



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>



Universitat Autònoma de Barcelona

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

FACULTAD DE VETERINARIA

CENTRO DE BIOTECNOLOGÍA ANIMAL Y TERAPIA GÉNICA

**TRATAMIENTO DE LA DIABETES Y LA
OBESIDAD MEDIANTE UNA TERAPIA
GÉNICA CON FGF21**

CLAUDIA JAMBRINA PALLARÉS

Este trabajo experimental se ha realizado bajo la dirección de la Dra. Fàtima Bosch i Tubert y la Dra. Verónica Jiménez Cenzano en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y en el Centro de Biotecnología Animal y Terapia Génica.

CLAUDIA JAMBRINA PALLARÉS

FÀTIMA BOSCH TUBERT

VERÓNICA JIMÉNEZ CENZANO

SEPTIEMBRE 2017

BELLATERRA

A mis padres

Una tesis es resultado del trabajo de muchas personas a las que quiero mostrar mi más sincero agradecimiento.

En primer lloc voldria agrair a la Dra. Fàtima Bosch la oportunitat de poder fer la tesis al seu grup, amb un ambient i unes condicions envejables. Moltes gràcies per la teva dedicació i entusiasme, per tota l'energia ayesada sobre el projecte.

Muchísimas gracias a mi co-directora Vero. Muchas gracias por confiar en mí y sobre todo, por cuidar tanto de que todo saliera como debía. Gracias por todo lo que me has enseñado, por ser paciente y comprensiva y por tu motivación en los momentos más difíciles.

Este trabajo ha sido realizado gracias a la financiación recibida del Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO) y FEDER, Plan Nacional I+D+I (SAF2014-54866R), de la Generalitat de Catalunya (2014 SGR-1669 y el premio ICREA Academia a F.B.) y de la *European Foundation for the Study of Diabetes (EFSD/MSD European Research Programme on Novel Therapies for Type 2 Diabetes, 2013)*.

μCT	Tomografía micro-computarizada
5-HT2C	<i>5-hydroxytryptamine receptor 2C</i>
AAP	Proteína de activación de ensamblaje
AARE	<i>Amino acid response element</i>
AAV	Vectores virales adenoasociados
ADIPOQ	Adiponectina
AMPA	<i>α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid</i>
AMPK	<i>5'-AMP-activated protein kinase</i>
ATF2	<i>Activating transcription factor 2</i>
ATF4	Activador del factor de transcripción 4
BAT	Tejido adiposo marrón
BMC	Contenido mineral óseo
BMD	Densidad mineral ósea
BS/BV	Ratio entre la superficie ósea y el volumen óseo
BV	Volumen óseo
BV/TV	Ratio entre el volumen óseo y el volumen tisular
CBATEG	Centro de biotecnología animal y terapia génica
CD68	<i>Cluster of Differentiation 68</i>
CDKAL1	<i>Cyclin-dependent kinase 5 regulatory subunit associated protein 1-like 1</i>
CDKN2A/2B	<i>Cyclin-dependent kinase 4 inhibitor B</i>
chow	Dieta estándar
DAB	Diaminobenzidina
db/db	Ratón deficiente para el receptor de la leptina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	Deoxinucleósidos trifosfato
DPP4	<i>Dipeptidyl peptidase 4</i>
dsAAV	AAV de doble cadena de DNA
DT1	Diabetes tipo 1
DT2	Diabetes tipo 2
EEM	Error Estándar de la media
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>
eWAT	Tejido adiposo blanco epididimal
F4/80	<i>EGF-like module-containing mucin-like hormone receptor-like 1</i>
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i>
FC	<i>Fold changes</i>
FFA	Ácidos grasos libres
FGF21	Factor de crecimiento fibroblástico 21

FGFRs	Receptores de FGF
FGFs	Factores de Crecimiento Fibroblástico
FTO	<i>Fat mass and obesity-associated protein</i>
FXR	<i>Farsenoid-X receptor</i>
GABA	<i>γ-aminobutyric acid</i>
GK	Glucoquinasa
GLPR1	<i>Glucagon-like peptide 1 receptor</i>
GRB14	<i>Growth factor receptor-bound protein 14</i>
GWA	<i>Genome-wide association</i>
h	Horas
hAAT	Promotor de la α1-antitripsina humana
HCC	Carcinoma hepatocelular
HCR	Región control del <i>locus</i> de la apolipoproteína E
HD	<i>High dose</i>
HDAC3	<i>Histone deacetylase 3</i>
HFD	Dieta alta en lípidos
HGFR	<i>Hepatocyte growth factor receptor</i>
HS	<i>Horse Serum</i>
HSGAG	<i>Heparan sulfat glycosaminoglycan</i>
HSL	Lipasa sensible a hormonas
HSPG	<i>Heparan sulfate proteoglycan</i>
iBAT	Tejido adiposo marrón interescapular
ID	<i>Intermediate dose</i>
IGF1	Factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1
IGFBP1	<i>Insulin-like Growth Factor Binding Protein 1</i>
IL-1β	Interleucina 1β
IMC	índice de masa corporal
IRS1	<i>Insulin receptor substrate 1</i>
IRS2	<i>Insulin receptor substrate 2</i>
ITRs	Repeticiones terminales invertidas
ITT	Test de la tolerancia a la insulina
iWAT	Tejido adiposo blanco inguinal
Kb	Kilobases
Kcal	Kilocalorias
Kg	Kilogramos
KLF14	<i>Krüppel-like factor 14</i>
LD	<i>Low dose</i>

LEPR	<i>Receptor de leptina</i>
m²	Metros al cuadrado
MAC2	<i>Galectin-3</i>
MC4R	Receptor 4 de la melanocortina
min	Minuto
MODY	<i>Madurity Onset Diabetes of the Young</i>
MS	Músculo esquelético
MTNR1B	<i>Melatonin receptor 1B</i>
NAFLD	Enfermedad del hígado graso no alcohólico
NASH	Esteatohepatitis no alcohólica
NBRE	<i>Nerve growth factor-induced clone B response element</i>
NF-κB	<i>Nuclear factor κ-light-chain-enhancer of activated β cells</i>
NUR77	<i>Nuclear hormone receptor 77</i>
ob/ob	Ratón deficiente para el gen de la leptina
oFGF21	FGF21 optimizado
OMS	Organización mundial de la salud
ORF	Marcos de lectura abiertos
pA	Secuencia de poliadenilación de la β-globina de conejo
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDGFR	<i>Platelet-derived growth factor receptor</i>
PEG	Polietilenglicol
PGC1α	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor-γ co-activator 1α</i>
PNH	Primate no humano
POMC	Neuronas <i>Pro-opiomelanocortin</i>
PPAR	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor</i>
PPARα	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor-α</i>
PPARγ	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor gamma</i>
PPRE	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor response element</i>
qPCR	PCR cuantitativa
rAAV	Vector AAV recombinante
RB	<i>Roller Bottles</i>
REV-ERBα	<i>Nuclear receptor subfamily 1, group D, member 1</i>
RNA	Ácido ribonucleico
RORα	<i>Retinoid-related orphan receptor-α</i>
RORE	<i>Retinoid-related orphan receptor response element</i>
RT-PCR	<i>Real Time PCR</i>

rWAT	Tejido adiposo blanco retroperitoneal
RXR	<i>Retinoid X receptor</i>
RXRβ	<i>Retinoid X receptor-β</i>
SIDA	Síndrome de la inmunodeficiencia adquirida
SIRT1	<i>Sirtuin 1</i>
SGLT2	Contransportador 2 de sodio-glucosa
SLC30A8	<i>Solute carrier family 30 member 8</i>
SNC	Sistema nervioso central
ssDNA	Cadena simple de DNA
TBG	Promotor de la globulina de unión a tiroxina
Tb.N	Número de trabéculas
Tb.Sp	Separación trabecular
Tb.Th	Grosor trabecular
TCF7L2	<i>Transcriptor factor 7-like 2</i>
TG	Triglicéridos
THR	Receptor de la hormona tiroidea
TNFα	Factor de necrosis tumoral α
TZD	Tiazolidinedionas
UAB	Universidad Autónoma de Barcelona
UCP1	Proteína desacopladora 1
UV	Luz ultravioleta
V	Voltios
vg	Genomas virales
WAT	Tejido adiposo blanco
WB	Western Blot
ZDF	Ratas <i>Zucker Diabetes Fatty</i>

I. PRESENTACIÓN	1
II. INTRODUCCIÓN	5
1. DIABETES MELLITUS	7
1.1. Diabetes tipo 2.....	8
1.1.1. <i>Patogenia de la diabetes tipo 2</i>	8
1.1.2. <i>Susceptibilidad genética y factores ambientales en la diabetes tipo 2</i> ...	12
2. OBESIDAD	14
2.1. Tipos de obesidad en humanos	15
2.2. Complicaciones de la obesidad.....	16
3. TRATAMIENTOS ACTUALES PARA LA DIABETES TIPO 2 Y LA OBESIDAD.....	17
3.1. Recomendaciones farmacoterapéuticas para pacientes diabéticos tipo 2	17
3.2. Recomendaciones farmacoterapéuticas para pacientes obesos.....	19
4. FACTOR DE CRECIMIENTO FIBROBLÁSTICO 21 (FGF21)	21
4.1. Familia de los factores de crecimiento fibroblástico	21
4.2. Regulación y señalización de FGF21	22
4.3. Efectos de FGF21	23
4.4. Perspectiva del uso de FGF21 como fármaco contra la DT2 y la obesidad	26
5. TERÁPIA GÈNICA IN VIVO CON VECTORES ADENOASOCIADOS (AAV)....	28
5.1. Biología de los virus adenoasociados	28
5.2. Vectores virales adenoasociados recombinantes.....	29
5.3. Transferencia de genes al hígado mediante vectores AAV	32
III. OBJETIVOS	35
IV. RESULTADOS	39
1. CONSTRUCCIÓN DE UN VECTOR VIRAL ADENOASOCIADO CODIFICANTE PARA LA PROTEÍNA FGF21 MURINA.....	41

2. ESTUDIO DEL EFECTO DEL TRATAMIENTO CON AAV8-FGF21 EN RATONES CON OBESIDAD INDUCIDA POR UNA DIETA ALTA EN LÍPIDOS	42
2.1. Reversión duradera de la obesidad mediante AAV8-FGF21	44
2.2. Expresión y secreción continua de FGF21 en animales tratados con AAV8-FGF21.....	48
2.3. Reversión de la hipertrofia y la inflamación del eWAT inducidas por la dieta HFD	50
2.4. El tratamiento con AAV8-FGF21 aumenta el gasto energético sin inducir <i>browning</i> en el tejido adiposo blanco subcutáneo	54
2.5. Reversión de la esteatosis hepática, la inflamación y la fibrosis inducidas por dieta alta en lípidos	59
2.6. Reversión de la resistencia a la insulina inducida por dieta alta en lípidos	62
2.7. Seguridad a largo plazo del tratamiento con AAV8-FGF21	65
3. ESTUDIO DEL EFECTO DEL TRATAMIENTO CON AAV8-FGF21 EN RATONES OB/OB.....	69
3.1. Disminución del peso corporal en ratones ob/ob tras una única administración de AAV8-FGF21	70
3.2. Expresión y secreción sostenida de FGF21 en animales ob/ob tratados con AAV8-FGF21.....	72
3.3. Disminución de la hipertrofia y la inflamación del eWAT en animales ob/ob tratados con AAV8-FGF21	73
3.4. Disminución del peso y la esteatosis del hígado de animales ob/ob tratados con AAV8-FGF21	75
3.5. Mejora de la glucemia y de la sensibilidad a la insulina en ratones ob/ob tratados con AAV8-FGF21	75
V. DISCUSIÓN.....	79
VI. CONCLUSIONES	89

VII. MATERIALES Y MÉTODOS	93
1. MATERIALES.....	95
1.1. Animales	95
1.2. Cepas bacterianas	95
1.3. Anticuerpos.....	95
1.4. Reactivos.....	96
1.5. Plásmidos	96
2. MÉTODOS	98
2.1. Técnicas básicas de DNA	98
2.1.1. Preparación del DNA plasmídico.....	98
2.1.2. Digestión del DNA con enzimas de restricción	98
2.1.3. Desfosforilación de fragmentos de DNA	99
2.1.4. Generación de extremos romos de fragmentos de DNA	99
2.1.5. Construcción de moléculas híbridas: ligación	99
2.1.6. Transformación en células competentes <i>E.coli</i> XL2-blue	99
2.1.7. Separación y visualización del fragmento de DNA	100
2.2. Células eucariotas en cultivo	100
2.2.1. Células HEK293	100
2.2.2. Transfección de DNA en células en cultivo.....	101
2.3. Producción, purificación y titulación de vectores virales adenoasociados.....	101
2.3.1. Producción y purificación.....	101
2.3.2. Titulación de genomas virales	102
2.3.3. Cuantificación de las partículas virales por tinción de plata.....	103
2.4. Administración sistémica de los vectores virales.....	104
2.5. Análisis de expresión del mRNA por RT-PCR.....	104
2.5.1. Extracción de RNA	104
2.5.2. Síntesis de cDNA.....	105
2.5.3. Real Time PCR.....	105

2.6. Extracción y análisis de proteínas	106
2.6.1. <i>Extracción de proteínas</i>	106
2.6.2. <i>Determinación de la concentración de proteínas</i>	106
2.6.3. <i>Análisis de la expresión de proteínas mediante Western Blot</i>	107
2.6.3.1. <i>Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)</i>	107
2.6.3.2. <i>Transferencia de proteínas a membranas e inmunodetección</i>	107
2.7. Análisis histológico.....	108
2.7.1. <i>Tinción con hematoxilina/eosina</i>	108
2.7.2. <i>Determinación del área media de los adipocitos</i>	108
2.7.3. <i>Inmunohistoquímica contra Mac-2</i>	108
2.7.4. <i>Tinción Tricrómica de Masson</i>	109
2.8. Determinación del consumo de alimentos.....	109
2.9. Determinación de parámetros séricos.....	109
2.9.1. <i>Glucosa</i>	110
2.9.2. <i>Insulina</i>	110
2.9.3. <i>Adiponectina</i>	110
2.9.4. <i>FGF21</i>	110
2.9.5. <i>Leptina</i>	110
2.9.6. <i>IGFBP1</i>	110
2.9.7. <i>IGF-1</i>	111
2.10. Determinación del contenido de triglicéridos hepáticos	111
2.11. Test de tolerancia a la insulina.....	111
2.12. Calorimetría indirecta	112
2.13. Análisis óseo.....	112
2.14. Test de Open-field	112
2.15. Análisis estadístico	113
VIII. BIBLIOGRAFÍA	115

I. PRESENTACIÓN

La obesidad y la diabetes tipo 2 (DT2) son dos patologías estrechamente relacionadas que representan un grave problema de salud, económico y social debido a su alta prevalencia a nivel mundial. Las terapias disponibles actualmente no son del todo eficaces y no se adaptan a la amplia heterogeneidad de población obesa y/o con resistencia a la insulina. Por lo tanto, existe la necesidad urgente de desarrollar nuevas aproximaciones terapéuticas más eficaces para contrarrestar estas enfermedades metabólicas.

A este respecto, el factor de crecimiento fibroblástico 21 (FGF21) se considera un prometedor agente terapéutico para la DT2 y la obesidad. FGF21 es secretado por diversos órganos, principalmente el hígado y actúa sobre múltiples tejidos como una hormona endocrina regulando la homeostasis energética. Durante la última década, FGF21 se ha erigido como un potente regulador metabólico capaz de mejorar el metabolismo de la glucosa y de los lípidos, así como de lograr una reducción de la adiposidad y del peso corporal. Sin embargo, la proteína nativa posee escasas propiedades farmacocinéticas dado que la vida media en suero es muy corta, es muy susceptible a la proteólisis y agrega con facilidad. Por este motivo, la industria farmacéutica está realizando grandes esfuerzos para desarrollar moléculas análogas o miméticas de FGF21 que mejoren el perfil cinético y permitan su producción a gran escala. No obstante, las alteraciones de la molécula nativa pueden inducir respuestas inmunitarias ante una proteína no reconocida como propia. Asimismo, el hecho de alterar la proteína nativa podría originar que señalizase de forma inespecífica al margen de la vía canónica de FGF21. Además, los análogos/miméticos de FGF21 requieren de administración periódica, hecho que supone una contrariedad para los pacientes.

En este sentido, la terapia génica presenta la ventaja de permitir alcanzar niveles circulantes sostenidos de la proteína nativa con una única administración del vector terapéutico, lo que la convierte en una estrategia terapéutica muy atractiva. Los vectores virales adenoasociados (AAV) son virus modificados genéticamente en los cuales se han reemplazado todos los genes virales sustituyéndolos por el constructo con el gen terapéutico. Existen múltiples serotipos de AAV con diferentes tropismos, así que la elección de un serotipo, junto con el uso de promotores específicos, permite restringir la sobreexpresión del gen de interés en el tejido diana de elección. En esta tesis doctoral, se usó un AAV de serotipo 8 para sobreexpresar FGF21 específicamente en hígado, principal secretor natural de FGF21, a fin de poder obtener niveles circulantes constantes elevados del factor.

La administración intravenosa del vector terapéutico AAV8-FGF21 permitió la secreción constante del factor al torrente circulatorio durante más de un año. El incremento de los niveles circulantes de FGF21 produjo una pérdida de peso corporal dependiente de la dosis de vector administrada en dos modelos murinos de obesidad: 1) ratones C57BL/6 alimentados con dieta alta en lípidos tratados con AAV8-FGF21 a dos edades diferentes y 2) ratones ob/ob. La administración del vector AAV8-FGF21 aumentó el gasto energético y redujo el acúmulo patológico de lípidos en el tejido adiposo y en hígado revirtiendo la inflamación de ambos tejidos. Asimismo, el tratamiento con AAV8-FGF21 normalizó la insulinemia en ayuno y mejoró la sensibilidad a la insulina. Aunque la dosis más alta de AAV8-FGF21 llegó a normalizar el peso de los ratones con obesidad inducida por la dieta, nunca produjo una disminución de peso por debajo de los niveles de los controles sanos al inicio del estudio. Además, se comprobó que el tratamiento con el vector AAV8-FGF21 no causó daño alguno en la estructura y la masa óseas. También se observó que la sobreexpresión de FGF21 prevenía el desarrollo de hepatocarcinomas inducidos por el consumo crónico de dieta alta en lípidos. Estos datos corroboraron la eficacia y la seguridad del tratamiento y enfatizan el potencial de esta estrategia de terapia génica con FGF21 para tratar en un futuro la DT2 y la obesidad.

II. INTRODUCCIÓN

1. DIABETES MELLITUS

La diabetes mellitus se define como el conjunto de enfermedades metabólicas de múltiple etiología caracterizadas por hiperglucemia crónica con perturbación en el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas resultante de defectos en la secreción de insulina, la acción de la insulina o ambas (WHO, 1999). Los efectos de la diabetes mellitus comportan daños a largo término, disfunción y fallo de varios órganos. Entre ellos se incluyen retinopatías, nefropatías, cardiopatías, disfunciones cerebrovasculares y vasculares periféricas (Gregg et al., 2016).

En la actualidad, la diabetes ha alcanzado proporciones epidémicas, convirtiéndose en una de las mayores emergencias sanitarias a nivel mundial. Se estima que 415 millones de adultos padecen la enfermedad y que 318 millones más tienen disminuida la tolerancia a la glucosa, hecho que les predispone a desarrollar la patología en el futuro (International Diabetes Federation (IDF), 2015). Se estima que unos 64 millones de afectados viven en Europa y 62 en América (WHO, 2016). La Organización Mundial de la Salud (OMS) considera que, a nivel global, la diabetes es la octava causa de mortalidad en ambos sexos y la quinta en mujeres (WHO, 2016). Concretamente, la cifra mundial de muertos a causa de diabetes durante el 2015 se estima en 4.96 millones de personas. Además, los gastos médicos de los pacientes con diabetes son entre dos y tres veces superiores a los del resto de la población (International Diabetes Federation (IDF), 2015).

La diabetes se clasifica por su etiología. Hay dos categorías mayoritarias de diabetes: la diabetes tipo 1 (DT1), la diabetes tipo 2 (DT2). La diabetes tipo 1 se debe a la destrucción autoinmune de las células β del páncreas, lo que provoca deficiencia en la producción y secreción de insulina. La aparición suele ocurrir durante la infancia o la juventud y los pacientes de diabetes tipo 1 generalmente necesitan insulina exógena diaria para mantener los niveles de glucemia. La principal causa de la diabetes tipo 2 es la resistencia a la insulina (principalmente en hígado, músculo y tejido adiposo) que conlleva a una pérdida progresiva de la capacidad para secretar insulina por parte de las células β del páncreas. Suele aparecer en adultos aunque la incidencia en niños aumenta cada vez más (International Diabetes Federation (IDF), 2015).

Además de estas dos grandes categorías, existen otros tipos de diabetes como la diabetes gestacional. Se trata de cualquier grado de intolerancia a la glucosa con inicio o primer reconocimiento a partir del segundo trimestre de gestación. Las mujeres a quienes se les diagnostica y sus hijos tienen mayor riesgo de desarrollar

diabetes tipo 2. Más minoritarios son síndromes diabéticos monogénicos tales como los MODY (*Maturity-onset diabetes of the young*), debidos a defectos autosómicos dominantes en genes implicados en la función de las células β del páncreas (American Diabetes Association, 2016).

1.1. Diabetes Tipo 2

La DT2 es la forma más común de la enfermedad afectando al 90-95% del total de los pacientes diabéticos. La mayoría de los afectados son obesos y, los que no lo son por criterios de peso, suelen tener un aumento del porcentaje de grasa corporal distribuido principalmente en la región abdominal (American Diabetes Association, 2016). La DT2 es un grave problema cuya prevalencia aumenta alarmantemente en todo el mundo. Aunque previamente se diagnosticaba principalmente en adultos, en la actualidad, la edad de diagnóstico ha disminuido y cada vez hay más niños afectados, hecho que se relaciona con el aumento de la prevalencia del sobrepeso infantil (Cheng, 2005).

Con frecuencia, este tipo de diabetes no se diagnostica durante los primeros años de la enfermedad dado que la hiperglucemia se desarrolla gradualmente y, a menudo, los efectos iniciales no son tan graves como para poder relacionarlos con los síntomas clásicos de la diabetes (American Diabetes Association, 2016). Además, del componente genético, el incremento de la incidencia de la DT2 es multifactorial y está asociado al envejecimiento de la población, el desarrollo económico y al estilo de vida, lo que ha conllevado una gran heterogeneidad en la patofisiología y el fenotipo de la DT2 a nivel global (Gregg et al., 2016; Smith et al., 2010a).

1.1.1. Patogenia de la diabetes tipo 2

La DT2 es un trastorno metabólico caracterizado por la resistencia a la insulina en los tejidos periféricos y la deficiencia relativa en la secreción de insulina por parte de las células β del páncreas como consecuencia de la hiperglucemia sostenida no resuelta (Ashcroft and Rorsman, 2012; Butler et al., 2003). La hiperplasia de la célula β y la hiperinsulinemia en respuesta a la resistencia a la insulina se produce en el periodo pre-clínico de la enfermedad (Quan et al., 2013). Cuando la hiperglucemia es crónica, llega un punto en el que las células β no pueden compensar la demanda de insulina y entran en fase de agotamiento. En esta fase se produce hipotrofia, hipoplasia, des-diferenciación y disminución de la proliferación de la célula β (Cerf, 2015). Además, la hiperglucemia crónica también da lugar a la disfunción de las

células β , las cuales disminuyen la síntesis, señalización y secreción de insulina para finalmente morir por apoptosis, dando lugar a la DT2 (Cerf, 2015).

Los pacientes diabéticos de tipo 2 se caracterizan por el incremento de la concentración de ácidos grasos libres (FFA) en sangre a lo largo del día (Figura 1) (Reaven et al., 1988). Los FFA se almacenan como triglicéridos (TG) en los adipocitos y suponen una fuente de energía importante en condiciones de ayuno. La insulina es un regulador negativo de la lipólisis que limita la liberación de FFA de los adipocitos mediante la inhibición de la lipasa sensible a hormonas (HSL). En la DT2, la capacidad de la insulina para inhibir la lipólisis y reducir los FFA circulantes se ve notablemente reducida (Figura 1) (Jansson et al., 1994). En este sentido, la ingesta excesiva de calorías y la falta de actividad física conducen al aumento del tamaño de los adipocitos a causa del incremento de la deposición de TG en dichas células (Sattar and Gill, 2014). A medida que aumenta la adiposidad, los adipocitos hipertrofiados no son capaces de almacenar eficazmente más lípidos y se produce una alteración en la acumulación de TG, que acaban depositándose en compartimentos ectópicos, como el hígado, el músculo y el tejido adiposo perivascular, pericárdico y omental a la vez que se favorece la lipólisis (Figura 1) (Guilherme et al., 2008; Loher et al., 2016; Sattar and Gill, 2014). El incremento en la liberación de FFA por parte de los adipocitos provoca también la liberación de citoquinas pro-inflamatorias, como por ejemplo, el factor de necrosis tumoral α (TNF- α) o la interleucina 1 β (IL-1 β). Esto provoca que aumente aún más la lipólisis y se inhiba la expresión de los genes que son necesarios para la señalización de la insulina y la diferenciación de los adipocitos, proporcionando la base molecular de la resistencia a la insulina en el tejido adiposo (Figura 1) (Ruan et al., 2002). Aunque los macrófagos activados en el tejido adiposo producen la mayor parte de citoquinas pro-inflamatorias, otros tipos celulares como los linfocitos B y las células T también pueden secretar este tipo de agentes inmunomoduladores, ayudando a aumentar la inflamación local y sistémica, contribuyendo así a la resistencia a la insulina (Strissel et al., 2014). Los excesivos niveles circulantes de TG y FFA secretados por los adipocitos resultan en una acumulación ectópica de lípidos en otros tejidos no adiposos y junto con TNF- α , desencadena la resistencia a la insulina a nivel sistémico y afecta profundamente a la función y la masa de células β (Kahn et al., 2006). En este contexto de resistencia a la insulina, el músculo esquelético y el tejido adiposo disminuyen la captación de glucosa y la insulina no es capaz de inhibir la lipólisis en el tejido adiposo. A su vez, la insulina tampoco puede suprimir la gluconeogénesis hepática y lo que conlleva un aumento en la producción de glucosa. La esteatosis

hepática que precede a la DT2 manifiesta, se asocia habitualmente a la obesidad, particularmente a la visceral (Taylor, 2008). Ésta representa una causa determinante en la reducción de la sensibilidad hepática y muscular a la insulina, uno de los principales contribuyentes a la resistencia sistémica a esta hormona (Figura 1) (Birkenfeld and Shulman, 2014; DeFronzo, 2004; McGarry, 2002). En cuanto a las células β , el incremento crónico de los niveles circulantes de FFA junto con una elevada glucemia, trastornan la cinética de la secreción de insulina y glucosa (Donath and Halban, 2004; Leahy), disminuyen la biosíntesis de insulina, promueven la apoptosis de las células β y median efectos autoinflamatorios deletéreos en los islotes pancreáticos que acaban impactando sobre la función y la masa de células β (Donath et al., 2010; Hager, 2008; Halban, 2008; Nolan et al., 2011). En respuesta a los FFA y las citoquinas pro-inflamatorias circulantes en un contexto de resistencia a la insulina acompañada de una eventual disfunción de la célula β , la homeostasis general energética del organismo se ve alterada (Nolan et al., 2011) (Figura 1).

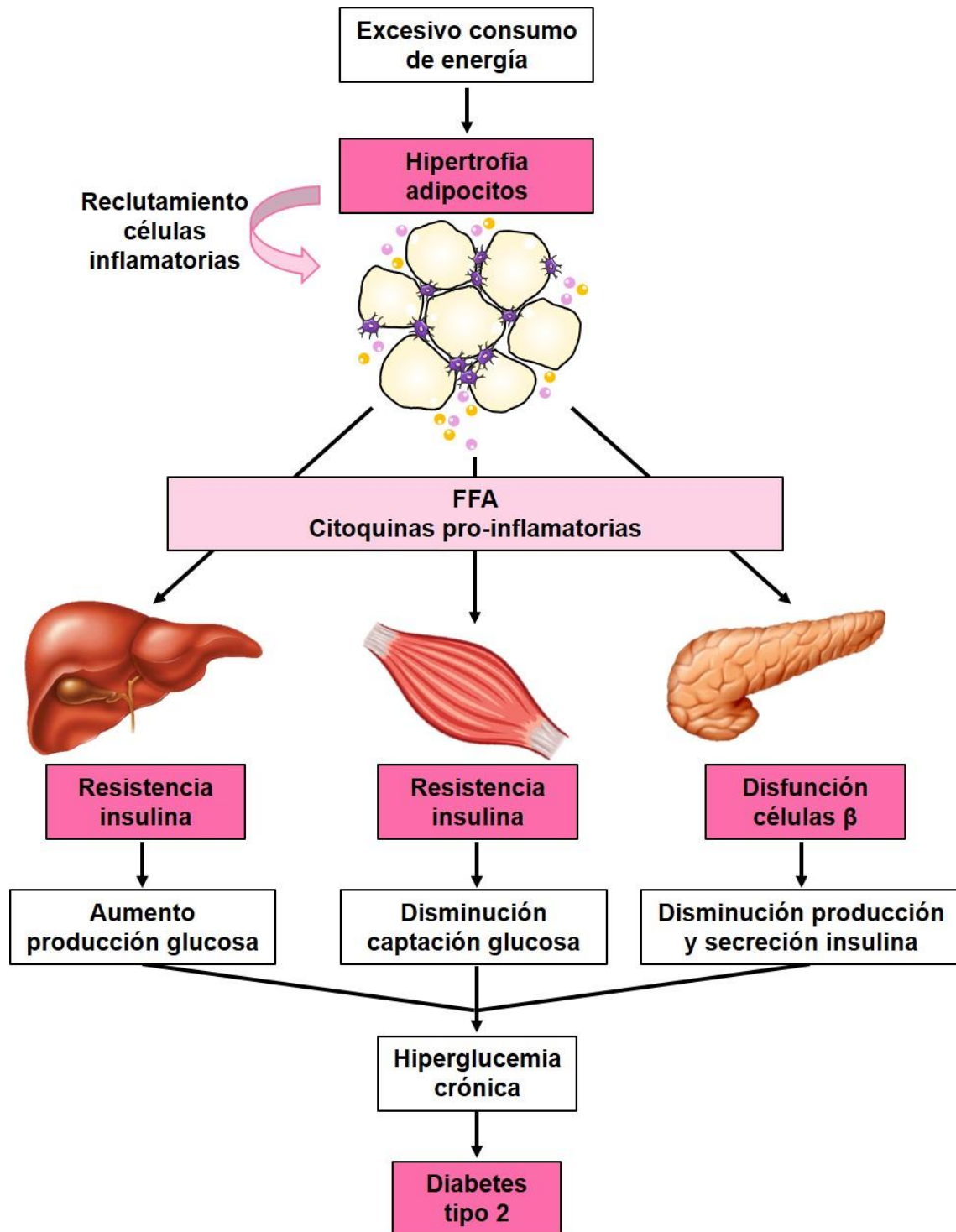


Figura 1. Alteraciones clave que desencadenan la diabetes tipo 2. El acúmulo excesivo de lípidos en los adipocitos induce el reclutamiento de células inflamatorias que secretan citoquinas proinflamatorias e inhibe la lipólisis. El aumento de FFA y citoquinas circulantes favorece la deposición patológica de lípidos en el músculo y el hígado e induce la resistencia a la hormona insulina. Entonces, el hígado aumenta la glucogénesis y la glucogenólisis, que junto con la disminución de la captación de glucosa por el músculo, produce hiperglucemia sostenida. Ante el incremento de los niveles de glucosa en sangre, se produce hiperplasia de las células β del páncreas para compensar la demanda de insulina. Con el tiempo se ocasiona el agotamiento de las células β y disminuye su capacidad para producir y secretar insulina. Todo ello conlleva a la cronificación de la hiperglucemia y el establecimiento de la DT2.

1.1.2. Susceptibilidad genética y factores ambientales de la diabetes tipo 2

Los factores genéticos contribuyen en gran manera al desarrollo de la DT2 (Stumvoll et al., 2005). Los antecedentes familiares de DT2, por ejemplo, triplican el riesgo de desarrollar dicha enfermedad (Schäfer et al., 2011). Los estudios genéticos *Genome-wide association* (GWA) han permitido asociar más de 60 loci a esta enfermedad (Billings and Florez, 2010; Dupuis et al., 2010; Morris et al., 2012; Voight et al., 2010). Cada uno de estos loci contiene variaciones en la secuencia que son causales del riesgo de sufrir DT2. Aunque aún no se ha esclarecido el mecanismo molecular de muchas de estas variantes genéticas, su influencia en la sensibilidad a la insulina o la secreción de ésta ha quedado patente en diversos casos. Un ejemplo serían las variantes de los genes *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma* (PPAR γ), *Fat mass and obesity-associated protein* (FTO), *Insulin receptor substrate 1* (IRS1) o *Krüppel-like factor 14* (KLF14) que se relacionan con altos niveles de insulina en ayuno (Voight et al., 2010). Otros genes se asocian a la disfunción de las células β del páncreas, como es el caso de glucoquinasa (GK) o *Melatonin receptor 1B* (MTNR1B). También hay genes asociados a defectos en la secreción de insulina sin efectos marcados en la glucemia como Transcriptor factor 7-like 2 (TCF7L2), Solute carrier family 30 member 8 (SLC30A8), *Cyclin-dependent kinase 5 regulatory subunit associated protein 1-like 1* (CDKAL1) y *Cyclin-dependent kinase 4 inhibitor B* (CDKN2A/2B) (Dimas et al., 2014). La estrecha relación entre la obesidad y la DT2 (Hu et al., 2001) hace que gran parte de estos loci también estén involucrados con la susceptibilidad a la obesidad, como en el caso de FTO (Karaderi et al., 2015). Asimismo, también se han identificado loci que aumentan el riesgo de sufrir sobrepeso y obesidad en diabéticos de tipo 2 como el gen de la adiponectina (ADIPOQ), el del receptor de leptina (LEPR), *Insulin receptor substrate 2* (IRS2) o *Growth factor receptor-bound protein 14* (GRB14) (Kasim et al., 2016).

A pesar de la influencia genética en la patogénesis de la DT2, se considera que las variantes genéticas de riesgo solo contribuyen a aumentar la susceptibilidad a la enfermedad. La causa principal del aumento en la incidencia de la DT2 se debe a cambios ambientales asociados al estilo de vida (Imamura and Maeda, 2011). El consumo de dietas con alta densidad energética propias de Occidente (*Western diet*) junto con el estilo de vida sedentario son los dos factores más importantes en el desarrollo de la DT2. Ambas causas también son las responsables de la actual epidemia de obesidad, claramente relacionada con la DT2. En concreto, el incremento de la grasa visceral y la acumulación ectópica de grasa, como por ejemplo el hígado graso, contribuyen en mayor manera que el índice de masa corporal (IMC)

al riesgo de desarrollar DT2. Esto encaja con el hecho de que las personas obesas pero sin desregulación metabólica tienen menor obesidad visceral o hígado graso. Contrariamente, aquellos que desarrollan DT2 sin ser excesivamente obesos o teniendo un peso corporal normal, presentan obesidad visceral, acúmulo de grasa ectópica y masa muscular reducida (Kolb and Martin, 2017).

