

Alteraciones de la expresión génica de *Sor11* y *Rb1* en distintos modelos de estrés metabólico.

Alteracións da expresión xénica de *Sor11* e *Rb1* en distintos modelos de estrés metabólico.

Alterations of *Sor11* and *Rb1* gene expression in different models of metabolic stress.

Alumna: Lorena Sampedro Ares

Directora: Susana Sangiao Alvarellos

Codirector: Fernando Cordido Carballido

Fecha de presentación: 19/07/17

Trabajo Fin de Máster

Máster en Biología Molecular, Celular y Genética

Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña (INIBIC)

Facultad de Ciencias

Universidade da Coruña



Alteraciones de la expresión génica de *Sor11* y *Rb1* en distintos modelos de estrés metabólico.


Alteracións da expresión xénica de *Sor11* e *Rb1* en distintos modelos de estrés metabólico.

Alterations of *Sor11* and *Rb1* gene expression in different models of metabolic stress.

Dra. Susana Sangiao Alvarellos en calidad de directora del trabajo "Alteraciones de la expresión génica de *Sor11* y *Rb1* en distintos modelos de estrés metabólico" y el Dr. Fernando Cordido Carballido en calidad de codirector autorizan a Lorena Sampedro Ares su presentación ante el Tribunal Evaluador.

En A Coruña, a 19 de Julio de 2017

Susana  
Sangiao  
Alvarellos

 Firmado digitalmente por Susana Sangiao Alvarellos  
Nombre de reconocimiento (DN):  
cn=Susana Sangiao Alvarellos  
Fecha: 2017.07.19 07:35:30 +01'00'

VºBº Tutor externo

Fdo.: Susana Sangiao Alvarellos

Fdo.: Fernando Cordido Carballido

Fdo.: Lorena Sampedro Ares

# ÍNDICE

---

ÍNDICE DE FIGURAS.....	2
ÍNDICE DE TABLAS.....	2
ABREVIATURAS.....	3
RESUMEN.....	4
RESUMO.....	4
SUMMARY.....	4
INTRODUCCIÓN.....	4
1.    Obesidad.....	5
1.1.    Balance energético.....	6
1.2.    Factores genéticos y epigenéticos.....	7
1.3.    Complicaciones asociadas a la obesidad.....	8
2.    Tejido adiposo.....	9
2.1.    Tipos de tejido adiposo.....	10
2.2.    Formación y diferenciación del tejido adiposo.....	12
3. <i>Sor11</i> .....	13
3.1. <i>Sor11</i> y Alzheimer.....	14
3.2. <i>Sor11</i> y Obesidad.....	15
4. <i>Rb1</i> .....	16
5.    Relación entre <i>Sor11</i> y <i>Rb1</i> .....	16
OBJETIVOS.....	18
MATERIALES Y MÉTODOS.....	19
1.    Modelo <i>in vivo</i> .....	19
1.1.    Animales.....	19
1.2.    Modelo experimental.....	19
2.    Modelo <i>in vitro</i> .....	20
2.1.    Línea celular 3T3-L1.....	20
2.2.    Diferenciación de células 3T3-L1.....	20
2.3.    Tratamientos.....	20
3.    Diseño y testado de cebadores de <i>Sor11</i> y <i>Rb1</i> .....	22
4.    Extracción de ARN y realización de PCRs.....	22
5.    Análisis estadístico.....	23
RESULTADOS.....	24
1.    Testado de cebadores.....	24
2.    Modelo <i>in vivo</i> .....	24
2.1.    Modelo de restricción calórica y dieta alta en grasa a largo plazo.....	24
2.2.    Modelo de ayuno.....	26
2.3.    Modelo de diabetes inducida con alloxan.....	27
2.4.    Modelo de ratas tratadas con leptina.....	29
3.    Modelo <i>in vitro</i> .....	30
DISCUSIÓN.....	33
CONCLUSIONES.....	38
BIBLIOGRAFÍA.....	39
ANEXO I.....	41

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Prevalencia de la obesidad en 2014 de hombres y mujeres mayores de 18 años.....	6
<b>Figura 2.</b> Disposición y funciones de los diferentes tipos de tejido adiposo en humanos (A) y roedores (B).....	10
<b>Figura 3.</b> Origen de los adipocitos.....	12
<b>Figura 4.</b> Cronograma y tratamientos utilizados en la línea celular 3T3-L1.....	21
<b>Figura 5.</b> Ejemplo del uso del gel de agarosa para comprobar el tamaño del amplicón durante el testado de cebadores.....	24
<b>Figura 6.</b> Antropometría del modelo de restricción calórica y dieta alta en grasa a largo plazo.....	25
<b>Figura 7.</b> Niveles de expresión de <i>ARNm</i> , de <i>Sor11</i> en TAP (A), TAE (B), TAS (C), TAV (D) e hipotálamo (E) tras tres meses de restricción calórica o dieta alta en grasa.....	25
<b>Figura 8.</b> Niveles de expresión de <i>ARNm</i> , de <i>Rb1</i> en TAP (A), TAE (B), TAS (C), TAV (D) e hipotálamo (E) tras tres meses de restricción calórica o dieta alta en grasa.....	26
<b>Figura 9.</b> Niveles de expresión de <i>ARNm</i> , de <i>Sor11</i> en TAP (A), TAE (B) e hipotálamo (C) en un modelo de ayuno de 48 horas.....	26
<b>Figura 10.</b> Niveles de expresión de <i>ARNm</i> , de <i>Rb1</i> en TAP (A), TAE (B) e hipotálamo (C) en un modelo de ayuno de 48 horas.....	27
<b>Figura 11.</b> Concentración de glucosa en sangre en el modelo de diabetes inducida con alloxan.....	27
<b>Figura 12.</b> Niveles de expresión de <i>ARNm</i> , de <i>Sor11</i> en TAP (A), TAE (B), TAV (C) y TAS (D), tras el tratamiento con salino, alloxan y alloxan más insulina.....	28
<b>Figura 13.</b> Niveles de expresión de <i>ARNm</i> , de <i>Rb1</i> en TAP (A), TAE (B), TAV (C) y TAS (D), tras el tratamiento con salino, alloxan y alloxan más insulina.....	28
<b>Figura 15.</b> Niveles de expresión de <i>ARNm</i> , de <i>Rb1</i> en TAP (A), TAE (B), TAV (C) y TAS (D), tras el tratamiento con salino o leptina intraperitoneal durante 2 días.....	29
<b>Figura 16.</b> Línea celular 3T3-L1. Células sin diferenciar 100 % confluentes (A), tratamiento I (B), tratamiento II (C) y tratamiento III (D).....	30
<b>Figura 17.</b> Modelo de 3T3-L1. Expresión de <i>UCP1</i> (A), <i>CIDEA</i> (B), <i>SORL1</i> (C), <i>Rb1</i> (D) y <i>PPARg</i> (E). 32	

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Secuencia de los cebadores utilizados en este estudio.....	41
<b>Tabla 2.</b> Mezcla de la RT.....	41
<b>Tabla 3.</b> Programa de la RT.....	42
<b>Tabla 4.</b> Mezcla de la qRT-PCR.....	42
<b>Tabla 5.</b> Etapas de la qRT-PCR.....	42

## ABREVIATURAS

<b>Sigla</b>	<b>Significado</b>	<b>Sigla</b>	<b>Significado</b>
A $\beta$	Péptidos $\beta$ -amiloides	MYF 5	Factor miogénico 5
ACAD	Acil-CoA deshidrogenasa	PGC-1 $\alpha$	Receptor activado por el proliferador de peroxisomas
ACC	Acetil-CoA carboxilasa	PKA	Proteína quinasa A
ADN	Ácido desoxirribonucleico	PPA	Proteína precursora amiloide
AGLs	Ácidos grasos libres	<i>PPAR</i> $\gamma$	Receptor gamma activado por proliferador de peroxisomas
ARN	Ácido ribonucleico	pRb	Proteína del retinoblastoma
BHE	Barrera hematoencefálica	P/S	Penicilina/streptomicina
BMPs	Proteínas morfogénicas óseas	RI	Receptor de insulina
<i>CIDEA</i>	Factor de fragmentación de ADN inductor de muerte celular, subunidad alfa del efector tipo A	ROS	Especies reactivas de oxígeno
<i>DM2</i>	Diabetes <i>mellitus</i> tipo 2	RTG	Red trans-Golgi
EA	Enfermedad de Alzheimer	<i>S11</i>	Proteína ribosomal S11
FAS	Ácido graso sintasa	SNC	Sistema nervioso central
ES	Error estándar	SREBP1c	Proteína de unión a elemento regulador de esteroides 1
FBS	Suero bovino fetal	T3	Triyodotironina
FGF21	Factor 21 de crecimiento de fibroblastos	TAE	Tejido adiposo epididimal
FTO	Proteína asociada a la obesidad y a la grasa corporal	TAB	Tejido adiposo blanco
GSH	Glutación	TAGs	Triacilglicéridos
<i>HPRT</i>	Hipoxantina guanina fosforribosil transferasa	TAP	Tejido adiposo pardo o marrón
IBMX	3-isobutil-1-metilxantina	TAS	Tejido adiposo subcutáneo
IMC	Índice de masa corporal	TAV	tejido adiposo visceral
MDCs	Químicos que interrumpen el metabolismo	<i>UCP1</i>	Proteína desacopladora de tipo 1

## RESUMEN

*Sor11* se ha descrito como un importante factor de riesgo para la enfermedad de Alzheimer. Estudios recientes de GWAS también han asociado *Sor11* con obesidad en humanos y en modelos de ratón, y se sabe que es un importante regulador negativo de la termogénesis, lo que sugiere que este receptor puede desempeñar un papel en la regulación del metabolismo. *Rb1* parece ser esencial en el mantenimiento de la capacidad adipogénica y en la diferenciación a adipocitos blancos, también actúa como un modulador negativo de la diferenciación de adipocitos marrones. Con el fin de comprobar si la expresión de *Sor11* y *Rb1* se alteran en condiciones de estrés metabólico y durante el fenómeno de *browning*, y si podría existir una relación entre la expresión de ambos genes, se analizaron sus niveles de expresión en diferentes modelos de estrés metabólico en ratas y una línea celular de preadipocitos de ratón, antes y después de su diferenciación tanto a adipocitos blancos como beige. Los resultados muestran que tanto el ayuno como la diabetes tipo I disminuyen los niveles de expresión de *Sor11* tanto en tejido adiposo blanco como pardo, y que es necesario un descenso en la expresión de *Sor11* y un aumento en la expresión de *Rb1* para que se produzca la diferenciación de preadipocitos a adipocitos maduros.

## RESUMO

*Sor11* describiuse coma un importante factor de risco para a enfermidade de Alzheimer. Estudos recentes de GWAS tamén asociaron *Sor11* con obesidade en humanos e modelos de rato, e sábese que é un importante regulador negativo da termoxénese, o que suxire que este receptor pode xogar un papel na regulación do metabolismo. *Rb1* parece ser esencial no mantemento da capacidade adipoxénica e na diferenciación a adipocitos brancos, tamén actúa coma un modulador negativo da diferenciación de adipocitos marróns. Coa fin de comprobar se a expresión de *Sor11* e *Rb1* se altera en condicións de estrés metabólico e durante o fenómeno de *browning*, e se podería existir unha relación entre a expresión de ambos xenos, analizáronse os seus niveis de expresión en diferentes modelos de estrés metabólico en ratas e nunha liña celular de preadipocitos de rato, antes e despois da súa diferenciación tanto a adipocitos brancos coma beige. Os resultados amosan que tanto o xaxún coma a diabetes tipo I diminúen os niveis de expresión de *Sor11* tanto en tecido adiposo branco coma pardo, e que é necesario un descenso na expresión de *Sor11* e un aumento na expresión de *Rb1* para que se produza a diferenciación de preadipocitos a adipocitos maduros.

## SUMMARY

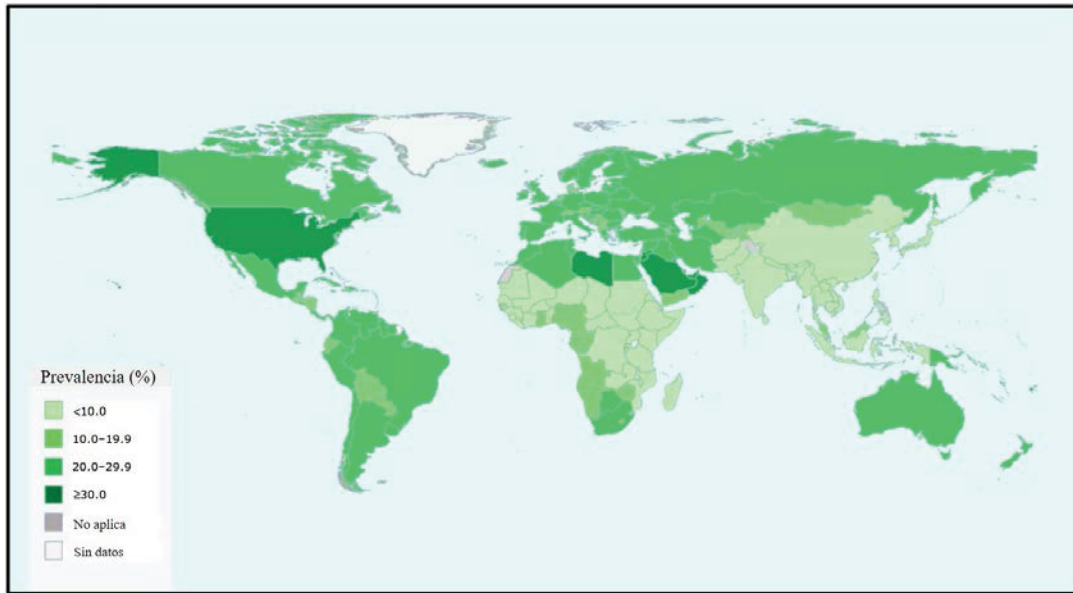
*Sor11* has been described as an important risk factor for Alzheimer's disease. Recent studies of GWAS have also associated *Sor11* with obesity in human and mouse models, and it is known that is a significant negative regulator of thermogenesis suggesting that this receptor may play a role in regulating metabolism. *Rb1* appears to be essential in the maintenance of adipogenic capacity and in differentiation to white adipocytes, it also acts as a negative modulator of the differentiation of brown adipocytes. In order to check whether the expression of *Sor11* and *Rb1* are altered under conditions of metabolic stress and during the *browning* process, and if there could be a relationship between the expression of both genes, it was analyzed the expression levels in different models of metabolic stress in rats and a mouse preadipocyte cell line, before and after its differentiation to both white and beige adipocytes. The results show that both fasting and type I diabetes decrease *Sor11* expression levels in brown and white adipose tissue, and that a decrease in *Sor11* expression and an increase in *Rb1* expression is required for differentiation of preadipocytes into mature adipocytes.

## INTRODUCCIÓN

### 1. Obesidad

La obesidad se define como una acumulación excesiva de grasa, resultado de un desbalance en la ingesta de energía en comparación con el gasto. Las formas graves de la enfermedad presentan mayor probabilidad de tener una base predominantemente genética y posiblemente poligénica<sup>1</sup>. Tanto la prevalencia de la obesidad como del sobrepeso han sufrido un aumento considerable a nivel mundial en las últimas décadas. Según datos proporcionados por la Organización Mundial de la Salud (OMS), el número de personas con sobrepeso y/u obesidad prácticamente se duplicó entre los años 1980 y 2014. Mientras que en los años ochenta la obesidad y el sobrepeso eran un problema exclusivo de los países más ricos, actualmente los países en vías de desarrollo presentan el mismo problema (Figura 1), por ello en la actualidad, la obesidad se considera una epidemia de impacto global, generando un grave problema de salud pública por la gran cantidad de comorbilidades asociadas que presenta<sup>2, 3</sup>. La obesidad afecta tanto a niños como a adultos pero es especialmente preocupante la obesidad infantil. En 2014, 41 millones de niños menores de cinco años tenían sobrepeso o eran obesos<sup>4</sup>. Los niños y adolescentes obesos tienen más posibilidades de ser obesos en la edad adulta que aquellos que no lo fueron. Se calcula que aproximadamente el 55% de los niños que son obesos también lo serán durante su adolescencia y alrededor del 80% de los adolescentes obesos seguirán siéndolo como adultos<sup>5</sup>. Estos datos hacen que sea prioritaria tanto la búsqueda del origen de esta patología como de un tratamiento efectivo<sup>6</sup>.

