndrome in humans. *Diabetes* 57, 1246–1253 (2008).
222. Cuevas-Ramos D., Almeda-Valdes P., Gomez-Perez F. J., Meza-Arana C. E., Cruz-Bautista I., Arellano-Campos O., Navarrete-López M., Aguilar-Salinas C.A. Daily physical activity, fasting glucose, uric acid, and body mass index are independent factors associated with serum fibroblast growth factor 21 levels. *Eur. J. Endocrinol.* 163, 469–477 (2010).
223. Gómez-Sámano M. Á., Grajales-Gómez M., Zuarth-Vázquez J. M., Navarro-Flores M. F., Martínez-Saavedra M., Juárez-León Ó. A., Morales-García M.G., Enríquez-Estrada V.M., Gómez-Pérez F.J., Cuevas-Ramos D. Fibroblast growth factor 21 and its novel association with oxidative stress. *Redox Biol.* 11, 335–341 (2017).
224. Schoenberg K. M., Giesy S. L., Harvatine K. J., Waldron M. R., Cheng C., Kharitonov A., Boisclair Y.R. Plasma FGF21 is elevated by the intense lipid mobilization of lactation. *Endocrinology* 152, 4652–4661 (2011).
225. Cuevas-Ramos D., Almeda-Valdés P., Meza-Arana C. E., Brito-Córdova G., Gómez-Pérez F. J., Mehta R., Oseguera-Moguel J., Aguilar-Salinas C.A. Exercise increases serum fibroblast growth factor 21 (FGF21) levels. *PLoS One* 7:e38022 (2012).

226. Chen W., Hoo R. L., Konishi M., Itoh N., Lee P. C., Ye H. Y., Lam K.S., Xu A. Growth hormone induces hepatic production of fibroblast growth factor 21 through a mechanism dependent on lipolysis in adipocytes. *J. Biol. Chem.* 286, 34559–34566 (2011).
227. Dostálová I., Kaválková P., Haluzíková D., Lacinová Z., Mráz M., Papezová H., Haluzík M. Plasma concentrations of fibroblast growth factors 19 and 21 in patients with anorexia nervosa. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 93, 3627–3632 (2008).
228. Talukdar S., Zhou Y., Li D., Rossulek M., Dong J., Somayaji V., Weng Y., Clark R., Lanba A., Owen B.M., Brenner M.B., Trimmer J.K., Gropp K.E., Chabot J.R., Erion D.M., Rolph T.P., Goodwin B., Calle R.A. A long-acting FGF21 molecule, PF-05231023, decreases body weight and improves lipid profile in non-human primates and type 2 diabetic subjects. *Cell Metab.* 23, 427–440 (2016).
229. Gaich G., Chien J. Y., Fu H., Glass L. C., Deeg M. A., Holland W. L., Kharitonov A., Bumol T., Schilske H.K., Moller D.E. The effects of LY2405319, an FGF21 analog, in obese human subjects with type 2 diabetes. *Cell Metab.* 18, 333–340 (2013).
230. McGarry J. D., Mannaerts G. P. & Foster, D. W. A possible role for malonyl-CoA in the regulation of hepatic fatty acid oxidation and ketogenesis. *J. Clin. Invest.* 60, 265–270 (1977).
231. McGarry J. D., Mannaerts G. P., Foster D. W. Characteristics of fatty acid oxidation in rat liver homogenates and the inhibitory effect of malonyl-CoA. *Biochim. Biophys. Acta* 530, 305–313 (1978).
232. Zammit V.A. Carnitine palmitoyltransferase 1: Central to cell function. *IUBMB Life.* 60(5):347-354 (2008).
233. McGarry J.D., Brown N.F. The mitochondrial carnitine palmitoyltransferase system. From concept to molecular analysis. *Eur. J. Biochem.* 244(1):1-14 (1997).
234. Britton C.H., Mackey D.W., Esser V., Foster D.W., Burns D.K., Yarnall D.P., Froguel P., McGarry J.D. Fine chromosome mapping of