Además, existen otros múltiples factores ambientales que influyen sobre el riesgo de desarrollar DT2 independientemente de la adiposidad. Las dietas pobres en fibra triplican el riesgo de padecer DT2 y el consumo regular de bebidas azucaradas lo eleva un 20%. Por otro lado, la escasa actividad física, prolongados períodos frente a un monitor o la televisión y la exposición a partículas finas procedentes de la contaminación por tráfico también aumentan la susceptibilidad a la enfermedad. Los fumadores incrementan el riesgo de DT2 desde un 30% hasta un 90% dependiendo del grado de adicción, mientras que cada hora de sueño escaso aumenta un 10% la susceptibilidad. La depresión y el estrés también son factores que influyen sobre el riesgo de padecer la enfermedad, así como una posición socioeconómica baja (Kolb and Martin, 2017).

Por último, también hay relación entre ciertas infecciones y el desarrollo de DT2. La hepatitis C puede provocar esteatosis hepática y con ello, resistencia a la insulina, y DT2 (Negro, 2014). La infección por *Chlamydia pneumoniae* puede causar la disfunción de las células β del páncreas en un contexto de inflamación sistémica (Rodríguez et al., 2015). También cabe mencionar que el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) y los tratamientos anti-retrovirales aumentan la inflamación sistémica y promueven la resistencia a la insulina (Dooko et al., 2015).

2. OBESIDAD

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), la obesidad y el sobrepeso se definen como el acúmulo anormal o excesivo de grasa que pone en riesgo la salud. La obesidad es una enfermedad metabólica muy compleja y uno de los factores de riesgo más importantes para la resistencia a la insulina y el desarrollo de DT2 (Kusminski et al., 2016). Tal y como sucede con la DT2, la obesidad ha alcanzado proporciones epidémicas. Datos de la OMS señalan que en 2014 cerca de 2 billones de adultos padecían sobrepeso y de ellos, más de medio billón era clínicamente obesos. Como resultado del sobrepeso o la obesidad cada año mueren al menos 2.8 millones de personas. La prevalencia de esta patología se dobló entre 1980 y 2014 y aunque inicialmente se asociaba a países desarrollados, cada vez es más prevalente en países aún en vías de desarrollo.

Un aspecto alarmante de esta pandemia es el concerniente a los más jóvenes, pues se estima que cerca de 200 millones de niños en edad escolar tienen sobrepeso. Ello les predispone a desarrollar diabetes a una edad más temprana y contribuye a que su generación sea la primera predestinada a tener una vida más corta que sus progenitores. Por tanto, la obesidad asociada a diabetes se ha convertido en un problema de salud pública de principal importancia (Morigny et al., 2016).

La obesidad se desencadena cuando se produce un desequilibrio en el que el consumo de energía excede el gasto energético lo que comporta una distribución anómala de la grasa (Frühbeck et al., 2009). El método más usado para medir e identificar la obesidad es el índice de masa corporal (IMC). Se calcula como el peso en kilogramos (Kg) dividido por el cuadrado de la altura en metros (m^2). La OMS define el sobrepeso a partir de un IMC igual o mayor a 25 kg/m^2 y obesidad cuando el IMC es de 30 kg/m^2 o mayor (Flegal et al., 2010; WHO, 2000). Para Asia y Oceanía, estos criterios son un tanto diferentes, estableciendo el sobrepeso a los 23 kg/m^2 y la obesidad a los 25 kg/m^2 (Stommel and Schoenborn, 2009). Aunque el IMC es una medida simple muy utilizada en estudios de poblaciones, no es la medida más correcta para predecir el riesgo individual ya que no permite distinguir entre el peso asociado a músculo o a grasa y, dado que hay grandes diferencias individuales en lo referente a constitución corporal, no siempre corresponde al mismo nivel de obesidad (James, 2008). La circunferencia de la cintura o el ratio entre el perímetro de la cintura y la cadera son otros métodos comúnmente utilizados para clasificar a los pacientes obesos y más específicos para determinar la distribución grasa (T. et al., 2008).

También existen medidas directas de la composición corporal tales como la tomografía computarizada o la resonancia magnética.

2.1. Tipos de obesidad en humanos

La distribución de la grasa corporal varía entre individuos debido al sexo, la edad, el estado hormonal, patologías concomitantes o en respuesta a fármacos. Esta distribución es crucial para predecir enfermedades asociadas a la obesidad (Tchkonina et al., 2013). En función de la localización de los depósitos grasos, se pueden distinguir dos clases de obesidad (Gesta et al., 2007):

- **Obesidad central (forma de manzana):** se caracteriza por una acumulación intra-abdominal/visceral de la grasa, aumentando su deposición alrededor de las vísceras en los depósitos adiposos omental, mesentérico y retroperitoneal. También se denomina obesidad androide por ser la más común en hombres. Los individuos que la padecen presentan una reducción de la sensibilidad a la insulina y de la tolerancia a la glucosa ligada a un incremento en el riesgo de sufrir complicaciones metabólicas como la DT2 (Tchernof and Després, 2013).
- **Obesidad periférica (forma de pera):** se caracteriza por un incremento subcutáneo de la deposición grasa en muslos y caderas. También se la denomina obesidad ginoidea ya que es típica de mujeres. Al contrario que la obesidad central, no tiene tanto riesgo metabólico y los pacientes que la presentan tienen una tolerancia a la glucosa normal (Tchernof and Després, 2013).

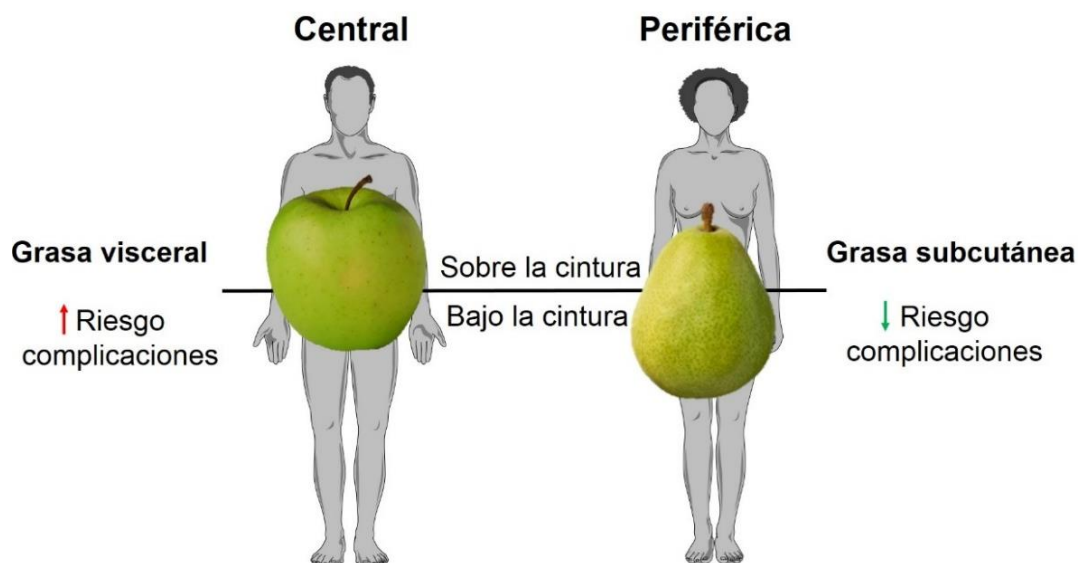


Figura 2. Clasificación de la obesidad en función de la distribución. Obesidad central o periférica.

2.2. Complicaciones de la obesidad

Se ha asociado la obesidad con un mayor riesgo de mortalidad, disminuyendo la esperanza de vida una media de 7 años (Peeters et al., 2003). A parte de estar estrechamente relacionada con la DT2, también se asocia a un mayor riesgo de padecer otras patologías metabólicas, cardiovasculares e inflamatorias crónicas (Van Gaal et al., 2006) como por ejemplo la enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD). Ésta es la enfermedad hepática crónica más prevalente a nivel mundial y se caracteriza por desarrollar un espectro histopatológico que va desde la esteatosis más ligera hasta la forma más agresiva necro-inflamatoria, la esteatohepatitis no alcohólica (NASH), que induce fibrosis y acaba resultando en cirrosis hepática (Bertot and Adams, 2016). Por otro lado, la obesidad también está asociada a la hipertensión, enfermedad crónica en la que se produce una elevación persistente de la presión arterial. La hipertensión supone un riesgo muy importante en relación a las enfermedades cardiovasculares como la hipertrofia ventricular izquierda, arritmias ventriculares y atriales, fallo cardíaco diastólico y sistólico, isquemia cardíaca y daños renales y neurológicos (Black, 2003). Además, la obesidad aumenta el riesgo de cáncer colorectal, de esófago, de riñón y de páncreas en ambos sexos. En hombres predispone a sufrir cáncer de tiroides mientras que en mujeres aumenta el riesgo de cáncer de endometrio, vesícula biliar y mama (Renehan et al., 2008).

3. TRATAMIENTOS ACTUALES PARA LA DIABETES TIPO 2 Y LA OBESIDAD

Para seleccionar el mejor tratamiento farmacológico para el paciente con sobrepeso u obeso que padece DT2, primero hay que considerar la mejor opción para disminuir los niveles de glucosa en sangre. Siempre que sea posible, la medicación también debería promover la reducción de peso o al menos, no causar su incremento. Los fármacos contra la DT2 asociados a una disminución de la masa corporal son: metformina, inhibidores del contrantransportador 2 de sodio-glucosa (SGLT2), agonistas del *glucagon-like peptide 1 receptor* (GLPR1) y miméticos de amilina. Los inhibidores de la *dipeptidyl peptidase 4* (DPP4) son neutrales respecto al peso. Por el contrario, los *insulin secretagogues* como las sulfonilureas, las tiazolidinedionas (TZD) y la insulina misma muchas veces inducen la ganancia de peso (American Diabetes Association, 2016).

3.1. Recomendaciones farmacoterapéuticas para pacientes diabéticos tipo 2

A los pacientes obesos diagnosticados con DT2 se les recomiendan terapias basadas en cambios en la dieta y ejercicio (Lipkin, 1999) que en la mayoría de casos se combinan con metformina. Si no se consigue normalizar la glucemia en 3 meses, se combina el tratamiento con metformina con un segundo fármaco de entre los siguientes: sulfonilureas, tiazolidinedionas, inhibidores de DPP4, inhibidores de SGLT2, análogos de GLPR1 o insulina basal. En los casos de severa hiperglucemia se pueden combinar dos fármacos a la administración de múltiples dosis de insulina diaria directamente (American Diabetes Association, 2016; Inzucchi et al., 2012). Si tras otros 3 meses tampoco se consigue disminuir la glucemia hasta los niveles deseados, se procede a la combinación de un tercer fármaco. Si con esta aproximación no se consigue disminuir suficientemente la glucemia, se procede a la terapia con combinaciones de insulina inyectables (American Diabetes Association, 2016). La elección de la terapia se basa en las características individuales del paciente y las indicaciones de los fármacos con el objetivo principal de mejorar el control de la glucemia minimizando los efectos secundarios (Inzucchi et al., 2012).

La metformina es una biguanidina y es el fármaco más ampliamente utilizado para el tratamiento de la DT2 (Inzucchi et al., 2012). Su mecanismo de acción consiste principalmente en la reducción hepática de gluconeogénesis, aligerando la hiperglucemia y mejorando la sensibilidad a la insulina (Pryor and Cabreiro, 2015). A diferencia de otros fármacos, la metformina no aumenta el riesgo de sufrir hipoglucemias (Inzucchi et al., 2012).

Debido a la progresiva disminución de la masa de células β durante la DT2, a menudo se requiere terapia de remplazo con insulina. En principio, el uso de insulina exógena mejora la capacidad de secreción de insulina endógena y estabiliza la glucemia. El inconveniente es que puede provocar estados de hipoglucemia e incremento de peso (Turner et al., 1999). Aunque la mayoría de pacientes con DT2 que requieren tratamiento con insulina solo requieren insulina basal, algunos acaban necesitando insulina pandrial con insulinas de acción corta. En este caso se suelen administrar análogos de insulina rápidos dosificados justo antes de las ingestas (Inzucchi et al., 2012).

Los fármacos basados en el sistema de incretinas se han introducido más recientemente. Los agonistas inyectables de GLP-1 mimetizan el efecto endógeno de GLP-1 estimulando la secreción pancreática de insulina, retrasando el vaciamiento gástrico, suprimiendo la secreción de glucagón y disminuyendo el apetito (Drucker and Nauck, 2006; Inzucchi et al., 2012). Por otro lado, los inhibidores de la DPP4 aumentan los niveles endógenos de GLP-1 y la secreción de insulina y suprimen la secreción de glucagón (Mulvihill and Drucker, 2014). Los inhibidores de DPP4 no afectan al peso corporal. Al igual que la metformina, los fármacos basados en el sistema de incretinas no producen hipoglucemias (Inzucchi et al., 2012).

Las tiazolidinedionas activan la heterodimerización de PPAR γ -RXR y bloquean la fosforilación de CDK-5 por PPAR γ (Yki-Järvinen, 2004) incrementando la sensibilidad a la insulina en el músculo esquelético y reduciendo la producción de glucosa hepática (Inzucchi et al., 2012; Yki-Järvinen, 2004). Tampoco incrementan el riesgo de hipoglucemia y sus efectos pueden durar más que los de las sulfonilureas y la metformina (Inzucchi et al., 2012). Como efectos adversos de las tiazolidinedionas se incluyen la ganancia de peso o la retención de líquidos (Inzucchi et al., 2012).

Los inhibidores de SGLT2 disminuyen la hiperglucemia a causa del bloqueo de la reabsorción de glucosa en el riñón, incrementando su excreción en orina. Sin embargo, estos fármacos pueden favorecer infecciones del tracto urinario (Zinman et al., 2015). También existe la posibilidad de que favorezcan la resorción ósea, incrementando el riesgo de fracturas, aunque faltan estudios más concluyentes al respecto (Brunton, 2015).

Las sulfonilureas son el agente oral más antiguo cuya actuación mejora la secreción de insulina. Esta mejora se produce gracias a su unión con los canales de potasio sensibles a ATP (K_{ATP}) de las células β del páncreas (Inzucchi et al., 2012; Turner et al., 1999). De esta forma, suprimen la gluconeogénesis hepática (Turner et

al., 1999). Aunque son eficaces controlando los niveles de glucosa, su uso está asociado a la ganancia de peso y a riesgo de hipoglucemias. Por otro lado, las meglitinidas también actúan uniéndose a los canales K_{ATP} y mejoran la secreción de insulina. Como son de acción corta, tienen menos riesgo de provocar hipoglucemias pero se requiere una administración más frecuente (Inzucchi et al., 2012).

En los casos en los que la dieta, el ejercicio y la farmacoterapia resultan insuficientes se puede requerir cirugía bariátrica en pacientes con DT2 y obesidad severa y cada vez más en pacientes obesos o con sobrepeso (Ahn et al., 2010).

3.2. Recomendaciones farmacoterapéuticas para pacientes obesos

La pérdida de peso es el objetivo principal para prevenir y tratar la obesidad y puede prevenir el riesgo de desarrollar comorbilidades de la obesidad. Se puede lograr la pérdida de peso cambiando el estilo de vida, con farmacoterapia o cirugía. Las intervenciones en el estilo de vida incluyen cambios en la dieta, ejercicio físico e incluso intervenciones psicológicas (terapia comportamental y cognitiva o terapia de grupo). El efecto de las intervenciones en el estilo de vida en la pérdida de peso es modesto pero significativo y es aditivo junto con otro tipo de terapias (Dyson, 2010). La farmacoterapia contra la obesidad se recomienda en individuos con un IMC de al menos 27 Kg/m^2 con alguna comorbilidad persistente o en aquellos sujetos con un IMC de 30 Kg/m^2 o superior. La farmacoterapia no induce una pérdida involuntaria y sustancial de peso y por tanto es más efectiva cuando se usa conjuntamente dentro de un programa de control de peso bien establecido. La eficacia de un fármaco contra la obesidad se basa en su capacidad para conseguir una reducción del 3-5% del peso corporal después de 3 meses de tratamiento (American Diabetes Association, 2016). Actualmente hay 5 fármacos contra la obesidad aprobados por la *U.S. Food and Drug Administration* (FDA), hecho que permite a los médicos adaptar el tratamiento de la obesidad a cada paciente (American Diabetes Association., 2017; American Diabetes Association, 2016). Estos fármacos son: el agonista de GLP-1 Liraglutide® (Astrup et al., 2011; Pi-Sunyer et al., 2015), el inhibidor de la lipasa Orlistat® (Sumithran and Proietto, 2014), el agonista del *5-hydroxytryptamine receptor 2C* (5-HT_{2C}) Lorcaserin® (Smith et al., 2010b) y las combinaciones duales de agonistas de la noradrenalina con inhibidores de la anhidrasa carbónica, Phentermine-topiramate (Verrotti et al., 2011) y Naltrexone-bupropion (Greenway et al., 2010).

El *Liraglutide* reduce el apetito y la ingesta de alimento mediante la regulación de los receptores de leptina solubles (Astrup et al., 2011; Pi-Sunyer et al., 2015).

El *Orlistat* inhibe las lipasas gástricas y pancreáticas, reduciendo la digestión de grasa intestinal. Esto permite limitar el consumo de calorías mejorando la glucemia y las funciones endoteliales (Sumithran and Proietto, 2014).

La *Lorcaserin* activa las neuronas *Pro-opiomelanocortin* (POMC) hipotalámicas para favorecer la saciedad. Por otro lado, reduce los niveles de hemoglobina glicosilada y los factores de riesgo de enfermedades cardiovasculares (Smith et al., 2010b).

El *Phentermine-topiramate* reduce la ingesta de alimento mediante antagonistas del α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) y de receptores de cainita. Además, mejora la actividad de los receptores del γ -aminobutyric acid (GABA) y de la noradrenalina, incrementando el gasto energético (Verrotti et al., 2011).

El *Naltrexone-bupropion* activa las neuronas POMC mediante la unión al receptor 4 de la melanocortina (MC4R) y antagoniza el sistema opioide. De esta forma incrementa el consumo de energía y reduce la ingesta de alimentos (Greenway et al., 2010).

Como se ha mencionado anteriormente, otra alternativa es la cirugía bariátrica, la cual se utiliza cada vez más en pacientes con un IMC superior a 40 Kg/m² o con comorbilidades severas. La mortalidad de la cirugía está por debajo del 1% y se consiguen pérdidas de peso de alrededor del 25-30% con una rápida normalización de la glucosa y la presión sanguínea. Aun así, es necesaria una monitorización post-quirúrgica a largo plazo y los pacientes deben mantener una dieta muy restrictiva, nutricionalmente pobre y exenta de fruta y vegetales (Haslam and James, 2005).

4. FACTOR DE CRECIMIENTO FIBROBLÁSTICO 21 (FGF21)

Durante la última década, el factor de crecimiento fibroblástico 21 (FGF21) se ha erigido como un regulador metabólico potente capaz de mejorar el metabolismo de la glucosa y los lípidos, así como de lograr una reducción de la adiposidad y del peso corporal. Estas características lo convierten en un potencial agente terapéutico para tratar la DT2 y la obesidad (Arner et al., 2008; Badman et al., 2007; Coskun et al., 2008a; Hunt et al., 2007; Inagaki et al., 2007; Kharitononkov et al., 2005a, 2007; Wente et al., 2006).

FGF21 es una proteína perteneciente a la familia de los Factores de Crecimiento Fibroblástico (FGFs) que se identificó por vez primera en embriones de ratón en el año 2000 (Nishimura et al., 2000). En adultos, FGF21 se secreta por diversos órganos, principalmente el hígado (Markan et al., 2014) y actúa sobre múltiples tejidos como una hormona endocrina para regular la homeostasis energética (Fisher and Maratos-Flier, 2016; Potthoff et al., 2012).

4.1. Familia de los Factores de Crecimiento Fibroblástico

La familia de los FGFs regula una enorme cantidad de procesos del desarrollo lo que le confiere una amplia variedad de aplicaciones mitogénicas, citoprotectoras y angiogénicas. La mayoría de los FGFs ejercen su función uniéndose a los receptores de FGF (FGFRs) en la superficie celular (Beenken and Mohammadi, 2009). En mamíferos existen 18 miembros de la familia (FGF1-FGF10 y FGF16-FGF23) agrupados en 6 subfamilias en función de la homología de la secuencia y su filogenia (Itoh et al., 2004). Los factores FGF11-FGF14 tienen una alta identidad con la familia de los FGFs pero son incapaces de activar los FGFRs por lo que no se les incluye en la familia (Olsen et al., 2003). Por otro lado, FGF15 es el ortólogo murino del FGF19 humano (Beenken and Mohammadi, 2009).

Típicamente los FGFs actúan de forma paracrina sobre la modelación y organización tisular durante el desarrollo embrionario. Sin embargo, la subfamilia de FGF19, FGF21 y FGF23 funciona de forma endocrina dependiente de la presencia de proteínas klotho en los tejidos diana, regulando la homeostasis de ácidos biliares, colesterol, glucosa, vitamina D y fosfato (Fu et al., 2004; Goetz et al., 2007; Kharitononkov et al., 2005b).

La región central de unos 120-130 aminoácidos es homóloga entre todos los FGFs; son las variaciones en los extremos amino y carbonilo lo que confiere diversidad biológica a los ligandos (Mohammadi et al., 2005). Además, los FGFs

paracrinós tienen una región (HBS) que se une al *heparan sulfat glycosaminoglycan* (HSGAG) pero la región HBS de la subfamilia de FGF19, FGF21 y FGF23 posee una estructura que reduce la afinidad estereológica por el HSGAG y les confiere la naturaleza endocrina (Goetz et al., 2007).

4.2. Regulación y señalización de FGF21

FGF21 tiene un papel sumamente importante en el metabolismo como hepatoquina, adipoquina y mioquina. Su transcripción se induce principalmente por múltiples factores: ayuno, dietas cetogénicas o altas en carbohidratos, ácidos grasos libres (FFAA) y agonistas de receptores nucleares (Figura 3) (Badman et al., 2007; Inagaki et al., 2007; Lundâsen et al., 2007).

El hígado es el principal órgano secretor de FGF21. El *peroxisome proliferator-activated receptor- α* (PPAR α) media la inducción hepática de FGF21 inducida por ayuno y coopera con el receptor de glucocorticoides para estimular su transcripción (Lundâsen et al., 2007; Patel et al., 2015). Otros receptores nucleares también están implicados en la regulación de la transcripción hepática de FGF21 tales como el receptor de la hormona tiroidea (THR), *retinoid X receptor- β* (RXR β), *farsenoid-X receptor* (FXR), *retinoid-related orphan receptor- α* (ROR α), *nuclear hormone receptor 77* (NUR77) y *peroxisome proliferator-activated receptor- γ* (PPAR γ) (Adams et al., 2010; Cyphert et al., 2012; Li et al., 2013; Oishi and Tomita, 2011). También, se induce la transcripción en hígado por butirato sódico, dioxinas y otros fármacos como la metformina (Figura 3) (Li et al., 2012; Nygaard et al., 2012).

En el tejido adiposo, FGF21 se induce en respuesta a la alimentación después de un periodo de ayuno, mediado por PPAR γ . Se considera que forma parte de la vía de regulación de la respuesta a alimentación en el tejido adiposo, comportándose más de la forma autocrina o paracrina típica de los FGFs (Dutchak et al., 2012; Oishi et al., 2011). La exposición a bajas temperaturas también induce la transcripción de FGF21 en el tejido adiposo con capacidad termogénica, tanto blanco como marrón (Figura 3) (Fisher et al., 2012; Hondares et al., 2011).

Asimismo, FGF21 también se comporta como una mioquina inducida por diversos tipos de estrés, entre ellos el estrés de retículo endoplásmico, mediado por el Activador del factor de transcripción 4 (ATF4) y la autofagia (Luo and McKeehan, 2013). La inducción de FGF21 en músculo hace que actúe en el propio tejido como una mioquina y produzca alteraciones en la función mitocondrial y una respuesta integrada al estrés y que a la vez, FGF21 se secreta y actúe de manera endocrina

sobre el tejido adiposo induciendo la actividad termogénica (Figura 3) (Keipert et al., 2014).

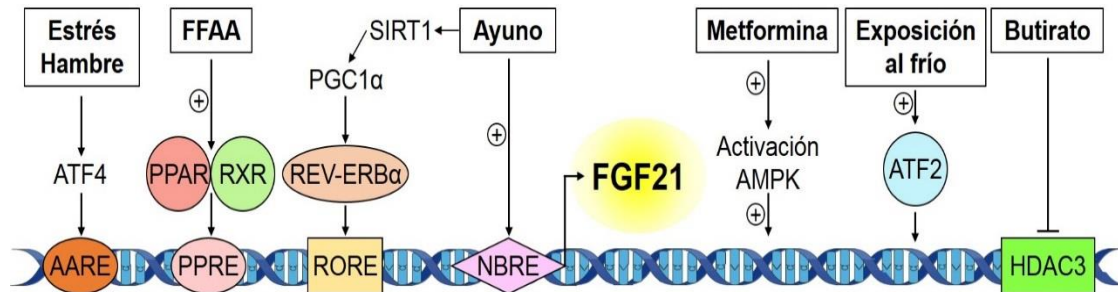


Figura 3. Regulación transcripcional de FGF21. La transcripción de FGF21 se regula por el estado nutricional como el ayuno o hambre; componentes derivados de alimentos como los ácidos grasos libres (FFAA) o el butirato; la exposición a bajas temperaturas; o fármacos como la metformina. ATF4: *activating transcription factor*, AARE: *amino acid response element*, PPAR: *peroxisome proliferator-activated receptors*; RXR: *retinoid X receptor*, PPRE: *peroxisome proliferator-activated receptor response element*, SIRT1: *sirtuin 1*; PGC1α: *peroxisome proliferator-activated receptor-γ co-activator 1α*; REV-ERBα: *nuclear receptor subfamily 1, group D, member 1*; RORE: *retinoid-related orphan receptor response element*, NBRE: *nerve growth factor-induced clone B response element*, AMPK: *5'-AMP-activated protein kinase*; ATF2: *activating transcription factor 2*; HDAC3: *histone deacetylase 3*.

FGF21 ejerce su función a través de los receptores FGFRs, principalmente FGFR1c, FGFR2c y FGFR3c, y del co-receptor β -klotho (Kharitonov et al., 2007; Ogawa et al., 2007; Suzuki et al., 2008). Mientras que los FGFRs se expresan ubicuamente, β -klotho se expresa marcadamente en tejidos metabólicamente activos tales como el hígado, el tejido adiposo blanco (WAT) y el tejido adiposo marrón (BAT), lo que confiere especificidad a los efectos de FGF21 (Fon Tacer et al., 2010; Ito et al., 2000).

4.3. Efectos de FGF21

Existe controversia respecto a los efectos de FGF21 entre los diferentes estudios. Su mecanismo de acción es complejo dado que se ha observado el mismo fenotipo en modelos animales con depleción de la expresión de FGF21 como en otros que, por el contrario, lo sobreexpresan. Se ha sugerido que los efectos de FGF21 cuando se administra exógenamente difieren en magnitud o incluso se oponen cuando se comparan con los efectos fisiológicos del FGF21 endógeno (Kliwer and Mangelsdorf, 2010).

En el caso de la gluconeogénesis hepática, se ha descrito que FGF21 la induce en ratones ayunados, con lo que los ratones en los que se depleciona FGF21 son incapaces de revertir la hipoglucemia producida por el ayuno (Potthoff et al., 2009). Contrariamente a lo que cabría esperar, cuando se sobreexpresa FGF21 en ratones transgénicos, la glucemia también disminuye (Zhang et al., 2012). La magnitud de la reducción de la glucemia producida por FGF21 es proporcional a la dosis inyectada y no se observa ningún efecto cuando se administran dosis bajas de la proteína (Xu et al., 2009). Los ensayos *in vitro* también contradicen que FGF21 estimule la gluconeogénesis hepática dado que suprime la producción de glucosa de forma parecida a la insulina (Xu et al., 2009). En conjunto, los datos parecen indicar que cuando FGF21 supera los niveles fisiológicos, se inhibe la producción hepática de glucosa (Figura 4). Asimismo, la administración de FGF21 incrementa la movilización de ácidos grasos libres (FFA) (Inagaki et al., 2007) y la cetogénesis en hígado (Potthoff et al., 2009) protegiéndolo de la hepatoesteatosis (Xu et al., 2009) (Figura 4).

La señalización directa de FGF21 en el tejido adiposo tanto blanco como marrón (WAT y BAT respectivamente) aumenta la sensibilidad a la insulina (BonDurant et al., 2017; Ding et al., 2012) y mejora la homeóstasis de la glucosa (Véniant et al., 2012). Mediante la señalización en el tejido adiposo, FGF21 también incrementa el gasto energético e induce la sobreexpresión de genes relacionados con la termogénesis y el *browning* (proceso mediante el cual el tejido adiposo blanco subcutáneo adquiere el fenotipo del tejido adiposo marrón) (Figura 4) (Adams et al., 2013a; Laeger et al., 2017).

El estado nutricional regula la expresión de FGF21 a nivel pancreático, ya que se produce principalmente en el páncreas acinar y actúa localmente (Singhal et al., 2016a). La administración de FGF21 reduce la secreción de glucagón (Kharitonov et al., 2005b) y protege la masa de células β de la inflamación, garantizando su conservación (Figura 4) (Singhal et al., 2016a; Wente et al., 2006).

En el músculo esquelético, FGF21 protege los miocitos de la resistencia a la insulina inhibiendo señales de estrés como la *stress kinase* y el *nuclear factor κ -light-chain-enhancer of activated β cells* (NF- κ B) (Lee et al., 2012). Además favorece la captación de glucosa y su incorporación a glicógeno (Figura 4) (Mashili et al., 2011).

El corazón también es un órgano diana del FGF21 circulante y del secretado por los propios cardiomiocitos. El factor se induce en hígado y tejido adiposo cuando hay daño cardíaco y, junto con el producido por el propio corazón, contribuye a la

protección del miocardio y evita la hipertrofia y la oxidación (Liu et al., 2013; Planavila et al., 2013). También, previene la apoptosis a nivel cardíaco producida por la diabetes y la deposición lipídica (Figura 4) (Zhang et al., 2015).

Asimismo, FGF21 protege del daño renal mediante la reversión de las alteraciones metabólicas sistémicas y la nefropatía derivadas de la diabetes tipo 2 (Figura 4) (Kim et al., 2013; Shao et al., 2015). Por otro lado, el FGF21 presente en la leche materna induce la expresión intestinal de factores hormonales y enzimas digestivas mejorando la absorción de lactosa en neonatos, asegurando una correcta digestión y función endocrina del intestino en desarrollo (Figura 4) (Gavaldà-Navarro et al., 2015).

A nivel central, la administración intra-cerebroventricular continua de FGF21 incrementa la ingesta y el gasto energético en ratas con obesidad inducida por la dieta a la vez que mejora la sensibilidad sistémica a la insulina favoreciendo la supresión de la gluconeogénesis (Figura 4) (Owen et al., 2014; Sarruf et al., 2010). Además, FGF21 estimula la termogénesis y el *browning* activando el sistema nervioso simpático (Figura 4) (Douris et al., 2015). También, se indicó que FGF21 actúa en el hipotálamo inhibiendo la vía de señalización vasopresina-kisspeptina de manera que suprime el pico hormonal necesario para la reproducción en ratones hembra (Figura 4) (Owen et al., 2013). Sin embargo, dicha infertilidad se revierte simplemente alimentando a los animales con una dieta hipercalórica (Singhal et al., 2016b).

Por último, los efectos de FGF21 sobre la remodelación ósea también han sido discutidos. Por un lado, se sugirió que inhibe la formación ósea a la vez que estimula la resorción en hueso (Figura 4) (Wei et al., 2012) pero estudios recientes cuestionan el efecto directo de FGF21 sobre el hueso, lo que atribuiría los defectos óseos observados a diferencias en el balance energético (Guo et al., 2016; Li et al., 2017; Thompson et al., 2014).

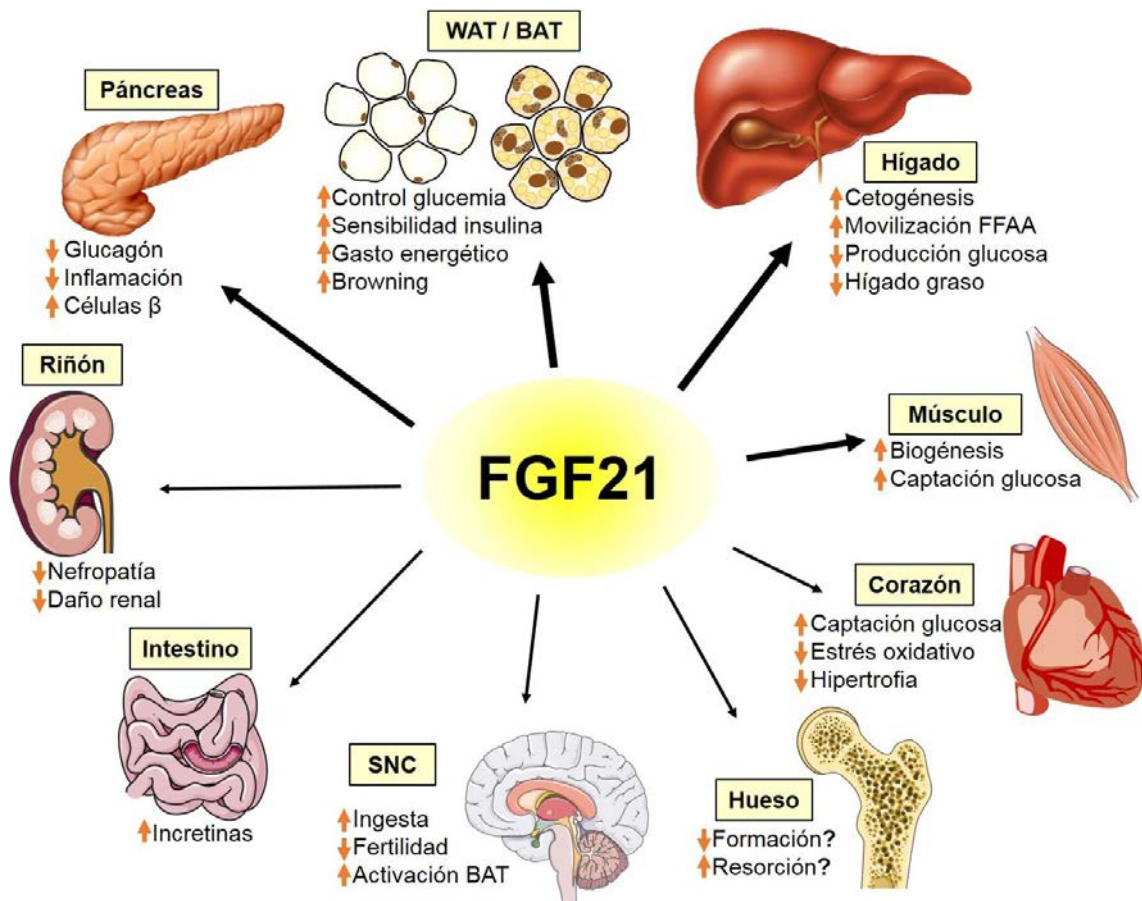


Figura 4. Esquema representativo de los efectos de FGF21 sobre sus órganos diana. Los efectos de FGF21 se deben principalmente a su acción sobre el tejido adiposo y el hígado, aumentando la sensibilidad a la insulina, el gasto energético, la cetogénesis y la movilización de ácidos grasos libre (FFA) y disminuyendo la producción de glucosa y la deposición ectópica de lípidos. FGF21 también puede actuar sobre otros órganos tales como el páncreas, el riñón, el músculo esquelético y cardíaco y el intestino, mejorando su función metabólica ante ciertas disfunciones. Además, dado que cruza la barrera hematoencefálica, actúa a nivel central donde induce múltiples señales bioquímicas y respuestas funcionales. Igualmente, FGF21 podría actuar sobre la homeóstasis ósea.