Diferentes factores como la reducción de la actividad física, malos hábitos alimenticios y diferentes circunstancias socioeconómicas han conducido a la epidemia de la obesidad en las últimas décadas. Existen evidencias de que esta epidemia se está estabilizando en algunas poblaciones, pero la prevalencia de sobrepeso se mantiene elevada en muchos países<sup>7</sup>. El aumento de la prevalencia de sobrepeso y obesidad, a pesar de que actualmente los países en vías de desarrollo también lo presentan, está asociado con un mayor nivel de ingresos de los países, siendo ésta más del doble en países con ingresos medios y altos que en países con bajos ingresos (Figura 1)<sup>2</sup>. En España, la prevalencia estimada de sobrepeso en 2015 en la población adulta (25-64 años) fue del 39,3% mientras que la de la obesidad general fue del 21,6% (22,8% entre los varones y 20,5% entre las mujeres), y se observó que aumentaba con la edad. La prevalencia de obesidad abdominal se estimó un 33,4%, mayor entre las mujeres que entre los varones y también se observó que aumentaba con la edad<sup>8</sup>.



**Figura 1. Prevalencia de la obesidad en 2014 de hombres y mujeres mayores de 18 años** (estimaciones estandarizadas por edad). Modificada de la OMS<sup>4</sup>.

### 1.1. Balance energético

El equilibrio energético es aquel que se establece entre la ingesta y el gasto. Cuando la ingesta calórica supera al gasto, el exceso de energía se almacena en forma de triacilglicéridos (TAGs) en el tejido adiposo. Mantener estable el peso corporal depende de que, a lo largo del tiempo, la ingesta calórica sea igual al gasto energético, que es el resultado de la combinación del metabolismo basal, la termogénesis y la actividad física. Mínimas desviaciones en el balance energético, del orden del 1-2% de la ingesta calórica diaria, pueden suponer grandes cambios a largo plazo en el peso corporal<sup>9</sup>.

#### 1.1.1. Regulación hormonal

Para que todos estos procesos se puedan regular adecuadamente es necesaria una coordinación y comunicación entre los tejidos periféricos y el sistema nervioso central (SNC). El cerebro integra múltiples señales metabólicas desde la periferia transmitidas a través de nutrientes, señales gastrointestinales de saciedad y hormonas relacionadas con la adiposidad. En función de la información recibida, los centros reguladores del SNC, mediante señales eferentes, modulan aspectos del metabolismo tales como la ingesta calórica, el gasto energético, la secreción de insulina, la producción de glucosa hepática y el metabolismo de la glucosa y ácidos grasos en el tejido adiposo y el músculo esquelético<sup>10</sup>.

Las barreras cerebrales tales como la barrera hematoencefálica (BHE), la barrera hemocefalorraquídea y las barreras taníticas, son interfaces reguladoras críticas en esta



comunicación. Las células que forman estas barreras están altamente especializadas en restringir la difusión no regulada de macromoléculas entre la sangre y el SNC, regulan selectivamente el transporte de nutrientes circulantes y las señales hormonales que son esenciales para mantener las funciones normales del SNC<sup>11</sup>.

Entre las hormonas alteradas durante la obesidad y que regulan la ingesta se encuentran entre otras: la insulina, hormona secretada por las células  $\beta$  del páncreas que actúa sobre el cerebro para modular el metabolismo hepático de la glucosa; la leptina, hormona producida por los adipocitos y con un alto poder anorexigénico y con un papel importante en el control del metabolismo de la glucosa; la adiponectina, hormona sintetizada por el tejido adiposo que participa en el metabolismo de la glucosa y los ácidos grasos y la ghrelina, hormona secretada por el estómago durante el ayuno y que promueve la ingesta<sup>10</sup>.

Las interacciones altamente coordinadas entre el cerebro y los órganos metabólicos periféricos son críticas para el mantenimiento de la energía y la homeostasis de la glucosa, por ello, las señales defectuosas entre el cerebro y los órganos periféricos contribuyen al desarrollo de la obesidad y la diabetes *mellitus* tipo 2 (*DM2*)<sup>1,10</sup>. En individuos obesos se han descrito cambios patológicos en la BHE que pueden incluso conducir a cambios patológicos adicionales en el SNC, como la neuroinflamación y el deterioro cognitivo, procesos que previamente se habían observado durante la obesidad<sup>11</sup>.

Estudios recientes muestran que la disfunción en el sistema de control homeostático también puede estar influenciada por los químicos que interrumpen el metabolismo (MDCs), clase particular de químicos, como ftalatos y contaminantes orgánicos persistentes, que afectan a la homeostasis energética y a múltiples mecanismos endocrinos modificando la expresión génica y la biosíntesis de enzimas clave, hormonas y adipoquinas esenciales en el control de la homeostasis energética. Los MDC también pueden regular la ingesta y el metabolismo actuando a diferentes niveles, como la secreción de péptidos intestinales, regulación de niveles de neuropéptidos hipotalámicos y liberación de insulina<sup>12</sup>.

## **1.2. Factores genéticos y epigenéticos**

Los patrones y distribución de la obesidad tanto dentro, como entre poblaciones étnicamente diversas, que viven en ambientes similares y contrastados, sugieren que algunos grupos étnicos presentan una mayor susceptibilidad a padecer obesidad que otros, pudiendo deberse a que poseen una carga genética que les hace susceptibles a un mayor almacenamiento de grasa<sup>1,9</sup>. Más de 150 variantes genéticas comunes se han podido asociar

con medidas de composición corporal, aunque el impacto individual de cada una de estas variantes ha resultado ser mínimo<sup>9</sup>. Entre estas variantes identificadas gracias a los estudios de metaanálisis, podemos destacar el gen que codifica para la proteína asociada a la obesidad y a la grasa corporal (FTO). Existen pruebas epidemiológicas de las interacciones entre las variantes comunes de este gen, el estilo de vida y la obesidad<sup>13-14</sup>. No obstante, la mayor parte de los datos provienen de estudios transversales y las relaciones temporales no están claras. Existen otros estudios en varios *loci* comunes que apoyan las interacciones entre gen y estilo de vida pero la evidencia es mucho menor que en el caso de FTO<sup>15</sup>. Sin embargo, la magnitud de los efectos de estos genes es insuficiente para trasladar estos datos a la clínica.

Los cambios epigenéticos son cambios en el genoma que no afectan a los nucleótidos, consisten en modificaciones químicas como la metilación del ADN y la acetilación de histonas, entre otras. Los cambios epigenéticos, en particular en los patrones alterados de metilación del ADN, podrían identificarse como biomarcadores del balance energético y mediadores de la interacción gen - medio ambiente en la obesidad<sup>16</sup>. Se han realizado diferentes estudios de asociación del epigenoma y se han identificado un panel de *loci* genéticos en los que los niveles de metilación difieren significativamente entre los individuos obesos y no obesos<sup>9</sup>. Además, estudios llevados a cabo en pares de gemelos monocigóticos con discordancia para la obesidad, sugieren que las influencias epigenéticas son muy importantes en la regulación del balance energético y por tanto en el mantenimiento del peso corporal<sup>17</sup>.

### **1.3. Complicaciones asociadas a la obesidad**

Las consecuencias de la obesidad para la salud son muchas y de diferente tipo, desde riesgo de muerte prematura, a varias patologías no mortales pero que empeoran la calidad de vida tales como: *DM2*, cáncer, hipertensión, enfermedades cardiovasculares, pulmonares y de la vesícula biliar, osteoartritis y problemas psicosociales<sup>3</sup>.

El desarrollo de la *DM2* está fuertemente asociado con la obesidad y el sobrepeso, tanto en hombres como en mujeres y en todos los grupos étnicos. Aproximadamente el 50% de los diabéticos de este tipo son obesos<sup>3</sup>.

El incremento de peso y la resistencia a la insulina preceden, normalmente, al inicio de la diabetes. Diversos estudios han indicado que la *DM2* se desarrolla cuando la producción de insulina por las células  $\beta$  pancreáticas ya no puede satisfacer las demandas impuestas por el aumento de la resistencia a la insulina<sup>1</sup>.

Actualmente, la obesidad está considerada como una inflamación crónica de grado bajo, puesto que la resistencia a la insulina en los tejidos hepáticos, musculares y adiposos aumenta el nivel de las citoquinas proinflamatorias y disminuye el de las citoquinas antiinflamatorias<sup>18</sup>. La obesidad viene acompañada de cantidades elevadas de ácidos grasos libres circulantes (AGLs), que generan estrés oxidativo promoviendo la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) a un mayor nivel que el de su eliminación contribuyendo con ello a la aparición y mantenimiento de la resistencia a la insulina<sup>3</sup>. Una dieta elevada en grasas se asocia con una disminución en los niveles hepáticos del antioxidante glutatión (GSH) y la reducción de la actividad de las enzimas antioxidantes, mientras que aumenta la actividad de otras enzimas que producen ROS, como la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH). En el músculo esquelético, los marcadores del estrés oxidativo también se ven aumentados por una dieta rica en grasa que conduce a un aumento de la resistencia periférica a la insulina en relación con el almacenamiento de grasa ectópica en el músculo. Con el tiempo el páncreas se agota y el nivel de glucosa en sangre empieza a aumentar ya que no se produce suficiente insulina para superar la resistencia. Cuando se produce la hiperglucemia, su efecto tóxico (glucotoxicidad) sobre las células de los islotes exacerba el problema. En consecuencia, el aumento de AGLs causa lipotoxicidad<sup>3</sup>.

## 2. Tejido adiposo

El tejido adiposo es un órgano metabólico y endocrino esencial, complejo y muy activo. Se trata de un regulador crítico de la homeostasis de la energía sistémica que actúa como depósito calórico y órgano endocrino<sup>19</sup>. Está formado por adipocitos, tejido conectivo, nervioso, células estromovasculares e inmunes. Estos componentes funcionan como una unidad integrada ya que están implicados en la coordinación de una variedad de procesos biológicos que incluyen metabolismo energético, función neuroendocrina e inmune<sup>19</sup>.

El tejido adiposo expresa y secreta factores con importantes funciones endocrinas como la leptina, adiponectina, otras citoquinas, componentes del complemento inhibidor-1 del activador del plasminógeno, proteínas del sistema renina-angiotensina y resistina. Las citoquinas producidas por el tejido graso se conocen como adipoquinas y actúan tanto a nivel local (autocrino/paracrino) como sistémico (endocrino)<sup>1</sup>. Muchas proteínas secretadas se derivan de la fracción no adipocitaria del tejido adiposo. Además de estas señales eferentes, el tejido adiposo expresa numerosos receptores que le permiten responder a las señales aferentes de los sistemas hormonales así como del SNC. La función endocrina del tejido adiposo se acentúa debido a las consecuencias metabólicas adversas del exceso y la deficiencia de este

tejido ya que en condiciones de exceso de nutrientes los almacena en forma de lípidos mientras que en condiciones de déficit suministra nutrientes a otros tejidos mediante lipólisis<sup>19-20</sup>.

## 2.1. Tipos de tejido adiposo

Tanto en humanos como en roedores, hay dos tipos principales de tejido adiposo, el tejido adiposo blanco (TAB) y el tejido adiposo pardo (TAP). Anatómicamente, el TAB comprende dos depósitos principales, el subcutáneo (TAS) y el visceral (TAV) que se sitúa alrededor de los órganos internos (Figura 2)<sup>21</sup>.

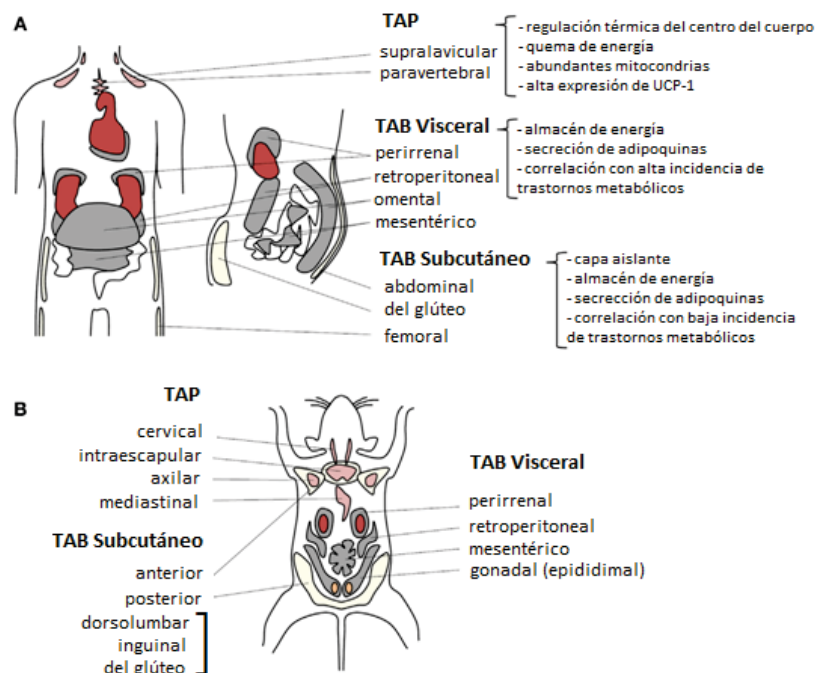


Figura 2. Disposición y funciones de los diferentes tipos de tejido adiposo en humanos (A) y roedores (B). Modificada de<sup>20</sup>.

La localización del tejido adiposo es de especial relevancia, puesto que, mientras que el TAV (y TAS abdominal) se asocia con características del síndrome metabólico, la acumulación de grasa en los depósitos subcutáneos glúteo-femorales pueden ser protectores contra cargas mecánicas, así como reserva durante tiempos de escasez de alimentos<sup>22</sup>.

El TAB y el TAP son diferentes tanto morfológicamente como en sus funciones, que prácticamente son antagónicas. Mientras que el TAB está formado por una gran gota lipídica y está específicamente diseñado para almacenar energía<sup>20</sup>, el TAP participa en la termogénesis mediante la oxidación de lípidos y su color pardo es debido a su alta densidad mitocondrial,

esencial para la generación de calor. Se caracteriza, además de por sus abundantes mitocondrias, por presentar gotas lipídicas multiloculares y rica vascularización<sup>20-21</sup>.

El TAP se observa con facilidad en roedores tanto adultos como en crías. Inicialmente, se propuso que en humanos sólo estaba presente en recién nacidos y que se reemplazaba gradualmente por TAB con el envejecimiento; sin embargo, estudios recientes demuestran que el TAP es viable y funcional en adultos humanos y se observa principalmente en la región supraclavicular, del cuello y a lo largo de la columna vertebral<sup>20, 23</sup>.

El TAP se especializa en la generación de calor más que en la síntesis de ATP porque presenta una alta expresión de la proteína desacopladora de tipo 1 (UCP1), la cual desacopla la fosforilación oxidativa de la síntesis de ATP, dando como resultado la producción de calor protegiendo al organismo de la hipotermia<sup>20, 24</sup>.

Recientemente se describió un tercer tipo de adipocito que se denominó adipocito que parece ser una transición entre el adipocito blanco y el adipocito pardo o marrón<sup>25-26</sup>. Estos adipocitos presentan muchas propiedades de los adipocitos marrones pero con orígenes de desarrollo completamente independientes. Los adipocitos pardos comparten el mismo origen que las células musculares, es decir derivan de los precursores con factor miogénico 5 (myf5), son myf5 positivos (myf5+), mientras que los adipocitos beige derivan de los precursores myf5 negativos (myf5-) y positivos, al igual que los adipocitos blancos que tienen ambos orígenes (Figura 3)<sup>27</sup>.