- the genes for human liver and muscle carnitine palmitoyltransferase I (CPT1A and CPT1B). *Genomics* 40(1):209-211 (1997).
235. Esser V., Britton C.H., Weis B.C., Foster D.W., McGarry J.D. Cloning, sequencing, and expression of a cDNA encoding rat liver carnitine palmitoyltransferase I. Direct evidence that a single polypeptide is involved in inhibitor interaction and catalytic function. *J. Biol. Chem.* 268(8):5817-5822 (1993).
236. Lavrentyev E.N., Matta S.G., Cook G.A. Expression of three carnitine palmitoyltransferase-I isoforms in 10 regions of the rat brain during feeding, fasting, and diabetes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 315(1):174-178(2004).
237. Price N., van der Leij F., Jackson V., Corstorphine C., Thomson R., Sorensen A., Zammit V. A novel brain-expressed protein related to carnitine palmitoyltransferase I. *Genomics.* 80(4):433-442 (2002).
238. Sierra A.Y., Gratacós E., Carrasco P., Clotet J., Ureña J., Serra D., Asins G., Hegardt F.G., Casals N. CPT1c is localized in endoplasmic reticulum of neurons and has carnitine palmitoyltransferase activity. *J. Biol. Chem.* 283(11):6878-6885 (2008).
239. Jackson V.N., Zammit V.A., Price N.T. Identification of positive and negative determinants of malonyl-CoA sensitivity and carnitine affinity within the amino termini of rat liver- and muscle-type carnitine palmitoyltransferase I. *J. Biol. Chem.* 275:38410–38416 (2000).
240. Pan Y., Cohen I., Guillerault F., Fève B., Girard J., Prip-Buus C. The extreme C terminus of rat liver carnitine palmitoyltransferase I is not involved in malonyl-CoA sensitivity but in initial protein folding. *J. Biol. Chem.* 277, 47184–47189 (2002).
241. Faye A., Borthwick K., Esnous C., Price N.T., Gobin S., Jackson V.N., Zammit V.A., Girard J., Prip-Buus C. Demonstration of N- and C-terminal domain intramolecular interactions in rat liver carnitine

- palmitoyltransferase 1 that determine its degree of malonyl-CoA sensitivity. *Biochem. J.* 387,67–76 (2005).
242. Faye A., Esnous C., Price N.T., Onfray M.A., Girard J., Prip-Buus C. Rat liver carnitine palmitoyltransferase 1 forms an oligomeric complex within the outer mitochondrial membrane. *J. Biol. Chem.* 282,26908–26916 (2007).
243. Jenei Z.A., Warren G.Z.L., Hasan M., Zammit V.A., Dixon A.M.. Packing of transmembrane domain 2 of carnitine palmitoyltransferase-1A affects oligomerization and malonyl-CoA sensitivity of the mitochondrial outer membrane protein. *FASEB J.* 25,4522–4530 (2011).
244. Casals N., Zammit V., Herrero L., Fadó R., Rodríguez-Rodríguez R., Serra D. Carnitine palmitoyltransferase 1C: From cognition to cancer. *Prog. Lipid. Res.* 61,134-148 (2016).
245. Koves T. R., Ussher J. R., Noland R. C., Slentz D., Mosedale M., Ilkayeva O., Bain J., Stevens R., Dyck, J. R., Newgard C. B., Lopaschuk G. D., & Muoio D. M. Mitochondrial overload and incomplete Fatty Acid oxidation contribute to skeletal muscle insulin resistance. *Cell Metab.* 7, 45–56 (2008).
246. Nassir, F., Rector R.S., Hammoud G.M. & Ibdah J. A. Pathogenesis and prevention of hepatic steatosis. *Gastroenterol. Hepatol. (N Y)* 11(3),167–175 (2015).
247. Fartoux L., Chazouillères O., Wendum D., Poupon R., Serfaty L. Impact of steatosis on progression of fibrosis in patients with mild hepatitis C. *Hepatology* 41(1):82-87 (2005).
248. Qayyum A., Nystrom M., Noworolski S.M., Chu P., Mohanty A., Merriman R. MRI steatosis grading: development and initial validation of a color mapping system. *AJR. Am. J. Roentgenol.* 198(3),582-588 (2012).