4.4. Perspectivas del uso de FGF21 como fármaco contra la DT2 y la obesidad

La administración de FGF21 recombinante a modelos de obesidad murinos como ratones *ob/ob* o *db/db* y ratas *Zucker Diabetes Fatty* (ZDF) ha demostrado mediar una robusta disminución en la adiposidad, la glucemia y los triglicéridos circulantes así como mejorar la sensibilidad a la insulina (Adams et al., 2012; Berglund et al., 2009; Coskun et al., 2008b; Kharitonov et al., 2005b; Xu et al., 2009). Asimismo, la sobreexpresión de FGF21 en hígado de ratones transgénicos protege frente a la obesidad inducida por la dieta y la resistencia a la insulina (Inagaki et al., 2007; Kharitonov et al., 2005b). Además, la administración de FGF21 a monos Rhesus obesos y diabéticos reduce marcadamente la glucemia en ayuno, los triglicéridos

circulantes y los niveles de insulina a la vez que induce una discreta pérdida de peso (Kharitononkov et al., 2007).

Las prometedoras características farmacológicas de FGF21 en ratones y en primates no humanos han estimulado la búsqueda por parte de diversas compañías farmacéuticas de tratamientos basados en FGF21 contra desórdenes metabólicos como la obesidad o la diabetes tipo 2 (Kharitononkov and DiMarchi, 2015; Zhang and Li, 2015). No obstante, la proteína nativa es muy lábil y altamente susceptible a la degradación proteolítica con lo que la vida media de FGF21 es muy corta (0.5h en ratón y 2h en primates) (Kharitononkov et al., 2007; Wentz et al., 2006). La industria farmacéutica está ejerciendo considerables esfuerzos para superar estas limitaciones mejorando la producción de miméticos o análogos de FGF21 que permitan desarrollar potenciales productos terapéuticos (So and Leung, 2016; Zhang and Li, 2015). Para ello, se producen alteraciones sobre la molécula original de FGF21, como la conjugación de FGF21 con polietilenglicol (PEGilación de FGF21), fusión con la región cristalizable de un anticuerpo (Fc-FGF21), la conjugación de FGF21 a la estructura de un anticuerpo monoclonal y otras moléculas quiméricas de FGF21 (So and Leung, 2016; Zhang and Li, 2015). Dichos miméticos tienen una eficacia terapéutica similar a la proteína FGF21 nativa en modelos animales (pequeños y grandes) de obesidad y DT2 (Adams et al., 2013b; Foltz et al., 2012; Hecht et al., 2012; Smith et al., 2013; Talukdar et al., 2016). De hecho, la primera generación de análogos de FGF21 ya ha alcanzado la fase clínica, con dos ensayos clínicos de fase I que han demostrado una mejora de la dislipidemia, una ligera pérdida de peso y disminución de la insulinemia en ayuno en pacientes con obesidad y DT2 (Gaich et al., 2013; Talukdar et al., 2016). Por lo tanto, la evidencia preclínica y clínica corrobora que FGF21 puede ser un candidato atractivo contra la obesidad y la DT2.

A pesar de las mejoras farmacocinéticas, los miméticos de FGF21 requieren administrarse periódicamente para mediar su efecto terapéutico y además, se trata de proteínas exógenas modificadas que pueden desencadenar problemas inmunológicos (Gaich et al., 2013; Talukdar et al., 2016), lo que, aparte de resultar incómodo para los pacientes, podría comprometer el tratamiento. Por este motivo, es necesario investigar nuevas estrategias terapéuticas basadas en FGF21, como por ejemplo, desarrollar nuevas aproximaciones de terapia génica que permitan expresar de manera sostenida esta proteína.

5. TERAPIA GÉNICA IN VIVO CON VECTORES ADENOASOCIADOS (AAV)

La terapia génica se basa en la introducción de material genético foráneo en las células diana con la finalidad de contrarrestar o reemplazar el mal funcionamiento mediante la edición génica, adición génica o tecnología del *knockdown* (Naldini, 2015).

Los vectores virales adenoasociados (AAV) son virus modificados genéticamente en los cuales se ha reemplazado o eliminado todos los genes virales involucrados en los mecanismos de integración y replicación, y se ha añadido el constructo con el gen terapéutico de interés (Nayerossadat et al., 2012). Además, hasta la fecha no se ha asociado ningún proceso patogénico en humanos a los virus adenoasociados. En consecuencia, los AAVs mantienen la infectividad del virus parental pero no son capaces de generar nuevos viriones.

El perfil de seguridad de los AAVs es excelente y poseen la capacidad de proporcionar una expresión a largo plazo en una amplia variedad de tejidos, características que los convierten en vehículos muy eficientes para la terapia génica (Mount et al., 2002). Por lo tanto, gran parte de las estrategias terapéuticas para el tratamiento de enfermedades genéticas en humanos mediante terapia génica *in vivo* hacen uso de la tecnología de los AAVs con resultados muy prometedores (Mingozzi and High, 2011).

5.1. Biología de los virus adenoasociados

Los AAVs pertenecen a la familia *Parvoviridae* y el género *Dependoparvovirus* y son virus no patogénicos con una cápside icosaédrica y sin envoltura que dependen de las funciones de un virus auxiliar co-infectante, como un adenovirus o un virus herpes simplex, para poder replicarse (Balakrishnan and Jayandharan, 2014; Wolf et al., 2015). Sin la presencia del virus auxiliar, los AAVs salvajes quedan retenidos en forma episomal formando grandes concatámeros circulares o, en frecuencia mucho más baja, integrados dentro de una región específica del cromosoma 19 humano (19q13.3-qter) (McCarty et al., 2004).

El genoma de los virus AAVs consiste en una cadena simple de DNA (ssDNA) de unas 4.7 Kb. Esto incluye las secuencias con los genes Rep y Cap con tres marcos de lectura abiertos (ORFs) que actúan como el origen de replicación viral y dos horquillas flanqueantes con secuencias de 145 pb palindrómicas, llamadas repeticiones terminales invertidas (ITRs), que actúan como señal de empaquetamiento (Figura 5) (Kotterman and Schaffer, 2014; Lisowski et al., 2015).

El ORF del gen Rep codifica para cuatro proteínas no estructurales (REP78, REP68, REP52 y REP40) expresadas mediante promotores alternativos y variantes de *splicing*, las cuales son cruciales para la replicación, transcripción, integración y encapsidación del genoma (Figura 5) (Kotterman and Schaffer, 2014). El ORF de Cap codifica para tres proteínas estructurales de ensamblaje (VP1, VP2 y VP3) que forman la cápside icosaédrica de 60 subunidades con la ayuda de la proteína de activación de ensamblaje (AAP) expresada a partir del ORF2 del gen Cap (Figura 5) (Kotterman and Schaffer, 2014; Naumer et al., 2012).

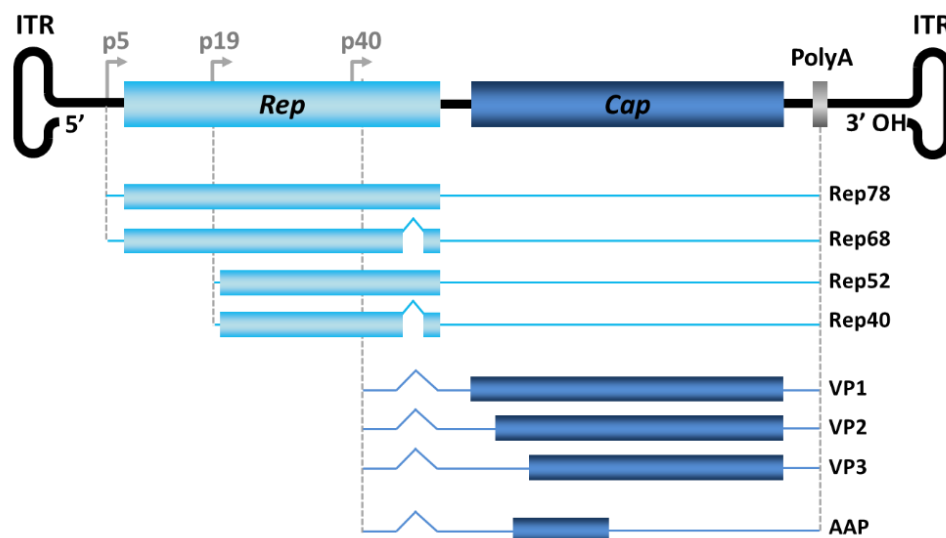


Figura 5. Genoma de los virus adenoasociados. Representación esquemática del genoma de DNA de cadena simple de un virus AAV que contiene dos genes (Rep y Cap) y tres marcos de lectura abiertos (ORF) flanqueados por repeticiones terminales repetidas (ITR). Por *splicing* alternativo, Rep codifica cuatro proteínas no estructurales (Rep78, Rep 68, Rep52 y Rep40) y el gen Cap codifica tres proteínas estructurales (VP1, VP2 y VP3) y la proteína de activación de ensamblaje (AAP). Rep 78 y Rep68 se transcriben por el promotor interno p5, Rep52 y Rep40 por el promotor p19 y las proteínas Cap por el promotor p40 (Adaptado de Balakrishnan and Jayandharan, 2014).

5.2. Vectores virales adenoasociados recombinantes

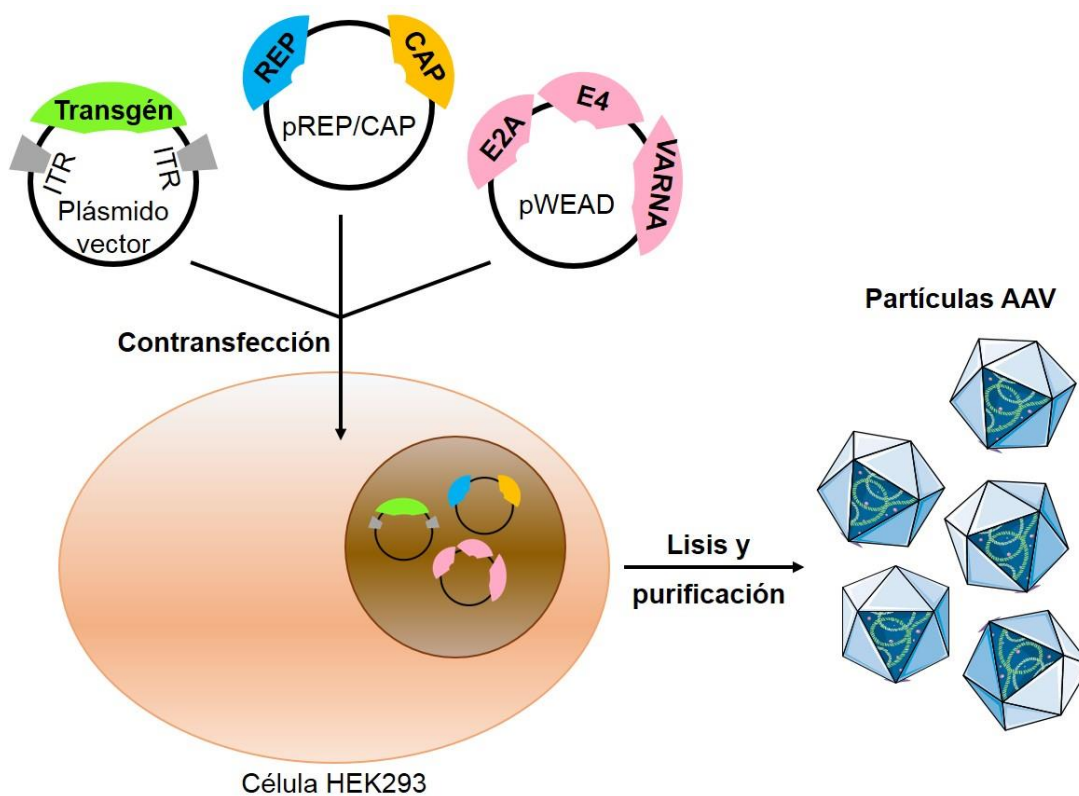
Para obtener los vectores utilizados en las aplicaciones de terapia génica, se eliminan todos los ORFs del genoma viral y se sustituyen por la secuencia de DNA heteróloga que contiene el constructo terapéutico de elección, el cual queda flanqueado por las ITRs. Por lo tanto, la partícula resultante, conocida como AAV recombinante (rAAV), puede empaquetarse dentro de la cápside pero no posee capacidad de integrarse ni de replicarse (Balakrishnan and Jayandharan, 2014; Hirata and Russell, 2000; Snyder et al., 2011). De esta manera, las células transducidas por los rAAVs no expresan ningún gen viral y por lo tanto, en modelos animales, no pueden ser reconocidas y destruidas por el sistema inmune. Sin

embargo, en humanos puede haber existido previamente una respuesta inmune contra el virus AAV salvaje que provoque posteriormente una respuesta inmune contra el vector administrado, o también contra el transgén, que podría interferir en la eficiencia terapéutica (Manno et al., 2006; Mingozzi and High, 2011, 2013).

Los vectores AAV recombinantes se mantienen predominantemente episomales en forma circular en el núcleo de la célula huésped aunque a veces, con muy baja frecuencia, pueden integrarse en el genoma, habitualmente en zonas de transcripción génica activa o en zonas donde se produce la ruptura de la doble cadena de DNA (Deyle and Russell, 2009; Lisowski et al., 2015). Una vez se ha transducido la célula diana, la cadena simple de los rAAVs deben convertirse en doble cadena para ser transcrita y permitir la expresión del transgén. La síntesis de la cadena complementaria requiere la actividad de la célula huésped y supone un paso limitante del proceso (Ferrari et al., 1996). Con tal de eludir este paso limitante se diseñaron AAVs con un genoma de doble cadena (dsAAV) que no requieren que se sintetice la cadena complementaria (McCarty et al., 2001). Contrariamente, los dsAAV presentan la mitad de la capacidad de clonaje y una mayor dificultad en su obtención. Además, exacerban la respuesta innata del sistema inmune contra ellos (Martino et al., 2011).

Es posible producir y purificar los vectores rAAV en el laboratorio a títulos elevados (Ayuso et al., 2010a). El sistema de triple transfección en células embrionarias de riñón humano (HEK293) es el más utilizado para producir los rAAVs (Figura 6). Uno de los tres plásmidos que se usan en la transfección contiene el constructo terapéutico flanqueado por las ITRs del AAV del serotipo 2, ya que se trata del serotipo mejor caracterizado (Samulski et al., 1982; Srivastava et al., 1983). El segundo plásmido aporta los genes Rep y Cap del genoma de los AAVs sin las ITRs. Para evitar posibles recombinaciones durante la producción de los vectores, los sistemas de empaquetamiento suelen expresar las proteínas virales en posición *trans* respecto al gen terapéutico (Snyder et al., 2011). Por último, el tercer plásmido posee las funciones adenovirales necesarias para la replicación de los AAVs. Después de la expresión y traducción de las proteínas REP y VP, el constructo terapéutico flanqueado por las ITRs se replica y las moléculas de DNA monocatenario se introducen en las cápsides del AAV (Figura 6). Posteriormente, las células HEK293 se lisan para liberar las partículas de vector, que se aíslan de los detritos celulares por centrifugación en gradiente de densidad (CsCl o iodixanol) y/o cromatografía en columna (Ayuso et al., 2010b). La preparación purificada del vector puede contener cápsides vacías, la cantidad de las cuales es inversamente proporcional a la

eficiencia de empaquetamiento del vector producido y depende también del método de purificación (Ayuso et al., 2010b). El método de purificación que separa más eficientemente las cápsidas vacías de las que contienen genoma es la purificación por gradiente de CsCl (Ayuso et al., 2010b; Scallan et al., 2006; Zolotukhin et al., 1999). En particular, la precipitación con polietilenglicol (PEG) y el protocolo de purificación en CsCl reducen significativamente las cápsidas vacías de los vectores AAV y las impurezas de DNA y proteína, aumentando así la pureza de la preparación viral que en último término resulta en una mayor transducción *in vivo* (Ayuso et al.,



2010b).

Figura 6. Producción de los AAVs recombinantes (rAAV) mediante el método de triple transfección. Para producir los vectores rAAV se transfecta células HEK293 con tres plásmidos: ambos genes (Rep y Cap) se reemplazan por el transgén flanqueado por las señales virales de empaquetamiento (ITRs) para crear el plásmido vector; las proteínas REP y CAP las aporta en *trans* el plásmido pREP/CAP y las funciones auxiliares propias de un virus auxiliar necesarias para la producción de los AAVs las aporta el tercer plásmido pWEAD. Posteriormente, las partículas de vector se purifican a partir del lisado celular con tal de obtener cápsidas llenas de vector. La representación esquemática no es a escala (Adaptado de Ayuso et al., 2010B).

En terapia génica se usan múltiples serotipos de AAVs con diferentes propiedades (Tabla 1). Estos serotipos se diferencian por las secuencias que codifican para las proteínas de la cápsida (VP1, VP2 y VP3), que determinan la afinidad de unión con

los distintos receptores y co-receptores celulares, confiriendo a cada serotipo un tropismo celular diferente (Balakrishnan and Jayandharan, 2014).

Tabla 1. Características de los serotipos AAV del 1 al 12. Resumen del origen de cada serotipo de AAV, sus receptores y su tropismo tisular.

Serotipo	Origen	Receptor y co-receptores	Tropismo tisular
AAV1	Humano o PNH	N-linked sialic acid	MS ^{1,2,3} , SNC ^{1,2} , vías respiratorias ^{1,2} , retina ¹ , páncreas ¹ , corazón ^{1,4} , hígado ¹
AAV2	Humano	HSPG, FGFR1, HGFR, LamR, CD9, integrina $\alpha_v\beta_5$, $\alpha_5\beta_1$,	MS ¹ , SNC ^{1,5} , hígado ¹ , riñón ¹ , retina ^{1,2,3,6}
AAV3	Humano o PNH	HSPG, FGFR, HGFR, LamR	HCC ⁶ , MS ¹ , oído interno
AAV4	PNH	O-linked sialic acid	SNC ¹ , retina ^{1,3} , pulmón ^{1,2} , riñón ¹
AAV5	Humano	N-linked sialic acid, PDGFR	SM ¹ , CNS ^{1,3} , lung ¹ , retina ¹ , liver
AAV6	Human	HSPG, N-linked sialic acid	MS ^{1,3} , corazón ^{1,3,4,7} , vías respiratorias ^{1,2,3}
AAV7	Rhesus macaque	Desconocido	MS ¹ , retina ¹ , SNC ¹ , hígado ¹
AAV8	Rhesus macaque	LamR	Hígado ^{1,2,3} , SNC ^{1,2,3} , retina ^{1,3} , corazón ¹ , MS ¹ , páncreas ¹ , riñón ¹ , tejido adiposo ¹
AAV9	Humano	N-linked glycans, LamR	Hígado ¹ , corazón ^{1,2,4} , MS ^{1,3} , pulmón ¹ , páncreas ¹ , SNC ^{1,2} , retina ^{1,2} , testículo ¹ , riñón ¹ , tejido adiposo ¹
AAV10	PNH	Desconocido	Hígado
AAVrh10	Rhesus macaque	LamR	Hígado ¹ , corazón ¹ , MS ^{1,3} , pulmón ¹ , SNC ^{1,8} , páncreas ¹ , retina ¹ , riñón ¹
AAV11	PNH	Desconocido	Hígado
AAV12	PNH	Desconocido	Hígado ¹ , corazón ¹ , MS ^{1,3} , pulmón ¹ , SNC ⁸ , páncreas ¹ , retina ¹ , riñón ¹

Tropismo tisular en ¹ratón, ²PNH, ³perro, ⁴cerdo, ⁵mono, ⁶ser humano, ⁷oveja y ⁸rata.

Abreviaciones: PNH, primate no humano; HSPG, *heparan sulfate proteoglycan*; LamR, 37/67 kDa *laminin receptor*; FGFR1, *fibroblast growth factor receptor 1*; HGFR, *hepatocyte growth factor receptor*; PDGFR, *platelet-derived growth factor receptor*; EGFR, *epidermal growth factor receptor*; MS, músculo esquelético; SNC, sistema nervioso central; HCC, carcinoma hepatocelular.

(Adaptado de Jimenez et al., 2013; Balakrishnan and Jayandharan, 2014; Lisowski et al., 2015).

5.3. Transferencia de genes al hígado mediante vectores AAV

La mejor opción para secretar proteínas al torrente circulatorio mediante vectores AAV es transducir el hígado. La administración sistémica de vectores AAV da lugar a una elevada acumulación de partículas virales en hígado debido a que dicho órgano recibe el 25% de la sangre bombeada por el corazón (Vollmar and Menger, 2009). Además, los hepatocitos de individuos adultos presentan una elevada longevidad, con el 98% del total de células en estado de quiescencia (MacDONALD, 1961), hecho que supone una ventaja importante dado que los vectores AAV no son integrativos y por tanto, se minimizan los efectos de dilución del vector propios de los tejidos con un alto grado de reposición celular (Kattenhorn et al., 2016).

Aunque se ha demostrado que muchos serotipos de AAV son capaces de transducir el hígado (Tabla 1), el vector AAV8 es el que muestra un mayor número de hepatocitos transducidos después de su administración sistémica (Gao et al., 2002; Wang et al., 2010; Zincarelli et al., 2008).

Por otro lado, también se puede aprovechar la ventaja de la existencia de promotores específicos de hígado que promueven la expresión del transgén específicamente en este órgano, evitando así la expresión del transgén en tejidos no deseados. En concreto, la región control del *locus* de la apolipoproteína E (HCR) juntamente con el promotor de la α 1-antitripsina humana (hAAT), promueven niveles elevados de producción proteica específicamente en hígado (Davidoff et al., 2005; Miao et al., 2000). Existen otros promotores específicos de hígado, como el promotor de la globulina de unión a tiroxina (TBG) que también se pueden usar para acotar la expresión génica al hígado (Rouet et al., 1992; Wang et al., 2005).

Todos estos motivos han hecho de los vectores AAV una herramienta muy útil para la manipulación genética del hígado. Específicamente, la administración sistémica de AAV8 junto con el uso de promotores específicos de hígado como HCR/hAAT es la estrategia que proporciona unos niveles superiores del transgén de interés en el hígado, consiguiendo así, niveles circulantes elevados de proteínas secretables.

III. OBJETIVOS

El potencial del factor de crecimiento fibroblástico 21 (FGF21) para regular el metabolismo energético y mejorar la sensibilidad a la insulina lo convierte en un prometedor agente terapéutico para tratar la obesidad y la diabetes tipo 2 (DT2). Dado que la proteína nativa posee una vida media en suero muy corta y es susceptible a la proteólisis y la agregación, la industria farmacéutica ha realizado grandes esfuerzos para desarrollar múltiples análogos y miméticos de FGF21 con un perfil farmacocinético mejorado y que se puedan producir a gran escala. No obstante, estas moléculas sintéticas pueden producir reacciones inmunitarias al no ser reconocidas como propias por el organismo y, dado que poseen modificaciones, también podrían señalar inespecíficamente al margen de la vía canónica de FGF21. A este respecto, la terapia génica ofrece una ventaja sobre los miméticos y análogos de FGF21 al permitir la sobreexpresión de la proteína nativa a largo plazo con una única administración de vectores adenoasociados (AAV).

Por lo tanto, el objetivo principal de esta tesis doctoral fue **desarrollar una estrategia de terapia génica capaz de incrementar los niveles circulantes de FGF21 para tratar la obesidad y la diabetes tipo 2**. Este objetivo general se subdividió en los siguientes objetivos específicos:

1. Estudiar la eficacia terapéutica y la seguridad de una aproximación de terapia génica mediada por el vector viral AAV8-FGF21 en un modelo murino de obesidad y resistencia a la insulina inducidas por una dieta alta en lípidos.
2. Evaluar los efectos terapéuticos del tratamiento con el vector de terapia génica AAV8-FGF21 en ratones ob/ob, un modelo extremo de obesidad y resistencia a la insulina.

IV. RESULTADOS

1. CONSTRUCCIÓN DE UN VECTOR VIRAL ADENOASOCIADO CODIFICANTE PARA LA PROTEÍNA FGF21 MURINA

Con la finalidad de desarrollar una aproximación terapéutica para el tratamiento de la diabetes T2 y la obesidad mediante la sobreexpresión a largo plazo de FGF21 en hígado, se diseñó un vector AAV del serotipo 8 codificante para el gen murino optimizado de FGF21 bajo el control del promotor humano de la α 1-antitripsina (hAAT).

La elección del serotipo 8 se fundamenta en su alta eficiencia para transducir el hígado. El promotor hAAT es específico de hígado y por tanto permite que la expresión del transgén quede localizada únicamente en este órgano tal como se ha demostrado anteriormente en nuestro laboratorio (Vilà et al., 2014). Por otro lado, la optimización del gen FGF21 (Gene ID: 56636; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>) permite obtener un aumento en la eficiencia tanto a nivel de traducción del mRNA así como de la expresión proteica (Disbrow et al., 2003; Ward et al., 2011). El plásmido resultante se denominó pGG2-hAAT-moFGF21 (en el que la *m* indica el origen murino y la *o* la optimización).

A modo de control, se generó un plásmido pAAV-hAAT-null no codificante que contenía las mismas secuencias del promotor hAAT, la señal de poliadenilación e ITRs que el plásmido pGG2-hAAT-moFGF21.

A partir de estos constructos, se generaron los vectores AAV8 correspondientes utilizando el sistema de triple transfección en células HEK293, que se llevó a cabo tal y como se especifica en el apartado de Material y Métodos. Los vectores virales resultantes se denominaron AAV8-FGF21 y AAV8-null (Figura 7).

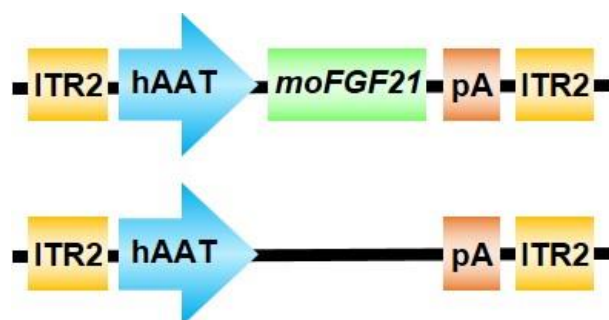


Figura 7. Representación esquemática del vector AAV8-FGF21 para expresar la proteína FGF21 murina optimizada específicamente en hígado y del control AAV8-null. ITR2: *Inverted Terminal Repeats* del vector AAV2; hAAT: promotor humano de la α 1-antitripsina; moFGF21: secuencia con uso de codón optimizado del gen *Fgf21* murino; pA: secuencia de poliadenilación de la β -globina de conejo. El constructo no está representado a escala.

2. ESTUDIO DEL EFECTO DEL TRATAMIENTO CON AAV8-FGF21 EN RATONES CON OBESIDAD INDUCIDA POR UNA DIETA ALTA EN LÍPIDOS

Una vez generado el vector AAV8-FGF21, se estudió si la sobreexpresión en hígado de FGF21 tras una única administración intravenosa del vector en ratones obesos era capaz de revertir la obesidad y la resistencia a la insulina.

La obesidad puede inducirse mediante la alimentación con una dieta alta en lípidos (HFD) (Surwit et al., 1998). El aumento de peso empieza a evidenciarse al cabo de tan solo una semana después del inicio de la dieta aunque a menudo se requiere un periodo de tiempo más largo para inducir un aumento de peso pronunciado (8 semanas o más) (Winzell and Ahrén, 2004). El incremento de peso está asociado con la resistencia a la insulina y deficiencias en el metabolismo de la glucosa aunque normalmente no desarrolla una DT2 abierta (Almind and Kahn, 2004; Surwit et al., 1995).

Por lo tanto, a fin de estudiar el potencial antiobesogénico de la administración del vector AAV8-FGF21, se alimentó con dieta alta en lípidos (HFD) a ratones macho C57BL/6. Otra cohorte de animales se mantuvo como control, alimentándolo con dieta estándar (*chow*). Se realizaron dos estudios en paralelo a dos edades diferentes, ratones “Adultos jóvenes” (Figura 8) y ratones “Adultos” (Figura 9).

En primer lugar se alimentó a ratones macho C57BL/6 de 9 semanas de edad (Adultos jóvenes) con dieta HFD durante dos meses. Mientras que los ratones control en dieta *chow* solo ganaron un 27% de su peso corporal, los animales alimentados con dieta HFD se volvieron obesos. A continuación, se les administró una única dosis intravenosa de 10^{10} vg/animal (*Low dose*, LD) o 5×10^{10} vg/animal (*High dose*, HD) de vector AAV8-FGF21. Como controles, un grupo de animales obesos, alimentados con dieta HFD y los animales sanos alimentados con dieta *chow* se trataron también con 5×10^{10} vg/animal de vector no codificante (AAV-null).

A continuación, se hizo un seguimiento semanal del peso, la ingesta y la glicemia hasta los 16.5 meses de edad y se realizaron pruebas metabólicas y comportamentales como la determinación del gasto energético, el test de tolerancia a la insulina (ITT) y la prueba del Open-field. Se sacrificó a los animales a ~1 año después de la administración de los vectores AAV (Figura 8).

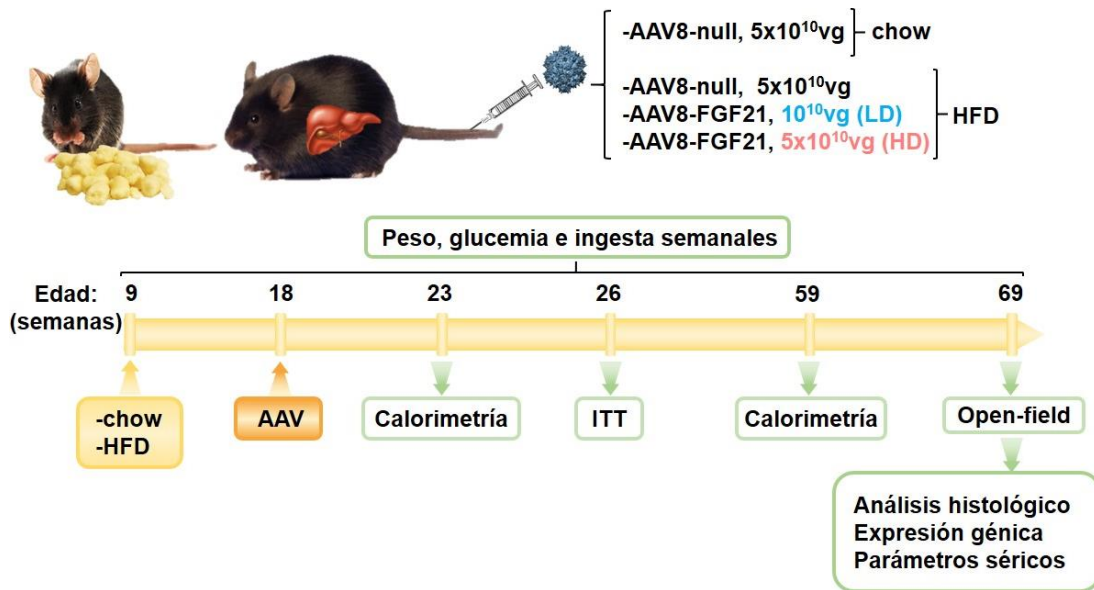


Figura 8. Diseño experimental de la administración iv de vectores AAV8-FGF21 o AAV-null a ratones Adultos jóvenes con obesidad inducida por la dieta. Inducción de la obesidad con dieta alta en lípidos a ratones macho C57BL/6 Adultos jóvenes durante ~2 meses, posterior administración única iv de vectores AAV a diversas dosis y esquema de las pruebas experimentales a las que se sometieron hasta el sacrificio a los 16.5 meses de edad. ITT: *Insulin Tolerance Test*. n=8-10.

Teniendo en cuenta que la obesidad y la diabetes T2 son patologías asociadas al envejecimiento, se planteó un segundo estudio paralelo enfocado a tratar animales de edad más avanzada. En este segundo estudio, se alimentó a ratones macho C57BL6 con dieta HFD o *chow* a las 29 semanas de edad (Adultos). Alrededor de las 38 semanas de edad, los ratones alimentados con HFD se volvieron obesos ganando un ~40% de su peso corporal mientras que el grupo control, alimentado con dieta *chow*, lo mantuvo constante. A continuación, de manera similar al primer estudio, se les administró una única dosis intravenosa de 10^{10} vg/animal (*Low dose*, LD), 2×10^{10} vg/animal (*Intermediate dose*, ID) o 5×10^{10} vg/animal (*High dose*, HD) de vector AAV8-FGF21. Como controles, un grupo de animales obesos y los animales sanos alimentados con dieta *chow* se trataron también con 5×10^{10} vg/animal de vector AAV-null. Seguidamente, se realizó un seguimiento semanal del peso, la ingesta y la glicemia y se efectuaron pruebas metabólicas como la determinación del gasto energético y el test de tolerancia a la insulina (ITT) sacrificando a los animales a los ~8 meses post-AAV (Figura 9).