El tejido adiposo expresa altos niveles de receptores de tipo  $\beta$ -adrenérgicos que median la lipólisis inducida por el frío y además mejoran la captación de lípidos para la producción de calor y la biogénesis mitocondrial<sup>20</sup>. La señalización  $\beta$ -adrenérgica en el TAP activa la expresión de la proteína  $1\alpha$  coactivadora del receptor activado por el proliferador de peroxisomas (PGC- $1\alpha$ ), que estimula la expresión de genes mitocondriales y de UCP1<sup>20</sup>. Tanto la exposición al frío, como la estimulación  $\beta$ -adrenérgica o la exposición a ciertas hormonas como el factor 21 de crecimiento de fibroblastos (FGF21) y la irisina provocan que grandes cantidades de lípidos del TAB fluyan hacia el TAP; se produce un fenómeno de transdiferenciación conocido como *browning*, en el cual adipocitos blancos acaban transformándose en adipocitos pardos. Se ha observado que la administración farmacológica de FGF21 en ratón induce *browning* en el TAB inguinal y perirrenal, evidenciado por el aumento de la expresión de genes termogénicos y el aspecto histológico del aumento de

adipocitos marrones<sup>28</sup>. También se ha observado en ratones que la irisina actúa sobre los adipocitos blancos subcutáneos para inducir *browning*<sup>23</sup>.

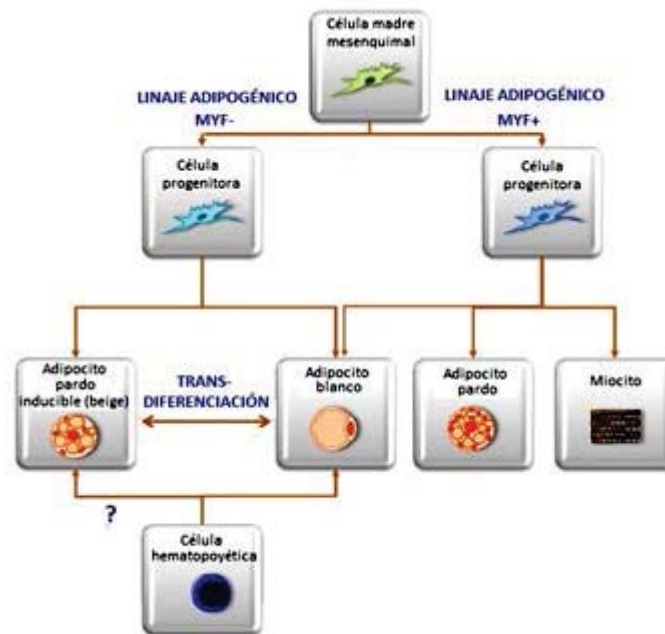


Figura 3. Origen de los adipocitos. Modificada de<sup>24</sup>.

## 2.2. Formación y diferenciación del tejido adiposo

El tejido adiposo es una entidad tisular que puede variar mediante hipertrofia (agrandamiento de los adipocitos) e hiperplasia (aumento del número de adipocitos)<sup>1, 20</sup>. La hipertrofia y la hiperplasia de los adipocitos están reguladas por factores ambientales y genéticos. Sin embargo, todavía no se conoce exactamente cómo estos dos modos de expansión del tejido adiposo son controlados a nivel molecular. Tanto las cantidades de TAS como de TAV están marcadamente aumentadas en humanos obesos. En condiciones fisiopatológicas como la obesidad, la remodelación del tejido adiposo puede inducir la desregulación de citoquinas, hormonas y metabolitos derivados del tejido adiposo, lo que provoca estrés y trastornos en los órganos metabólicos<sup>20</sup>.

Aunque también ocurre hiperplasia, el aumento de la cantidad de TAB se debe principalmente a la hipertrofia de los adipocitos y muchos estudios sugieren que esta hipertrofia resulta en una función anormal de los adipocitos que conduce a resistencia a la insulina<sup>20</sup>. Para la expansión hiperplásica del tejido adiposo, las células precursoras de adipocitos deben diferenciarse en adipocitos, este proceso está regulado por diversos factores de transcripción y hormonas. La regulación de la inducción y el mantenimiento de la

adipogénesis está mediada por distintos genes, entre los que podemos destacar el receptor gamma activado por el proliferador de peroxisomas (*PPAR $\gamma$* ), un regulador clave de la adipogénesis, la familia de proteínas CCAAT (*C/EBPs*) que son factores de transcripción que promueven la expresión de cierto genes pro-adipogénicos al unirse a sus promotores, la proteína de unión a elemento regulador de esteroides 1c (*SREBP1c*) es otro factor clave de transcripción que estimula la expresión de genes que codifican proteínas implicadas en la lipogénesis *de novo*, incluyendo la acetil-CoA carboxilasa (*ACC*), la ácido graso sintasa (*FAS*) y la acil-CoA deshidrogenasa (*ACAD*) de ácidos grasos saturados. Otras señales extracelulares, incluyendo proteínas morfogénicas óseas (*BMPs*) y factores de crecimiento similares a la insulina, modulan la diferenciación adipocitaria. Sin embargo, los mecanismos moleculares de la adipogénesis *in vivo* en condiciones normales y de obesidad siguen sin estar claros<sup>20-21</sup>.

### 3. *Sor11*

El gen *Sor11* también denominado *SORLA*, *SorLA*, *SorLA-1*, *LR11*, *LRP9*, *gp250* o *C11orf32* es el gen que codifica el receptor relacionado con sortilina 1 (*sortilin related receptor 1*). *Sor11* es un receptor de clasificación intracelular que transporta proteínas entre la red trans-Golgi (RTG), superficie celular y endosomas en neuronas y otros tipos celulares. Dirigiendo así proteínas de carga, tales como fosfatasas, quinasas, y receptores de señalización a su correcta ubicación en el interior de la célula. La actividad de *Sor11* garantiza la función adecuada de las células y tejidos y la disfunción de este receptor está relacionada con enfermedades como la aterosclerosis, el Alzheimer y la obesidad<sup>29-30</sup>.

*Sor11* pertenece a la familia de genes del receptor de lipoproteínas de baja densidad (LDLR) pero contiene elementos estructurales que no se habían encontrado en otros miembros de esta familia, por esto se planteó que estos elementos pudiesen conferir especificidad única en interacciones moleculares con otras proteínas. A pesar de que *Sor11* parece tener funciones distintas del metabolismo de las lipoproteínas, abunda en tejidos con metabolismo activo del colesterol, como el cerebro, hígado y glándulas suprarrenales. Las propiedades más interesantes que presentaba *Sor11* cuando se descubrió, ya que planteaban la posibilidad de que esta nueva proteína cumpliera funciones biológicas significativas, eran su alta expresión en el cerebro, ausencia de regulación por estrógenos y colesterol y elevado grado de conservación estructural entre especies<sup>31</sup>.



### 3.1. *Sor11* y Alzheimer

Debido a la alta expresión de *Sor11* en el cerebro y su compleja vía de señalización en las neuronas, se han llevado a cabo estudios con el objetivo de identificar su relevancia en la fisiología cerebral. Estos estudios han puesto de manifiesto la importancia de *Sor11* en el control de los procesos amiloideogénicos en el cerebro y su relación como un factor de riesgo para la enfermedad de Alzheimer (EA)<sup>29</sup>.

La desintegración proteolítica de la proteína precursora amiloide (PPA) en péptidos  $\beta$ -amiloides ( $A\beta$ ), es la causa molecular de la EA<sup>32</sup>. De forma natural PPA se divide en varios fragmentos proteolíticos, incluyendo los  $A\beta$ . Los  $A\beta$ , en particular  $A\beta_{42}$ , se consideran los principales responsables de los procesos neurodegenerativos, ya que presentan tendencia a agregarse a oligómeros neurotóxicos y placas seniles, características patológicas causantes de la disfunción neuronal y pérdida celular en pacientes con EA<sup>29</sup>.

*Sor11* controla el tráfico y el procesamiento de PPA, interactúa con distintos conjuntos de adaptadores citosólicos para el movimiento anterógrado y retrógrado de PPA entre la RTG y los endosomas tempranos, restringiendo así el suministro del precursor a los compartimientos endocíticos que favorecen la ruptura amiloidogénica. La sobreexpresión de *Sor11* en las células genera una reducción en la formación de  $A\beta$ , mientras que, la pérdida de expresión aumenta la producción de  $A\beta$  y deposición de placa senil, evidenciando una función protectora de *Sor11* frente a la progresión de EA, ya que reduce la carga amiloidogénica y retrasa la progresión de la neurodegeneración<sup>29, 32</sup>.

Investigaciones recientes, como la realizada por Davis y colaboradores, sugieren que existe una relación entre la *DM2* y la EA. Estos estudios demuestran que existen cambios fisiopatológicos comunes y vías de señalización como la ruta de señalización de la insulina, señales de estrés neuronal y vías inflamatorias que relacionan las dos patologías. Por esta razón, algunos investigadores propusieron el término "diabetes tipo 3" para la EA, debido a las características moleculares que comparten con la diabetes *mellitus* tipo 1 (DM1) y la resistencia a la insulina asociada con déficit de memoria y deterioro cognitivo en personas mayores<sup>33-34</sup>.

Se ha observado que una elevada ingesta de carbohidratos y ácidos grasos insaturados, baja ingesta de antioxidantes y falta de ejercicio físico causan estrés oxidativo en el cerebro, lo que conduce en una disminución cognitiva. Investigaciones sobre la *DM2* sugieren una relación entre el metabolismo alterado de la glucosa y la señalización de la insulina con la EA.



Clínicamente se ha observado que los pacientes con EA presentan una disminución significativa de la tasa de metabolismo de la glucosa, especialmente en zonas del cerebro donde tiene lugar el procesamiento de la memoria y el aprendizaje. Estas disminuciones ocurren en el envejecimiento normal, pero en las personas que presentan riesgo de EA comienzan a una edad más temprana y declinan de una forma más agresiva<sup>34</sup>.

Asimismo, se han llevado a cabo estudios sobre la obesidad como factor de riesgo para la EA, en ellos se ha demostrado que la obesidad a mediana edad se asocia con un mayor riesgo de demencia y EA. Las proteínas y hormonas secretadas por los adipocitos y las citoquinas inflamatorias podrían explicar la asociación entre la obesidad y el aumento del riesgo de demencia<sup>34</sup>.

### 3.2. *Sor11* y Obesidad

Se identificó el papel del receptor *Sor11* en el control del movimiento de lípidos en el tejido adiposo. Específicamente, *Sor11* facilita la expresión funcional del receptor de insulina (RI) favoreciendo la señalización de la misma. Actúa como un factor de clasificación que dirige las moléculas del RI internalizadas hacia la superficie celular, previniendo así el catabolismo lisosomal del RI y reforzando la recepción de la señal de insulina en el tejido adiposo<sup>29</sup>.

Para comprobar esto, Schmidt y colaboradores generaron ratones *knockout* para *Sor11*, es decir, genéticamente deficientes para este receptor, y otros ratones que presentaban una sobreexpresión de *Sor11* sólo en tejido adiposo. Observaron que los ratones *knockout* presentaban un defecto en la acumulación de tejido adiposo mientras que los ratones con sobreexpresión de *Sor11* presentaban obesidad, este efecto ya era evidente en ratones con una dieta normal, pero se exacerbó cuando los animales fueron alimentados con dieta alta en grasa<sup>29</sup>.

La sobreexpresión de *Sor11* en el tejido adiposo bloquea la hidrólisis de TAGs a AGLs y favorece la deposición de grasa. Por el contrario, la inactivación de *Sor11* acelera la liberación de AGLs a partir de TAGs y protege a los ratones de la obesidad inducida por la dieta. En humanos se observó una correlación clara entre el índice de masa corporal (IMC) y los niveles de expresión tanto génica como proteica para *Sor11* en tejido adiposo visceral<sup>29</sup>.

Recientemente, Whittle y colaboradores, utilizando ratones *knockout* para *Sor11* describieron un papel para la forma soluble de *Sor11* en el control de la termogénesis. Los datos obtenidos en este estudio demuestran un papel de *Sor11* como regulador negativo de la

termogénesis actuando a través de la vía de BMP/Smad, *Sor11* se une a los receptores de BMP y suprime la señalización termogénica a través de la supresión de la fosforilación de la proteína Smad, una proteína que actúa como segundo mensajero, en el tejido adiposo para suprimir la activación de la maquinaria termogénica e inhibir la transcripción de los principales genes termogénicos. Los ratones que carecen de *Sor11* muestran una protección contra la obesidad inducida por la dieta debido a un fenotipo hipermetabólico y *browning* del TAB, facilitado por la expresión de genes termogénicos en depósitos de TAB<sup>35</sup>.

Por lo tanto, *Sor11* actúa como un regulador metabólico, que funciona para mantener el equilibrio adecuado entre el almacenamiento y la oxidación de lípidos en respuesta a las condiciones ambientales cambiantes, particularmente cuando la actividad termogénica se incrementa. Este mecanismo podría ser utilizado para terapias contra la obesidad<sup>35</sup>.

#### 4. *Rb1*

*Rb1*, el gen del retinoblastoma, fue el primer gen supresor tumoral reconocido, codifica la proteína del retinoblastoma (pRb), un regulador central del ciclo celular necesario en varios procesos celulares, incluyendo apoptosis y diferenciación celular en miocitos esqueléticos, osteoblastos y adipocitos<sup>36</sup>.

Se ha descrito que, la expresión y actividad de *Rb1* parecen ser esenciales para el mantenimiento de la capacidad adipogénica/lipogénica del tejido adiposo tanto en ratones como en humanos. En ratones se ha descrito como esencial en la diferenciación de los adipocitos blancos y como un modulador negativo de la diferenciación de adipocitos marrones, observándose *browning* en depósitos de grasa blanca cuando *Rb1* es inactivado. En humanos tanto la expresión de *Rb1* como la actividad de pRb se asociaron negativamente con el IMC y la resistencia a la insulina, mientras que se asoció positivamente con la expresión de genes adipogénicos tanto en TAV como en TAS<sup>36</sup>.

#### 5. Relación entre *Sor11* y *Rb1*

Durante el año 2016, Petrov y colaboradores observaron que los ratones *Rb*<sup>+/-</sup> presentaban un descenso en la expresión de *Sor11*<sup>37</sup>. Además, también se sabe que tanto *Rb1* como *Sor11* reprimen la termogénesis y el proceso de *browning* y tanto los ratones *knockout* para *Sor11* como para *Rb1* son resistentes a la obesidad inducida por la dieta <sup>29, 38-39</sup>.

Hasta la fecha no se tiene constancia de si realmente los genes *Sor11* y *Rb1* están relacionados entre ellos de forma directa, ni de cómo están regulados en relación con

hormonas como la leptina, procesos como la resistencia a la insulina o enfermedades metabólicas como la diabetes o la obesidad.

## OBJETIVOS

Teniendo en cuenta los estudios publicados en el último año que demuestran que *Sor11* está asociado con la obesidad, termogénesis y resistencia a la insulina y dada la importancia de este gen en el sistema nervioso central (por ejemplo, su relación con el Alzheimer), nuestro objetivo general fue comprobar si la expresión génica de *Sor11* está alterada en distintos modelos de estrés metabólico, tanto a nivel central como periférico y observar si los valores de este gen cambian durante el fenómeno de *browning* en una línea celular de preadipocitos. Además, dado que *Rb1* se ha descrito como esencial en la diferenciación de los adipocitos blancos y, al igual que *Sor11*, es un modulador negativo de la diferenciación de adipocitos marrones, y su ausencia previene el desarrollo de la obesidad, quisimos comprobar si su patrón de expresión es similar al que presenta *Sor11*.

Para ello, nos planteamos una serie de objetivos específicos:

1. Estudiar si la restricción calórica y la dieta alta en grasa a largo plazo modifican la expresión génica de *Sor11* y *Rb1* en ratas tanto a nivel central como periférico.
2. Estudiar en ratas, si el tratamiento a corto plazo con leptina y la diabetes tipo I alteran la expresión génica de *Sor11* y *Rb1* a nivel periférico.
3. Estudiar la expresión génica de *Sor11* y *Rb1* en un modelo de preadipocitos de ratones cuando se induce el proceso de diferenciación tanto a adipocitos blancos como pardos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. Modelo *in vivo*

#### 1.1. Animales

El experimento fue revisado y aprobado por los comités de bioética de la Universidad de Coruña (UDC) y el Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña (CHUAC) de acuerdo con la Normativa de la Unión Europea para el uso de animales de experimentación.