249. Sunny N.E., Parks E.J., Browning J.D., Burgess S.C. Excessive hepatic mitochondrial TCA cycle and gluconeogenesis in humans with nonalcoholic fatty liver disease. *Cell Metab.* 14,804–810 (2011).
250. Hardy T., Anstee Q. M., Day, C. P. Nonalcoholic fatty liver disease new treatments *Curr. Opin. Gastroenterol.* 31(3),175-83 (2015).
251. Liu X., Lazenby A.J., Clements R.H., Jhala N., Abrams G.A. Resolution of nonalcoholic steatohepatitis after gastric bypass surgery. *Obes. Surg.* 17,486–492 (2007)
252. Barker K.B., Palekar N.A., Bowers S.P., Goldberg J.E., Pulcini J.P., Harrison S.A. Nonalcoholic steatohepatitis: effect of Roux-en-Y gastric bypass surgery. *Am. J. Gastroenterol.* 101,368–373 (2006).
253. Taitano A.A., Markow M., Finan J.E., Wheeler D.E., Gonzalvo J.P., Murr M.M. Bariatric surgery improves histological features of nonalcoholic fatty liver disease and liver fibrosis. *J. Gastrointest. Surg.* 19(3),429-436 (2015).
254. Turchinovich A, Baranova A, Drapkina O, Tonevitsky A. Cell-Free Circulating Nucleic Acids as Early Biomarkers for NAFLD and NAFLD-Associated Disorders. *Front Physiol.* 9:1256 (2018).
255. España. 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. Boletín Oficial del Estado, 8 de febrero de 2013, núm. 34, (pp. 11370-1142).
256. Unión Europea. Directiva (UE) 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. Diario Oficial de la Unión Europea L 276, 20 de octubre de 2010, (pp.33-77).
257. España. Comunidad Autónoma de Galicia. Decreto 296/2008, de 30 de diciembre, de protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos, incluida la docencia, y por el que se crea el Registro de los centros de cría, de suministradores y usuarios y la Comisión Gallega de Bienestar de los Animales de

- Experimentación. Diario Oficial de Galicia, 16 de enero de 2009, núm.11, p. 1018.
258. Russell W.M.S. and Burch R.L. The Principles of Humane Experimental Technique. *London, Methuen* (1959).
259. Bocher V., Pineda-Torra I., Fruchart J-C & Staels B. PPARs: Transcription Factors Controlling Lipid and Lipoprotein Metabolism *Ann N Y Acad Sci.* 2002;967:7-18.
260. Patsouris D., Reddy J.K., Müller M., Kersten S. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha mediates the effects of high-fat diet on hepatic gene expression. *Endocrinology.* 147(3):1508-1516 (2006).
261. Inagaki T., Dutchak P., Zhao G., Ding X., Gautron L., Parameswara V., Li Y, Goetz R, Mohammadi M, Esser V, Elmquist JK, Gerard RD, Burgess S.C., Hammer R.E., Mangelsdorf D.J., Kliewer S.A. Endocrine regulation of the fasting response by PPARalpha-mediated induction of fibroblast growth factor 21. *Cell Metab.* 5(6):415-425 (2007).
262. Fisher F.M., Estall J.L., Adams A.C., Antonellis P.J., Bina H.A., Flier J.S., Kharitonov A., Spiegelman B.M., Maratos-Flier E. Integrated regulation of hepatic metabolism by fibroblast growth factor 21 (FGF21) in vivo. *Endocrinology.* 152(8):2996-3004 (2011).
263. Dihingia A., Bordoloi J., Dutta P., Kalita J., Manna P. Hexane-Isopropanolic extract of Tungrymbai, a NorthEast Indian fermented soy bean food prevents hepatic steatosis via regulating AMPKmediated SR EBP/FAS/ACC/HMGCR and PPAR $\alpha$ /CPT1A/UCP2 pathways. *Sci Rep.* 3,8(1):10021 (2018).
264. Xu J., Lloyd D.J., Hale C., Stanislaus S., Chen M., Sivits G., Vonderfecht S., Hecht R., Li Y.S., Lindberg R.A., Chen J.L., Jung D.Y., Zhang Z., Ko H.J., Kim J.K., Véniant M.M.. Fibroblast growth factor 21 reverses hepatic steatosis, increases energy expenditure, and improves insulin sensitivity in diet-induced obese mice. *Diabetes* 58:250–259 (2009).