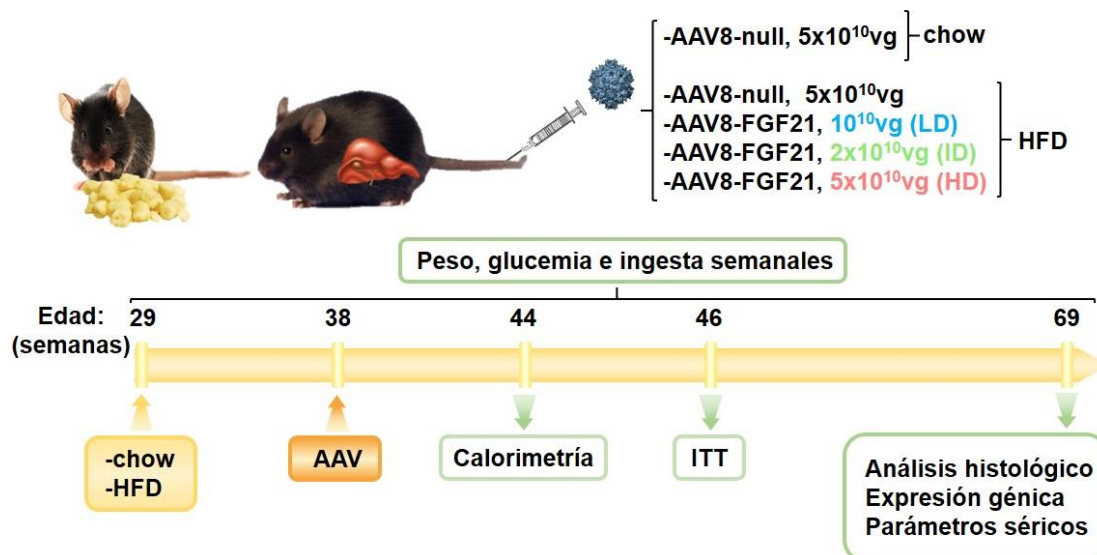


Figura 9. Diseño experimental de la administración iv de vectores AAV8-FGF21 o AAV-null a ratones Adultos con obesidad inducida por la dieta. Inducción de la obesidad con dieta alta en lípidos a ratones macho C57BL/6 Adultos durante ~2 meses, posterior administración única iv de vectores AAV a diversas dosis y esquema de las pruebas experimentales a las que se sometieron hasta el sacrificio a los 16.5 meses de edad. ITT: Insulin Tolerance Test. n=7-9.

2.1. Reversión duradera de la obesidad mediante AAV8-FGF21

Se valoró la evolución del peso de los animales incluidos en el estudio de Adultos jóvenes durante más de un año. Mientras que los Adultos jóvenes tratados con la LD ganaron el mismo peso que los controles alimentados con HFD, los tratados con la HD normalizaron el peso corporal unas pocas semanas después de la administración del vector AAV8-FGF21, manteniendo un peso similar al de sus controles alimentados con dieta *chow* durante el resto del seguimiento (Figura 10A,B).

En el segundo estudio con animales Adultos se obtuvieron resultados muy similares en los que se observó una bajada del peso corporal que fue dosis-dependiente. Al igual que en los Adultos jóvenes, la LD de AAV8-FGF21 no contrarrestó la ganancia de peso debida a la HFD aunque los animales tratados con esa dosis siempre se mantuvieron por debajo del peso de los controles obesos. Inicialmente, los animales tratados con la ID de AAV8-FGF21 perdieron un 20% del peso corporal y continuaron perdiendo peso progresivamente hasta alcanzar el peso de los animales controles alimentados con dieta *chow*. La administración de la HD de AAV8-FGF21 también medió una bajada de peso progresiva en los Adultos que, a al final del estudio (~8 meses post AAV), resultó en un peso similar al de los animales con dieta *chow* al inicio del estudio (Figura 11A,B).

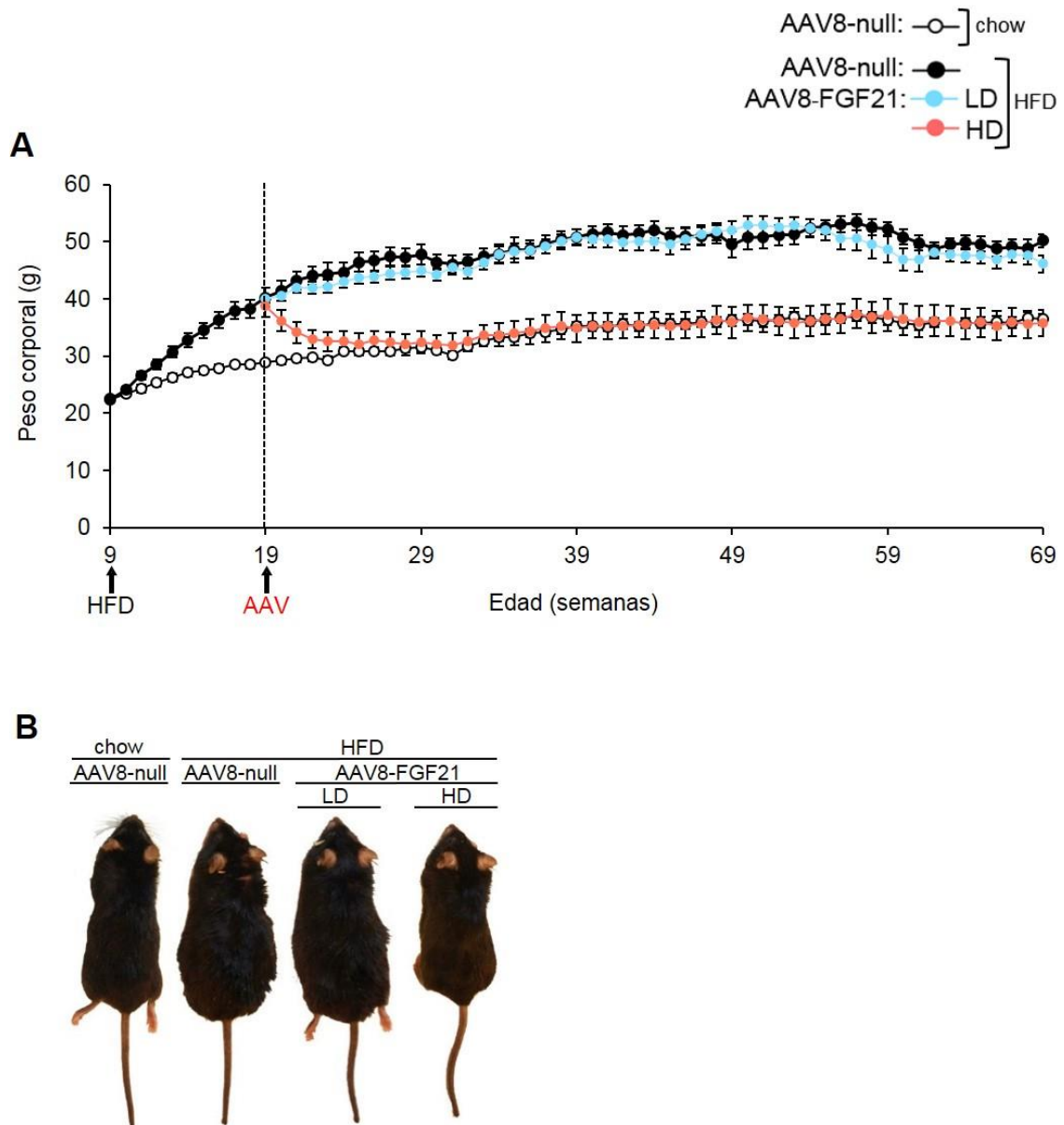


Figura 10. Evaluación del peso en animales Adultos jóvenes tratados con diversas dosis de AAV8-FGF21. (A, B) Ratones macho C57BL/6 con obesidad inducida por la dieta se trataron con diversas dosis de AAV8-FGF21 a las 19 semanas de edad. **(A)** Evolución del peso corporal absoluto en ratones macho C57BL/6 alimentados durante ~10 semanas con dieta *chow* o *HFD* cuando eran Adultos jóvenes y luego tratados con 10^{10} vg/animal (LD) o 5×10^{10} vg/animal (HD) de vector AAV8-FGF21. El grupo control obeso con *HFD* y el sano en dieta *chow* se trataron con 5×10^{10} vg/animal de vector AAV8-null. **(B)** Imágenes representativas de los animales pertenecientes a todos los grupos experimentales del estudio en Adultos jóvenes a los 16.5 meses de edad. $n=8-10$.

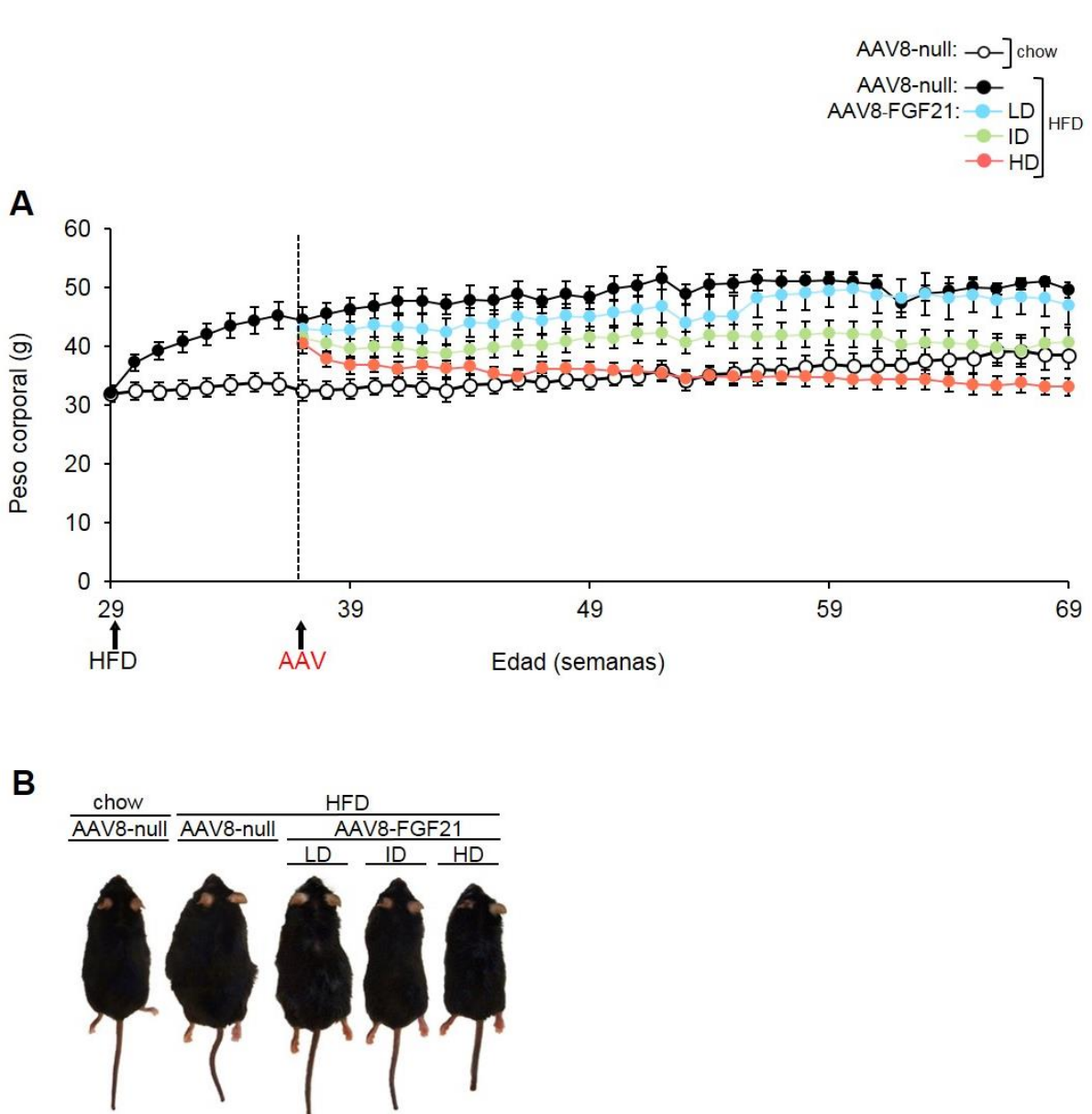


Figura 11. Evaluación del peso en animales Adultos tratados con diversas dosis de AAV8-FGF21. (A, B) Ratones macho C57BL/6 con obesidad inducida por la dieta se trataron con diversas dosis de AAV8-FGF21 a las 38 semanas de edad. (A) Evolución del peso corporal absoluto en ratones macho C57BL/6 alimentados durante ~10 semanas con dieta *chow* o *HDF* cuando eran Adultos y luego tratados con 10^{10} vg/animal (LD), 2×10^{10} vg/animal (ID) o 5×10^{10} vg/animal (HD) de vector AAV8-FGF21. El grupo control obeso con *HFD* y el sano en dieta *chow* se trataron con 5×10^{10} vg/animal de vector AAV8-null. (B) Imágenes representativas de los animales pertenecientes a todos los grupos experimentales del estudio en Adultos a los 17.25 meses de edad. $n=7-9$.

Al final del estudio se obtuvieron y pesaron los principales depósitos adiposos blancos (WAT), el hígado y el músculo esquelético (cuádriceps). La reversión de la obesidad provocada por el tratamiento con AAV8-FGF21 se hizo patente en la reducción, de manera dosis-dependiente, del peso de los depósitos adiposos blancos principales tales como el epididimal (eWAT) (Figura 12, Figura 13), el inguinal (iWAT) (Figura 12, Figura 13) y el retroperitoneal (rWAT) (Figura 12) tanto en animales tratados cuando eran Adultos jóvenes como cuando eran Adultos. El incremento de peso del hígado inducido por la dieta se normalizó completamente con la transferencia génica de FGF21 (Figura 12, Figura 13). No se observó ninguna alteración en la masa muscular causada por la dieta o por la administración de los vectores tal como indica el peso de los cuádriceps (Figura 12).

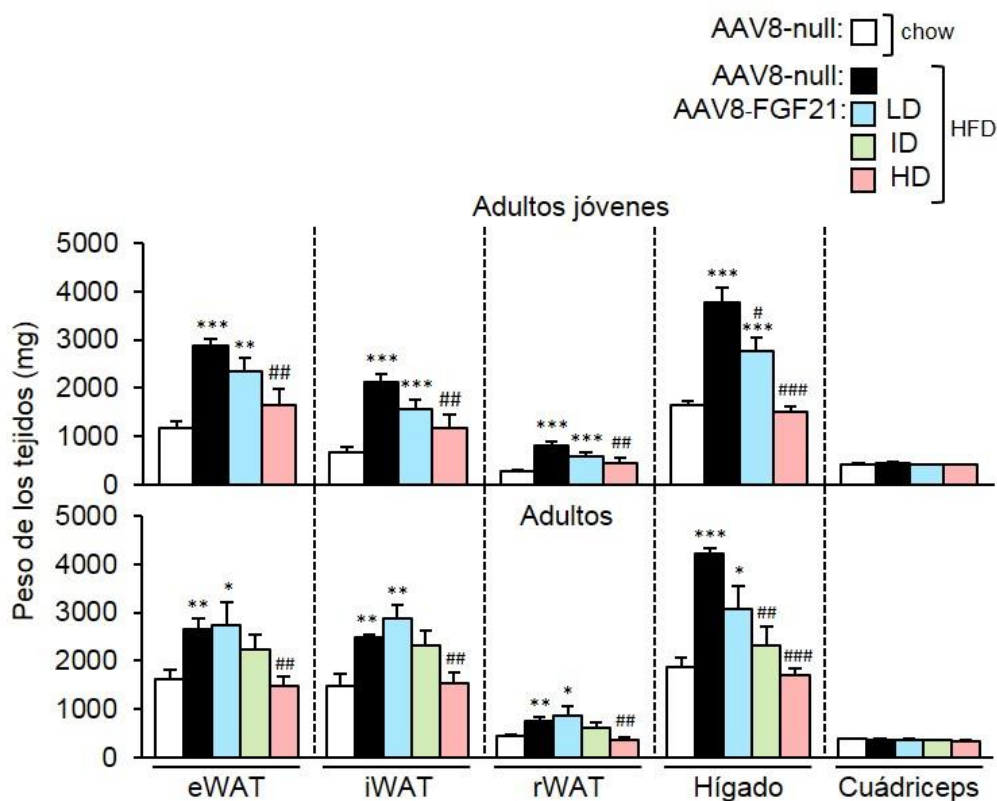


Figura 12. Pesos de los tejidos. Ratones macho C57BL/6 con obesidad inducida por la dieta se trataron con diversas dosis de AAV8-FGF21 a las 19 (Adultos jóvenes) o 38 (Adultos) semanas de edad. A las 50 y 31 semanas respectivamente después del tratamiento se midió el peso de los depósitos adiposos blancos eWAT, iWAT y rWAT, el hígado y los cuádriceps. n=7-10. Los resultados se expresan como la media \pm EEM. *P<0.05, **P<0.01 y ***P<0.001 versus el grupo alimentado con dieta chow inyectado con vectores nulos. #P<0.05, ##P<0.01 y ###P<0.001 versus el grupo alimentado con dieta HFD inyectado con vectores nulos.

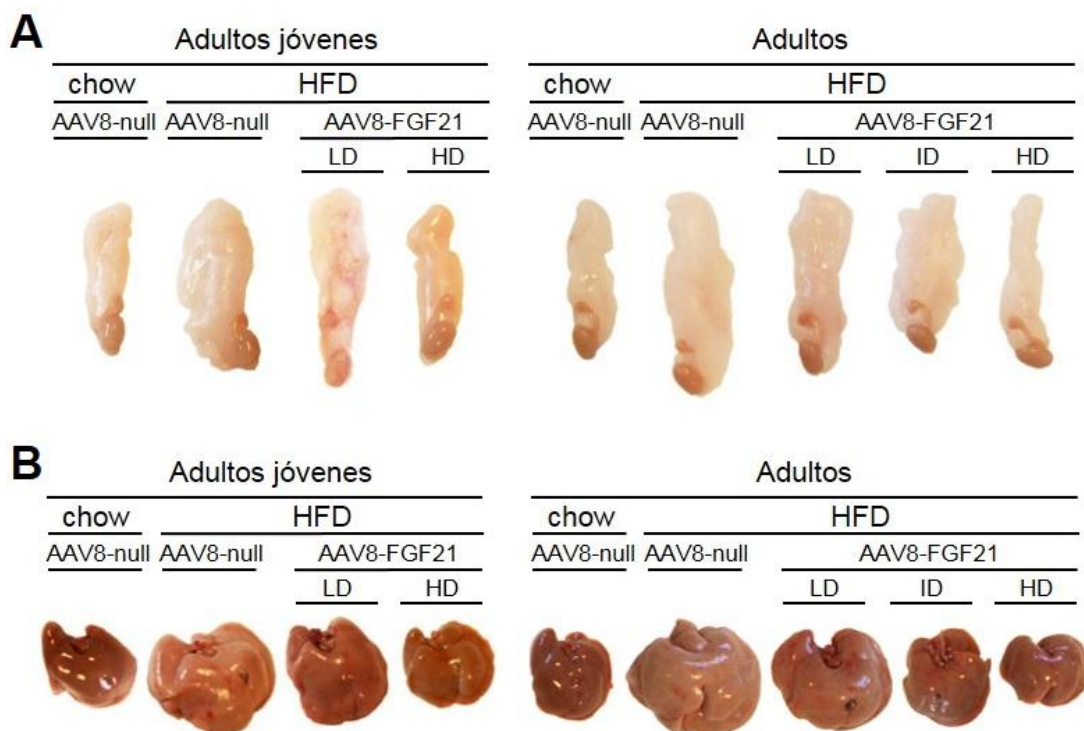


Figura 13. Evaluación macroscópica del eWAT y el hígado. (A, B) Ratones macho C57BL/6 con obesidad inducida por la dieta se trataron con diversas dosis de AAV8-FGF21 a las 19 (Adultos jóvenes) o 38 (Adultos) semanas de edad. A las 50 y 31 semanas respectivamente después del tratamiento, al final de los estudios, se extrajeron los eWAT y el hígado **(A)** Imágenes representativas de los eWAT de animales pertenecientes a todos los grupos experimentales de los estudios en Adultos jóvenes y Adultos. **(B)** Imágenes representativas de los hígados de animales pertenecientes a todos los grupos experimentales de los estudios en Adultos jóvenes y Adultos.

2.2. Expresión y secreción continua de FGF21 en animales tratados con AAV8-FGF21

Al finalizar los estudios a los 16.5 meses de edad, se comprobó la sobreexpresión de FGF21 en el hígado, el órgano diana del vector AAV8-FGF21. Los animales tratados con AAV8-FGF21 de ambas edades, Adultos jóvenes y Adultos, sobreexpresaban FGF21 optimizado específicamente en hígado (Figura 14A,B). Como consecuencia, dado que FGF21 es una proteína secretable, se detectaron en circulación niveles de FGF21 de manera dosis-dependiente, que se mantuvieron estables incluso un año después con una única administración del vector. Además, se observó que los niveles circulantes de FGF21 alcanzados fueron muy similares entre ambos estudios (Figura 14C).

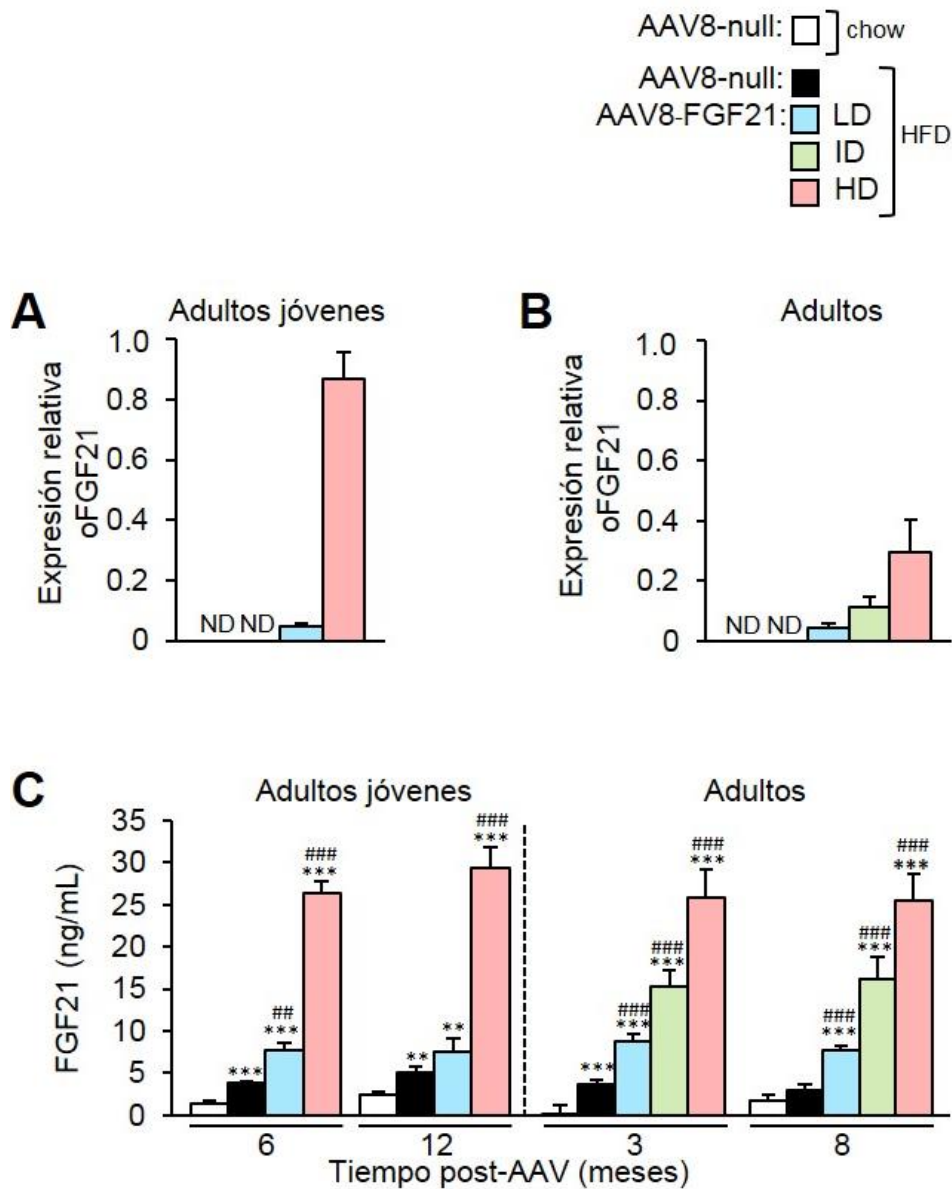


Figura 14. Niveles de expresión de FGF21 en hígado y niveles circulantes de FGF21. Ratones macho C57BL/6 con obesidad inducida por la dieta se trataron con diversas dosis de AAV8-FGF21 a las 18 o 38 semanas de edad. **(A, B)** Niveles de expresión de FGF21 optimizado (oFGF21) en hígado 54 semanas **(A)** y 34 semanas **(B)** después de una única administración de AAV8-FGF21 medidos por RT-PCR y normalizados por *Rplp0*. **(C)** Niveles séricos de FGF21 medidos a mitad y al final de ambos estudios mediante ELISA. ND: no detectado. n=7-10. Los resultados se expresan como la media \pm EEM. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ y *** $P < 0.001$ versus el grupo alimentado con dieta chow inyectado con vectores nulos. # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ y ### $P < 0.001$ versus el grupo alimentado con dieta HFD inyectado con vectores nulos.

2.3. Reversión de la hipertrofia y la inflamación del eWAT inducidas por la dieta HFD

La dieta HFD induce un incremento del tamaño de los adipocitos y la consecuente inflamación del tejido adiposo (Choe et al., 2016). La valoración microscópica del eWAT en ambos estudios reveló que la administración de la dosis alta del vector codificante para FGF21 contrarrestó la hipertrofia de los adipocitos. Así, se observó una clara disminución del tamaño de los adipocitos blancos (Figura 15A,B).

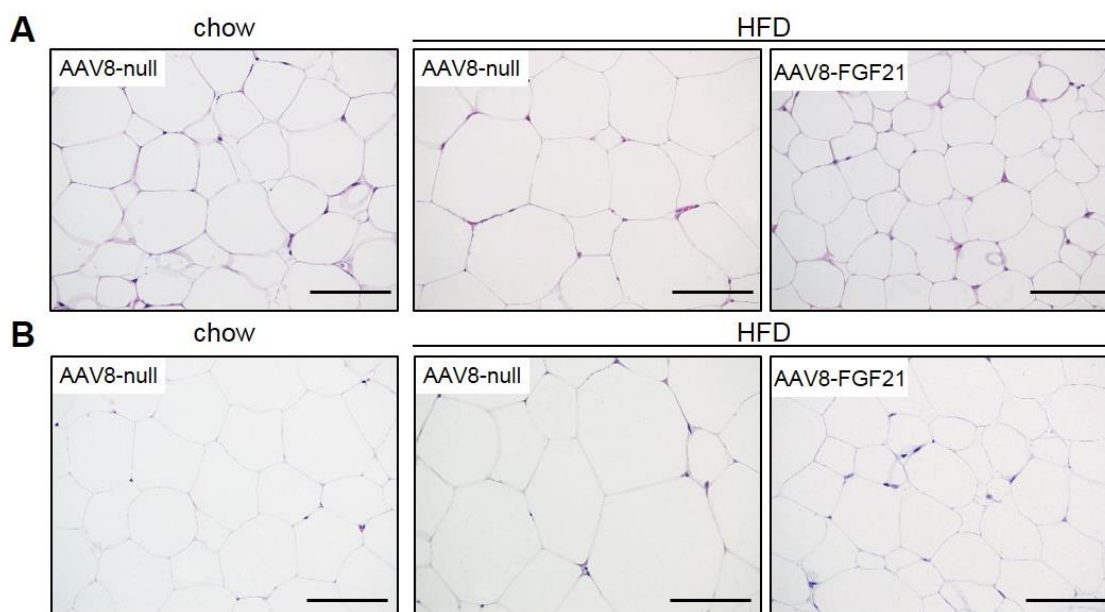


Figura 15. Análisis de la morfología del tejido adiposo blanco epididimal. (A, B) Imágenes representativas de una tinción de hematoxilina/eosina en secciones de eWAT de ratones macho C57BL/6 alimentados con dieta *chow* o HFD y tratados con AAV8-null o la dosis alta (HD) de AAV8-FGF21 cuando eran Adultos jóvenes (A) o Adultos (B). Escala: 100μm.

De acuerdo con los resultados observados en los cortes histológicos, el análisis morfométrico del eWAT mostró que el área de los adipocitos de los animales tratados con ambas dosis (LD y HD) del vector cuando eran Adultos jóvenes y los tratados cuando eran Adultos con las dosis intermedia (ID) y alta (HD) del vector era similar a la de los animales control sanos alimentados con dieta *chow* (Figura 16A). En ambos estudios, la dosis alta del vector (HD) medió una redistribución del tamaño de los adipocitos, aumentando el número de adipocitos pequeños y medianos mientras que se observó la disminución de la cantidad de adipocitos grandes (Figura 16B,C).

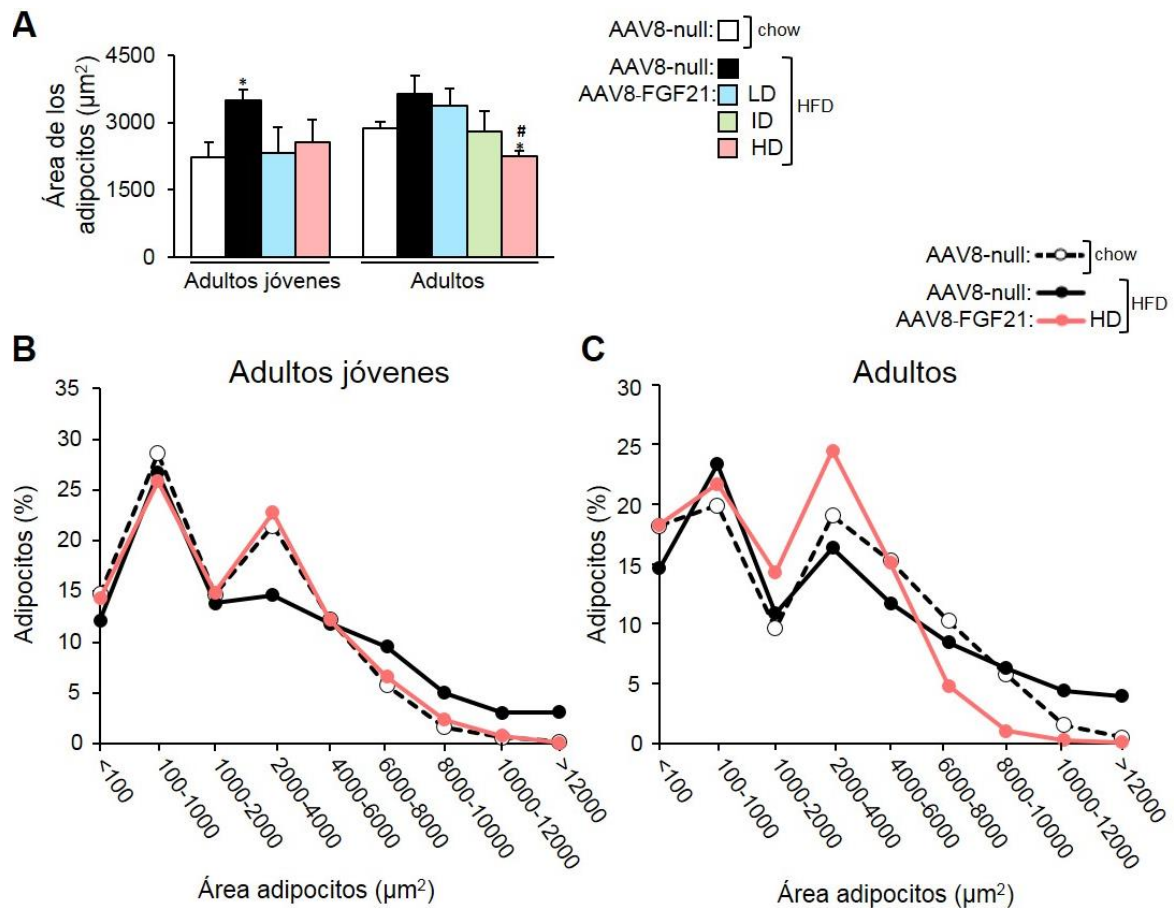


Figura 16. Área media y distribución de los adipocitos por área en el tejido adiposo epididimal. (A) Área media de los adipocitos blancos en el eWAT de ratones macho C57BL/6 alimentados con dieta chow o HFD y tratados con AAV8-null o la diversas dosis (LD, ID, HD) de AAV8-FGF21 cuando eran Adultos jóvenes o Adultos. (B) Distribución de frecuencias del área de los adipocitos en ratones macho C57BL/6 alimentados con dieta chow o HFD y tratados con AAV8-null o la dosis alta (HD) de AAV8-FGF21 cuando eran Adultos jóvenes (B) o Adultos (C). n=4. Los resultados se expresan como la media \pm EEM. *P<0.05, **P<0.01 y ***P<0.001 versus el grupo alimentado con dieta chow inyectado con vectores nulos. #P<0.05, ##P<0.01 y ###P<0.001 versus el grupo alimentado con dieta HFD inyectado con vectores nulos.

Al incrementar la acumulación de lípidos en el tejido adiposo blanco, se ha observado que cambia la composición de las células inmunitarias presentes en el mismo, resultando principalmente en un aumento del número de macrófagos. A medida que avanza la obesidad, los macrófagos pro-inflamatorios M1 se infiltran en el tejido adiposo causando resistencia a la insulina y los adipocitos muertos atraen a más macrófagos M1, formando estructuras en forma de corona (estructuras “*crown-like*”) que desencadenan una respuesta inflamatoria local (Choe et al., 2016).

Por ese motivo, se valoró la inflamación en el eWAT mediante un análisis inmunohistoquímico contra el marcador de macrófagos MAC2 (Galectin-3, proteína de superficie celular de los macrófagos). Mientras que los ratones control

alimentados con HFD presentaban un incremento de la presencia de macrófagos en forma de estructuras “*crown-like*”, los animales tratados a ambas edades con la dosis alta (HD) de AAV8-FGF21 no mostraron ningún signo de infiltración (Figura 17A,B).