#### 1.2. Modelo experimental

Debido a la duración del trabajo de fin de máster, y al tiempo de obtención de alguno de los modelos utilizados en este estudio, las muestras de los modelos animales fueron proporcionadas por el grupo de investigación Fisiopatología Endocrina, Nutricional y Médica (FENM), grupo en el que se realizó este trabajo.

El modelo animal se llevó a cabo en el animalario de la unidad de cirugía experimental del CHUAC, en condiciones estándar de alojamiento.

Los estudios se realizaron utilizando ratas macho (*Rattus norvegicus*) de la cepa *Wistar*. Se llevaron a cabo diferentes modelos animales, definidos detalladamente en <sup>40</sup>. En resumen, los modelos son:

- Realización de dos modelos opuestos, uno de ellos “imitando” a la anorexia nerviosa y el otro a la obesidad, a través de alteraciones en la dieta de ratas machos desde el día del destete (21 días) hasta la etapa adulta (4 meses de edad). El modelo de anorexia nerviosa, que presenta alta sensibilidad tanto a la insulina como a la leptina, se consiguió con una restricción calórica crónica. Mientras que el modelo de obesidad, con resistencia a la insulina y a la leptina, se obtuvo alimentando a las ratas con dieta alta en grasa.
- Modelo en el que se sometieron a las ratas a 48 horas de ayuno.
- Modelo experimental de diabetes inducida por un tratamiento con alloxan (destruye las células  $\beta$ -pancreáticas) y posterior normalización de sus niveles de glucosa mediante tratamiento con insulina.
- Un modelo de ratas tratadas con leptina, dada su importancia en el balance energético y en el desarrollo de resistencia a la misma que se produce durante la obesidad.

## 2. Modelo *in vitro*

### 2.1. Línea celular 3T3-L1

Para llevar a cabo los experimentos *in vitro*, se utilizó la línea celular de fibroblastos de ratón de la cepa Swiss 3T3-L1 (*ZenBio*). Estos fibroblastos se considera un modelo de preadipocitos, puesto que en presencia de ciertas hormonas/fármacos se diferencian a adipocitos maduros<sup>41</sup>.

Los preadipocitos 3T3-L1 fueron cultivados siguiendo el protocolo de Suenaga<sup>42</sup>. Las células se cultivaron en placas de cultivo de 100 mm diámetro (*Corning*) en 10 ml de medio de cultivo *Eagle* modificado por Dulbecco (DMEM; *Gibco*), suplementado con un 10 % de *Calf serum*, 100 U/ml de penicilina (*Gibco*) y 100 µg/ml de estreptomicina (*Gibco*).

Una vez obtenido el número suficiente de células para llevar a cabo los experimentos, se levantaron con Tripsina (0,5 % *Trypsin-EDTA (10x) Gibco*) diluida al 80% en suero salino (*Fresenius kabi*), se centrifugaron a 156 g durante 5 min a temperatura ambiente, se contaron con una cámara de Neubauer y se sembraron 80000 células/pocillo en placas multipocillo de 12 (*Thermo Scientific*) con 1,5 ml de medio y se incubaron hasta llegar a la confluencia total. Se usaron un total de cuatro placas para llevar a cabo el experimento completo.

### 2.2. Diferenciación de células 3T3-L1

Una vez que las células estuvieron confluentes se procedió al paso de diferenciación de las mismas, bien hacia adipocitos blancos o pardos dependiendo de los distintos tratamientos. Para la diferenciación se siguió el protocolo descrito por Zebisch<sup>41</sup> con ligeras modificaciones.

A las 48 horas de alcanzar el 100% de confluencia (día 0), se añadió el medio de diferenciación: DMEM F-12, suero fetal bovino (FBS) al 10%, penicilina/estreptomicina (P/S) al 1%, insulina (1 µg/ml), dexametasona (0,25 µM) e 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX; 0,5 mM). Tras 48 horas (día 2) se retiró el medio de diferenciación y se añadió medio de mantenimiento I (DMEM F-12, FBS al 10%, P/S al 1% e insulina (1 µg/mL)). Este medio se mantuvo durante 48 horas y se procedió a iniciar los tratamientos (día 4).

### 2.3. Tratamientos

Para el ensayo se emplearon 8 condiciones, células 100% confluentes sin diferenciar y 7 tratamientos distintos en células diferenciadas. El cronograma de la diferenciación y de los tratamientos se muestra en la Figura 4.

Una parte de las células se mantuvo sin diferenciar frente a las demás, que se diferenciaron mediante tratamientos con insulina, rosiglitazona y 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX), para ver si el proceso de adipogénesis genera variación en la expresión de *Sor11* y *Rb1*.

Para estudiar la posible implicación de *Sor11* y *Rb1* en el proceso de *browning* o termogénesis se trataron las células con triyodotironina (T3), adrenalina y forskolina, inductores de *browning* que dirigen los adipocitos blancos hacia adipocitos pardos, para después estudiar los niveles de expresión de estos genes y de *UCP1*, *CIDEA* y *PPAR $\gamma$* , genes marcadores de *browning*.

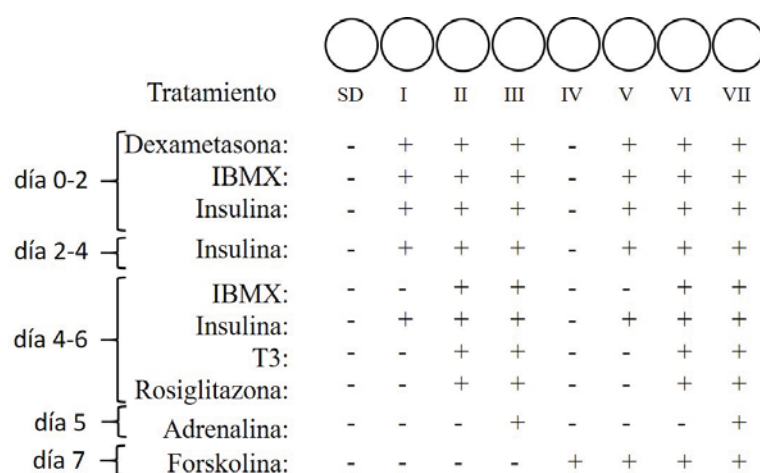


Figura 4. Cronograma y tratamientos utilizados en la línea celular 3T3-L1.

Las condiciones son:

- Tratamiento I: Insulina (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ); imprescindible para la lipogénesis *de novo*.
- Tratamiento II: Insulina (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), T3 (50 nM), rosiglitazona (2  $\mu\text{M}$ ) e IBMX (0,5 mM). T3 induce *browning* en los adipocitos; la rosiglitazona es un agonista de *PPAR $\gamma$* , que es un marcador de adipogénesis; IBMX, que aumenta los niveles de adenosín monofosfato cíclico (AMPc) activando la proteína quinasa A (PKA) y aumentando la diferenciación a adipocitos maduros.
- Tratamiento III: tratamiento II y adrenalina (1  $\mu\text{M}$ ). La adrenalina activa los receptores  $\beta$  adrenérgicos, por lo tanto favorece el fenómeno de *browning*, además potencia la acción de T3. Tratamiento con forskolina: a la mitad de las células se las trató con forskolina durante 4 h (10  $\mu\text{M}$ ), aumentando de este modo la cantidad de AMPc y la respuesta termogénica.

### 3. Diseño y testado de cebadores de *Sor11* y *Rb1*

Para poder realizar este trabajo primeramente se diseñaron y testaron los cebadores adecuados para el estudio de expresión génica mediante la técnica de PCR en tiempo real. Los cebadores usados en este estudio (ver ANEXO I, Tabla 1) fueron diseñados usando dos algoritmos informáticos gratuitos y disponibles a través de internet:

- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>
- <https://www.eurofinsgenomics.eu/en/dna-rna-oligonucleotides/optimised-application-oligos/pcr-qpcr-primer.aspx>

### 4. Extracción de ARN y realización de PCRs

El ARN total se extrajo mediante TRIzol (*Invitrogen*) siguiendo las especificaciones del fabricante. La integridad y la calidad/concentración del ARN se determinaron mediante geles de agarosa y el espectrofotómetro NanoDrop ND-100 (Thermo Scientific), respectivamente. Una vez que obtuvimos el ARN se siguieron estos pasos:

- Preparación de la mezcla de retro-transcripción (RT) para convertir el ARN en ADN complementario (ANEXO I. Tabla 2). A cada muestra se añadieron 20  $\mu$ l de la mezcla y 1  $\mu$ g de ARN (a una concentración de 100 ng/ $\mu$ l).
- Realización de la RT en el termociclador *GeneAmp<sup>R</sup> PCR System 9700* (*Applied Biosystems*) siguiendo el protocolo especificado en la Tabla 3 (ANEXO I). Una vez finalizada la RT el ADN complementario obtenido se diluyó en 70  $\mu$ l de agua.

Preparación de la mezcla para llevar a cabo la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real de modo cuantitativo (qRT-PCR). Se utilizaron placas de 96 pocillos (*Roche*) y en cada pocillo se añadió 2  $\mu$ l de ADN complementario y 15  $\mu$ l de la mezcla especificada en la Tabla 4 del ANEXO I.

- Realización de la qRT-PCR en el termociclador *Lightcycle<sup>®</sup> Instrument 480 System* (*Roche*) siguiendo el protocolo especificado en la Tabla 5 (ANEXO I).

Tanto en los modelos *in vivo* como *in vitro* se utilizaron genes control que no vieron alterada su expresión génica por los tratamientos: *HPRT* o *S11*. Los valores de expresión relativa del gen de interés se calcularon en base al gen de referencia siguiendo el método de Pfaffl<sup>43</sup>.



## 5. Análisis estadístico

Se calcularon las medias y el error estándar (ES) de cada uno de los grupos. Se estableció la significación estadística con un p-valor  $< 0,05$  y se determinó por la prueba de la t-Student (experimentos con dos grupos) y el test de análisis de la varianza (ANOVA) de una sola vía o de dos vías, con el test de Tukey *posthoc* (experimentos con más de dos grupos y una o dos variables). El análisis estadístico y las gráficas se crearon con el programa *SigmaPlot* versión 11.0.

## RESULTADOS

### 1. Testado de cebadores

Los cebadores fueron testados para saber si amplificaban el fragmento correcto. Para ello, tras la realización de las PCRs, se realizó una electroforesis en gel de agarosa con el producto obtenido en las mismas para comprobar que el tamaño del amplicón era el adecuado (Figura 5). También se calculó la eficiencia de los cebadores, para ello se hicieron diluciones seriadas de cDNA, y posteriormente se llevó a cabo una PCR. Se representó la expresión obtenida para las distintas diluciones y se ajustaron a una recta. La eficiencia de los primers se calculó usando la siguiente fórmula:  $\text{Eficiencia} = (10^{(-1/\text{pendiente de la recta})} - 1) \times 100$ . Finalmente, cuando se determinó que el tamaño del amplicón y la eficiencia eran correctos se envió el producto de la PCR a secuenciar. Una vez que se comprobó que todos los cebadores funcionaban adecuadamente se procedió con el resto del proyecto.

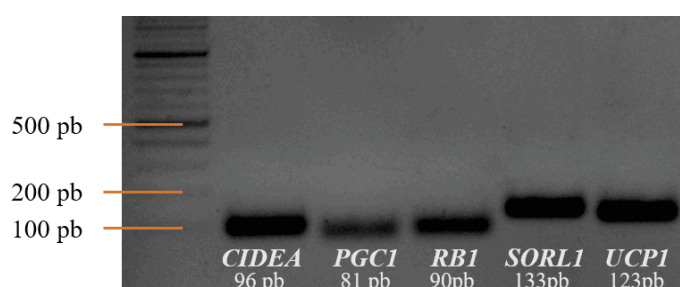


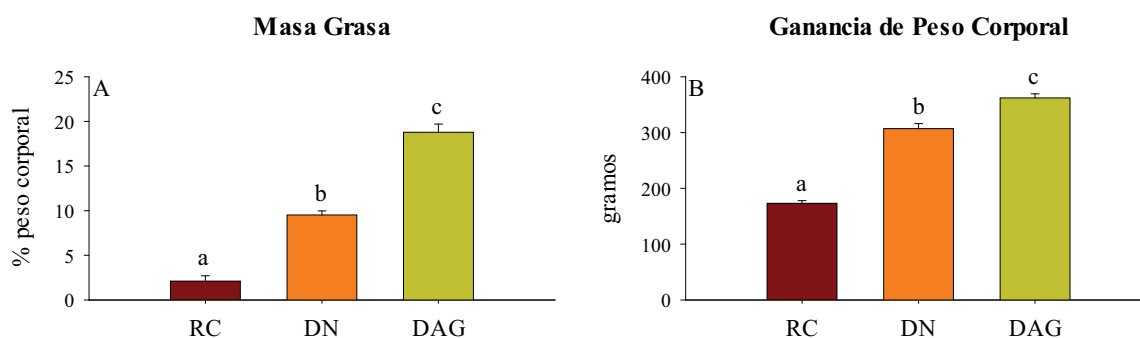
Figura 5. Ejemplo del uso del gel de agarosa para comprobar el tamaño del amplicón durante el testado de cebadores.

### 2. Modelo *in vivo*

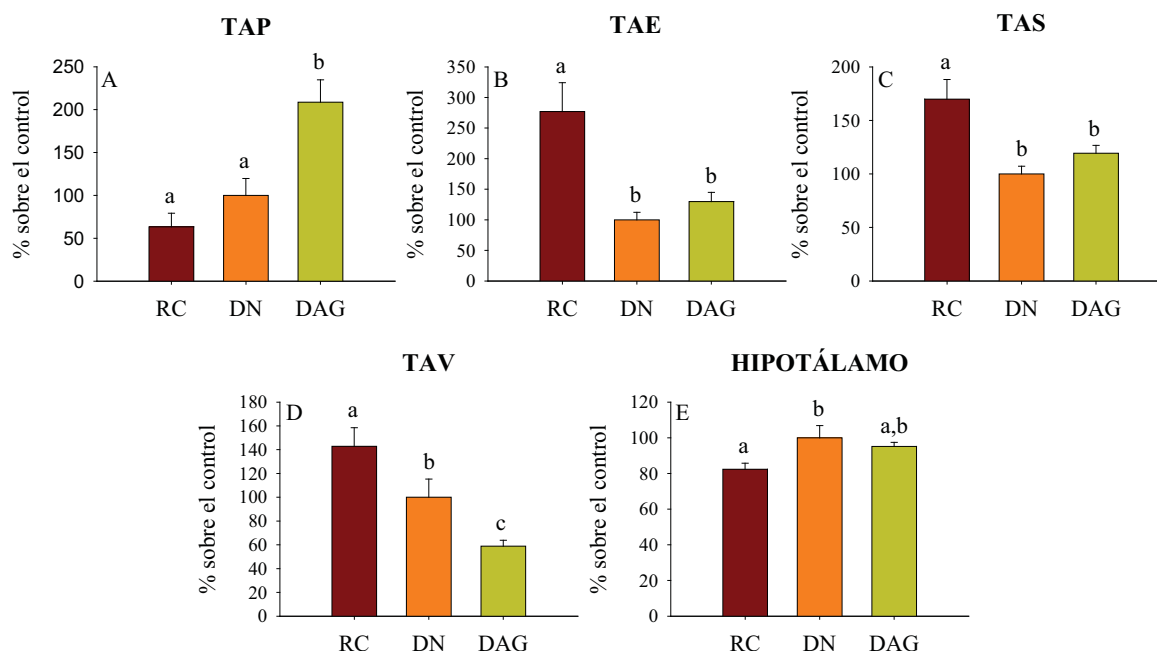
#### 2.1. Modelo de restricción calórica y dieta alta en grasa a largo plazo

Para comprobar que los 3 meses de restricción calórica y dieta alta en grasa fueron suficientes, se analizó mediante resonancia magnética nuclear (RMN) el porcentaje de masa grasa, y también se calculó la ganancia de peso corporal. Como puede observarse en la Figura 6, los tratamientos funcionaron correctamente creando tanto ratas obesas, como ratas con un porcentaje de masa grasa inferior al normal.