265. Berglund E.D., Li C.Y., Bina H.A., Lynes S.E., Michael M.D., Shanafelt A.B., Kharitonov A., Wasserman D.H. Fibroblast growth factor 21 controls glycemia via regulation of hepatic glucose flux and insulin sensitivity. *Endocrinology* 150:4084–4093 (2009).
266. Lundasen T., Hunt M.C., Nilsson L.M., Sanyal S., Angelin B., Alexson S.E., Rudling M. PPAR $\alpha$  is a key regulator of hepatic FGF21. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 360:437–440(2007).
267. Lin X., Bo Liu Y., Hu H. Metabolic role of fibroblast growth factor 21 in liver, adipose and nervous system tissues. *Biomed. Rep.* 6(5):495-502 (2017).
268. Dasarathy S., Yang Y., McCullough A.J., Marczewski S., Bennett C., Kalhan S.C. Elevated hepatic fatty acid oxidation, high plasma fibroblast growth factor 21, and fasting bile acids in nonalcoholic steatohepatitis. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 23(5):382-388 (2011).
269. Emanuelli B., Vienberg S.G., Smyth G., Cheng C., Stanford K.I., Arumugam M., Michael M.D., Adams A.C., Kharitonov A., Kahn C.R. Interplay between FGF21 and insulin action in the liver regulates metabolism. *J. Clin. Invest.* 124(2):515-527 (2014).
270. Aka A.A., Rappaport J.A., Pattison A.M., Sato T., Snook A.E., Waldman S.A. Guanylate cyclase C as a target for prevention, detection, and therapy in colorectal cancer. *Expert. Rev. Clin. Pharmacol.* 10(5):549-557. (2017)
271. Pitari G.M. Pharmacology and clinical potential of guanylyl cyclase C agonists in the treatment of ulcerative colitis. *Drug Des. Devel. Ther.* 7:351-360 (2013)
272. Rappaport J.A., Waldman S.A. The Guanylate Cyclase C-cGMP Signaling Axis Opposes Intestinal Epithelial Injury and Neoplasia. *Front. Oncol.* 8:299 (2018).
273. Blomain E.S., Waldman S.A. Does obesity promote the development of colorectal cancer? *Expert. Rev. Anticancer Ther.* 16(5):465-467 (2016).

274. Song H., Wu T., Xu D., Chu Q., Lin D., Zheng X. Dietary sweet cherry anthocyanins attenuates diet-induced hepatic steatosis by improving hepatic lipid metabolism in mice. *Nutrition*.32(7-8):827-833 (2016).
275. Wang L.F., Wang X.N., Huang C.C., Hu L., Xiao Y.F., Guan X.H., Qian Y.S., Deng K.Y., Xin H.B. Inhibition of NAMPT aggravates high fat diet-induced hepatic steatosis in mice through regulating Sirt1/AMPK $\alpha$ /SREBP1 signaling pathway. *Lipids Health Dis*. 27;16(1):82 (2017).
276. Huang W., Metlakunta A., Dedousis N., Zhang P., Sipula I., Dube J.J., Scott D.K., O'Doherty R.M. Depletion of liver Kupffer cells prevents the development of diet-induced hepatic steatosis and insulin resistance. *Diabetes* 59(2): 347-357 (2010).
277. Francque S., Verrijken A., Caron S., Prawitt J., Paumelle R., Derudas B., Lefebvre P., Taskinen M.R., Van Hul W., Mertens I., Hubens G., Van Marck E., Michielsens P., Van Gaal L., Staels B. PPAR $\alpha$  gene expression correlates with severity and histological treatment response in patients with non-alcoholic steatohepatitis. *J. Hepatol*. 63(1):164-173 (2015).