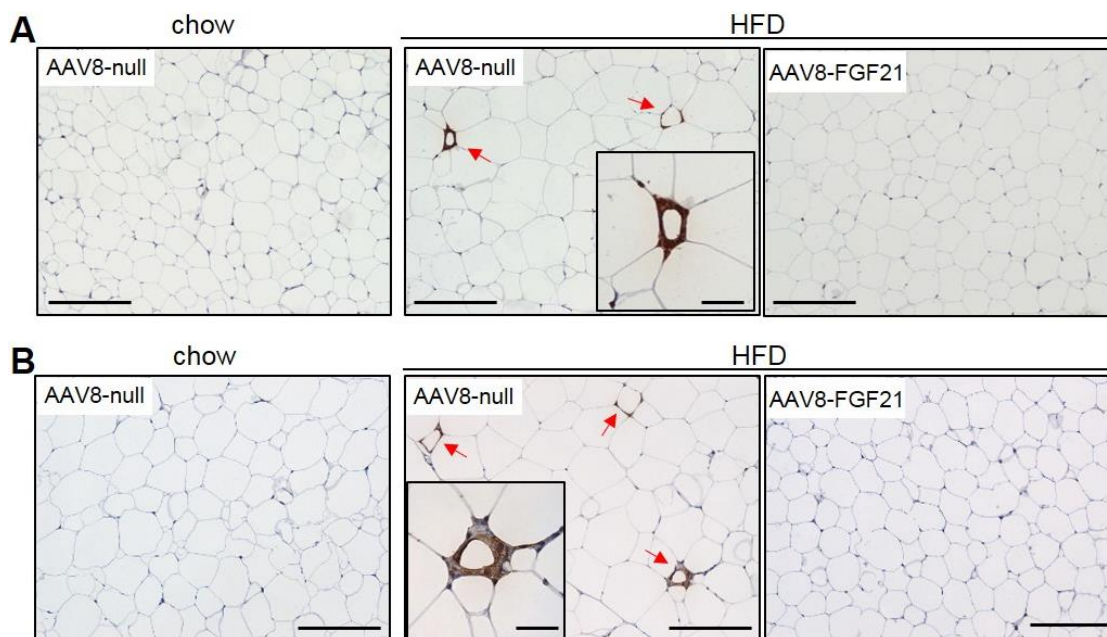


Figura 17. Evaluación de la infiltración del tejido adiposo blanco epididimal. (A, B) Tinción inmunohistoquímica contra Mac2 (marrón) en secciones de eWAT de ratones macho C57BL/6 alimentados con dieta *chow* o HFD y tratados con AAV8-null o la dosis alta (HD) de AAV8-FGF21 cuando eran Adultos jóvenes (A) o Adultos (B). En las secciones de eWAT de los ratones obesos control alimentados con dieta HFD e inyectados con el vector AAV8-null se aprecia la presencia de estructuras “*crown like*” (flechas rojas y ampliaciones) mientras que no hay infiltración de macrófagos en los ratones alimentados con dieta HFD e inyectados con la dosis alta (HD) de AAV8-FGF21. Escala: 200µm (ampliación: 50µm).

El aumento de la inflamación en el tejido adiposo blanco provoca la liberación de citoquinas pro-inflamatorias que, juntamente con el incremento de la hipoxia y la fibrosis, dan lugar a la disfunción de los adipocitos. A su vez, la disfunción de los adipocitos reduce los niveles circulantes de adiponectina, hormona secretada por los adipocitos e inversamente relacionada con el desarrollo de la resistencia a la insulina (Choe et al., 2016; Paniagua, 2016; Pellegrinelli et al., 2016; Rosen and Spiegelman, 2014). Por contra, la expansión del tejido adiposo durante la obesidad está asociada a un incremento de la secreción de leptina, hormona también producida por los adipocitos que regula la ingesta y la homeostasis energética.

En esta tesis doctoral se cuantificó mediante análisis por RT-PCR la expresión de marcadores específicos de macrófagos como el F4/80 (EGF-like module-containing mucin-like hormone receptor-like 1) y el CD68 (Cluster of differentiation 68) y de citoquinas pro-inflamatorias como el TNF α (Tumor necrosis factor alfa) y la IL-1 β

(Interleukin 1 beta). Asimismo, también se analizaron los niveles circulantes de adiponectina y leptina mediante ELISA. La disminución de la infiltración observada anteriormente en el estudio histológico (Figura 17), fue paralela a la normalización de la expresión de los marcadores de macrófagos F4/80 y CD68 y de las citoquinas pro-inflamatorias TNF α e IL-1 β tanto en los animales tratados con la dosis alta (HD) de AAV8-FGF21 cuando eran Adultos jóvenes (Figura 18A) o como cuando eran Adultos (Figura 18B) indicando que la sobreexpresión de FGF21 fue capaz de contrarrestar la inflamación del WAT asociada a la obesidad.

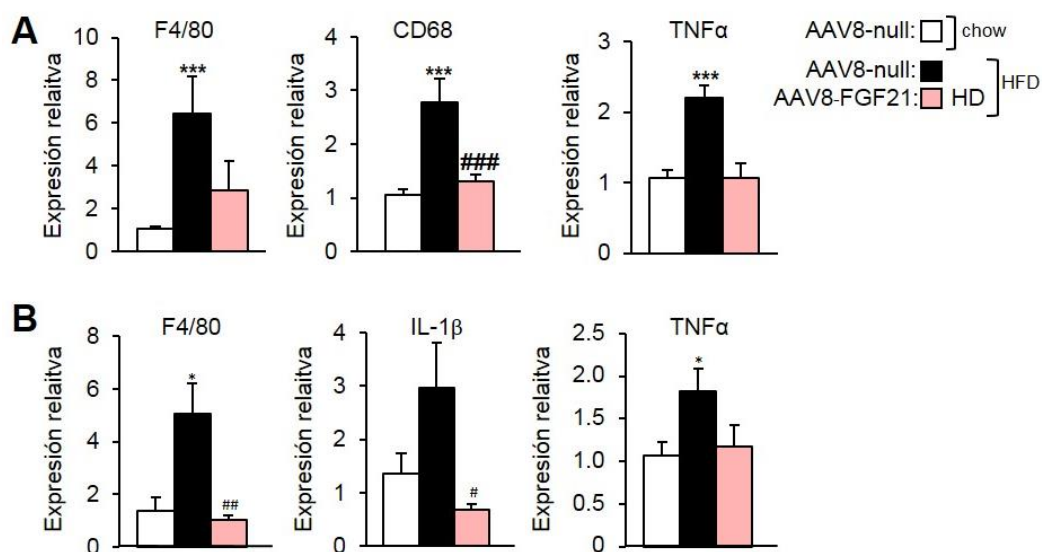


Figura 18. Evaluación de la inflamación del tejido adiposo blanco epididimal y de los niveles circulantes de adiponectina y leptina. (A) Análisis por RT-PCR de los niveles de expresión de F4/80, CD68 y TNF α normalizados por *Rplp0* en el eWAT de ratones macho C57BL/6 alimentados con dieta chow o HFD y tratados con AAV8-null o la dosis alta (HD) de AAV8-FGF21 cuando eran Adultos jóvenes. **(B)** Análisis por RT-PCR de los niveles de expresión de F4/80, IL-1 β y TNF α normalizados por *Rplp0* en el eWAT de ratones macho C57BL/6 alimentados con dieta chow o HFD y tratados con AAV8-null o la dosis alta (HD) de AAV8-FGF21 cuando eran Adultos. n=7-10. Los resultados se expresan como la media \pm EEM. *P<0.05, **P<0.01 y ***P<0.001 versus el grupo alimentado con dieta chow inyectado con vectores nulos. #P<0.05, ##P<0.01 y ###P<0.001 versus el grupo alimentado con dieta HFD inyectado con vectores nulos.

De acuerdo con estos resultados, los niveles circulantes de adiponectina (Figura 19A) y leptina (Figura 19B) también se normalizaron en los animales tratados con la dosis alta (HD) del vector AAV8-FGF21, independientemente de la edad a la que se inició el tratamiento.

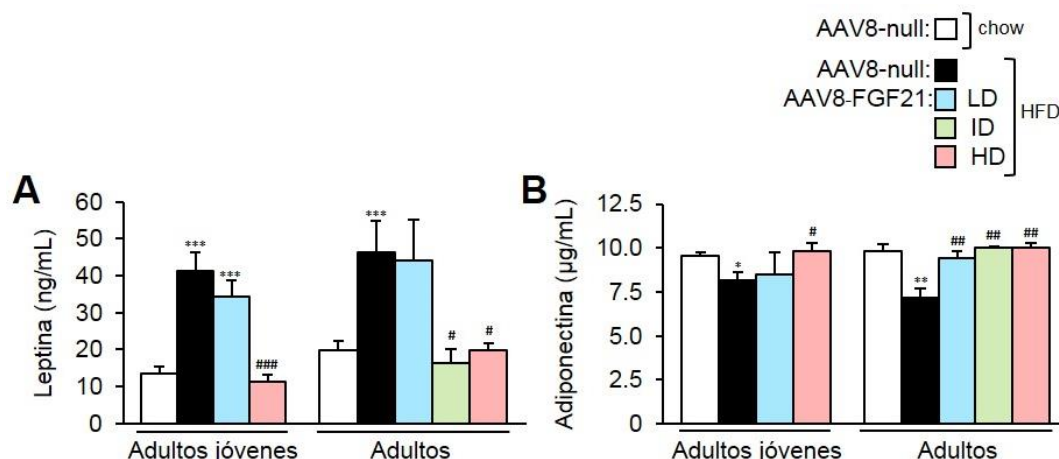


Figura 19. Determinación de los niveles circulantes de leptina y adiponectina. (A, B) Niveles circulantes de leptina **(A)** y adiponectina **(B)** en ratones macho C57BL/6 alimentados con dieta chow o HFD y tratados con AAV8-null o la diversas dosis (LD, ID, HD) de AAV8-FGF21 cuando eran Adultos jóvenes o Adultos a las 50 o 31 semanas post-AAV respectivamente. $n=7-10$. Los resultados se expresan como la media \pm EEM. * $P<0.05$, ** $P<0.01$ y *** $P<0.001$ versus el grupo alimentado con dieta chow inyectado con vectores nulos. # $P<0.05$, ### $P<0.01$ y #### $P<0.001$ versus el grupo alimentado con dieta HFD inyectado con vectores nulos.

La sobreexpresión de FGF21 mediada por un vector AAV8, permitía, por tanto, revertir la inflamación, la hipertrofia y la fibrosis inducidas por la dieta HFD en el eWAT.

2.4. El tratamiento con AAV8-FGF21 aumenta el gasto energético sin inducir *browning* en el tejido adiposo blanco subcutáneo

La pérdida de peso observada en los animales tratados con el vector AAV8-FGF21 no se debió a una reducción en la ingesta. Las determinaciones semanales de las calorías ingeridas por día indicaron que, en realidad, los animales que sobreexpresaban FGF21 en hígado comían más que los grupos control (Figura 20A).

Cuando se analizó el gasto energético (con un calorímetro indirecto de circuito abierto) 2 meses después de la administración de los vectores AAV, ambos grupos, Adultos jóvenes y Adultos, tratados con la HD de AAV8-FGF21 mostraron un mayor consumo energético durante los ciclos tanto de luz como de oscuridad que sus respectivos controles. (Figura 20 B). Al repetirse el mismo análisis en los animales tratados cuando eran Adultos jóvenes a los 10 meses post-AAV, se observaron los

mismos resultados, demostrando que el aumento del gasto energético era sostenido en el tiempo (Figura 20 C).

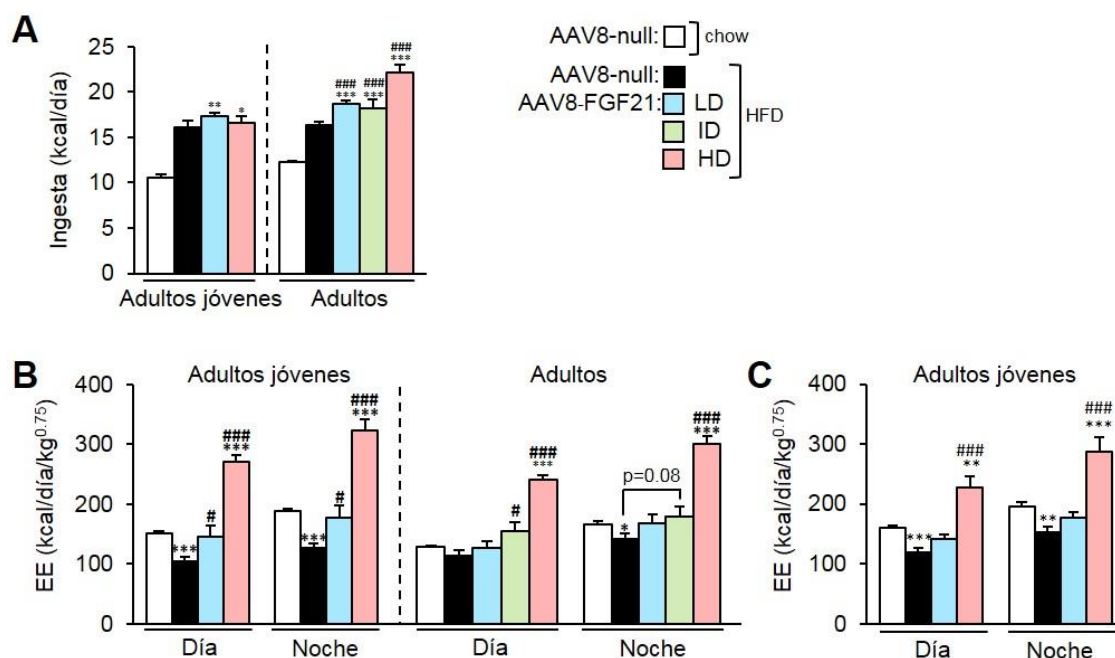


Figura 20. Ingesta y análisis del gasto energético. (A) Media de la ingesta diaria de ratones macho C57BL/6 alimentados con dieta *chow* o HFD y tratados con AAV8-null o a diversas dosis de AAV8-FGF21 cuando eran Adultos jóvenes o Adultos. (B) Análisis calorimétrico del gasto energético (*Energy Expenditure*: EE) 2 meses después de la administración de los vectores AAV8 en ratones macho C57BL/6 alimentados con dieta *chow* o HFD cuando eran Adultos jóvenes o Adultos. (C) Análisis calorimétrico del gasto energético 10 meses después de la administración de los vectores AAV8 en ratones macho C57BL/6 alimentados con dieta *chow* o HFD cuando eran Adultos jóvenes. Los datos se tomaron durante los ciclos diurno y nocturno. $n=7-10$. Los resultados se expresan como la media \pm EEM. * $P<0.05$, ** $P<0.01$ y *** $P<0.001$ versus el grupo alimentado con dieta *chow* inyectado con vectores nulos. # $P<0.05$, ## $P<0.01$ y ### $P<0.001$ versus el grupo alimentado con dieta HFD inyectado con vectores nulos.

Dichas observaciones estaban también de acuerdo con los efectos que se observaron en la actividad locomotora en los animales tratados con AAV8-FGF21. En contraste con la hipo-actividad que mostraban los controles obesos alimentados con HFD, los animales Adultos jóvenes que recibieron la HD de AAV8-FGF21 presentaron el mismo grado de actividad locomotora espontánea que los controles sanos alimentados con dieta *chow*. Tal y como se muestra en la Figura 15, un año después de la administración del vector AAV8-FGF21, los animales recorrían mayor distancia, estaban menos tiempo en reposo y pasaban mayor tiempo en movimiento (tanto lento como rápido) que sus controles obesos que solo recibieron AAV8-null (Figura 21).

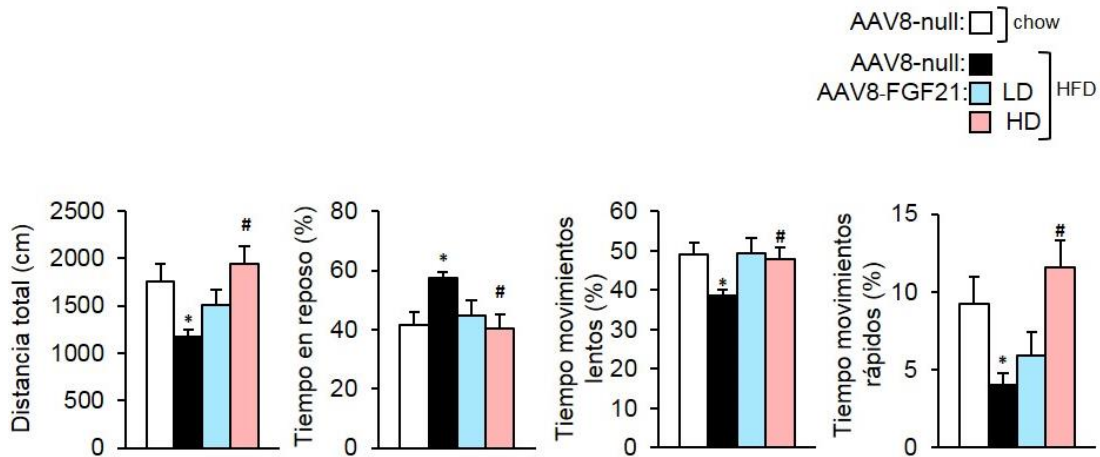


Figura 21. Evaluación de la actividad locomotora. Test del *Open-field* realizado a ratones macho C57BL/6 sujetos a alimentación HFD o *chow* desde los 2 meses de edad y posteriormente tratados con AAV9-FGF21 o AAV8-null. El test se realizó un año después de la administración de los vectores. n=8-10. Los resultados se expresan como la media \pm EEM. *P<0.05, **P<0.01 y ***P<0.001 versus el grupo alimentado con dieta *chow* inyectado con vectores nulos. #P<0.05, ##P<0.01 y ###P<0.001 versus el grupo alimentado con dieta HFD inyectado con vectores nulos.

Dado que los cambios en el gasto energético podrían reflejar un aumento de la termogénesis, se evaluó el grado de activación del tejido adiposo marrón (BAT). En ambos casos, animales alimentados con HFD cuando eran Adultos jóvenes y cuando eran Adultos, la administración de la HD de AAV8-FGF21 causó un descenso en la deposición de lípidos en el BAT (Figura 22).

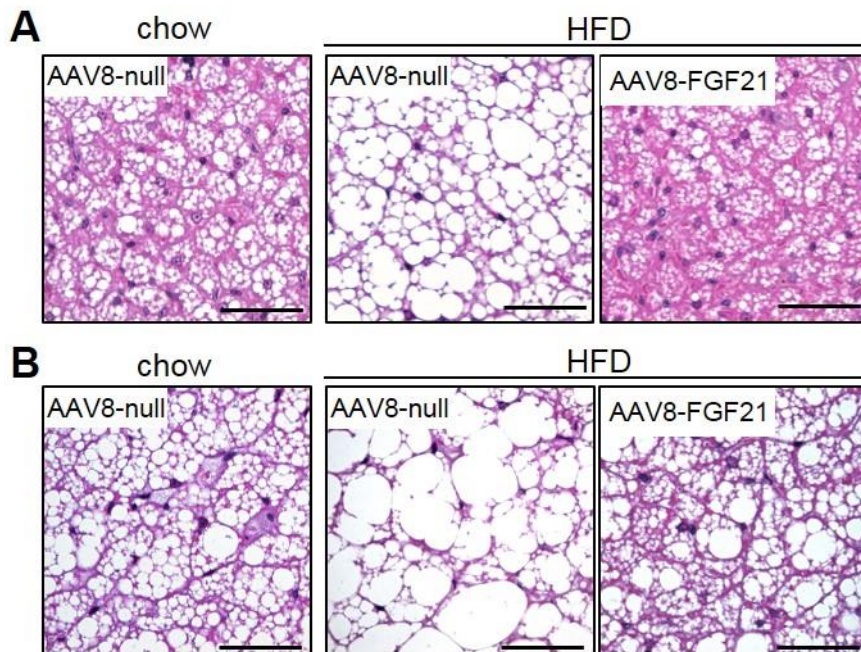


Figura 22. Análisis de la morfología del tejido adiposo marrón interescapular. (A, B) Imágenes representativas de una tinción con hematoxilina/eosina de secciones de iBAT de ratones macho C57BL/6 alimentados con dieta *chow* o HFD y tratados con AAV8-null o la dosis alta (HD) de AAV8-FGF21 cuando eran Adultos jóvenes (A) o Adultos (B). Escala: 50 μ m.

La termogenina o proteína desacopladora 1 (UCP1) es un indicador directo de la actividad termogénica del tejido adiposo marrón. En este estudio se observó que el contenido de UCP1 incrementó en el BAT de los animales tratados con el vector AAV8-FGF21 cuando eran Adultos jóvenes en función de la dosis (Figura 23). Estos resultados están de acuerdo con un aumento de la termogénesis no asociada a temblor inducido por el incremento de los niveles circulantes de FGF21.

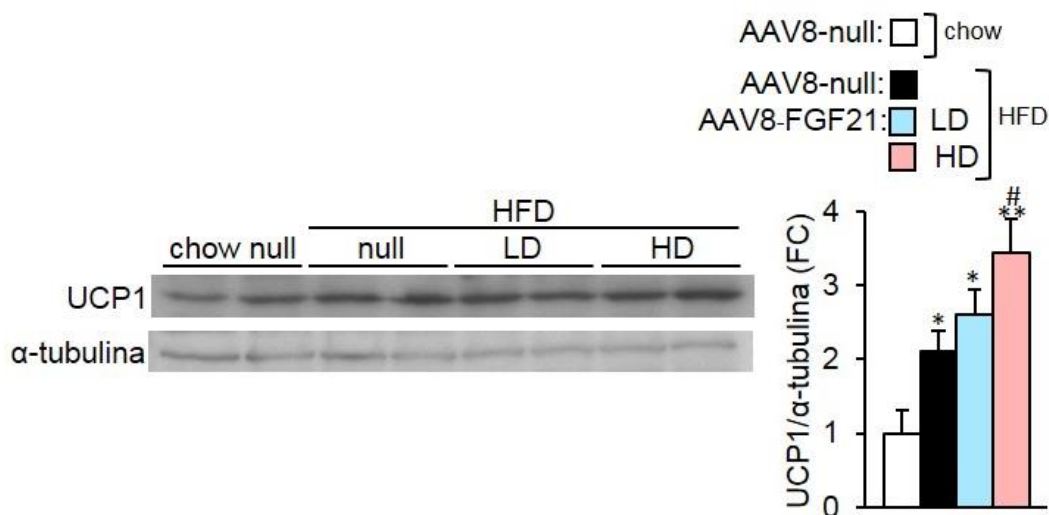


Figura 23. Análisis por Western blot del contenido de UCP1 en el tejido adiposo marrón interescapular. Western blot (WB) contra UCP1, y tubulina como control de carga, en extracto proteico de tejido adiposo marrón interescapular. Imagen representativa de una membrana de WB revelada y posterior cuantificación del contenido de UCP1 corregido por la cantidad de tubulina expresado como la inducción *versus* el grupo control alimentado con dieta chow (=1). FC: fold changes vs chow null. n=4. Los resultados se expresan como la media \pm EEM. *P<0.05, **P<0.01 y ***P<0.001 versus el grupo alimentado con dieta chow inyectado con vectores nulos. #P<0.05, ##P<0.01 y ###P<0.001 versus el grupo alimentado con dieta HFD inyectado con vectores nulos.

La adquisición por parte del tejido adiposo blanco subcutáneo de un fenotipo propio del marrón, caracterizado por la aparición de los llamados adipocitos beige con capacidad termogénica, recibe el nombre de *browning*. El *browning* del tejido adiposo blanco subcutáneo se asocia con el gasto energético (Janský, 1995). Para evaluar si el *browning* también contribuía al incremento del gasto energético provocado por el tratamiento con AAV8-FGF21, se realizó un análisis histológico del tejido adiposo blanco inguinal (iWAT). De acuerdo con la disminución del peso de este depósito adiposo (Figura 12), los adipocitos de los animales en dieta HFD tratados con AAV8-FGF21 eran más pequeños que los de sus controles en HFD (Figura 24 A,B). Sin embargo, el tratamiento con el vector codificante para FGF21 no causó un aumento de adipocitos beige multiloculares en el iWAT, en ninguna de las dosis administradas en ambos estudios (Figura 24 A,B). Por tanto, no se observaron

diferencias estadísticamente significativas en los niveles proteicos de UCP1 entre los grupos alimentados con HFD (Figura 24C).

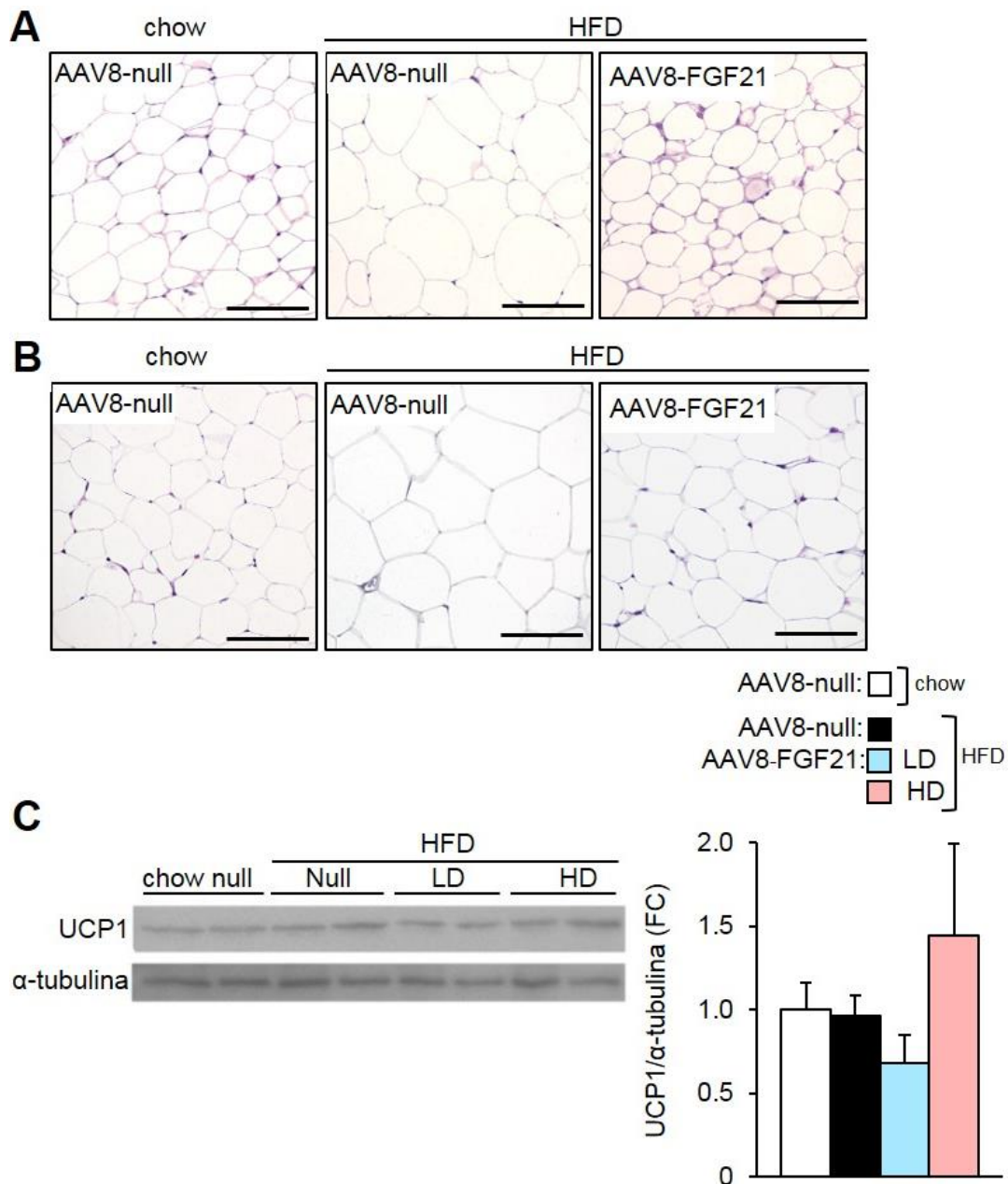


Figura 24. Análisis de la morfología y del contenido de UCP1 en el tejido adiposo blanco inguinal. (A, B) Imágenes representativas de una tinción de hematoxilina/eosina en secciones de iWAT de ratones macho C57BL/6 alimentados con dieta chow o HFD y tratados con AAV8-null o la dosis alta (HD) de AAV8-FGF21 cuando eran Adultos jóvenes (A) o Adultos (B). Escala: 100µm. (C) Western blot (WB) contra UCP1, y tubulina como control de carga, en extracto proteico de tejido adiposo blanco inguinal. Imagen representativa de una membrana de WB revelada y posterior cuantificación del contenido de UCP1 corregido por la cantidad de tubulina expresado como la inducción *versus* el grupo control alimentado con dieta chow (=1). FC: fold changes vs chow null. n=4. Los resultados se expresan como la media ± EEM. *P<0.05, **P<0.01 y ***P<0.001 *versus* el grupo alimentado con dieta chow inyectado con vectores nulos. #P<0.05, ##P<0.01 y ###P<0.001 *versus* el grupo alimentado con dieta HFD inyectado con vectores nulos.

Por lo tanto, muy probablemente todos estos resultados indican que la pérdida de peso inducida por el tratamiento con AAV8-FGF21 no se debió a una disminución de la ingesta sino al aumento del gasto energético causado por un incremento de la actividad termogénica del BAT y por la normalización de la actividad locomotora.

2.5. Reversión de la esteatosis hepática, la inflamación y la fibrosis inducidas por dieta alta en lípidos

En la obesidad, no sólo se acumula un exceso de lípidos en los depósitos adiposos, sino que también se produce un acúmulo ectópico de lípidos en el hígado, dando lugar a esteatosis hepática y posteriormente, inflamación y fibrosis.

En ambos grupos tratados cuando eran Adultos jóvenes o Adultos, el análisis histológico del hígado puso de manifiesto que los ratones tratados con el vector AAV8-null alimentados con HFD tenían una marcada esteatosis hepática al final de los estudios (Figura 25 A,B). Por el contrario, los animales alimentados con HFD pero tratados con la HD de AAV8-FGF21 evidenciaron claramente una reversión del acúmulo patológico de lípidos en el hígado (Figura 25A,B).

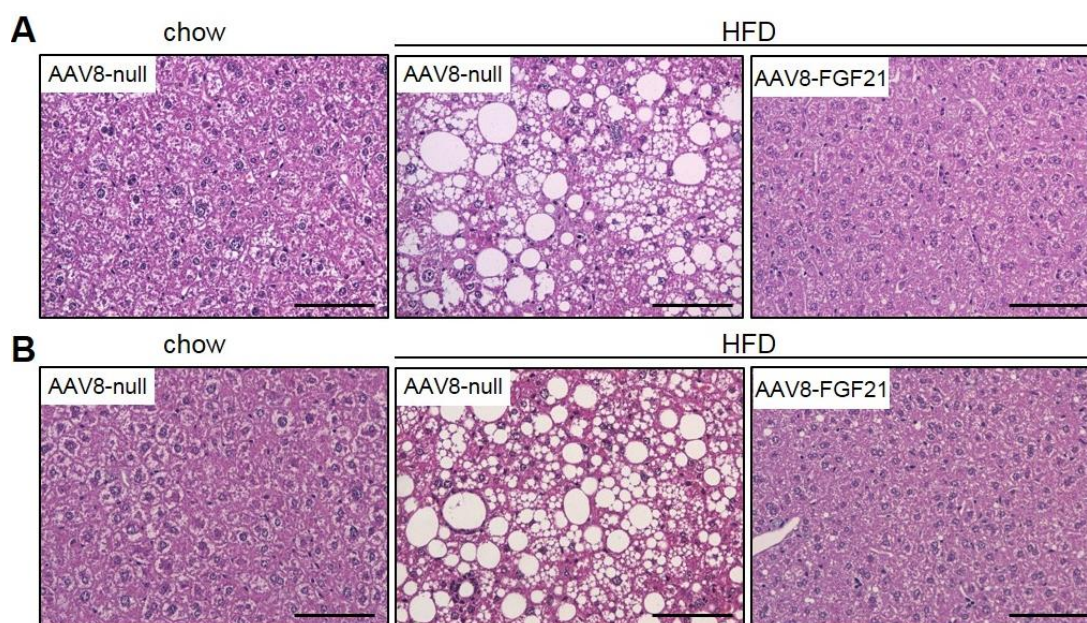


Figura 25. Análisis de la morfología hepática. (A,B) Imágenes representativas de una tinción de hematoxilina/eosina en secciones de hígado de ratones macho C57BL/6 alimentados con dieta chow o HFD y tratados con AAV8-null o la dosis alta (HD) de AAV8-FGF21 cuando eran Adultos jóvenes (A) o Adultos (B). Escala: 100µm.

Además, los ratones alimentados con HFD cuando eran Adultos jóvenes o Adultos a los que se administró la HD del vector codificante para FGF21, no manifestaron signo alguno de inflamación hepática, tal y como se demostró en la tinción inmunohistoquímica contra Mac2. Por contra, sus controles obesos tratados con el vector AAV8-null presentaban abundantes marcas positivas que revelaban la presencia de macrófagos infiltrados en el hígado (Figura 26A,B).

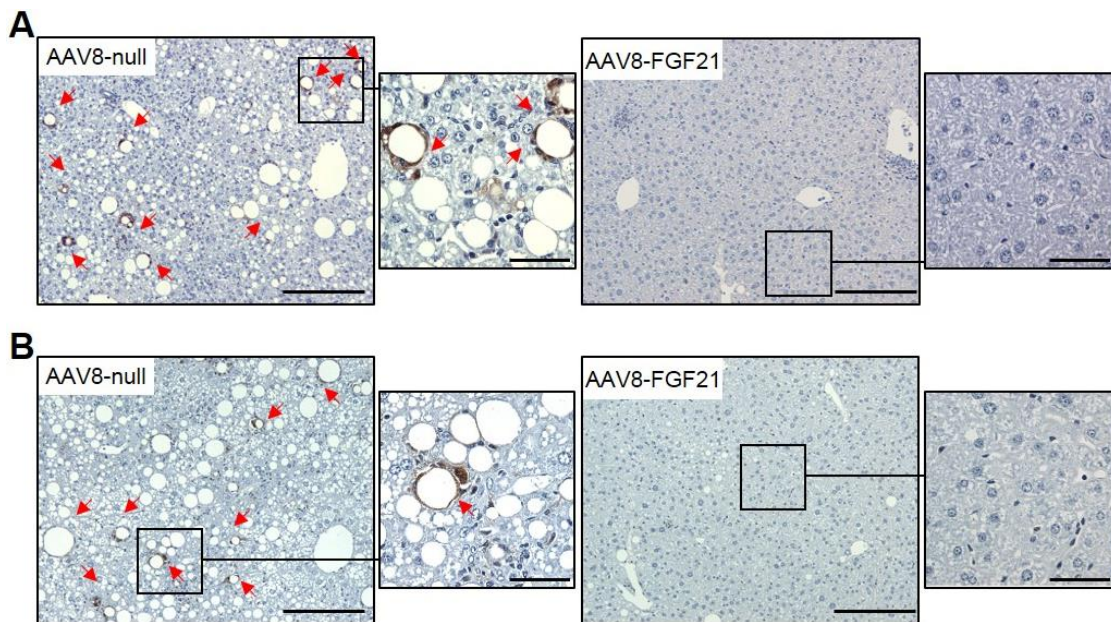


Figura 26. Evaluación de la inflamación hepática. Imágenes representativas de una tinción inmunohistoquímica contra Mac2 en secciones de hígado de ratones macho C57BL/6 alimentados con dieta HFD y administrados con AAV8-null o la dosis alta (HD) de AAV8-FGF21 cuando eran Adultos jóvenes (**A**) o Adultos (**B**). Las flechas rojas indican los macrófagos infiltrados en el parénquima hepático (marrón). Escala: 200 μ m (Ampliación: 50 μ m).