En la Figura 7 podemos ver la expresión génica de *Sor11* tras tres meses con dieta alta en grasa o restricción calórica. En la Figura 7A, se puede ver que la expresión de *Sor11* en el tejido adiposo pardo aumenta en los animales tratados con dieta alta en grasa, justo lo contrario que ocurre con el tejido adiposo blanco que aumenta con la restricción calórica (Figuras 7B-7D). A nivel central, en el hipotálamo, se observa que la expresión génica de *Sor11* disminuye en los animales sometidos a restricción calórica (Figura 7E).

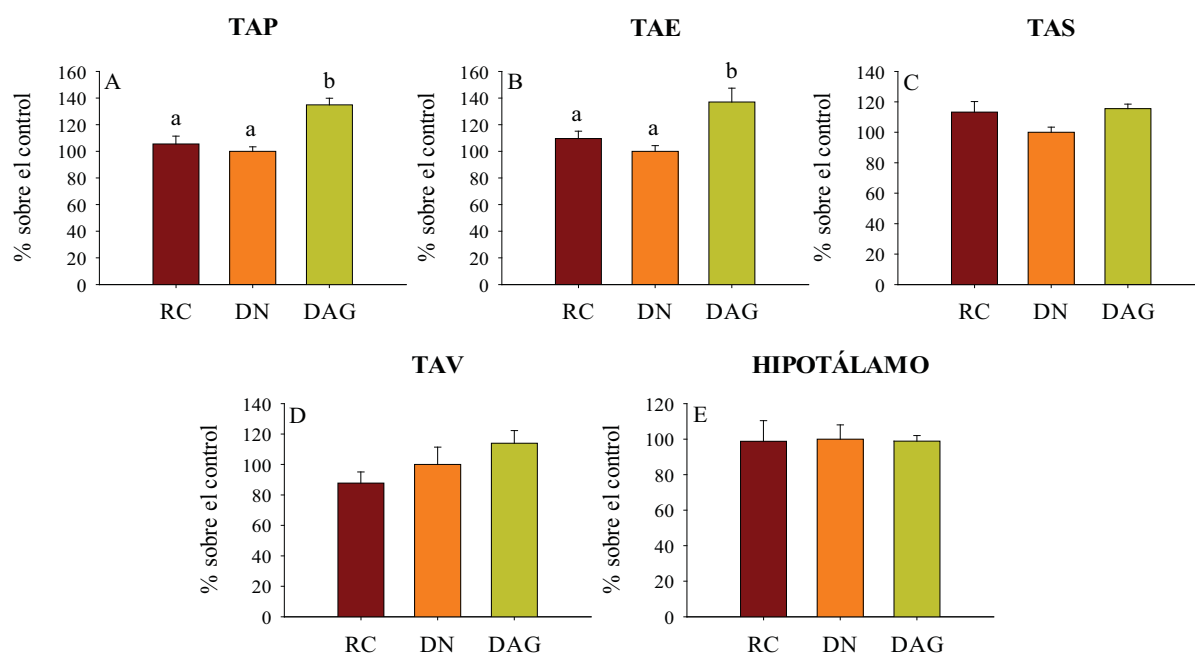


**Figura 6. Antropometría del modelo de restricción calórica y dieta alta en grasa a largo plazo.** Los datos se muestran como media  $\pm$  EE de cada grupo, donde al grupo control (DN) se le asignó el valor del 100% y el resto de los grupos se refirieron a este control. Diferentes letras sobre las barras indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ). Restricción calórica (RC); dieta normal (DN); dieta alta en grasa. (DAG) durante 3 meses desde el día del destete. ANOVA de una vía con un test de Tukey *post hoc*,  $n = 10$ .



**Figura 7. Niveles de expresión de ARNm, de Sor11 en TAP (A), TAE (B), TAS (C), TAV (D) e hipotálamo (E) tras tres meses de restricción calórica o dieta alta en grasa.** Los datos se muestran como media  $\pm$  EE de cada grupo, donde al grupo control (DN) se le asignó el valor del 100% y el resto de los grupos se refirieron a este control. Diferentes letras sobre las barras indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ). Restricción calórica (RC); dieta normal (DN); dieta alta en grasa. (DAG) durante 3 meses desde el día del destete. ANOVA de una vía con un test de Tukey *post hoc*,  $n = 10$ .

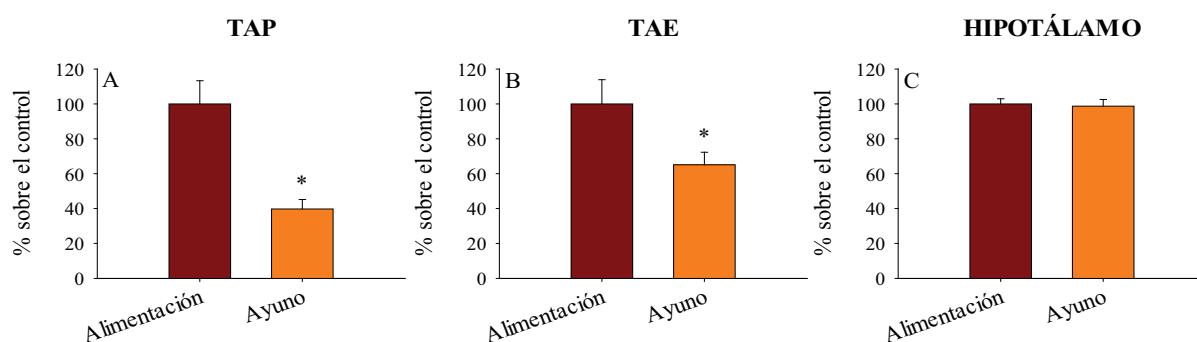
Para estudiar si podría existir algún tipo de relación entre *Sor11* y *Rb1*, estudiamos los niveles de expresión génica de *Rb1* en los mismos animales que antes y observamos que en el TAP, al igual que sucede para *Sor11*, la expresión génica de *Rb1* aumenta con dieta alta en grasa crónica (Figura 8A). En el tejido adiposo blanco las tendencias fueron contrarias en *Sor11* y *Rb1*, si bien en *Rb1* no se observaron diferencias estadísticamente significativas para TAS y TAV (Figura 8C-8D).



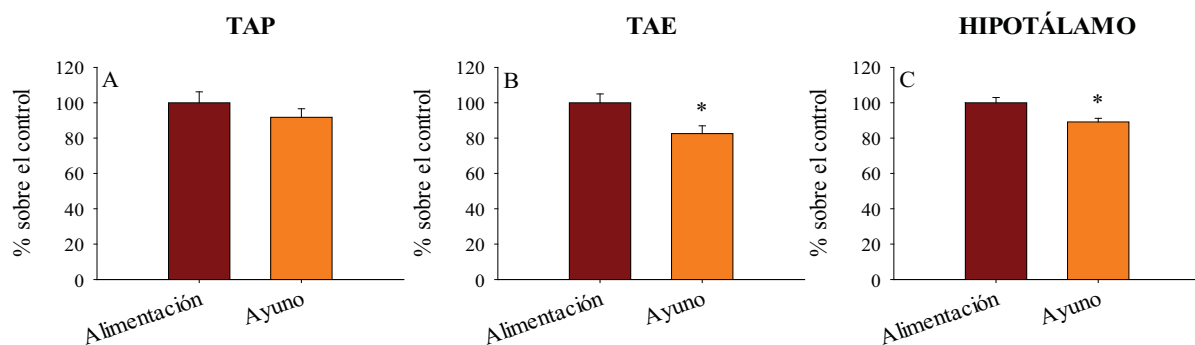
**Figura 8. Niveles de expresión de ARNm, de Rb1 en TAP (A), TAE (B), TAS (C), TAV (D) e hipotálamo (E) tras tres meses de restricción calórica o dieta alta en grasa.** Los datos se muestran como media  $\pm$  EE de cada grupo, donde al grupo control (DN) se le asignó el valor del 100% y el resto de los grupos se refirieron a este control. Diferentes letras sobre las barras indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ). Restricción calórica (RC); dieta normal (DN); dieta alta en grasa (DAG) durante 3 meses desde el día del destete. ANOVA de una vía con un test de Tukey *post hoc*,  $n = 10$ .

## 2.2. Modelo de ayuno

Tras 48h de ayuno se observó un descenso en la expresión de *Sor11* y *Rb1* en tejido adiposo blanco (Figura 9B y Figura 10B, respectivamente) y un descenso en la expresión de *Sor11* en tejido adiposo pardo (Figura 9A), mientras que, la expresión de *Rb1* disminuyó en hipotálamo (Figura 10C).



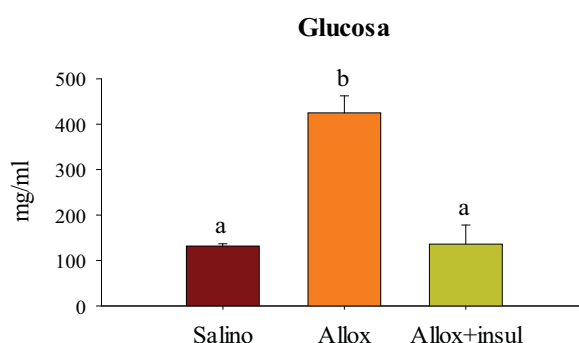
**Figura 9. Niveles de expresión de ARNm, de Sor11 en TAP (A), TAE (B) e hipotálamo (C) en un modelo de ayuno de 48 horas.** Los datos se muestran como media  $\pm$  EE de cada grupo, donde al grupo control (alimentación) se le asignó el valor del 100% y el otro grupo se refirió a este control. Diferentes letras sobre las barras indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ). Prueba t-Student. Alimentación  $n = 8$  y ayuno  $n = 6$ .



**Figura 10. Niveles de expresión de *ARNm*, de *Rb1* en TAP (A), TAE (B) e hipotálamo (C) en un modelo de ayuno de 48 horas.** Los datos se muestran como media  $\pm$  EE de cada grupo, donde al grupo control (alimentación) se le asignó el valor del 100% y el otro grupo se refirió a este control. Diferentes letras sobre las barras indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ). Prueba t-Student. Alimentación  $n = 8$  y ayuno  $n = 6$ .

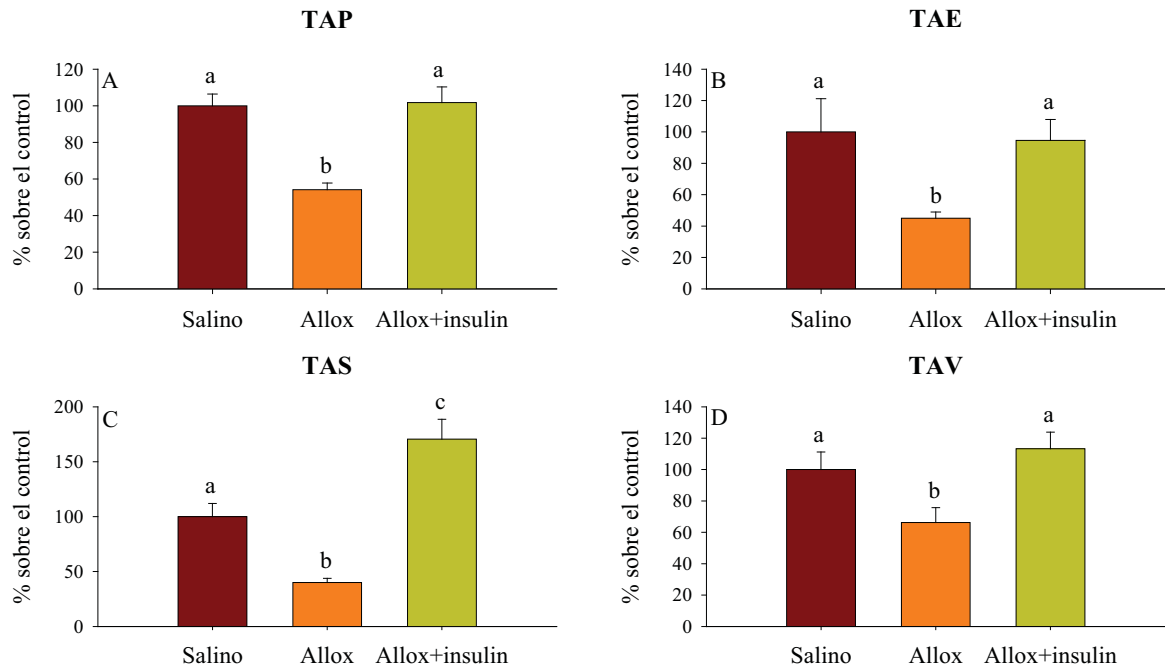
### 2.3. Modelo de diabetes inducida con alloxan

En este modelo experimental se indujo diabetes en las ratas mediante el tratamiento con alloxan y posteriormente se normalizaron sus niveles de glucosa mediante un tratamiento con insulina. Para comprobar que el tratamiento con alloxan funcionó adecuadamente y provocó diabetes, se analizaron los niveles de glucosa en sangre (Figura 11), donde pudimos comprobar la eficacia del tratamiento puesto que en todos los animales tratados los niveles de glucosa en sangre fueron superiores a 250 mg/dl.

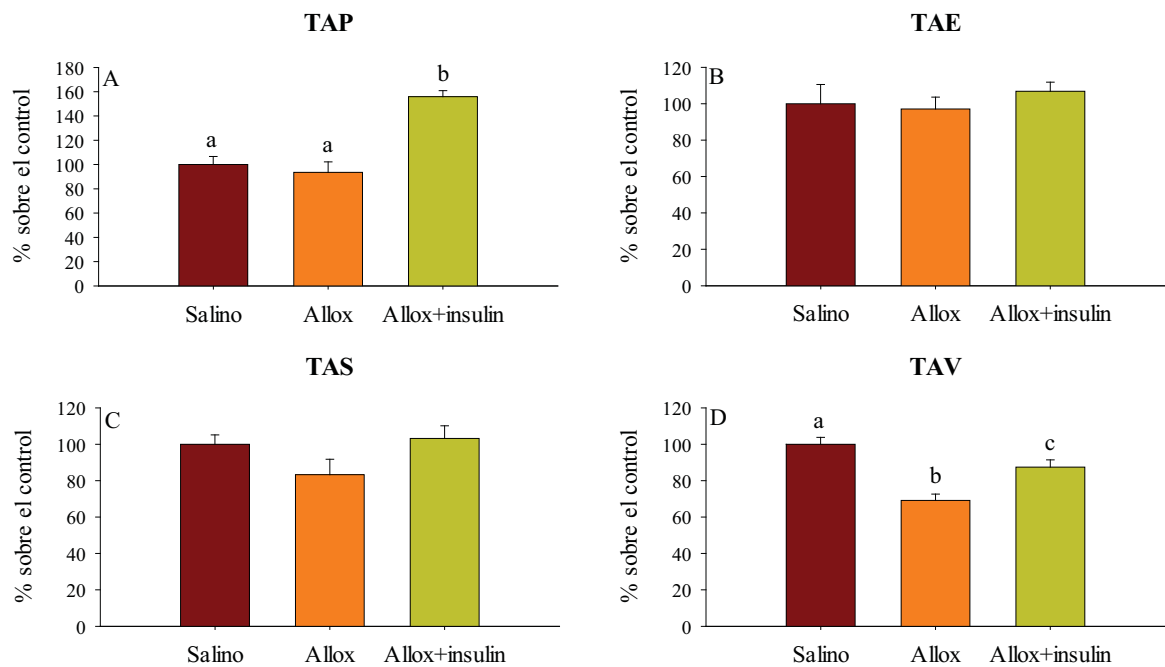


**Figura 11. Concentración de glucosa en sangre en el modelo de diabetes inducida con alloxan.** Los datos se muestran como media  $\pm$  EE de cada grupo, donde al grupo control (salino) se le asignó el valor del 100% y el resto de los grupos se refirieron a este control. Diferentes letras sobre las barras indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ). ANOVA de una vía con un test de Tukey post hoc,  $n = 8$  (salino),  $n = 9$  (allox) y  $n = 10$  (allox + insulina).

En la Figura 12 se puede ver que la expresión de *Sor11* disminuye en los animales tratados con alloxan en todos los tejidos estudiados, efecto que es revertido por el tratamiento con insulina. Para estudiar si existe algún tipo de relación entre *Sor11* y *Rb1*, estudiamos los niveles de expresión génica de *Rb1* en los mismos animales (Figura 13). En este caso sólo observamos un descenso en los niveles de *Rb1* en el tejido adiposo visceral tras el tratamiento con alloxan, efecto que es parcialmente revertido por el tratamiento con insulina (Figura 13D). Por otra parte, se observó que el tratamiento con insulina provocó un aumento en la expresión de este gen en el tejido adiposo pardo (Figura 13A).



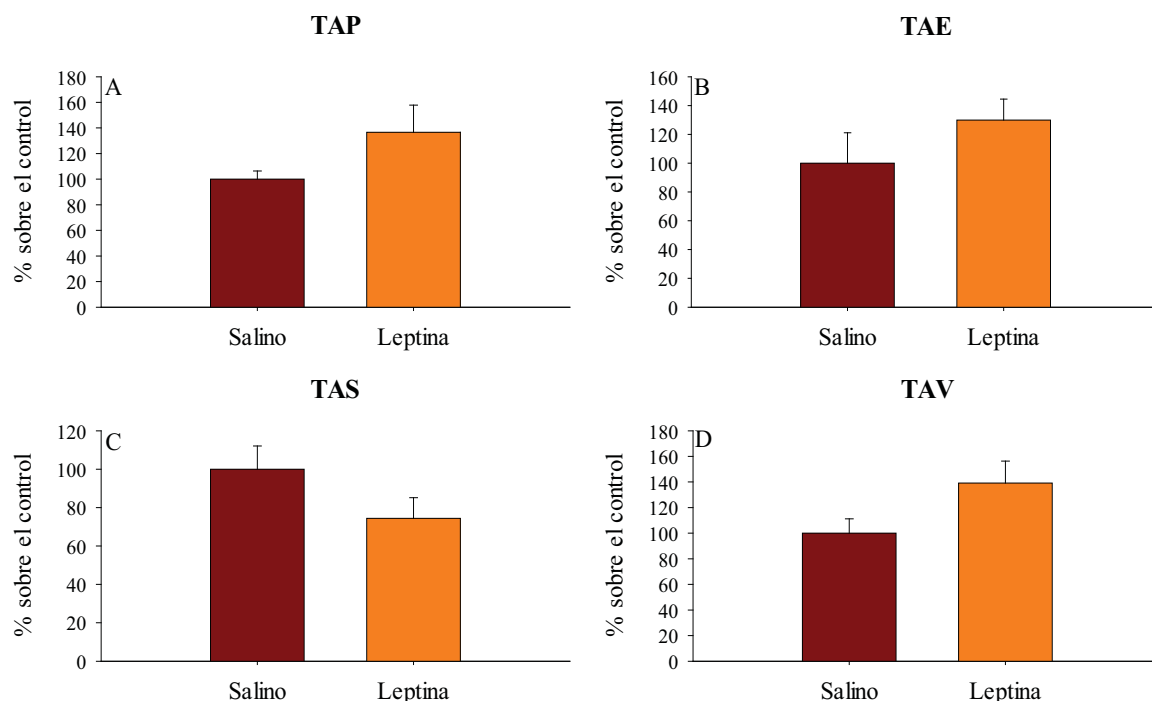
**Figura 12.** Niveles de expresión de *ARNm*, de *Sor11* en TAP (A), TAE (B), TAV (C) y TAS (D), tras el tratamiento con salino, alloxan y alloxan más insulina. Los datos se muestran como media  $\pm$  EE de cada grupo, donde al grupo control (salino) se le asignó el valor del 100% y el resto de los grupos se refirieron a este control. Diferentes letras sobre las barras indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ). ANOVA de una vía con un test de Tukey *post hoc*,  $n=8$  (salino),  $n=9$  (allox) y  $n=10$  (allox + insulina).



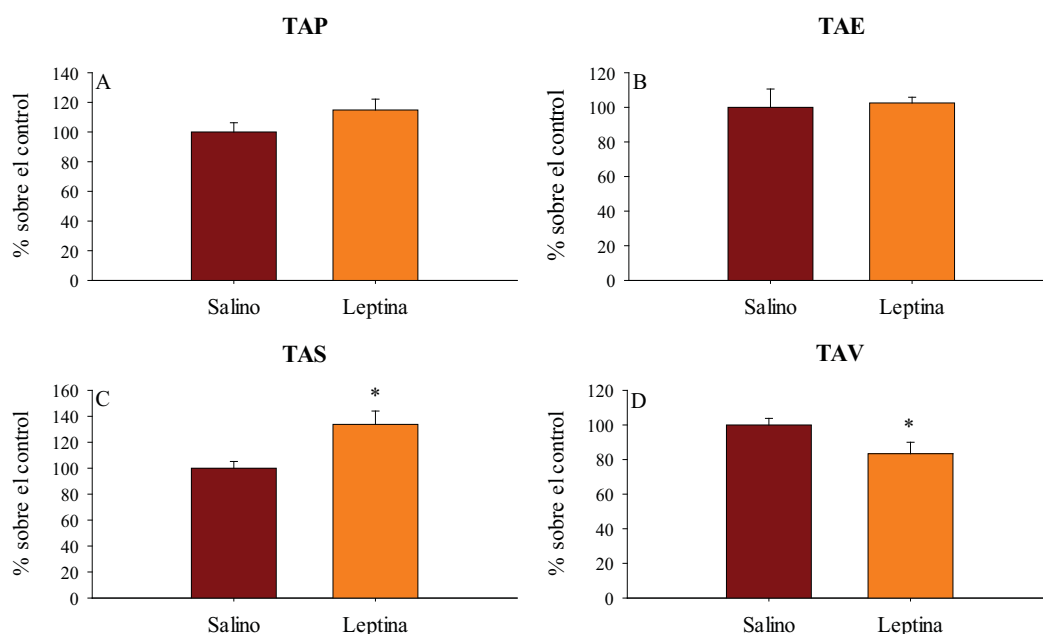
**Figura 13.** Niveles de expresión de *ARNm*, de *Rb1* en TAP (A), TAE (B), TAV (C) y TAS (D), tras el tratamiento con salino, alloxan y alloxan más insulina. Los datos se muestran como media  $\pm$  EE de cada grupo, donde al grupo control (salino) se le asignó el valor del 100% y el resto de los grupos se refirieron a este control. Diferentes letras sobre las barras indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ). ANOVA de una vía con un test de Tukey *post hoc*,  $n=8$  (salino),  $n=9$  (allox) y  $n=10$  (allox + insulina).

## 2.4. Modelo de ratas tratadas con leptina

El tratamiento con leptina, no provocó diferencias estadísticamente significativas en la expresión de *Sorll* en ninguno de los tejidos analizados (Figura 14).



**Figura 14.** Niveles de expresión de ARNm, de *Sorll* en TAP (A), TAE (B), TAV (C) y TAS (D), tras un tratamiento con salino o leptina intraperitoneal durante 2 días. 1 inyección cada día. Los datos se muestran como media  $\pm$  EE de cada grupo, donde al grupo control (salino) se le asignó el valor del 100% y el resto de los grupos se refirieron a este control. \*( $p < 0,05$ ). Prueba t-Student. Salino n=8 y leptina n=6.

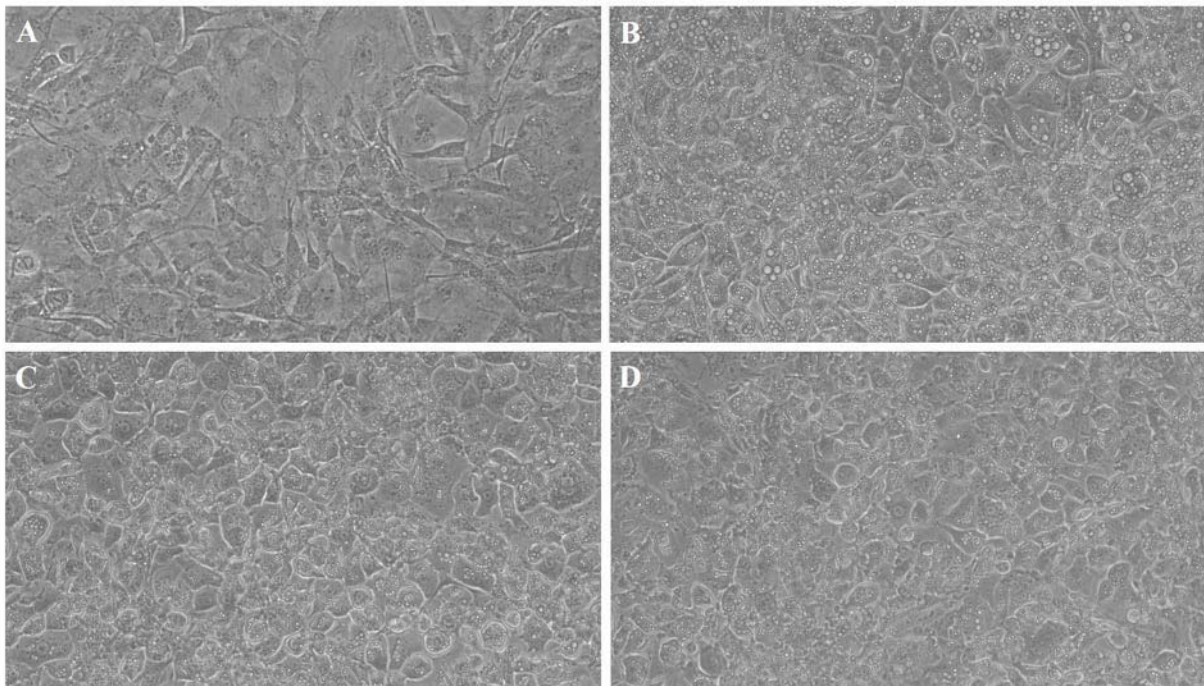


**Figura 15.** Niveles de expresión de ARNm, de *Rbl* en TAP (A), TAE (B), TAV (C) y TAS (D), tras el tratamiento con salino o leptina intraperitoneal durante 2 días. 1 inyección cada día. Los datos se muestran como media  $\pm$  EE de cada grupo, donde al grupo control (salino) se le asignó el valor del 100% y el resto de los grupos se refirieron a este control. \*( $p < 0,05$ ). Prueba t-Student. Salino n=8 y leptina n=6.

Esta misma situación se observó cuando estudiamos los niveles de expresión de *Rb1* con excepción del tejido adiposo subcutáneo, donde se observó un incremento tras el tratamiento con leptina (Figura 15C) y del tejido adiposo visceral, donde se observó un descenso de la expresión tras el tratamiento con leptina (Figura 15D).

### 3. Modelo *in vitro*

Se tomaron fotografías de células sin diferenciar y tras los tratamientos I, II y III (Figura 16). Se observa una clara diferencia entre las células sin diferenciar (Figura 16A) que presentan una morfología fibroblástica, y ausencia de lípidos, y las células diferenciadas (Figura 16B, C, D) en las que los adipocitos adquieren forma redondeada y presentan gran cantidad de lípidos.



**Figura 16. Línea celular 3T3-L1.** Células sin diferenciar 100 % confluentes (A), tratamiento I (B), tratamiento II (C) y tratamiento III (D). Microscopio Nikon Eclipse TS 100 con cámara Microscopía Digital XM Full HD Camera (XM Family). Samsung BWC-1602 (200x).

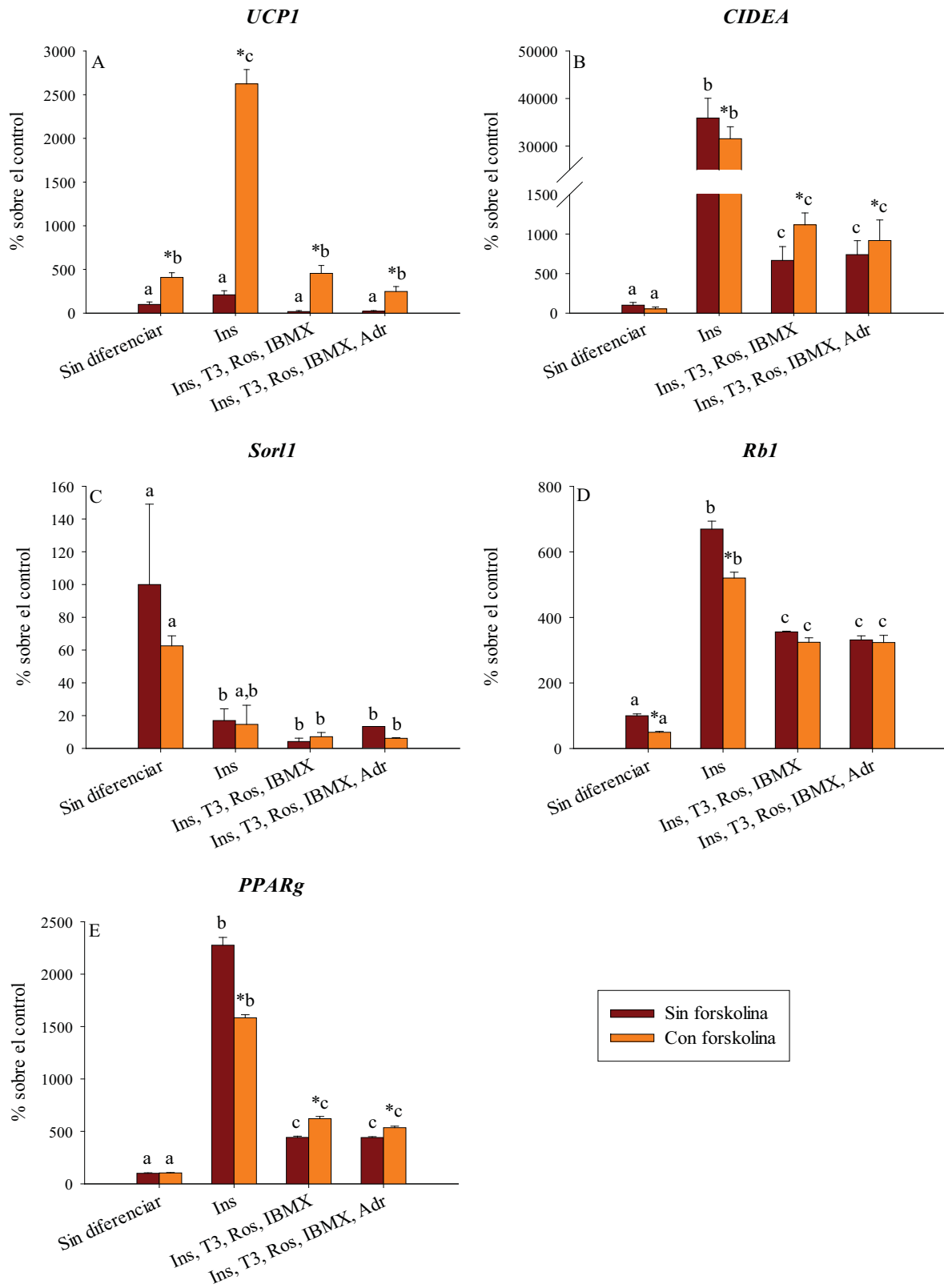
Las células que fueron tratadas sólo con insulina tras la retirada del medio de diferenciación (tratamiento I, Figura 16B) muestran grandes vacuolas lipídicas esféricas, mientras que en las células con tratamiento II y III (Figura 16C-D, respectivamente) el tamaño de los lípidos disminuye, siendo esta disminución más acusada en el tratamiento III (Figura 16D).