Por último, la transferencia génica de FGF21 al hígado fue capaz de revertir también la fibrosis producida por la dieta HFD en el parénquima hepático. Mediante un análisis histopatológico con una tinción Tricrómica de Masson se detectaron fibras de colágeno en las secciones hepáticas de los controles obesos alimentados con HFD que fueron tratados con el vector AAV8-null. Por el contrario, en los animales tratados con la HD de AAV8-FGF21 no se observó la presencia de fibras de colágeno (Figura 27A,B).

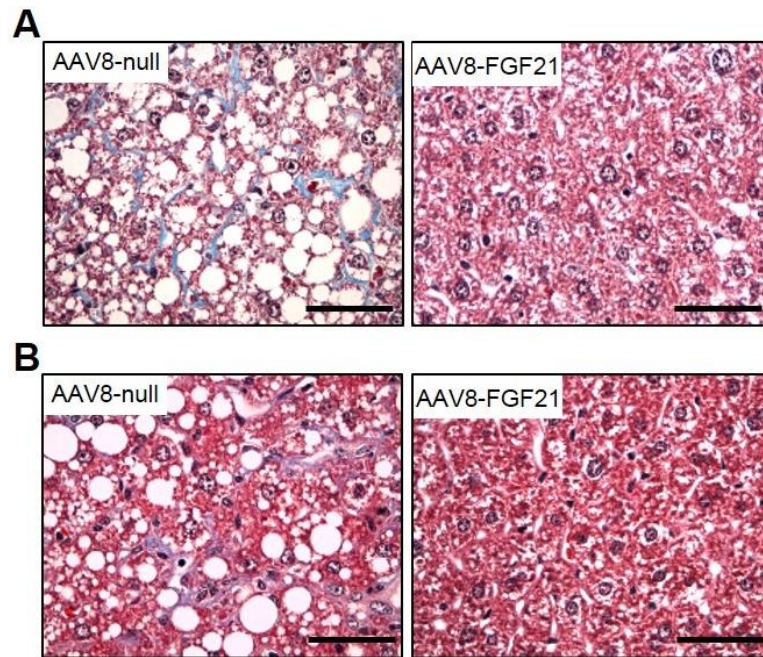


Figura 27. Evaluación de la fibrosis hepática. (A,B) Imágenes representativas de una tinción Tricrómica de Masson en secciones de hígado de ratones macho C57BL/6 alimentados con dieta HFD y administrados con AAV8-null o la dosis alta (HD) de AAV8-FGF21 cuando eran Adultos jóvenes (A) o Adultos (B). Las fibras de colágeno se tiñen de color azul, el citoplasma o las estructuras oxidadas de rojo y los núcleos de marrón. Escala: 50µm.

Estos hallazgos histológicos se correspondieron con una marcada reducción en el contenido de triglicéridos en el hígado de los animales alimentados con HFD tratados con AAV8-FGF21 (Figura 28).

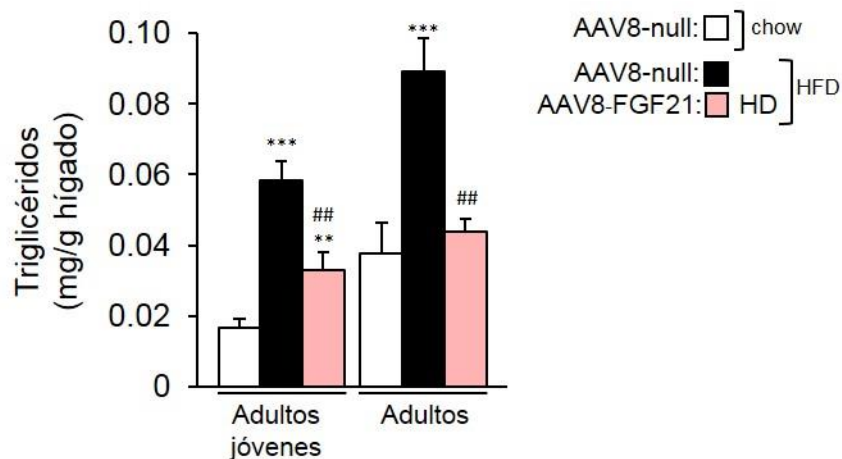


Figura 28. Contenido de triglicéridos en hígado. Contenido de triglicéridos (TG) en hígado de ratones macho C57BL/6 alimentados con dieta chow o HFD y tratados con AAV8-null o la HD de AAV8-FGF21 cuando eran Adultos jóvenes o Adultos. n=7-10. Los resultados se expresan como la media \pm EEM. *P<0.05, **P<0.01 y ***P<0.001 versus el grupo alimentado con dieta chow inyectado con vectores nulos. ##P<0.05, ###P<0.01 y ####P<0.001 versus el grupo alimentado con dieta HFD inyectado con vectores nulos.

En conjunto, estos resultados permiten concluir que el tratamiento con AAV8-FGF21 protege del desarrollo de esteatohepatitis no alcohólica (NASH) inducida por la dieta alta en lípidos.

2.6. Reversión de la resistencia a la insulina inducida por dieta alta en lípidos

Dado que el tratamiento con AAV8-FGF21 revirtió la obesidad (Figuras 10, 11) y evitó sus alteraciones patológicas tales como la hipertrófia de los adipocitos (Figuras 15 y 16), la inflamación del eWAT (Figuras 17 y 18) y del hígado, así como la hepatoesteatosis (Figuras 25 y 26), cabía esperar que pudiese haber una mejora en el metabolismo de la glucosa o la sensibilidad a la insulina. Por ese motivo, se midieron las glucemias y las insulinemias de los animales de ambos estudios tanto en condiciones de alimentación como en ayuno.

No se observaron diferencias en los niveles de glucemia tanto en alimentación como en ayuno en los ratones alimentados con HFD e inyectados con AAV8-null durante el año de seguimiento (Figura 29A). Sin embargo, estos ratones alimentados con HFD y tratados con los vectores nulos eran hiperinsulinémicos (Figura 29B), hecho que sugería que habían desarrollado resistencia a la insulina. Por el contrario, los ratones alimentados con HFD pero tratados con de HD del vector AAV8-FGF21 tanto cuando eran Adultos jóvenes como cuando eran Adultos, seguían siendo normoinsulinémicos al final de los estudios, tanto en condiciones de ayuno como de alimentación (Figura 29A,B). Además, los ratones Adultos tratados con la ID de AAV8-FGF21 también normalizaron la insulinemia (Figura 29B). Se observó que el tratamiento con la LD, no redujo significativamente la hiperinsulinemia en ninguno de los dos casos (Figura 29B).

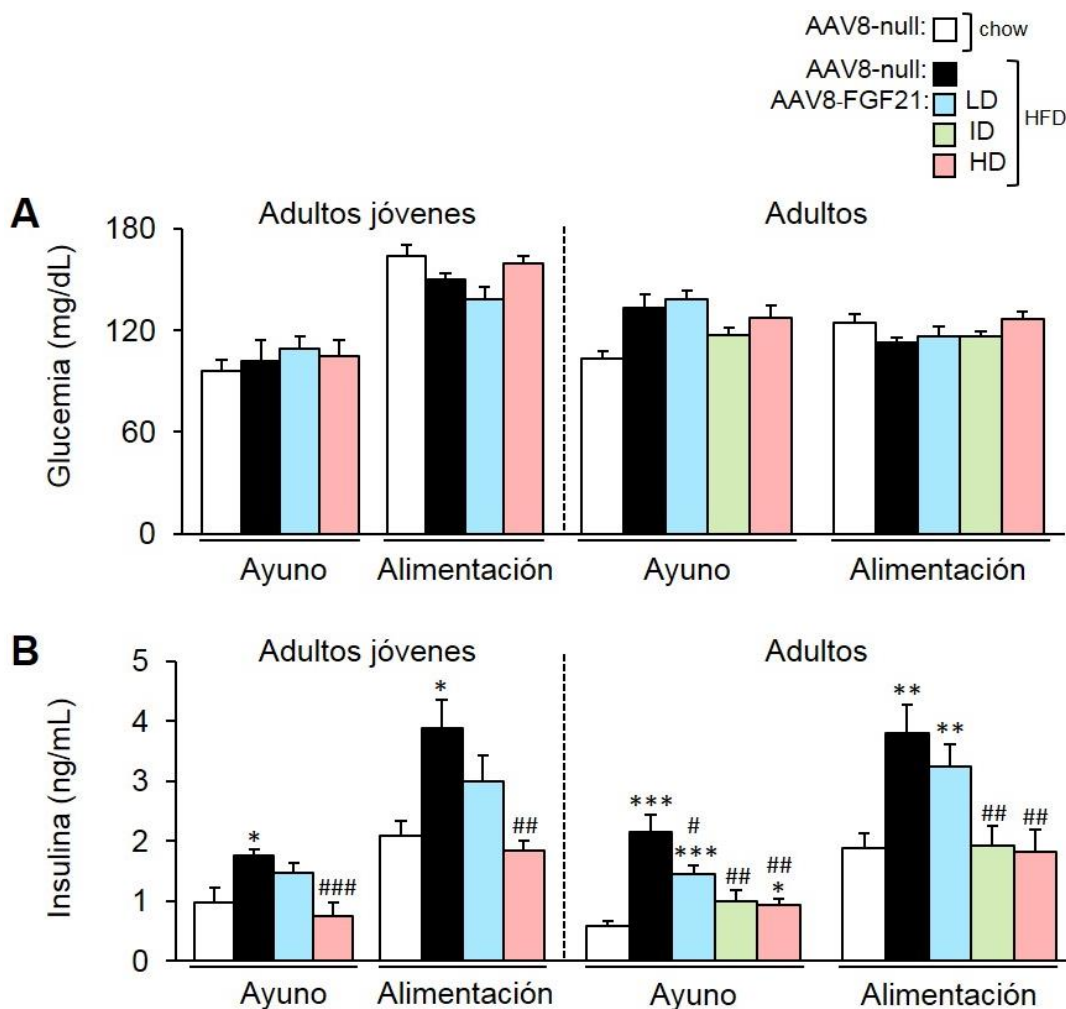


Figura 29. Determinación de la glucemia y la insulinemia. (A,B) Glucemia (A) e insulinemia (B) en ayuno y alimentación al final de los estudios en ratones macho C57BL/6 alimentados con dieta chow o HFD y tratados con AAV8-null o diversas dosis de AAV8-FGF21 cuando eran Adultos jóvenes o Adultos. $n=7-10$. Los resultados se expresan como la media \pm EEM. * $P<0.05$, ** $P<0.01$ y *** $P<0.001$ versus el grupo alimentado con dieta chow inyectado con vectores nulos. # $P<0.05$, ## $P<0.01$ y ### $P<0.001$ versus el grupo alimentado con dieta HFD inyectado con vectores nulos.

Para confirmar que el tratamiento con AAV8-FGF21 había mejorado la sensibilidad a la insulina, se realizó un test de tolerancia a la insulina (ITT) intraperitoneal 2 meses después de la administración del vector. Como era de esperar, la alimentación con HFD desde las 9 o 29 semanas de edad, conllevó una pérdida de la sensibilidad en los animales tratados con AAV8-null (Figura 30A,B). En cambio, los animales tratados con la HD de AAV8-FGF21 cuando eran Adultos jóvenes o Adultos demostraron tener una mayor sensibilidad a la insulina, mejor incluso que la de sus controles sanos alimentados con dieta chow (Figura 30A,B). Tanto la ID como la LD de AAV8-FGF21 también mejoraron la sensibilidad a la insulina, independientemente de la edad a la que se trataron los animales; la

respuesta de estos cohortes tratados con AAV8-FGF21 era indistinguible de la de sus propios controles sanos alimentados con dieta *chow* (Figura 30A,B).

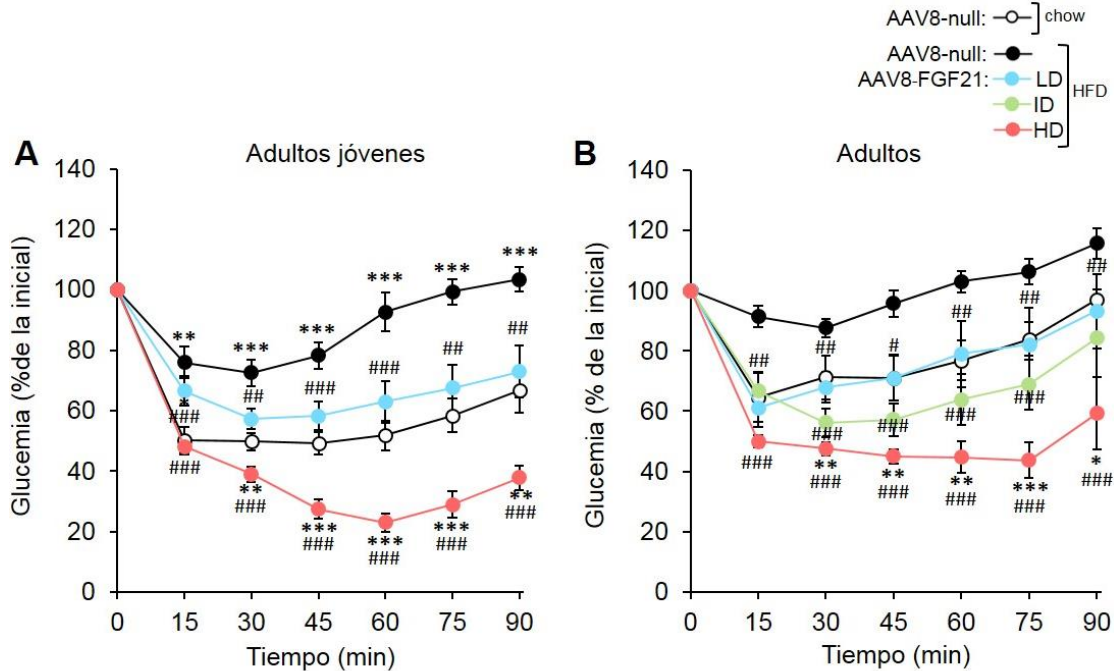


Figura 30. Evaluación de la sensibilidad a la insulina. Test de tolerancia a la insulina ITT intraperitoneal a los 2 meses post-AAV en ratones macho C57BL/6 alimentados con dieta chow o HFD y administrados con AAV8-null o diversas dosis de AAV8-FGF21 cuando eran Adultos jóvenes (A) o Adultos (B). Los resultados se expresan como la media \pm EEM. n=7-10.

Conjuntamente, los datos obtenidos indicaron que el tratamiento con AAV8-FGF21 mejoró considerablemente la sensibilidad a la insulina y fue capaz de revertir por completo la resistencia a la insulina provocada por la dieta alta en lípidos.

2.7. Seguridad a largo plazo del tratamiento con AAV8-FGF21

Existe controversia sobre si el tratamiento farmacológico con FGF21 o su sobreexpresión en animales transgénicos pueden producir alteraciones a nivel de la remodelación ósea. Por un lado, se sugirió que inhibe la formación ósea a la vez que estimula la resorción en hueso (Figura 10) (Wei et al., 2012) pero estudios recientes cuestionan el efecto directo de FGF21 sobre el hueso (Guo et al., 2016; Li et al., 2017; Thompson et al., 2014). Dado el potencial terapéutico de AAV8-FGF21 en el tratamiento de la obesidad y la diabetes, se evaluaron los efectos a largo plazo que la transferencia génica pudiera tener sobre el hueso de los animales tratados con la mayor dosis (HD) del vector. A punto final de ambos estudios, no había diferencias en la longitud naso-anal y de la tibia entre los animales controles, sanos y obesos, y los administrados con la HD de AAV8-FGF21 (Figura 31A,B).

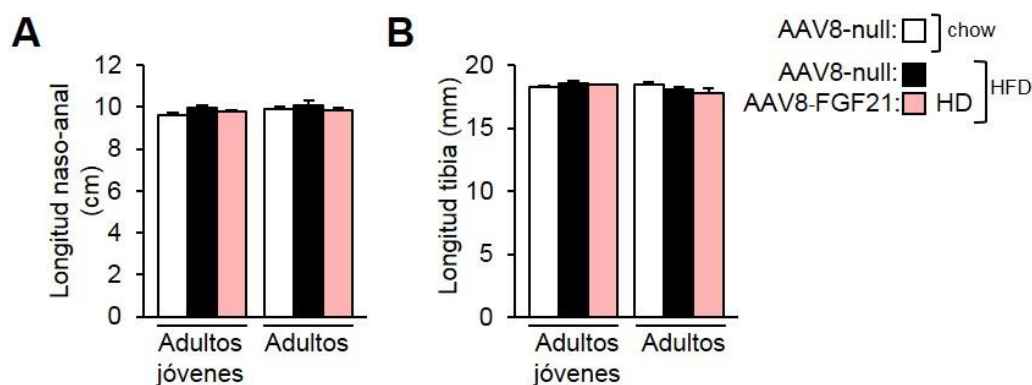


Figura 31. Determinación de la longitud naso-anal y de la tibia. Al punto final de los estudios, se midió la longitud corporal (naso-anal) (n=7-10) (A) y la de la tibia (B) en ratones macho C57BL/6 alimentados con dieta chow o HFD y administrados con AAV8-null o la HD de AAV8-FGF21 cuando eran Adultos jóvenes o Adultos. n=4. Los resultados se expresan como la media \pm EEM. *P<0.05, **P<0.01 y ***P<0.001 versus el grupo alimentado con dieta chow inyectado con vectores nulos. #P<0.05, ##P<0.01 y ###P<0.001 versus el grupo alimentado con dieta HFD inyectado con vectores nulos.

A continuación, se analizó la estructura ósea mediante tomografía micro-computarizada (μ CT) de la epífisis proximal y la diáfisis de la tibia de los ratones alimentados con HFD de ambos estudios. No se encontró ninguna diferencia significativa en el hueso tanto trabecular como cortical entre los ratones tratados con el vector AAV8-FGF21 y los tratados con el vector AAV8-null. Concretamente, no se alteró la densidad mineral ósea (BMD) (Figura 32A), el contenido mineral óseo (BMC) (Figura 32B), el volumen óseo (BV) (Figura 32C), la ratio entre el volumen óseo y el volumen tisular (BV/TV) (Figura 32D), el ratio entre la superficie ósea y el volumen óseo (BS/BV) (Figura 32E), el número de trabéculas (Tb.N) (Figura 32F), el grosor trabecular (Tb. Th) (Figura 32G) o la separación trabecular (Tb.Sp) (Figura 32H) cuando se analizó la epífisis de la tibia.

Cuando se analizó la diáfisis, no se obtuvieron diferencias entre los animales alimentados con HFD tratados con el vector control o el vector terapéutico. Los parámetros que se midieron en este caso fueron también el BMC, BMD, BV, BV/TV y BS/BV (Figura 32I-M).

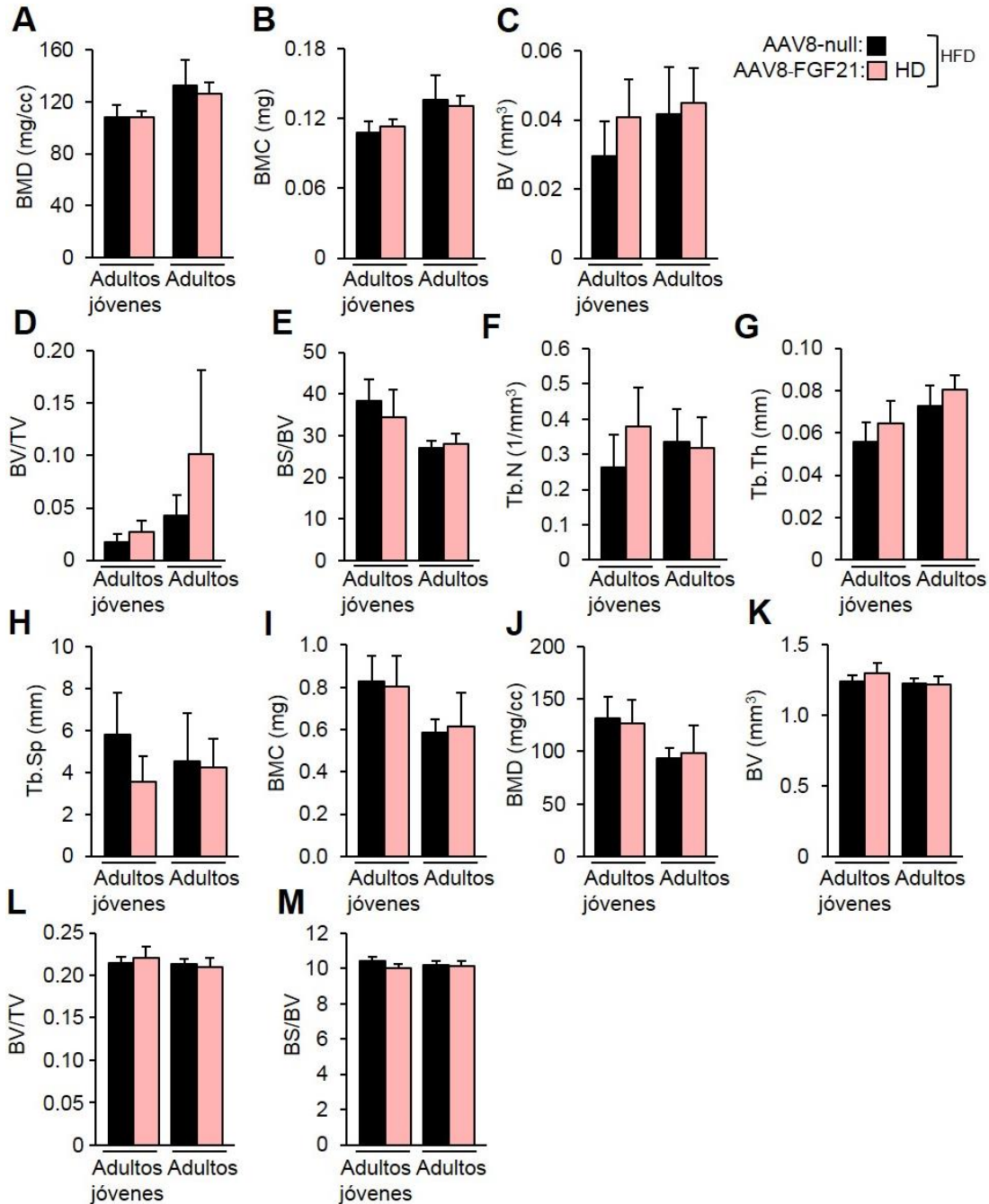


Figura 32. Análisis estructural de la tibia por tomografía micro-computarizada. Se analizó por tomografía micro-computarizada (μ CT) la epífisis proximal y la diáfisis de la tibia en ratones macho C57BL/6 alimentados con dieta HFD y tratados con AAV8-null o la HD de AAV8-FGF21 cuando eran Adultos jóvenes o Adultos a punto final. (A-H) En la epífisis se obtuvieron los parámetros siguientes: densidad mineral ósea (BMD) (A), contenido mineral óseo (BMC) (B), volumen óseo (BV) (C), ratio entre el volumen óseo y el volumen tisular (BV/TV) (D), ratio entre la superficie ósea y el volumen óseo (BS/BV) (E), número de trabéculas (Tb.N) (F), grosor trabecular (Tb. Th) (G), separación trabecular (Tb.Sp) (H). (I-M) En la diáfisis, se evaluaron: el BMC (I), la BMD (J), el BV (K), el BV/TV (L), el BS/BV (M). n=4. Los resultados se expresan como la media \pm EEM.

Se ha descrito que los posibles efectos adversos pueden ser mediados por el incremento de la producción hepática de la Insulin-like Growth Factor Binding Protein 1 (IGFBP1) (Wang et al., 2015). De acuerdo con la ausencia de alteraciones óseas observada por el análisis con tomografía microcomputarizada, la sobreexpresión de FGF21 a largo plazo no condujo a un aumento en los niveles circulantes de IGFBP1 12 (Adultos jóvenes) o 6 (Adultos) meses después del tratamiento con la HD de AAV8-FGF21 en comparación con sus controles obesos alimentados con HFD (Figura 33A). Asimismo, los niveles del factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF1) eran normales en todos los grupos experimentales (Figura 33B).

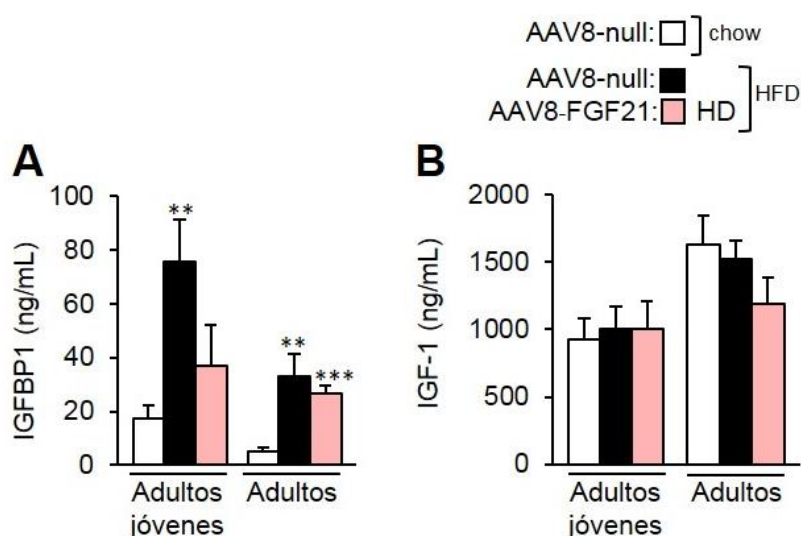


Figura 33. Determinación de los niveles circulantes de IGFBP1 e IGF1. Al término de los estudios, se determinaron mediante ELISA, los niveles séricos de IGFBP1 (A) e IGF1 (B) en ratones macho C57BL/6 alimentados con dieta chow o HFD y administrados con AAV8-null o la HD de AAV8-FGF21 cuando eran Adultos jóvenes o Adultos. n=7-10. Los resultados se expresan como la media \pm EEM. *P<0.05, **P<0.01 y ***P<0.001 versus el grupo alimentado con dieta chow inyectado con vectores nulos. #P<0.05, ##P<0.01 y ###P<0.001 versus el grupo alimentado con dieta HFD inyectado con vectores nulos.

En conjunto, estos resultados corroboran que el tratamiento a largo plazo con AAV8-FGF21 es seguro para el tejido óseo.

La alimentación con HFD a largo término (>60 semanas) está asociada a un incremento en la incidencia de neoplasias en hígado de ratones C57BL/6J (Hill-Baskin et al., 2009; Nakagawa, 2015). En el estudio en el que los animales iniciaron la alimentación con HFD cuando eran Adultos jóvenes y se mantuvieron con esta dieta durante más de 60 semanas. En el momento de la eutanasia, se observaron tumores hepáticos en el 66.7% (6/9) de los animales inyectados con el vector AAV8-null. Por contra, los animales tratados con el vector AAV8-FGF21 mostraron protección contra la aparición de dichas neoplasias. El 0% (0/8) de los animales

tratados con la HD de AAV8-FGF21 cuando eran Adultos jóvenes presentaron tumores hepáticos, mientras que el cohorte tratado con la LD mostró una incidencia del 40% (4/10). Ninguno (0/11) de los animales tratados con la dieta chow desarrolló neoplasias hepáticas durante el mismo periodo de tiempo.

Así pues, el conjunto de los resultados obtenidos demostraron que el tratamiento con AAV8-FGF21 medió la sobreexpresión del factor a largo plazo en el hígado de ratones con obesidad inducida por la dieta HFD y permitió revertir la obesidad. Así, se observó que causó una disminución del peso corporal hasta alcanzar el de los animales sanos, disminuyó el acúmulo patológico de lípidos en los tejidos adiposos y el hígado y bloqueó la inflamación y fibrosis de dichos órganos. Además, se observó la reversión de la resistencia a la insulina generada por la alimentación con HFD sin causar efectos adversos en hueso. Por lo tanto, la aproximación de terapia génica con el vector AAV8-FGF21 representa un nuevo posible tratamiento para curar la obesidad y la DT2.

3. ESTUDIO DEL EFECTO DEL TRATAMIENTO CON AAV8-FGF21 EN RATONES OB/OB

Dados los prometedores resultados obtenidos tras el tratamiento con el vector AAV8-FGF21 en ratones C57/BL6 con obesidad inducida por la dieta, se decidió estudiar sus efectos en un modelo extremo de obesidad genética, los ratones ob/ob.

Los ratones ob/ob son un conocido modelo de obesidad severa provocada por una mutación espontánea que inactiva el gen de la leptina. Se trata de una mutación autosómica recesiva que fue detectada por vez primera en una cepa no consanguínea que después se retro-cruzó con la cepa C57/BL/6J (Castracane and Henson, 2007). Su fenotipo es complejo, los ratones exhiben un aumento de peso fácilmente detectable a partir de las dos semanas de edad, acompañado de resistencia a la insulina, hipertrofia del tejido adiposo y de una elevada acumulación de triglicéridos en hígado. Además, los ratones ob/ob presentan otras alteraciones metabólicas como la disminución de la tasa metabólica, hiperinsulinemia, disfunción de la termogénesis, hiperlipidemia e infertilidad (Kim et al., 2007; Lindström, 2007; Wang et al., 2014).

En este estudio, para examinar los efectos anti-obesogénicos y anti-diabéticos de la transferencia genética de FGF21 en este modelo animal, se trataron ratones macho ob/ob de 8 semanas de edad por vía intravenosa con 1×10^{10} (D1) o 5×10^{10} (D2) vg/animal de vector AAV8-FGF21. Como control, se administró una dosis intravenosa de vector AAV8-null a ratones ob/ob de la misma edad. Se realizó un seguimiento semanal del peso, la ingesta y la glicemia hasta los 7 meses de edad y se realizó un test de tolerancia a la insulina (ITT). Se eutanasió a los animales a los 5 meses post-AAV (Figura 34).

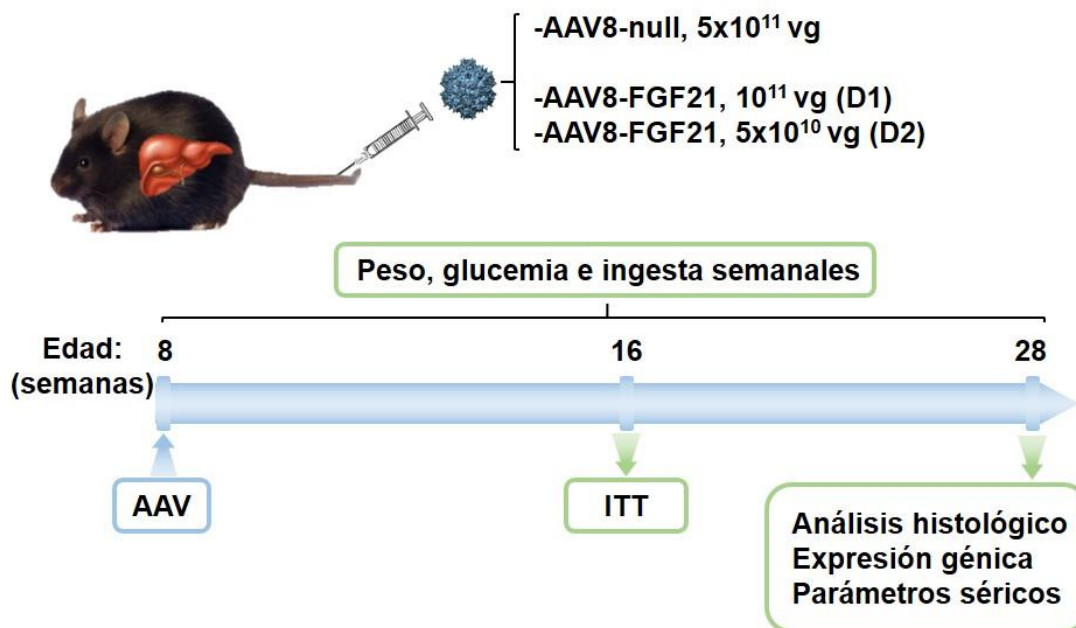


Figura 34. Diseño experimental de la administración iv de vectores AAV8-FGF21 o AAV-null a ratones ob/ob. Ratones macho ob/ob de 8 semanas de edad se inyectaron por vía iv con AAV8-FGF21 a dos dosis diferentes (D1= 10^{11} y D2= 5×10^{10} vg/animal) o con 5×10^{11} vg/animal del vector control AAV8-null. Posteriormente se sometieron a pruebas experimentales y se eutanasiaron a los 7 meses de edad. ITT: Insulin Tolerance Test. n=8-10.

3.1. Disminución del peso corporal en ratones ob/ob tras una única administración de AAV8-FGF21

De manera similar a los resultados obtenidos en los estudios anteriores (Figuras 10 y 11), mientras el peso corporal de los ratones ob/ob inyectados con el vector AAV8-null incrementó de manera significativa durante el periodo de seguimiento (20 semanas), los ratones ob/ob tratados con la D2 de AAV8-FGF21 perdieron un $\sim 7\%$ de su peso corporal durante las dos primeras semanas y luego lo mantuvieron estable durante el resto del estudio (Figura 35A-C). Los ratones ob/ob que recibieron la D1 del vector codificante para FGF21, ganaron peso durante el transcurso de las 20 semanas de seguimiento pero el incremento de peso fue marcadamente menor ($\sim 10\%$ ganancia de peso corporal) que el observado en el grupo al que se administró el vector AAV8-null ($\sim 60\%$ ganancia de peso corporal) (Figura 35A-C).