En la Figura 17 se muestran los resultados obtenidos en la expresión tanto de marcadores de *browning*, como de adipogénesis en el experimento con células 3T3-L1. Como era de esperar, los niveles de expresión de *PPAR $\gamma$*  (Figura 17E) aumentan en todos los grupos tras la diferenciación, todos los tratamientos indujeron el fenómeno de adipogénesis, que fue mucho más marcada en el tratamiento I, coincidiendo con las fotografías de microscopía (Figura 16) donde se observa que el tratamiento I es el que provoca unas características más típicas de adipocito blanco, como gran cantidad de lípidos y forma redondeada. En las células tratadas solo con insulina se observa una disminución en la expresión de *PPAR $\gamma$*  cuando se tratan con forskolina, mientras que, en los otros dos tratamientos la expresión se ve aumentada.

En todos los grupos se observa un aumento de la expresión de *UCPI* (Figura 17A) tras el tratamiento con forskolina, aumento mucho más acusado en el tratamiento I. La expresión de *CIDEA* (Figura 17B) presenta un gran aumento en las células tratadas únicamente con insulina tras la diferenciación con respecto a las demás, en este caso se observa variación significativa cuando se añade forskolina en todos los tratamientos, disminuyendo en el tratamiento con insulina y aumentando en los otros dos tratamientos.

La expresión de *Sor11* está representada en la Figura 17C, en general podemos decir que su expresión disminuye tras el proceso de diferenciación, si bien las diferencias no son estadísticamente significativas en todos los grupos, debido a que la variabilidad es muy grande y necesitaríamos hacer más experimentos para aumentar el tamaño muestral. Por el contrario, la expresión de *Rb1* (Figura 17D) aumenta de forma estadísticamente significativa con el proceso de adipogénesis.



**Figura 17. Modelo de 3T3-L1. Expresión de UCPI (A), CIDEA (B), SORL1 (C), Rb1 (D) y PPARg (E).** Los datos se muestran como media  $\pm$  EE de cada grupo, donde al grupo control (sin diferenciar) se le asignó el valor del 100% y el resto de los grupos se refirieron a este control. Diferentes letras sobre las barras indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ). \*, estadísticamente significativo con respecto al mismo grupo pero sin forskolina. Ins, insulina; Ros, rosiglitazona; Ad, adrenalina. ANOVA de dos vías con un test de Tukey *post hoc*,  $n = 12$ .

## DISCUSIÓN

Durante los últimos años el número de personas que padecen obesidad ha aumentado considerablemente a nivel mundial, afectando tanto a países ricos como a países en vías de desarrollo, convirtiéndose en una epidemia de impacto global que trae consigo un elevado número de comorbilidades asociadas<sup>2-3</sup>. Por ello, es de especial importancia tratar de conocer las causas que están implicadas en el desarrollo y mantenimiento de la misma para poder encontrar una terapia en el futuro.

El hecho de que algunos grupos étnicos presentan una mayor susceptibilidad a padecer obesidad que otros, llevó a pensar que poseen una carga genética que les hace más susceptibles a desarrollar obesidad<sup>1, 9</sup>. Las alteraciones genéticas únicas con herencia mendeliana representan menos del 5% de las alteraciones no sindrómicas de los casos graves de desarrollo temprano de la obesidad, incluyendo mutaciones en el gen de la leptina o de su receptor, así como en el receptor 4 de las melanocortinas, que son las causas más comunes de la obesidad monogénica. También se han identificado alteraciones genéticas, genómicas y epigenéticas en formas sindrómicas de la obesidad, como el síndrome de Bardet-Biedl, el síndrome de Prader-Willi o el síndrome de Beckwith-Wiedemann<sup>44</sup>. Sin embargo, la obesidad generalmente se considera un trastorno multifactorial con alta heredabilidad (50 - 75%), probablemente mayor en los casos de inicio temprano. Hasta la fecha, múltiples estudios han tratado de dilucidar los factores genéticos que contribuyen a la etiopatogenia de la obesidad<sup>44</sup>. Gracias al estudio de metaanálisis genómicos (GWAS), se descubrieron más de 150 variantes genéticas que presentan asociaciones con medidas de composición corporal y determinados parámetros relacionados con el peso corporal. Sin embargo, la fracción de la varianza del IMC explicado por estos estudios se estima que ronda únicamente un 2%.<sup>44</sup>

En los últimos años ha emergido la relación de *Sor11* con la obesidad. Se ha observado que este receptor promueve la inhibición de la lipólisis dependiente de insulina en los adipocitos, tanto bloqueando la hidrólisis de TAGs, como mediante su acción sobre el receptor de insulina aumentando la señalización de la misma, demostrando de este modo una implicación de *Sor11* con comorbilidades asociadas a la obesidad, tales como la resistencia a la insulina<sup>29</sup>. Puesto que *Sor11* favorece la señalización de insulina en tejido adiposo blanco<sup>29</sup>, los altos niveles que observamos en la expresión de este gen en este tejido en ratas sometidas a restricción calórica crónica, podrían ayudar a explicar porque estos animales presentan una mayor sensibilidad a insulina. Por otra parte, como la sobreexpresión de *Sor11* en el tejido adiposo bloquea la hidrólisis de TAGs a AGLs<sup>29</sup>, esto podría ayudar a mantener los depósitos

de grasa en situaciones de déficit energético crónico. Sin embargo, nuestros resultados plantean diversas dudas para las que serían necesarios más estudios y experimentos, pero que dada la duración de este trabajo fue imposible completar. Cuando sometimos a las ratas a un ayuno agudo de dos días, observamos un descenso en la expresión de *Sor11* tanto en tejido adiposo blanco, como en tejido adiposo pardo, tal y como habían descrito previamente Whittle y colaboradores en un estudio del año 2015<sup>35</sup>. Estos hechos aportan información muy relevante en relación a la regulación de la expresión de este gen, puesto que parece comportarse de forma contraria cuando las ratas se someten a restricción calórica crónica o a un ayuno agudo. Por otra parte, el hecho de que los niveles de expresión de *Sor11* no aumenten con DAG en el tejido adiposo blanco, o incluso lleguen a disminuir en depósitos como el visceral, parece contrario a los resultados obtenidos previamente por otros autores que observaron que los niveles de *Sor11* en tejido adiposo blanco subcutáneo y epididimal se correlacionaban positivamente con el peso de los ratones<sup>29</sup> y que la expresión de *Sor11* en tejido adiposo visceral en humanos se correlaciona positivamente con el IMC <sup>29</sup>. Esta diferencia en los resultados podría deberse por una parte al uso de distintas especies para llevar a cabo los experimentos, o podría deberse a los distintos grados de obesidad en los estudios realizados, puesto que en humanos sólo observaron un aumento estadísticamente significativo en los niveles de *ARNm* de *Sor11* en aquellas personas que presentaban un IMC superior a 40 y que se corresponde con un porcentaje de masa grasa probablemente muy superior al de los animales obesos de este estudio ( $\approx 20\%$  de su peso corporal). Sin embargo, existe otra explicación que nosotros creemos más plausible. Durante el año 2016, Berk et al<sup>45</sup> demostraron que los niveles circulantes de *Sor11*, realmente no tienen una correlación con la circunferencia de la cintura o con el IMC (ambos indicadores directos de la obesidad), sino que sus niveles estaban directamente relacionados con la cantidad de hemoglobina glicosilada (es decir con la diabetes) y con la cantidad de colesterol que no es de tipo lipoproteína de alta densidad (HDL). Si tenemos en cuenta que tanto la diabetes tipo II como los niveles de colesterol de tipo no-HDL, aumentan gradualmente con la obesidad, esto podría explicar porque tanto los niveles circulantes de *Sor11* como sus niveles de expresión a nivel adiposo se encontraron aumentados en estudios con pacientes/animales obesos, pero sin embargo en este trabajo de fin de máster no obtenemos tales resultados, puesto que el tratamiento con DAG durante 3 meses provocó cierta resistencia a la insulina pero sin que las ratas llegasen a desarrollar diabetes.

Cuando tratamos ratas con alloxan, generamos ratas diabéticas por destrucción de sus células  $\beta$ -pancreáticas, y lo que observamos fue un descenso en los niveles de expresión de *Sor11* en todos los depósitos de tejido adiposo blanco estudiados, estos resultados podrían deberse a que una de las funciones de *Sor11* es favorecer la sensibilidad de la insulina puesto que en su presencia, actúa sobre su receptor translocándolo hacia la membrana de la célula, pero en este modelo los niveles de insulina son prácticamente indetectables. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que las ratas tratadas con alloxan pierden mucho peso, ya que sus células son incapaces de internalizar la glucosa de la dieta, y cuando vuelven a tener insulina disponible al ser capaces de asimilar la glucosa de la dieta recuperan su peso normal; por ello, no podemos descartar que los efectos vistos en este experimento no sean directos de la falta de insulina, sino de la “desnutrición” que provocó este modelo donde los animales perdieron casi la totalidad de su masa grasa (datos no mostrados), por ello, en un futuro, deberían hacerse más experimentos con otros modelos de diabetes menos agresivos para separar los resultados provocados por la insulina (o su carencia) y aquellos debidos a la pérdida de grasa corporal.

La relación entre *Sor11* y señalización de insulina no es la única relación encontrada hasta el momento entre *Sor11* y fenómenos asociados a la obesidad y al metabolismo energético. Whittle y colaboradores demostraron que la forma soluble de *Sor11* suprime la termogénesis en el tejido adiposo pardo de una forma autónoma en las células, y que ratones que carecen de este gen están protegidos contra la obesidad inducida por la dieta debido a un aumento en el *browning* del tejido adiposo blanco y el hipermetabolismo<sup>35</sup>. Esto podría explicar los resultados obtenidos en el modelo de ratas sometidas a dieta alta en grasa, en el que, el aumento observado en la expresión de *Sor11* en tejido adiposo pardo, podría contribuir al descenso que se observa en la termogénesis durante la obesidad<sup>46</sup> sin embargo, para clarificar bien este punto sería muy importante analizar en todos nuestros modelos los niveles de *Sor11* circulante, y sobre todo, saber qué tejido es el principal contribuyente a estos niveles circulantes, y si la forma soluble de *Sor11* actúa de manera autocrina, paracrina y/o endocrina; cuestiones todas ellas que continúan sin esclarecerse.

Hasta la fecha no se ha descrito ninguna relación directa entre *Sor11* y *Rb1*, sin embargo, Petrov y colaboradores publicaron en 2016 un trabajo en el que observaron que los ratones con *Rb1* parcialmente inactivado, ratones *Rb1*<sup>+/-</sup>, presentaban un descenso en la expresión de *Sor11*<sup>37</sup>. Estos ratones también presentaban una mayor expresión de genes relacionados con la termogénesis, ya que *Rb1*, al igual que *Sor11*, reprime la termogénesis y el proceso de

*browning*, hecho que explica por qué tanto los ratones *knockout* para *Sor11* como para *Rb1* son resistentes a la obesidad<sup>29, 38-39</sup>. Sin embargo, estos datos no son suficientes para determinar si existe realmente una relación entre las rutas metabólicas de ambos genes. Por ello, en este trabajo inicialmente se llevó a cabo el estudio de la expresión de estos genes en modelos de rata con obesidad, restricción calórica y tratamientos hormonales como la leptina y farmacológicos que simulan diabetes, y en una línea celular de preadipocitos de ratón sin diferenciar y diferenciados a los que se les indujo el proceso de *browning*. Posteriormente se comparó la expresión de ambos genes para estudiar si presentaban un patrón de comportamiento igual, contrario o sin ningún tipo de asociación en busca de una posible relación entre ellos. Sin embargo, los modelos animales no arrojaron mucha información al respecto. Cuando analizamos la expresión de *Sor11* y *Rb1* en las células sometidas a los diferentes tratamientos encontramos que, cuando se produce la diferenciación de preadipocitos a adipocitos maduros, presentan patrones de expresión opuestos, es decir, la expresión de *Sor11* disminuye tras la diferenciación, siendo muy baja en adipocitos maduros, mientras que, la expresión de *Rb1* aumenta en todos los tratamientos con respecto a las células no diferenciadas, siendo este aumento mucho más acusado en aquellas células donde los marcadores de adipogénesis también son más elevados. Teniendo en cuenta que los fibroblastos embrionarios de ratón y la línea celular 3T3-L1 que carecen del gen *Rb1* son incapaces de experimentar diferenciación adipocitaria en respuesta al tratamiento con inductores adipogénicos estándar<sup>36</sup> y los resultados obtenidos en este estudio, parece claro que se necesita un aumento en la expresión de *Rb1* para que se lleve a cabo la adipogénesis y por lo tanto la formación de adipocitos maduros, tanto a blancos como marrones, si bien parece que valores de expresión superiores durante la diferenciación favorecen la formación de adipocitos blancos, puesto que el tratamiento con forskolina, que aumenta los marcadores de *browning*, disminuye los niveles de *Rb1*, algo que coincide perfectamente con el hecho de que este gen actúe como un regulador negativo de la termogénesis. Sin embargo, teniendo en cuenta nuestros resultados, el hecho de que *Sor11* actúe como un regulador negativo del *browning*, parece estar más relacionado con el hecho de que no se puede producir la diferenciación de los preadipocitos, que con la diferenciación a un tipo de adipocito u otro.

También analizamos a nivel central la expresión de *Sor11* ya que existen estudios que relacionan la expresión de este gen con el Alzheimer<sup>32</sup> y actualmente, existen investigaciones que plantean por sus características similares, una relación entre el Alzheimer y la diabetes,

llegando incluso a proponer denominar el Alzheimer como diabetes tipo III<sup>34</sup>. Además, se sabe que tanto la obesidad como un déficit en la expresión de *Sor11* son factores de riesgo para el Alzheimer<sup>32</sup>. Sin embargo, nosotros observamos que una restricción calórica crónica (que en teoría ayudaría a prevenir enfermedades como el Alzheimer), provoca un descenso en los niveles de expresión de *ARNm* de *Sor11* a nivel hipotalámico (y con ello, en teoría, un mayor riesgo de desarrollar Alzheimer). Esto podría deberse a que el hipotálamo, aun siendo muy importante como regulador del metabolismo energético, no es especialmente relevante en el Alzheimer, pero fue la única región cerebral con la que contábamos para la realización del presente trabajo. Por ello, estos datos no son suficientes para entender lo que ocurre a nivel central y sería necesario analizar no sólo hipotálamo, sino también otras partes del cerebro que tienen una mayor relación con el Alzheimer, como la corteza cerebral<sup>47</sup>.

En conclusión, teniendo en cuenta tantos los datos obtenidos en los modelos *in vivo* e *in vitro*, podemos decir que tanto la expresión de *Sor11* se ven modificadas por la dieta a nivel central y periférico, que la diabetes tipo I disminuye la expresión de *Sor11* en el tejido adiposo blanco, y que el descenso de la expresión de *Sor11* junto con el aumento de la expresión de *Rb1* son necesarios para la diferenciación a adipocitos maduros tanto blancos como pardos.

## CONCLUSIONES

1. La restricción calórica y la dieta alta en grasa a largo plazo modifican la expresión génica de *Sor11* y *Rb1* a nivel periférico, y de *Sor11* a nivel central.
2. La diabetes tipo I inducida con alloxan provoca una disminución en la expresión de *Sor11*, disminución que se ve corregida con el tratamiento de insulina, pero debido a las alteraciones que se producen en la masa grasa corporal no se puede descartar que los efectos se deban a estas alteraciones y no a la diabetes en sí.
3. Tanto *Sor11* como *Rb1* parecen ser reguladores críticos en el proceso de diferenciación de adipocitos, necesitándose un descenso en la expresión de *Sor11* y un aumento en *Rb1* para que se produzca el paso de preadipocito a adipocito maduro.