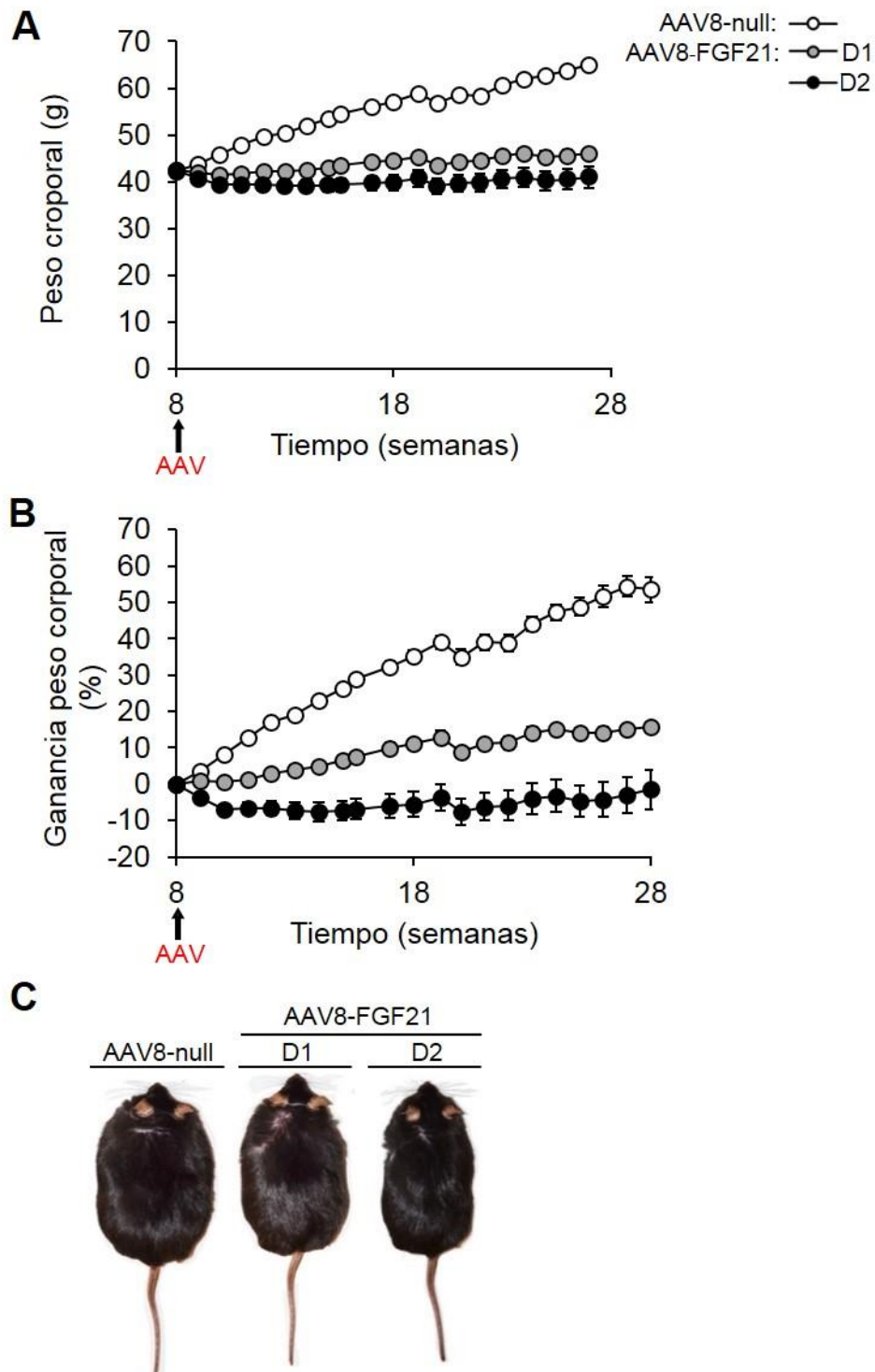


Figura 35. Evaluación del peso corporal en animales ob/ob tratados con AAV8-FGF21 o AAV8-null. A las 8 semanas de edad, se administraron dos dosis de 10^{11} vg/animal (D1) o 5×10^{11} vg/animal (D2) de vector AAV8-FGF21 o 5×10^{10} vg/animal de vector AAV8-null a ratones macho ob/ob. Se realizó un seguimiento semanal del peso corporal durante 5 meses hasta el sacrificio de los animales. **(A, B)** Evolución del peso corporal absoluto **(B)** o en ganancia de peso respecto al inicial **(C)**. $n=8-10$. Los resultados se expresan como la media \pm EEM. **(C)** Imágenes representativas de los animales pertenecientes a todos los grupos experimentales del estudio a tiempo final.

Por tanto, estos resultados demostraron que una única administración de AAV8-FGF21, no solo podía revertir la obesidad inducida por la dieta, sino que era capaz de adelgazar un modelo de obesidad extrema tal como los ratones ob/ob.

3.2. Expresión y secreción sostenida de FGF21 en animales ob/ob tratados con AAV8-FGF21

A las 28 semanas de edad, 20 semanas tras la administración intravenosa de AAV8-FGF21, se comprobó la sobreexpresión de FGF21 mediante análisis RT-PCR en el hígado. De manera similar a los estudios previos, la transferencia genética de FGF21 a hígado mediada por AAVs, permitió la sobreexpresión del factor de manera dosis-dependiente (Figura 36A).

Cuando se determinaron por ELISA los niveles circulantes de FGF21 a 2 y 5 meses después de la administración del vector, se observó un aumento también dosis-dependiente de los niveles circulantes de la proteína, debido a la secreción hepática del factor (Figura 36B). De esta manera, se demostró que en el hígado de los ratones ob/ob tratados con AAV8-FGF21 eran capaces de producir de forma estable la proteína y secretarla a la circulación sanguínea.

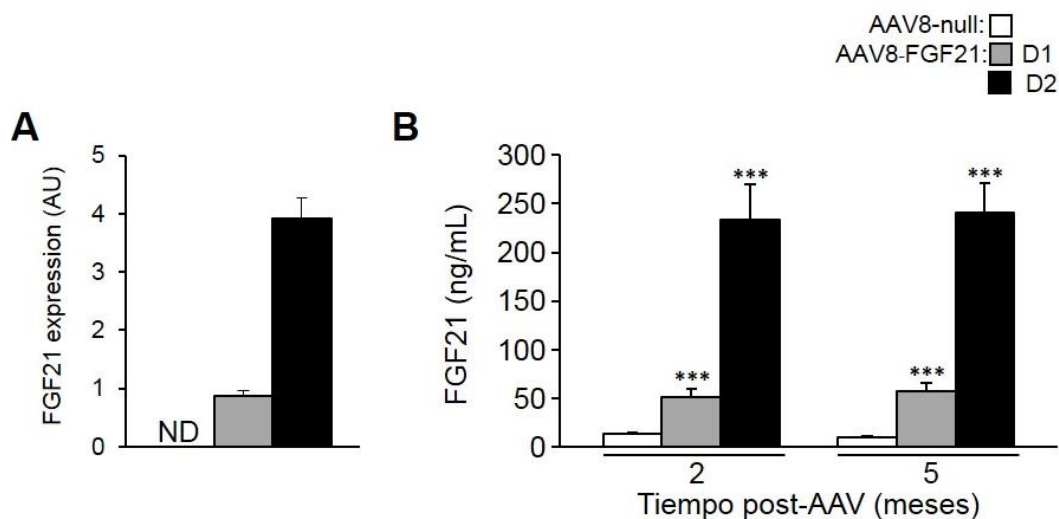


Figura 36. Niveles de expresión de FGF21 en hígado y niveles circulantes de FGF21. Ratones macho ob/ob se trataron con diversas dosis de AAV8-FGF21 a las 8 semanas de edad. **(A)** Niveles de expresión de FGF21 optimizado (oFGF21) en hígado 20 semanas después de una única administración de AAV8-FGF21 medidos por análisis RT-PCR y normalizados por *Rplp0*. **(B)** Niveles séricos de FGF21 medidos a la mitad y al final del estudio mediante ELISA. ND: no detectado. n=8-10. Los resultados se expresan como la media ± EEM. *P<0.05, **P<0.01 y ***P<0.001 versus el grupo tratado con vectores nulos.

3.3. Disminución de la hipertrofia y la inflamación del eWAT en animales ob/ob tratados con AAV8-FGF21

De acuerdo con la reducción del peso corporal, el análisis de los cortes histológicos de eWAT de los animales que sobreexpresaban FGF21 en el hígado mostrará una reducción del tamaño de los adipocitos, la cual fue más marcada en los tratados con la D2 (Figura 37).

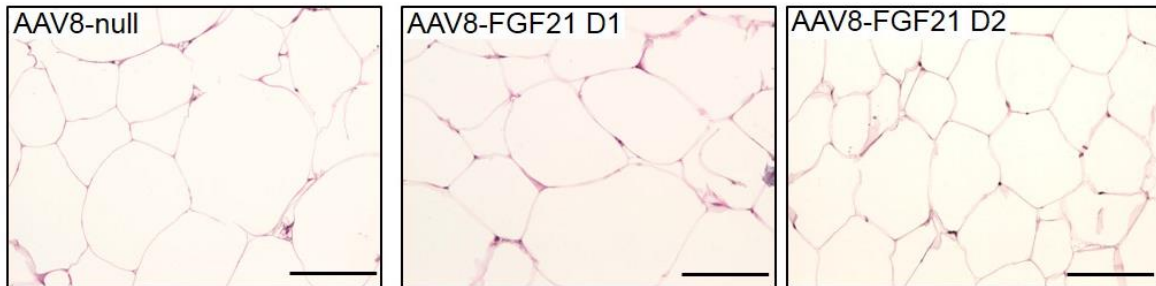


Figura 37. Análisis de la morfología del tejido adiposo blanco epididimal. Imágenes representativas de una tinción de hematoxilina/eosina en secciones de eWAT de ratones macho ob/ob tratados con AAV8-null o con las dosis D1 o D2 de AAV8-FGF21 y sacrificados a las 20 semanas post-tratamiento. Escala: 100 μ m.

En paralelo, una tinción inmunohistoquímica contra Mac2 en cortes histológicos de eWAT mostró que el tratamiento con AAV8-FGF21 disminuía la infiltración de macrófagos dentro del tejido, reduciendo la presencia de estructuras “*crown-like*” en función de la dosis recibida (Figura 38).

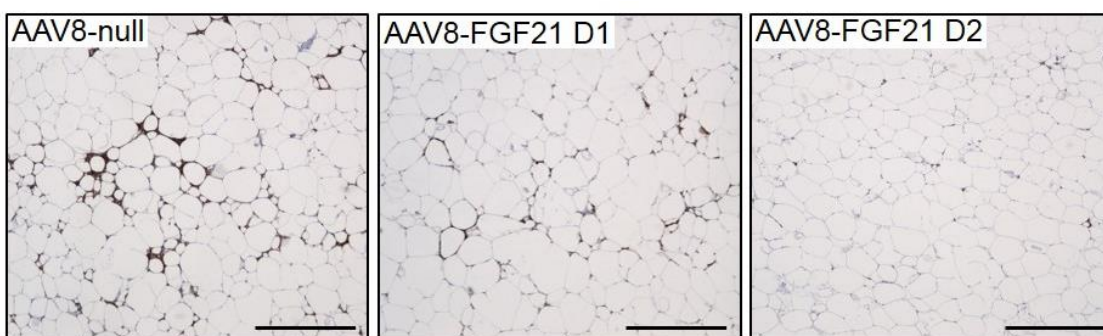


Figura 38. Evaluación de la inflamación del tejido adiposo blanco epididimal. Tinción inmunohistoquímica contra Mac2 (marrón) en secciones de eWAT de ratones macho ob/ob a las 20 semanas de tratarse con AAV8-null o con la D1 o D2 de AAV8-FGF21. En las secciones de eWAT de los ratones control se aprecia la presencia de estructuras “*Crown-like*” (marrón) mientras que la infiltración de macrófagos disminuye a medida que se eleva la dosis de AAV8-FGF21. Escala: 500 μ m.

Además, al determinar por RT-PCR la expresión de los marcadores de macrófagos F4/80 y TNF α , éstos se hallaban disminuidos en el eWAT al tratar con ambas dosis de AAV8-FGF21 a los animales ob/ob (Figura 39A,B), indicando que el tratamiento resultaba en una clara disminución de la inflamación del eWAT. De acuerdo con estos resultados, los niveles circulantes de adiponectina incrementaron en función de la dosis de AAV8-FGF21 recibida (Figura 39C).

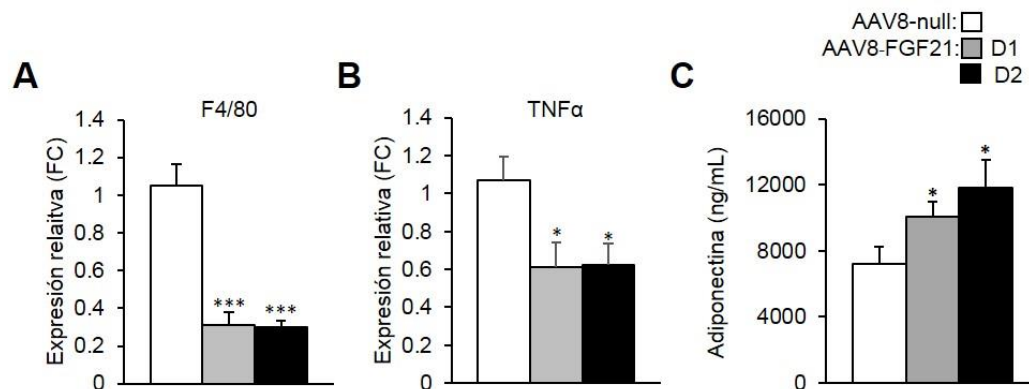


Figura 39. Determinación de los niveles circulantes de adiponectina. (A, B) Análisis por RT-PCR de los niveles de expresión de F4/80 (A) y TNF α (B) en el eWAT de ratones macho ob/ob después de 20 semanas tras el tratamiento con AAV8-null o ambas dosis de AAV8-FGF21. (C) Niveles circulantes de adiponectina medidos por ELISA al final del experimento. n=8-10. Los resultados se expresan como la media \pm EEM. *P<0.05, **P<0.01 y ***P<0.001 versus el grupo tratado con vectores nulos.

Estos datos demostraron la reducción de la hipertrofia y la inflamación del eWAT en ratones ob/ob gracias al incremento de los niveles circulantes de FGF21 tras sobreexpresar el factor en hígado mediante AAVs.

3.4. Disminución del peso y la esteatosis del hígado de animales ob/ob tratados con AAV8-FGF21

El análisis de los cortes histológicos del hígado al final del experimento, mostró que los ratones ob/ob a los 7 meses de edad tenían una marcada esteatosis hepática. En cambio, los ratones ob/ob de la misma edad tratados con AAV8-FGF21 a los dos meses, no presentaron acúmulo patológico de lípidos en los hepatocitos (Figura 40A). Por ello, el peso y el tamaño del hígado de los animales tratados con el vector terapéutico disminuyó un 60% en comparación con sus controles tratados con AAV8-null (Figura 40B,C).

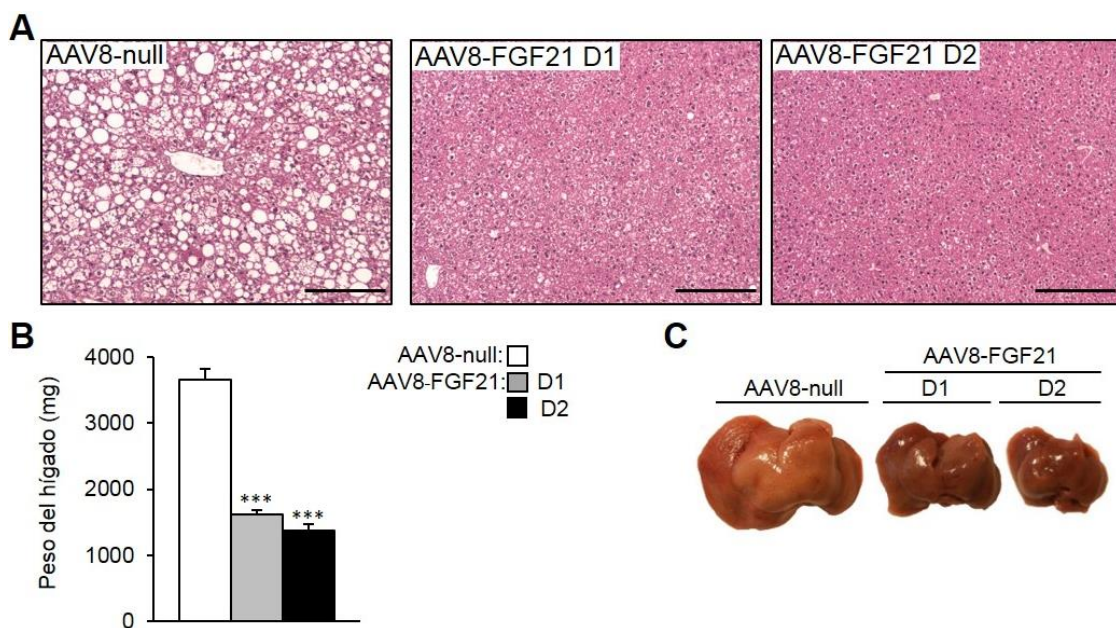


Figura 40. Análisis de la morfología hepática. (A) Imágenes representativas de una tinción de hematoxilina/eosina en secciones de hígado de ratones ob/ob a las 20 semanas de haberse tratado con AAV8-null o con las dosis D1 o D2 de AAV8-FGF21. Escala: 200µm. **(B)** Peso del hígado de ratones ob/ob a las 28 semanas de edad, 20 semanas tras el tratamiento con AAVs. n=8-10. Los resultados se expresan como la media ± EEM. *P<0.05, **P<0.01 y ***P<0.001 versus el grupo tratado con vectores nulos. **(C)** Imágenes macroscópicas representativas de los hígados de animales pertenecientes a todos los grupos experimentales.

3.5. Mejora de la glucemia y de la sensibilidad a la insulina en ratones ob/ob tratados con AAV8-FGF21

Se ha descrito que el modelo animal ob/ob presenta una marcada hiperinsulinemia y que también presenta alteraciones en el metabolismo de la glucosa (Wang et al., 2014). Puesto que en los estudios con HFD se observó una mejora en la sensibilidad

a la insulina, en los ratones ob/ob tratados con AAV8-FGF21, también se determinó los niveles circulantes de glucosa e insulina y se evaluó la sensibilidad a la insulina.

Los ratones ob/ob tratados con ambas dosis de AAV8-FGF21 presentaron una reducción en la glucemia en alimentación en comparación con sus controles tratados con el vector AAV8-null (Figura 41A). Cuando se midió por ELISA la insulina circulante, la insulinemia en alimentación también se redujo hasta un 70% tras el tratamiento con ambas dosis del vector codificante para FGF21 (Figura 41B).

Asimismo, la sensibilidad a la insulina de los animales tratados con AAV8-FGF21 también mejoró en función de la dosis administrada en comparación con los controles tratados con AAV8-null, los cuales presentaron una marcada resistencia a la insulina (Figura 41C).

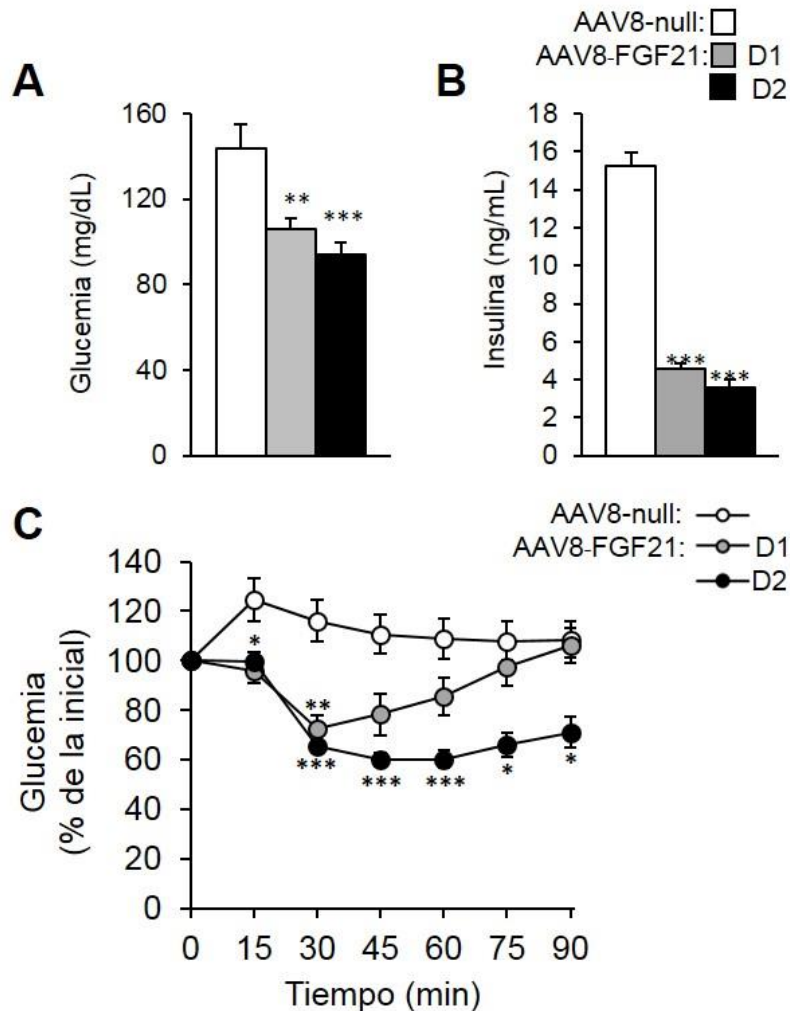


Figura 41. Determinación de la glucemia y la insulinemia y evaluación de la sensibilidad a la insulina. (A,B) Glucemia (A) e insulinemia (B) en alimentación en ratones ob/ob tratados con AAV8-null o diversas dosis de AAV8-FGF21 al final de los estudios (20 semanas post-AAV). (C) Test de tolerancia a la insulina (ITT) intraperitoneal a los 4 meses post-AAV en ratones macho ob/ob tratados con AAV8-null o diversas dosis de AAV8-FGF21. Los resultados se expresan como la media \pm EEM. n=8-10.

Así pues, los resultados obtenidos mostraron que el tratamiento con AAV8-FGF21 podía revertir parcialmente los efectos adversos de la obesidad y mejorar la sensibilidad a la insulina en un modelo de obesidad extrema como son los ratones ob/ob.

En conclusión, la sobreexpresión de FGF21 en hígado mediante un vector AAV permitió la secreción duradera del factor al torrente circulatorio, lo que, a nivel sistémico, evitó el acúmulo patológico de lípidos en el tejido adiposo y el hígado y aumentó el gasto energético, revirtiendo así los efectos adversos de la obesidad y mejorando la sensibilidad a la insulina (Figura 42). Además, se comprobó que el tratamiento con el vector AAV8-FGF21 a las dosis utilizadas no causó daño alguno en la estructura y la homeóstasis óseas. En conjunto, los datos obtenidos demostraron que el tratamiento con el vector AAV8-FGF21 podría suponer en un futuro una alternativa terapéutica para la obesidad y la diabetes tipo 2.

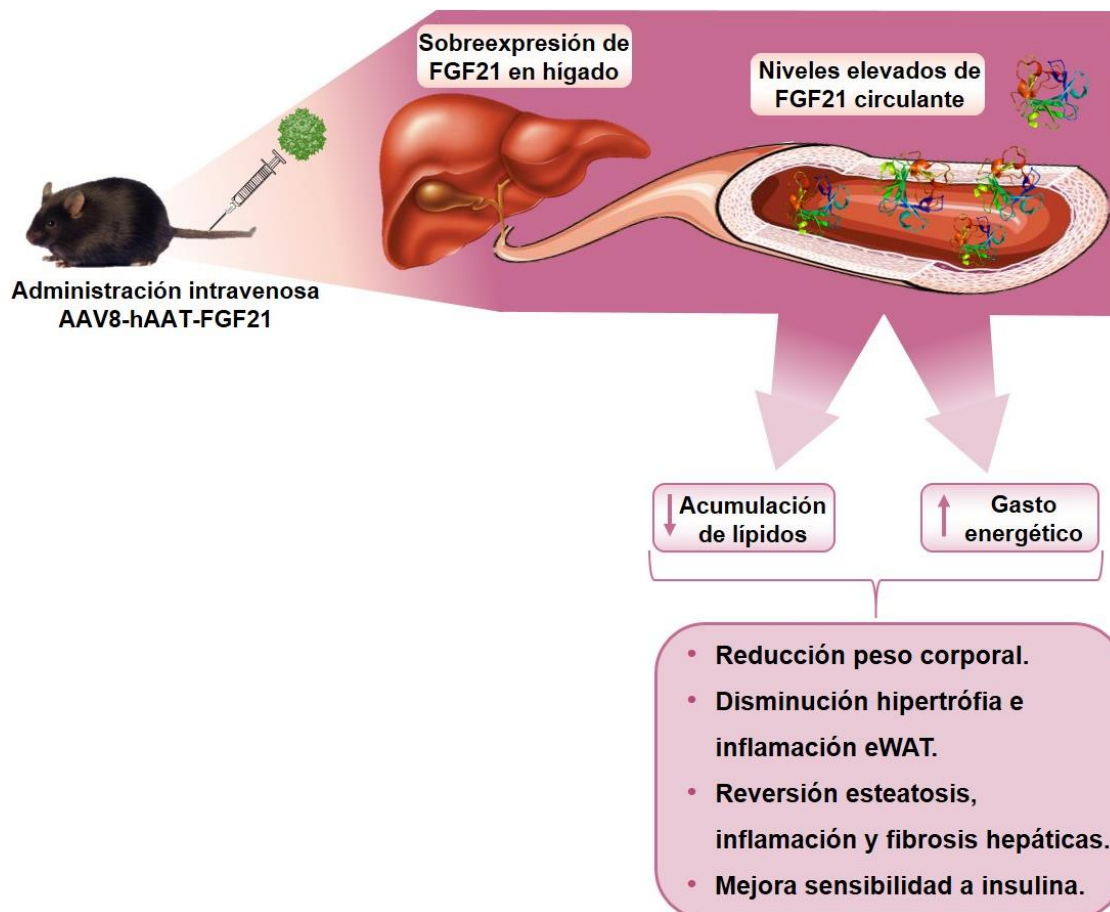


Figura 42. Esquema de los efectos terapéuticos de la administración intravenosa del vector AAV8-FGF21. La administración intravenosa del vector AAV8-FGF21 promovió la sobreexpresión de dicho factor en el hígado. Esto llevó a la secreción continua de FGF21 al torrente sanguíneo promoviendo la acción a nivel sistémico del factor. FGF21 aumentó el gasto energético y revirtió la deposición patológica de lípidos en el tejido adiposo y en el hígado, evitando así la consecuente inflamación de dichos tejidos. Todo ello contribuyó a mejorar la sensibilidad a la insulina a nivel sistémico a la vez que se redujo el peso corporal.

V. DISCUSIÓN

La obesidad y la DT2 son enfermedades metabólicas muy complejas e íntimamente relacionadas. Ambas patologías han alcanzado proporciones epidémicas tanto en países desarrollados como en los que aún están en vías de desarrollo. Sin embargo, los tratamientos actuales disponibles se basan en terapias farmacológicas complejas que presentan efectos secundarios y no suponen una cura real para la enfermedad, o bien, en intervenciones quirúrgicas bariátricas con efectos adversos considerables (Ahn et al., 2010). Por este motivo, es urgente desarrollar nuevas estrategias terapéuticas para curar la DT2 y la obesidad. A este respecto, FGF21 se ha postulado como un factor muy prometedor para tratar estas patologías (Kharitonov et al., 2007).

Hasta la fecha, los estudios de este trabajo aportan la primera evidencia de la posibilidad de revertir la obesidad y la resistencia a la insulina a largo plazo con una única administración de un producto de terapia génica que codifica para FGF21. En este estudio se aprovechó la preferencia de los vectores AAV8 por transducir el hígado conjuntamente con el uso de un promotor específico de este tejido para sobreexpresar una secuencia de FGF21 con optimización de codón en dicho órgano, el principal secretor del FGF21 endógeno (Markan et al., 2014). Esto permitió alcanzar un incremento sostenido en el tiempo de los niveles circulantes de FGF21.

En primer lugar, hemos demostrado que AAV8-FGF21 era capaz de revertir la enfermedad durante más de un año, en una aproximación con ratones con obesidad inducida por una dieta alta en lípidos (el modelo que reproduce mejor las características metabólicas de los humanos con obesidad y resistencia a la insulina) tratados cuando eran adultos jóvenes o bien cuando superaban los 9 meses de edad. Esta aproximación constituye el seguimiento más largo que se ha reportado con un tratamiento basado en FGF21 en ratones alimentados con dieta alta en lípidos y demuestra tanto la eficacia como la seguridad de nuestra aproximación terapéutica. Cabe remarcar que además, el potencial de la transferencia génica de AAV8-FGF21 a hígado para revertir la obesidad y la resistencia a la insulina también se confirmó en un modelo genético de obesidad y resistencia a la insulina extremas como son los ratones ob/ob.

La administración de los vectores AAV codificantes para FGF21 varias semanas después del inicio de la alimentación con dieta alta en lípidos medió una reducción de peso corporal proporcional a la dosis administrada. Se debe recalcar que, una vez se normalizó el peso, éste se mantuvo estable durante el resto del periodo de seguimiento y, que en el caso de los animales que recibieron la dosis más alta, nunca

alcanzó niveles por debajo del peso corporal observados al inicio del estudio y no indujo caquexia a los animales tratados con AAV8-FGF21, lo que sustenta la seguridad del tratamiento.

La pérdida de peso observada fue paralela a la disminución del peso de los depósitos adiposos y el área media de los adipocitos. De acuerdo con la reducción de los depósitos adiposos, los niveles circulantes de las adipocinas adiponectina y leptina se normalizaron. Además, a diferencia de los animales control obesos, no se detectaron signos de inflamación en el tejido adiposo blanco. También, el tratamiento con los vectores codificantes para FGF21 previno la ganancia de peso y la hipertrofia e inflamación del tejido adiposo en ratones ob/ob. Observaciones similares a las obtenidas en este estudio, se han reportado en ratones transgénicos que sobreexpresan FGF21 en hígado (Tg-FGF21) (Inagaki et al., 2007; Kharitonov et al., 2005a) o en animales tratados farmacológicamente con la proteína nativa o análogos/miméticos de FGF21 (Adams et al., 2012a; Berglund et al., 2009; BonDurant et al., 2017; Coskun et al., 2008; Emanuelli et al., 2014; Foltz et al., 2012; Hecht et al., 2012; Markan and Potthoff, 2016; Smith et al., 2013; So and Leung, 2016; Stanislaus et al., 2017; Talukdar et al., 2016; Xu et al., 2009; Zhang and Li, 2015).

El marcado efecto de FGF21 sobre el peso corporal se produjo a pesar del incremento de la ingesta, de acuerdo con lo observado en publicaciones previas en ratones Tg-FGF21 o tratados con proteína exógena (Coskun et al., 2008; Inagaki et al., 2008; Kharitonov et al., 2005a; Laeger et al., 2017). Esta reducción del peso corporal puede explicarse por el incremento del gasto energético y la normalización de la actividad locomotora descritos en este trabajo, así como en otros (Coskun et al., 2008; Xu et al., 2009). Además, la transferencia génica de FGF21 a hígado y el consecuente incremento de FGF21 circulante, redujo la deposición de lípidos e incrementó los niveles proteicos de UCP1 en el BAT. Esto sugería un incremento de la termogénesis no asociada a temblor en dicho tejido. Aunque hay estudios que han descrito la inducción de la expresión de UCP1 tanto en BAT como en iWAT (Adams et al., 2013a; Douris et al., 2015; Emanuelli et al., 2014; Fisher et al., 2012; Hondares et al., 2010), en este trabajo no se observó inducción de *browning* en el iWAT. Sin embargo, de acuerdo con nuestros resultados, estudios recientes han descrito la ausencia de *browning* en iWAT de ratones alimentados con dieta alta en lípidos y en primates obesos *Cynomolgus* tratados con análogos de FGF21 (Talukdar et al., 2016; Véniant et al., 2015), lo que sugiere que el *browning* del iWAT no es uno de los principales mecanismos responsables de los efectos anti-obesogénicos de FGF21.

La esteatohepatitis-no-alcohólica está estrechamente asociada a la resistencia a la insulina y la DT2 en humanos (Kitade et al., 2017) y es uno de los principales objetivos en el desarrollo de tratamientos anti-diabéticos. En nuestra aproximación, la alimentación con dieta alta en lípidos durante más de 10 meses produjo el incremento del peso del hígado y marcadas alteraciones en la estructura del parénquima hepático, tales como la presencia de grandes vacuolas lipídicas, fibrosis e inflamación. La terapia génica con FGF21 corrigió completamente las alteraciones hepáticas de manera que la morfología del hígado de los animales tratados con AAV8-FGF21 era similar al de los ratones sanos alimentados con dieta estándar. Asimismo, cuando se trataron ratones ob/ob, se observaron resultados similares. En conjunto, estos datos subrayan el potencial de la transferencia génica de FGF21 para contrarrestar esta condición pro-diabetogénica.

Como resultado de la mejoría observada en el hígado y los tejidos adiposos blanco y marrón, tanto los ratones alimentados con dieta alta en lípidos como los ratones ob/ob que se trataron con AAV8-FGF21, mostraron un incremento muy importante en la sensibilidad a la insulina. Este hecho quedó claramente demostrado tanto por la corrección de la hiperinsulinemia como por la mejora en el perfil de respuesta en el test de tolerancia a la insulina. Notablemente, los ratones con obesidad inducida por la dieta, tratados con la dosis más baja del vector terapéutico, que no medió pérdida de peso, también presentaron una mejoría en la sensibilidad a la insulina. Este hecho indica que no todos los efectos positivos de FGF21 sobre el metabolismo de la glucosa dependen de la pérdida de peso sino que muy probablemente son efectos directos del factor sobre la homeostasis de la glucosa. Esta mejoría en la sensibilidad a la insulina mediada por FGF21 se ha descrito en otros estudios en ratones y primates obesos (Adams et al., 2013b; Berglund et al., 2009; Camporez et al., 2013; Charoenphandhu et al., 2017; Emanuelli et al., 2014; Hale et al., 2012; Hecht et al., 2012; Kharitonov et al., 2007; Stanislaus et al., 2017; Véniant et al., 2012). Sin embargo, los estudios clínicos en humanos tratados con análogos de FGF21 llevados a cabo hasta la actualidad, habrían resultado probablemente demasiado cortos para reproducir dichas observaciones hechas en modelos animales. Por tanto, quedaría por determinar si la terapia génica, que permite la producción constante de la proteína terapéutica y la obtención de niveles circulantes estables, podría mejorar la glucemia y la sensibilidad a la insulina en pacientes humanos.