## BIBLIOGRAFÍA

1. Sikaris, K. A., *Clin Biochem Rev* 2004, 25 (3), 165-81.
2. Romieu, I.; Dossus, L.; Barquera, S.; Blottiere, H. M.; Franks, P. W.; Gunter, M.; Hwalla, N.; Hursting, S. D.; Leitzmann, M.; Margetts, B.; Nishida, C.; Potischman, N.; Seidell, J.; Stepien, M.; Wang, Y.; Westerterp, K.; Winichagoon, P.; Wiseman, M.; Willett, W. C., *Cancer Causes Control* 2017, 28 (3), 247-258.
3. Abdelaal, M.; le Roux, C. W.; Docherty, N. G., *Ann Transl Med* 2017, 5 (7), 161.
4. WHO, 2014.
5. Simmonds, M.; Llewellyn, A.; Owen, C. G.; Woolacott, N., *Obesity reviews : an official journal of the International Association for the Study of Obesity* 2016, 17 (2), 95-107.
6. Gicevic, S.; Aftosmes-Tobio, A.; Manganello, J. A.; Ganter, C.; Simon, C. L.; Newlan, S.; Davison, K. K., *Obesity reviews : an official journal of the International Association for the Study of Obesity* 2016, 17 (8), 724-34.
7. Gutierrez-Fisac, J. L.; Guallar-Castillon, P.; Leon-Munoz, L. M.; Graciani, A.; Banegas, J. R.; Rodriguez-Artalejo, F., *Obesity reviews : an official journal of the International Association for the Study of Obesity* 2012, 13 (4), 388-92.
8. Aranceta, J., Pérez, C., Alberdi, G., Ramos, N., Lázaro, S., *Revista española de cardiología* 2016, 69 (6), 579-587.
9. Romieu, I.; Dossus, L.; Barquera, S.; Blottiere, H. M.; Franks, P. W.; Gunter, M.; Hwalla, N.; Hursting, S. D.; Leitzmann, M.; Margetts, B.; Nishida, C.; Potischman, N.; Seidell, J.; Stepien, M.; Wang, Y.; Westerterp, K.; Winichagoon, P.; Wiseman, M.; Willett, W. C.; Balance, I. w. g. o. E.; Obesity, *Cancer causes & control : CCC* 2017, 28 (3), 247-258.
10. Roh, E.; Song, D. K.; Kim, M. S., *Exp Mol Med* 2016, 48, e216.
11. Rhea, E. M.; Salameh, T. S.; Logsdon, A. F.; Hanson, A. J.; Erickson, M. A.; Banks, W. A., *AAPS J* 2017.
12. Nadal, A.; Quesada, I.; Tuduri, E.; Nogueiras, R.; Alonso-Magdalena, P., *Nat Rev Endocrinol* 2017.
13. Claussnitzer, M.; Dankel, S. N.; Kim, K. H.; Quon, G.; Meuleman, W.; Haugen, C.; Glunk, V.; Sousa, I. S.; Beaudry, J. L.; Puvion, V.; Abdennur, N. A.; Liu, J.; Svensson, P. A.; Hsu, Y. H.; Drucker, D. J.; Mellgren, G.; Hui, C. C.; Hauner, H.; Kellis, M., *N Engl J Med* 2015, 373 (10), 895-907.
14. Livingstone, K. M.; Celis-Morales, C.; Lara, J.; Ashor, A. W.; Lovegrove, J. A.; Martinez, J. A.; Saris, W. H.; Gibney, M.; Manios, Y.; Traczyk, I.; Drevon, C. A.; Daniel, H.; Gibney, E. R.; Brennan, L.; Bouwman, J.; Grimaldi, K. A.; Mathers, J. C., *Obes Rev* 2015, 16 (8), 666-78.
15. Nettleton, J. A.; Follis, J. L.; Ngwa, J. S.; Smith, C. E.; Ahmad, S.; Tanaka, T.; Wojczynski, M. K.; Voortman, T.; Lemaitre, R. N.; Kristiansson, K.; Nuotio, M. L.; Houston, D. K.; Perala, M. M.; Qi, Q.; Sonestedt, E.; Manichaikul, A.; Kanoni, S.; Ganna, A.; Mikkila, V.; North, K. E.; Siscovick, D. S.; Harald, K.; McKeown, N. M.; Johansson, I.; Rissanen, H.; Liu, Y.; Lahti, J.; Hu, F. B.; Bandinelli, S.; Rukh, G.; Rich, S.; Boonij, L.; Dimitriou, M.; Ax, E.; Raitakari, O.; Mukamal, K.; Mannisto, S.; Hallmans, G.; Julia, A.; Ericson, U.; Jacobs, D. R., Jr.; Van Rooij, F. J.; Deloukas, P.; Sjogren, P.; Kahonen, M.; Djousse, L.; Perola, M.; Barroso, I.; Hofman, A.; Stirrups, K.; Viikari, J.; Uitterlinden, A. G.; Kalafati, I. P.; Franco, O. H.; Mozaffarian, D.; Salomaa, V.; Borecki, I. B.; Knekt, P.; Kritchevsky, S. B.; Eriksson, J. G.; Dedoussis, G. V.; Qi, L.; Ferrucci, L.; Orho-Melander, M.; Zillikens, M. C.; Ingelsson, E.; Lehtimäki, T.; Renstrom, F.; Cupples, L. A.; Loos, R. J.; Franks, P. W., *Human molecular genetics* 2015, 24 (16), 4728-38.
16. van Dijk, S. J.; Tellam, R. L.; Morrison, J. L.; Muhlhäusler, B. S.; Molloy, P. L., *Clinical epigenetics* 2015, 7, 66.
17. Ollikainen, M.; Ismail, K.; Gervin, K.; Kyllonen, A.; Hakkarainen, A.; Lundbom, J.; Jarvinen, E. A.; Harris, J. R.; Lundbom, N.; Rissanen, A.; Lyle, R.; Pietiläinen, K. H.; Kaprio, J., *Clin Epigenetics* 2015, 7, 39.
18. Keane, K. N.; Calton, E. K.; Carlessi, R.; Hart, P. H.; Newsholme, P., *Eur J Clin Nutr* 2017.

19. Kershaw, E. E.; Flier, J. S., *J Clin Endocrinol Metab* 2004, 89 (6), 2548-56.
20. Choe, S. S.; Huh, J. Y.; Hwang, I. J.; Kim, J. I.; Kim, J. B., *Front Endocrinol (Lausanne)* 2016, 7, 30.
21. Lapid, K.; Graff, J. M., *Adipocyte* 2017, 1-11.
22. Valencak, T. G.; Osterrieder, A.; Schulz, T. J., *Redox Biol* 2017, 12, 806-813.
23. Wu, J.; Bostrom, P.; Sparks, L. M.; Ye, L.; Choi, J. H.; Giang, A. H.; Khandekar, M.; Virtanen, K. A.; Nuutila, P.; Schaart, G.; Huang, K.; Tu, H.; van Marken Lichtenbelt, W. D.; Hoeks, J.; Enerback, S.; Schrauwen, P.; Spiegelman, B. M., *Cell* 2012, 150 (2), 366-76.
24. Algire, C.; Medrikova, D.; Herzig, S., *Biochim Biophys Acta* 2013, 1831 (5), 896-904.
25. Ishibashi, J.; Seale, P., *Science* 2010, 328 (5982), 1113-4.
26. Seale, P.; Bjork, B.; Yang, W.; Kajimura, S.; Chin, S.; Kuang, S.; Scime, A.; Devarakonda, S.; Conroe, H. M.; Erdjument-Bromage, H.; Tempst, P.; Rudnicki, M. A.; Beier, D. R.; Spiegelman, B. M., *Nature* 2008, 454 (7207), 961-7.
27. Chu, D. T.; Gawronska-Kozak, B., *Biochimie* 2017.
28. Wang, S.; Yang, X., *Cell Mol Life Sci* 2017, 74 (10), 1765-1776.
29. Schmidt, V.; Schulz, N.; Yan, X.; Schurmann, A.; Kempa, S.; Kern, M.; Bluher, M.; Poy, M. N.; Olivecrona, G.; Willnow, T. E., *J Clin Invest* 2016, 126 (7), 2706-20.
30. Schmidt, V.; Subkhangulova, A.; Willnow, T. E., *Cell Mol Life Sci* 2017, 74 (8), 1475-1483.
31. Morwald, S.; Yamazaki, H.; Bujo, H.; Kusunoki, J.; Kanaki, T.; Seimiya, K.; Morisaki, N.; Nimpf, J.; Schneider, W. J.; Saito, Y., *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997, 17 (5), 996-1002.
32. Willnow, T. E.; Andersen, O. M., *J Cell Sci* 2013, 126 (Pt 13), 2751-60.
33. Davis, W. A.; Zilkens, R. R.; Starkstein, S. E.; Davis, T. M.; Bruce, D. G., *Diabetologia* 2017, 60 (1), 89-97.
34. Kandimalla, R.; Thirumala, V.; Reddy, P. H., *Biochim Biophys Acta* 2017, 1863 (5), 1078-1089.
35. Whittle, A. J.; Jiang, M.; Peirce, V.; Relat, J.; Virtue, S.; Ebinuma, H.; Fukamachi, I.; Yamaguchi, T.; Takahashi, M.; Murano, T.; Tatsuno, I.; Takeuchi, M.; Nakaseko, C.; Jin, W.; Jin, Z.; Campbell, M.; Schneider, W. J.; Vidal-Puig, A.; Bujo, H., *Nat Commun* 2015, 6, 8951.
36. Moreno-Navarrete, J. M.; Petrov, P.; Serrano, M.; Ortega, F.; Garcia-Ruiz, E.; Oliver, P.; Ribot, J.; Ricart, W.; Palou, A.; Bonet, M. L.; Fernandez-Real, J. M., *Diabetes* 2013, 62 (6), 1923-31.
37. Petrov, P. D.; Bonet, M. L.; Reynes, B.; Oliver, P.; Palou, A.; Ribot, J., *PLoS One* 2016, 11 (5), e0155361.
38. Petrov, P. D.; Palou, A.; Bonet, M. L.; Ribot, J., *J Cell Physiol* 2016, 231 (9), 1941-52.
39. Petrov, P. D.; Ribot, J.; Palou, A.; Bonet, M. L., *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2015, 308 (2), E172-83.
40. Varela-Rodriguez, B. M.; Pena-Bello, L.; Juiz-Valina, P.; Vidal-Bretal, B.; Cordido, F.; Sangiao-Alvarellos, S., *Sci Rep* 2016, 6, 29898.
41. Zebisch, K.; Voigt, V.; Wabitsch, M.; Brandsch, M., *Anal Biochem* 2012, 425 (1), 88-90.
42. Suenaga, M.; Matsui, T.; Funaba, M., *J Vet Med Sci* 2010, 72 (3), 373-7.
43. Pfaffl, M. W., *Nucleic Acids Res* 2001, 29 (9), e45.
44. Serra-Juhe, C.; Martos-Moreno, G. A.; Bou de Pieri, F.; Flores, R.; Gonzalez, J. R.; Rodriguez-Santiago, B.; Argente, J.; Perez-Jurado, L. A., *PLoS Genet* 2017, 13 (5), e1006657.
45. Berk, K. A.; Vongprommek, R.; Jiang, M.; Schneider, W. J.; Timman, R.; Verhoeven, A. J.; Bujo, H.; Sijbrands, E. J.; Mulder, M. T., *Atherosclerosis* 2016, 254, 67-72.
46. Lecoultre, V.; Ravussin, E., *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care* 2011, 14 (1), 1-6.
47. Sepulcre, J.; Grothe, M. J.; Sabuncu, M.; Chhatwal, J.; Schultz, A. P.; Hanseeuw, B.; El Fakhri, G.; Sperling, R.; Johnson, K. A., *JAMA Neurol* 2017, 74 (7), 813-820.

## ANEXO I

**Tabla 1.** Secuencia de los cebadores utilizados en este estudio.

Gen	Secuencia sentido (5'----3')	Secuencia antisentido (5'----3')	Nº Acceso
<i>SorII rata</i>	AACACCTGTCTTCGCAACCA	CCGGAAGTGTCTGCAT	NM_053519.1
<i>SorII ratón</i>	TCGGCTTCCAGTGCAGAAC	AGAGTAGTCCCCGCAGTCAT	NM_011436.3
<i>Rb1 rata</i>	TGCGCTTTGACATCGAAGGA	TGGAATTTGGACTCCGCTGG	NM_017045.1
<i>Rb1 ratón</i>	TGCATGGCTTTCAGATTCACC	AGAGGACAAGCAGGTTCAAGG	NM_009029.2
<i>UCPI ratón</i>	ACTGCCACACCTCCAGTCATT	CTTGCCTCACTCAGGATTGG	NM_009463.3
<i>CIDEA ratón</i>	AAACCATGACCGAAGTAGCC	AGGCCAGTTGTGATGACTAAGAC	NM_007702.2
<i>PPAR<math>\gamma</math> ratón</i>	GGTGTGATCTTAACTGCCGGA	ACCTGATGGCATTGTGAGACA	NM_001127330.2

**Tabla 2.** Mezcla de la RT.

Mezcla de la RT	Volumen/pocillo ( $\mu$ l)
Buffer 5x First Strand ( <i>Invitrogen</i> )	6
dNTPs ( <i>Thermo Scientific</i> )	6
MgCl <sub>2</sub> ( <i>Ambion</i> )	1,5
Cebadores de RT ( <i>Invitrogen</i> )	0,17
<i>Rnase Out</i> ( <i>Invitrogen</i> )	0,25
RT·M·MLV ( <i>Invitrogen</i> )	1,5
H <sub>2</sub> O estéril ( <i>Sigma</i> )	4,58

**Tabla 3.** Programa de la RT.

<b>Etapa</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Tiempo (min)</b>
Retrotranscripción	37	95
	42	15
Desnaturalización	95	5
Enfriamiento	4	∞

**Tabla 4.** Mezcla de la qRT-PCR.

<b>Mezcla de la qRT-PCR</b>	<b>Volumen/pocillo (μl)</b>
<i>PowerUp SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems)</i>	8,5
<i>Cebador Forward (Invitrogen)</i>	0,068
<i>Cebador Reverse (Invitrogen)</i>	0,068
H <sub>2</sub> O estéril ( <i>Sigma</i> )	6,4

**Tabla 5.** Etapas de la qRT-PCR.

<b>Etapa</b>	<b>Ciclos</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Tiempo (s)</b>
Incubación	1	95	600
		95	600
Amplificación	40	60	45
		72	4
Enfriamiento		40	10

Gracias a mis directores del trabajo fin de Máster, la Dra. Susana Sangiao Alvarellos y el Dr. Fernando Cordido Carballido, por darme la oportunidad de formar parte de su proyecto de investigación, por toda la confianza depositada en mí y por haberme ayudado y guiado durante todo el trabajo. En especial, gracias a Susana por aguantar la brasa de tanta pregunta y tanta corrección y por sus ánimos y apertas en cada mail.

Gracias a todo el personal del Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña por su colaboración, y en concreto a los componentes del grupo de Endocrino, en especial a Paula, no sé cómo agradecerte ya toda tu ayuda, por tantos litros de café compartidos que nos ayudaban a aguantar hasta que no había rastro de vida humana en el INIBIC, por tus clases de informática (básica ;)), por toda tu paciencia y por todo lo que he aprendido contigo, y de ti.

Gracias a mi familia por hacer posible la realización de este Máster, por comprender y aguantar mi mal humor de estos últimos meses y por apoyarme siempre en todo. Gracias a mis compañeros del máster por hacerme sentir tan a gusto todo el curso, por los ánimos y porque juntos hemos aprendido a trabajar en equipo. Gracias a mis amigos, por entender mi falta de tiempo para verlos y mandarme mucho ánimo, y en especial a mi querida Paula, porque un año más has estado ahí a mi lado cada día, para lo bueno y lo no tan bueno, siendo uno de mis mayores pilares, aunque ahora nuestros caminos se bifurquen un poco y no sepamos qué hacer con nuestras vidas, si algo sé es que no te vas librar de esta pesada tan fácilmente. Y por último y no menos importante, unas gracias enormes a mi novio Sergio, por soportar mi estrés, mi mal humor y mi agobio siempre con una sonrisa y por estar ahí día a día diciéndome: tu puedes.