El potencial terapéutico de FGF21 para tratar la obesidad y la resistencia a la insulina ha motivado que la industria farmacéutica haya desarrollado rápidamente un

gran número de análogos y miméticos que poseen las mismas acciones biológicas que el FGF21 endógeno pero con mejores propiedades farmacocinéticas (So and Leung, 2016; Zhang and Li, 2015). Modificaciones de la proteína nativa, como la conjugación de FGF21 con polietilenglicol se utilizan en farmacología para alargar la vida media de muchas proteínas. Sin embargo, la conjugación de FGF21 con polietilenglicol conlleva el riesgo de acumular vacuolas (Bendele et al., 1998; Webster et al., 2007) lo que compromete la seguridad del tratamiento si éstas se acumulan en el epitelio tubular renal de pacientes diabéticos con fallo renal. Otros anticuerpos miméticos de FGF21 activan el receptor FGFR1 sin la actuación del co-receptor β -klotho (So and Leung, 2016; Zhang and Li, 2015) levantando sospechas de riesgo de tumorigénesis debida a acciones inespecíficas. Además, se ha descrito que los miméticos/análogos de FGF21 son inmunogénicos (Adams et al., 2013b; Gaich et al., 2013; Kim et al., 2017; Stanislaus et al., 2017). El tratamiento con el análogo LY2405319 en monos *Rhesus* indujo el desarrollo de anticuerpos e inmunoglobulinas anti-LY2405319 en todos los animales tratados (Adams et al., 2013b). Asimismo, algunos de los pacientes humanos tratados con LY2405319 desarrollaron reacciones locales en el sitio de inyección y la mitad de ellos desarrolló anticuerpos (Gaich et al., 2013). También se ha descrito el desarrollo de anticuerpos y reacciones alérgicas y de hipersensibilidad en humanos tratados con el análogo PF-05231023 (Kim et al., 2017). Por otro lado, aunque las moléculas análogas/miméticas de FGF21 son de larga duración, aún requieren de administraciones periódicas que suponen un inconveniente para los pacientes y pueden comprometer, en algunos casos, la continuidad del tratamiento. En este sentido, la terapia génica ofrece ventajas sobre estas moléculas sintéticas. Por un lado, brinda la posibilidad de alcanzar los niveles terapéuticos de la proteína tras una única administración, lo que constituye una mejora obvia para el paciente. Pero lo que es aún más importante, la terapia génica permite tratar con la proteína nativa, que es reconocida como propia por el sistema inmunitario y señala a través de la vía canónica de FGF21, evitando respuestas biológicas inespecíficas o inmunológicas. Cabe mencionar que los vectores AAV no están asociados a ninguna patología en humanos y que muestran una muy baja inmunogenicidad y un perfil de seguridad excelente que ha impulsado su uso en un creciente número de ensayos clínicos (Mingozzi and High, 2011). Particularmente, el uso de la terapia génica con AAV dirigida a hígado en paciente humanos ha estado ampliamente estudiada con prometedores resultados (Mingozzi and High, 2011).

Las preocupaciones respecto a la seguridad del tratamiento crónico con FGF21 a tener en cuenta son los posibles efectos adversos sobre la homeóstasis ósea y, dada

la condición de factor de crecimiento de FGF21, la potencial tumorigénesis (Kharitononkov and DiMarchi, 2017a; Kharitononkov et al., 2005a). Los ratones Tg-FGF21 son más cortos y se ha descrito que se produce pérdida de masa ósea en los Tg-FGF21 y también en animales y humanos tratados con FGF21 recombinante o con análogos/miméticos de este factor (Charoenphandhu et al., 2017; Kim et al., 2017; Talukdar et al., 2016; Wang et al., 2015; Wei et al., 2012). No obstante, a pesar de que, en este estudio los niveles de FGF21 alcanzados en animales alimentados con dieta alta en lípidos tratados con la dosis más alta de AAV8-FGF21 (dosis que revirtió la obesidad y resistencia a la insulina hasta los niveles de los animales controles sanos) eran del mismo rango que los obtenidos en los Tg-FGF21 (Inagaki et al., 2008), no observamos ninguna diferencia en la longitud naso-anal o en la de la tibia, independientemente de la edad a la que se trataron los animales. Cabe remarcar que además, los animales tratados cuando eran Adultos jóvenes, recibieron los vectores cuando aún no se había producido el cierre de la placa de crecimiento ósea (Kilborn et al., 2002). Los ratones alimentados con dieta HFD utilizados en este estudio eran de la misma cepa que los Tg-FGF21 de los que se describió menor longitud corporal, por lo tanto, las llamativas diferencias en el fenotipo óseo podrían ser debidas a efectos de FGF21 durante el desarrollo embrionario o en un período temprano post-natal en los animales transgénicos. Por otra parte, se ha postulado que el fenotipo óseo observado en los Tg-FGF21 no se debería a consecuencias directas de la acción de FGF21, sino al balance energético negativo crónico inducido por FGF21 en estos animales (Kharitononkov and DiMarchi, 2017a). En nuestros estudios, no se observaron signos de pérdida ósea trabecular o cortical con el tratamiento de AAV8-FGF21 en los ratones con obesidad y resistencia a la insulina inducidas por la dieta. Actualmente, existe controversia sobre si FGF21 ejerce efectos adversos sobre la densidad mineral ósea. Los animales transgénicos de FGF21 muestran una masa ósea reducida (Wang et al., 2015; Wei et al., 2012). El tratamiento farmacológico a largo plazo con FGF21 nativo o sus análogos/miméticos causó pérdida ósea y/o alteraciones en los marcadores de remodelamiento óseo en roedores y humanos (Charoenphandhu et al., 2017; Kim et al., 2017; Talukdar et al., 2016; Wang et al., 2015; Wei et al., 2012). En cambio, un estudio publicado este mismo año, describe que el tratamiento a corto plazo con FGF21 no produjo efectos sobre la masa ósea en ratones alimentados con dieta alta en lípidos, sugiriendo que FGF21 no es dañino para la homeostasis ósea en roedores (Li et al., 2017).

Otras consideraciones respecto a posibles efectos adversos del incremento de los niveles circulantes de FGF21 serían la inducción de torpor y la reducción de la

fertilidad en hembras. Se ha descrito que FGF21 produjo la reducción de la actividad física y la temperatura corporal en ratones ayunados, lo que condujo a la hipótesis de que FGF21 induce un estado propio de la hibernación conocido como torpor (Inagaki et al., 2007). Por el contrario, estudios posteriores en ratones sin limitaciones alimentarias demostraron que FGF21, no solo no disminuía la temperatura corporal, sino que la aumentaba debido a un mayor consumo energético (Coskun et al., 2008; Inagaki et al., 2008). En este trabajo, se ha podido demostrar que la sobreexpresión sostenida de FGF21, tras la administración del vector AAV, causaba un incremento de la actividad locomotora, en contra de la hipótesis de que FGF21 produce la inducción de torpor en ratones. Estas discrepancias pueden deberse a diferencias en la disponibilidad energética, por lo que los ratones ayunados no podrían compensar el incremento del gasto energético inducido por FGF21 y entrarían en fase de torpor. Lo mismo sucedería con en el caso de la fertilidad en hembras (Kharitonov and DiMarchi, 2017b). En contraposición a la infertilidad observada en ratones Tg-FGF21 hembras (Owen et al., 2013), estudios más recientes han concluido que dicha infertilidad no era debida a la acción directa de FGF21 sobre el sistema reproductivo sino que era consecuencia de un balance energético negativo en condiciones de nutrición insuficientes (Singhal et al., 2016).

En relación a la formación de tumores, aunque el número de animales utilizados en este estudio era bajo, la diferencia en la incidencia de neoplasias hepáticas inducidas por la dieta alta en lípidos fue evidente entre los animales tratados con los vectores control nulos y los tratados con los vectores terapéuticos. Estas observaciones defienden la idea del papel protector de FGF21 frente a este tipo de neoplasias. Por lo tanto, la transferencia génica de FGF21 no sólo no causó tumores *per se* sino que previno la formación de tumores inducidos por la exposición crónica a dieta alta en lípidos. De acuerdo con estas observaciones, tampoco se detectaron signos de proliferación patológica en el hígado en ninguno de los modelos de ratones Tg-FGF21 que sobreexpresaban FGF21 desde el nacimiento (Huang et al., 2006; Kharitonov et al., 2005b), ni en los ratones tratados con FGF21 recombinante nativo (Adams et al., 2012b). Es más, la sobreexpresión de FGF21 específicamente en el hígado de ratones transgénicos o el tratamiento con la proteína nativa FGF21 retrasó la aparición de hepatocarcinomas inducidos químicamente (Huang et al., 2006; Xu et al., 2015).

El excelente registro de seguridad y eficacia de la terapia génica mediada por vectores AAV ha ampliado el rango de aplicaciones desde las enfermedades monogénicas hasta las no hereditarias, como la diabetes. Hay experiencia sustancial,

pre-clínica y clínica en transferencia génica a hígado para tratar patologías hereditarias (Mingozzi and High, 2011), suficiente para apoyar la viabilidad de una aproximación terapéutica como la propuesta en esta tesis doctoral para tratar una enfermedad metabólica compleja en humanos. En este estudio, se ha desarrollado una aproximación de terapia génica para la obesidad y la resistencia a la insulina basada en el uso de vectores AAV8 que codifican para FGF21. Una única administración del vector en ratones obesos permitió incrementar los niveles circulantes de FGF21 de forma duradera, revirtiendo a la vez la obesidad, la inflamación del tejido adiposo, la resistencia a la insulina y el desarrollo de hepatoesteatosis-no-alcohólica sin efectos adversos. Los resultados presentados en esta tesis doctoral sientan las bases para la futura translación clínica de esta aproximación para tratar la DT2, la obesidad y las comorbilidades asociadas.

VI. CONCLUSIONES

1. La administración intravenosa del vector AAV8-FGF21 en ratones C57BL/6 alimentados con dieta HFD permitió incrementar los niveles circulantes de la proteína FGF21 durante más de un año.
2. El tratamiento con AAV8-FGF21 produjo una pérdida de peso escalada en función de la dosis administrada en ratones C57BL/6 con obesidad inducida por la dieta tratados a dos edades diferentes.
3. El tratamiento con AAV8-FGF21 en ratones ob/ob también aumentó los niveles circulantes de la proteína FGF21 y revirtió la ganancia de peso.
4. El tratamiento con AAV8-FGF21 medió la disminución de la adiposidad, evitó la inflamación del tejido adiposo y normalizó los niveles de adipoquinas, tanto en los ratones con obesidad inducida por la dieta como en los ratones ob/ob.
5. El tratamiento con AAV8-FGF21 redujo la deposición ectópica de lípidos en hígado evitando la hepatoesteatosis, la inflamación y la fibrosis en ratones alimentados con dieta alta en lípidos. Resultados similares se obtuvieron en los ratones ob/ob.
6. El tratamiento con AAV8-FGF21 produjo un aumento del gasto energético causado por el aumento de la termogénesis no asociada a temblor en el BAT y la normalización de la actividad locomotora. No obstante, no se observó *browning* en el iWAT.
7. El tratamiento con AAV8-FGF21 incrementó de manera dosis-dependiente la sensibilidad a la insulina y revirtió la hiperinsulinemia en ratones C57BL/6 con obesidad y resistencia a la insulina inducidas por la dieta y en ratones ob/ob.
8. La administración del vector AAV8-FGF21 no alteró la longitud naso-anal ni de la tibia, ni la estructura o la masa óseas a largo plazo.
9. El tratamiento con AAV8-FGF21 previno el desarrollo de hepatocarcinomas inducidos por el consumo crónico de dieta alta en lípidos.
10. En conclusión, los resultados presentados en esta tesis doctoral sientan las bases para la futura translación clínica de esta aproximación para tratar la DT2 y la obesidad.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

1. MATERIALES

1.1. Animales

En los estudios de esta tesis doctoral se utilizaron ratones machos de 9 o 29 semanas de edad C57BL/6J^{OlaHsd} y B6.V-Lep^{ob}/OlaHsd (ob/ob) de 8 semanas de edad (Harlan Teklad, Barcelona, España). Los animales se estabularon en una instalación libre de patógenos (SER-CBATEG, UAB) y se mantuvieron en condiciones de temperatura (22°C±2) y luz (ciclos de luz-oscuridad de 12h) controladas mientras se les alimentaba *ad libitum* con una dieta estándar (2018S Teklad Global Diets®, Envigo) o alta en lípidos (TD.88137 Harlan Teklad).

Cuando fue necesario, se ayunó a los animales durante 16h. Para la toma de muestras, se anestesió a los animales con anestésicos inhalatorios (Isoflorano, IsoFlo®, Abbott Animal Health, Illinois, EEUU) y se eutanasiaron por decapitación. Las muestras de sangre y los tejidos se tomaron por la mañana e inmediatamente se conservaron en formol (tejidos) o congeladas con N₂ líquido y guardadas a -80°C (suero y tejidos). Todos los procedimientos experimentales fueron aprobados por el Comité de Ética y de Experimentación Animal y Humana de la Universitat Autònoma de Barcelona.

1.2. Cepas bacterianas

Se utilizó la cepa *E.coli* XL2Blue (Stratagene-Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EEUU) para obtener y amplificar los dos constructos plasmídicos utilizados en este trabajo. Todos los plásmidos contenían el gen de selección de resistencia a la ampicilina. Los cultivos bacterianos se hicieron crecer en medio LB (Miller's LB Broth, Conda, Madrid, España) con un 2% de agar y 50 µg/mL de ampicilina.

1.3. Anticuerpos

Las muestras de tejido se fijaron en una solución tamponada de formol al 4%, se incluyeron en bloques de parafina y posteriormente se obtuvieron secciones de 2-3 µm para realizar la incubación con los anticuerpos y las tinciones correspondientes. Asimismo, se extrajo el extracto proteico de los tejidos congelados a -80°C y se realizaron los *western blots* con los anticuerpos necesarios. Los anticuerpos y

reactivos que se utilizaron para la detección de proteínas mediante técnicas inmunohistoquímicas o *western blot* fueron los siguientes (Tabla 2):

Tabla 2. Listado de anticuerpos.

	Reactividad	Especie	Proveedor
Inmunohistoquímica			
Anti-Mac2	Ratón	Rata	Cederlane CL8942AP
Anti-rata (IgG)	Rata	Conejo	Dako E0467
Western Blot			
Anti-UCP1	Ratón	Conejo	Abcam ab10983
Anti- α tubulina	Ratón	Conejo	Abcam ab4074
Anti-conejo/HRP (IgG)	Conejo	Cerdo	Dako P0217

1.4. Reactivos

Los reactivos de biología molecular se obtuvieron de las casas comerciales Roche (Roche Diagnostics Corp. IN, EEUU), Invitrogen Corporation, actualmente Life Technologies (San Diego, CA, EEUU), Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, EEUU), Amersham Biosciences (Piscataway, NJ, EEUU), Sigma (St. Louis, MO, EEUU), Promega Corporation (Madison, WI, EEUU), BASF (Barcelona, España), Qiagen (Hilden, Alemania), QBIogen, actualmente MP Biomedicals (Irvine, CA, EEUU) y Fermentas (St-Leon-Rot, Alemania). Los medios de cultivo y los antibióticos se obtuvieron de PAA (Paschin, Austria) y el suero (FBS) y F68 Pluronic® de Gibco (Invitrogen, Life Technologies).

1.5. Plásmidos

Los plásmidos usados en este estudio se resumen en la siguiente tabla (Tabla 3):

Tabla 3. Listado plásmidos.

Nombre	Promotor	Gen de interés	PolyA
pGG2-hAAT-coFGF21	HCR/hAAT	coFGF21	β -globina de conejo
pAAV-hAAT-Null	HCR/hAAT	-	β -globina de conejo

co: secuencia con optimización de codón.

El promotor HCR/hAAT contiene la región control del *locus* de la apolipoproteína E (HCR) juntamente con el promotor de la α 1-antitripsina humana (hAAT) y permite mediar niveles de expresión proteica altos específicamente en hígado.

Las estrategias de clonaje utilizadas para la generación de los plásmidos se resumen en la siguiente tabla (Tabla 4):

Tabla 4. Estrategias de clonaje de los plásmidos.

Nombre		Estrategia de clonaje
pGG2-hAAT-coFGF21	vector	pGG2-HCR/hAAT-oCre (CBATEG) digerido con MluI y XhoI
	inserto	pAAV-CAG-coFGF21-dmiRT (CBATEG) digerido con NotI y XhoI
pAAV-hAAT-Null		CBATEG

co: secuencia con optimización de codón.

2. MÉTODOS

2.1. Técnicas básicas de DNA

2.1.1. Preparación del DNA plasmídico

Para la obtención de pequeñas cantidades de DNA plasmídico (3-4 μ g) se realizaron *minipreparaciones* (*minipreps*) según el protocolo de lisis alcalina originariamente descrito por Birnboim y colaboradores (Birnboim et al., 1979). A partir de 1.5 mL de medio de cultivo (LB con ampicilina) se degrada la pared bacteriana por acción de la enzima lisozima, seguida de una lisis alcalina y de la precipitación selectiva del DNA genómico y proteínas desnaturalizadas con una solución de acetato de potasio a pH ácido. El RNA bacteriano se degrada por la adición de la enzima RNAsa.

Por otro lado, con tal de obtener grandes cantidades de DNA, se realizaron *maxipreparaciones* (*maxipreps*), a partir de las cuales se obtiene como máximo 1 mg de plásmido, o *megapreparaciones* (*megapreps*) para obtener un máximo de 2.5 mg de plásmido, a partir de 200 o 500 mL de medio de cultivo respectivamente. El método está basado igualmente en la lisis alcalina, pero en este caso, la purificación del DNA se realizó mediante columnas de absorción *Pure Yield™ Plasmid MaxiPrep System* (Promega Corporation) para las *maxipreps* y *EndoFree Plasmid Mega Kit* (Qiagen) para la *megapreps*.

2.1.2. Digestión del DNA con enzimas de restricción

Cada enzima de restricción requiere unas condiciones de reacción específicas de pH, fuerza iónica y temperatura. En cada caso se siguieron las instrucciones de la casa comercial (Fermentas). En general, el DNA se digirió con una unidad de enzima por μ g de DNA en el tampón suministrado por el fabricante durante una hora a la temperatura óptima de cada enzima. El producto de la reacción se analizó en geles de agarosa. Cuando el DNA debía ser digerido por dos enzimas de restricción, las digestiones se llevaron a cabo conjuntamente siempre que las condiciones de tampón y temperatura fueran compatibles. Si las enzimas tenían requerimientos diferentes, después de la primera digestión el DNA se purificaba de las sales y la enzima anteriores a través del kit *GeneJET® Gel Extraction* (ThermoSCIENTIFIC) según las instrucciones del fabricante y se eluía en 30 μ L de tampón de elución. Seguidamente se digería con la segunda enzima de restricción.

2.1.3. Desfosforilación del fragmento de DNA

Una vez digerido, el DNA plasmídico puede volver a religar. Este proceso se puede evitar mediante la eliminación de los residuos fosfato del extremo 5' del vector. Para la desfosforilación se utilizó una unidad de fosfatasa alcalina por 1-5 µg de DNA (FastAP™ *Thermosensitive Alkaline Phosphatase*, Fermentas) en su tampón comercial a 1X. La reacción de desfosforilación se realizó durante 10 minutos a 37°C. Posteriormente se inactivó la enzima a 75°C durante 5 minutos para evitar cualquier reacción de la fosfatasa alcalina en la reacción de ligación con el inserto.

2.1.4. Generación de extremos romos de fragmentos de DNA

En los casos en los que la digestión con la enzima de restricción produjo los extremos cohesivos y se necesitaban extremos romos para el clonaje, el fragmento digerido se trató con la enzima *Klenow Fragment* (Fermentas). En presencia de la doble cadena de DNA y de deoxinucleósidos trifosfato (dNTPs), la DNA polimerasa rellena el extremo protuberante generado por la enzima de restricción (actividad polimerasa 5'→3' o 3'→5'). En ausencia de dNTPs, la enzima elimina el extremo 3' protuberante mediante su acción exonucleasa (3'→5') pero no tiene actividad exonucleasa 5'→3'. La reacción se llevó a cabo siguiendo las instrucciones de la casa comercial.

2.1.5. Construcción de moléculas híbridas de DNA: ligación

La construcción de moléculas híbridas de DNA a partir de diferentes fragmentos es un procedimiento conocido como ligación y se lleva a cabo gracias a la acción de la enzima ligasa. Los fragmentos DNA de interés se mezclaron a distintos ratios molares de vector:inserto (1:5, 1:10 y 1:20) con la enzima DNA ligasa del bacteriófago T4 (New England Biolabs) y el tampón correspondiente según el protocolo establecido por el fabricante. Los productos resultantes de la ligación se transformaron en células competentes *E.coli* de la cepa XL2Blue (Stratagene-Agilent technologies, Santa Clara, CA, EEUU).

2.1.6. Transformación en células competentes *E.coli* XL2Blue

El plásmido de DNA se introdujo en células bacterianas competentes mediante la electroporación. Se utilizaron 40 µL de células *E. coli* XL2Blue (2×10^{10} células/mL) previamente descongeladas en hielo, a las que se les añadió 1 µL (aproximadamente 10 ng) de la reacción de ligación del DNA o de DNA control. Después de una incubación en hielo durante 5 minutos, las células se electroporaron a 2500 V con un

electroporador (Bio-Rad). Posteriormente se diluyeron en 100 μ L de LB y se sembraron en placas de LB con ampicilina que se incubaron a 37°C durante toda la noche.

A la mañana siguiente se hicieron crecer las colonias de bacterias obtenidas y posteriormente se extrajo el DNA de las colonias recombinantes. Se identificó la presencia de moléculas híbridas de DNA mediante el uso de enzimas de restricción.

2.1.7. Separación y visualización del fragmento de DNA

El gel de electroforesis de agarosa es el método estándar utilizado para separar, identificar y purificar fragmentos de DNA. Para separar fragmentos de DNA de entre 0.2 y 7 Kb se usaron geles de agarosa al 1%. La visualización del DNA en el gel se consiguió mediante la adición de bajas concentraciones de bromuro de etidio fluorescente al gel (0.5 μ g/mL), el cual se intercala entre dos cadenas de DNA. La presencia de DNA se visualizó utilizando luz ultravioleta (UV) de baja longitud de onda (310 nm) a través de un transiluminador y un sistema de cámaras (Syngene). Como marcador de tamaño molecular de DNA se utilizó el *GeneRuler* 1 Kb y el *GeneRuler* 100 pb (Thermo Scientific).

Los geles de agarosa se prepararon disolviendo agarosa en tampón de electroforesis 1X TAE (Trisacetate pH 8.3, 40 mM y EDTA 1nM) con 0.5 μ g/mL de bromuro de etidio. Las muestras se cargaron en el gel con 1X de tampón de carga (Fermentas) y se corrieron con el tampón de electroforesis 1X Tae a 80 V. Con tal de obtener y purificar el fragmento de DNA de interés del gel de agarosa, se usó el kit *GeneJET™ Gel Extraction* (Fermentas) y se cuantificó el DNA en el espectrofotómetro Nanodrop 1000 (Thermo Fisher Scientific Inc., EEUU).

2.2. Células eucariotas en cultivo

2.2.1. Células HEK293

Las células HEK293 son células embrionarias de riñón humano que en este trabajo se utilizaron para la comprobación *in vitro* de la expresión de FGF21 a partir del plásmido generado. Se mantuvieron en medio de cultivo DMEM (PAA) con 2 mM de glutamina suplementado con suero fetal bovino (FBS) al 10% (inactivado por calor) en una incubadora ajustada al 8.5% de CO₂ y a 37°C. Cuando las células alcanzaron una confluencia del 70% se tripsinizaron y se plaquearon a diferentes diluciones.

2.2.2. Transfección de DNA en células en cultivo

Para llevar a cabo el análisis de la expresión *in vitro* de FGF21 a partir del constructo generado, se transfectó el plásmido pGG2-hAAT-coFGF21 en células HEK293. Se utilizó la técnica de transfección con lipofectamina (Lipofectamine™2000, Invitrogen) basada en la formación de un complejo hidrofóbico lipofectamina-DNA para favorecer la entrada del DNA en la célula. Se utilizó una proporción de lipofectamina/DNA de 10 µL de lipofectamina (1 mg/mL) por 4 µg de DNA en placas de 6 pozos. En el momento de la transfección, las células HEK293 estaban al 70-80% de confluencia. El cultivo de las células se finalizó a las 24-48 h post-transfección para el análisis de las muestras.

2.3. Producción, purificación y titulación de vectores virales adenoasociados

2.3.1. Producción y purificación

Las partículas infectivas de vectores virales AAV8 de cadena simple se generaron en células HEK293 con el gen adenoviral E1 del adenovirus 5 integrado de forma estable en el genoma celular. Las células se cultivaron en *Roller Bottles* (RB) (Corning) hasta que alcanzaron el 70% de confluencia en medio DMEM suplementado con el 10% de FBS. Entonces, cada RB se co-transfectó con 30mL de fosfato cálcico con 150 µg de cada uno de los siguientes plásmidos: 1) los plásmidos pGG2-hAAT-coFGF21 o pGG2-hAAT-Null; 2) un plásmido de empaquetamiento pREP/CAP que codificaba para los genes AAV *Rep2* y *Cap8*; y 3) un plásmido auxiliar adenoviral denominado pWEAD que contenían los genes codificantes para las funciones auxiliares de los adenovirus. Los plásmidos pREP/CAP y pWEAD fueron amablemente proporcionados por la Dra. K.A. High, del *Children's Hospital of Philadelphia*, EEUU y se amplificaron en Plasmid Factory.

A continuación, se llevó a cabo la purificación mediante un protocolo con polietilenglicol (PEG) y ultracentrifugación en gradientes de CsCL que permite eliminar prácticamente todas las cápsidas vacías y disminuir las impurezas proteicas (Ayuso et al., 2010). Así pues, tres días después de la co-transfección, se recogieron las células y se centrifugaron a 2500 G durante 15 min a 4°C. El medio se guardó a 4°C mientras que pellet celular se reconstituyó en TMS (50 mM TrisHCL, 150 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, pH=8.0) y se sonicó para lisar las células y liberar los vectores del interior. El lisado se centrifugó a 2500 G durante 30 min y el sobrenadante resultante se añadió al cultivo previamente guardado a 4°C. A continuación, las partículas virales se precipitaron mediante una incubación de 15 h en PEG 8000 al

8% (Sigma) a 4°C. Pasado dicho periodo, los vectores se precipitaron por centrifugación a 400 G durante 30 min. El nuevo pellet con los vectores virales se reconstituyó con TMS, se trató con benzoasa (Merck) durante 1 h a 37°C y finalmente se centrifugó a 10000 G durante 10 min. El sobrenadante resultante se cargó en tubos de 37.5 mL *Ultra clear* (Beckman) que contenían un gradiente discontinuo de CsCl de densidad 1.5 (5 mL) y 1.3 g/mL (10 mL). A continuación, se centrifugaron a 27000 rpm en un rotor SW28 (Beckman). Las bandas que contenían vectores se recogieron con agujas de 18 G y se transfirieron a tubos *Ultra clear* de 12.5 mL. El resto del tubo de 12.5 mL se llenó con CsCl a 1.379 g/mL para generar un gradiente continuo. Estos tubos se centrifugaron a 38000 rpm en un rotor SW40Ti (Beckman) durante 48 h. Finalmente, se recogieron y dializaron las bandas correspondientes a las partículas AAV que contenían el genoma del vector mediante una membrana de 10 kDa (*Slide-A-Lyzer Dialysis Products*, Pierce) y se filtraron con filtros con poros de 0.22 µm de diámetro (Millipore).

2.3.2. Titulación de genomas virales

Los genomas virales de AAV8 se determinaron por PCR cuantitativa adecuando el protocolo descrito para AAV2, AAV8 y AAV9 *Reference Standard Material* (Lock et al., 2010) a los vectores usados en este estudio. La cuantificación de cada vector se realizó en paralelo con un vector de referencia de concentración conocida para garantizar la validez de los resultados. Para la curva estándar se utilizó un plásmido linealizado y cuantificado midiendo la absorbancia a 260 nm.

Con la finalidad de asegurar que el título del vector viral no se sobreestimaba debido a la presencia de plásmidos de DNA sobrantes de la transfección en la preparación viral final, se realizó un tratamiento con DNAsa previo a la cuantificación ya que solo los genomas virales encapsidados son resistentes a la digestión con DNAsa. Se añadieron 5 µL de cada preparación del vector viral a 5 µL de tampón de DNAsa 10X (130 mM Tris-HCl, 50 mM MgCl₂, 1.2 mM CaCl₂, pH=7.5), 1 µL de DNAsa (10 U/µL) y 36 µL de agua Milli-Q. La digestión se incubó 60 min a 37°C y posteriormente, las muestras se diluyeron para obtener el valor de amplificación dentro del rango de la curva estándar.

La reacción de cuantificación por PCR consistió en una incubación inicial de 10 min a 95°C (que permite la activación de la polimerasa y la desnaturalización de las cápsides virales, permitiendo la liberación de los genomas), seguida de 40 ciclos de 30 s a 95°C (desnaturalización) y 30 s a 60°C (*annealing* y elongación). Cada reacción de TaqMan contenía un volumen final de 10 µL (Tabla 5):

Tabla 5. Componentes de la reacción TaqMan.

Reacción TaqMan
5 μL <i>TaqMan LightCycler</i> ® 480 Probe Master
0.2 μL <i>primer forward</i> (10 μM)
0.2 μL <i>primer reverse</i> (10 μM)
0.1 μL sonda (10 μM)
2 μL H ₂ O Milli-Q
2.5 μL vector diluido

Los *primers* utilizados en la cuantificación de los genomas virales de los AAV hibridaban en la zona común del polyA (β -globina de conejo):

Forward: 5' CTTGAGCATCTGACTTCTGGCTAAT 3'

Reverse: 5' GGAGAGGAGGAAAAATCTGGCTAG 3'

Sonda: 5' CCGAGTGAGAGACACAAAAAATTCCAACAC 3'

El título viral asignado resultó de la media de tres cuantificaciones realizadas en días diferentes:

AAV8-FGF21: 7.8×10^{13} vg/mL

AAV8-Null: 1.4×10^{14} vg/mL

2.3.3. Cuantificación de las partículas virales por tinción de plata

El análisis de las preparaciones virales por electroforesis de proteínas SDS-PAGE y la posterior tinción con nitrato de plata permite la cuantificación de las cápsides virales, que en comparación con el valor de genomas virales obtenidos por RT-PCR, permite calcular el porcentaje de cápsides vacías en cada preparación (relación: partículas virales/genomas virales). Además, este método permite visualizar en el gel el grado de contaminación de proteínas no virales que podrían afectar la eficiencia de transducción *in vivo*.

Se mezclaron el volumen apropiado del vector de interés, del vector de referencia (el mismo que se usó como control en la cuantificación por RT-PCR) y de diferentes diluciones del vector K208 (de concentración conocida y usado como curva estándar) con el tampón 4X *Novex® Tris-Glycine LDS Sample Buffer* (Invitrogen) y 10X *NuPAGE Sample Reducing Agent* (Invitrogen) hasta un volumen final de 20 μ L. Tras 5 min de ebullición, las muestras se cargaron en un gel al 10% Bis-Tris Gel 1.5mm de 15 pocillos (Invitrogen) y se corrieron a 120 V durante 2 h. Se fijaron las proteínas del gel con una mezcla de H₂O Milli-Q, etanol y ácido acético. A continuación, el gel se sensibilizó con una mezcla de Na₂S₂O₃, acetato sódico, etanol y H₂O Milli-Q. Finalmente se tiñó el gel con nitrato de plata y las bandas se revelaron usando una mezcla de Na₂S₂O₃, formaldehído y H₂O Milli-Q.

El título de las partículas virales se obtuvo por densitometría. A partir de la intensidad de la VP3 de cada dilución del vector K208 se generó una curva estándar para cuantificar las partículas virales de las diferentes preparaciones.

2.4. Administración sistémica de los vectores virales

La cantidad necesaria de los vectores AAV8-FGF21 y AAV8-null se diluyeron hasta un volumen final de 200 μ L con solución salina con 0.001% de F68 Pluronic® (Gibco) y se administraron por vía intravenosa en la vena caudal lateral sin ejercer presión en el momento de la inyección. Antes de la administración, se expuso a los animales a luz infrarroja de 250 W (Philips) durante unos minutos para inducir vasodilatación y facilitar la visualización y acceso a la vena caudal. Para facilitar la inyección, se colocó a los animales en un *restrainer* de metacrilato (Harvard Apparatus) para inmovilizarlos.

2.5. Análisis de la expresión del mRNA por RT-PCR

2.5.1. Extracción de RNA

El RNA se obtuvo de los diferentes tejidos congelados a -80°C en nitrógeno líquido justo después de la extracción. Se homogenizaron los tejidos congelados usando un politrón (Polytron® MICCRA-KIT D-9, ART Prozess & Labortechnik GmbH & Co. KG, Mullheim, Alemania) en 1 mL de reactivo de aislamiento, Tripure (Roche) para el hígado y QIAzol (QIAGEN) para los depósitos adiposos. A continuación se siguió el protocolo comercial de purificación de RNA en columnas *Rneasy Mini Kit* (Cat.No.74104, QIAGEN, Invitrogen) para extraer el RNA total.

Todas las muestras fueron tratadas con DNAsal (RNase-Free DNase Set, proporcionado con el kit, QIAGEN) en las columnas de purificación. Después de limpiarse con los *buffers* suministrados por el fabricante, todas las muestras se eluyeron en 30 μ L de agua destilada libre de RNAsas (DEPC), menos las de hígado, que al contener gran cantidad de RNA se eluyeron en 70 μ L. Finalmente, se determinó la concentración y pureza del RNA midiendo la absorbancia a 260 nm con un Nanodrop (ND-1000, Thermo Fisher Scientific Inc.).

2.5.2. Síntesis de cDNA

Se sintetizó el cDNA a partir de 1 μ g de RNA retrotranscribiéndolo con el kit comercial *Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit* (Roche) siguiendo las instrucciones del fabricante. Como *primers* en la reacción se utilizaron *Oligo-dT* y hexámeros de oligonucleótidos en la presencia de un inhibidor de RNAsas.

2.5.3. Real Time PCR

La PCR cuantitativa o *Real-Time* PCR (RT-PCR) es un método muy útil para el análisis de la expresión del mRNA de diversos genes. Se realizó RT-PCR para cuantificar la expresión de los genes listados a continuación con sus respectivos *primers* (Tabla 6) en el LightCycler® 480 (Roche) utilizando LightCycler® 480 SYBR Green I Master (Roche).

Tabla 6. Listado de primers.

Gen	Primer Forward	Primer Reverse
coFGF21	CCTAACCAGGACGCCACAAG	GTTCCACCATGCTCAGAGGG
F4/80	CTTTGGCTATGGGCTTCCAGTC	GCAAGGAGGACAGAGTTTATC
CD68	GGGGCTCTTGGAACACTACAC	CAAGCCCTCTTTAAGCCCCA
IL-1 β	TGTAATGAAAGACGGCACACC	TCTTCTTTGGGTATTGCTTGG
TNF- α	CATCTTCTCAAAATTCGAGTGACAA	TGGGAGTAGACAAGGTACAACCC
Rplp0	TCCCACCTTGTCTCCAGTCT	ACTGGTCTAGGACCCGAGAAG

Cada reacción de RT-PCR (LightCycler® 480 SYBR Green I Master, Roche) contenía 10 μ L de volumen total (Tabla 7):

Tabla 6. Componentes de la reacción SYBR Green.

Reacción SYBR Green
5 μL 2X LightCycler480 SYBRGreen I Master
0.2 μL <i>primer forward</i> (10 μM)
0.2 μL <i>primer reverse</i> (10 μM)
2.6 μL H ₂ O Milli-Q
2 μL cDNA (dil. 1/10)

La reacción consistió en 5 min a 95°C para una desnaturalización inicial y posteriormente 45 ciclos de 4 etapas: desnaturalización (10 s a 95°C), *annealing* (10 s a 60°C), amplificación (10 s a 72°C) y 30 s a 60°C. Antes de enfriar la reacción a 4°C, se dejó 5 s a 95°C y 1 min a 65°C para determinar la temperatura de *melting*.

Para cuantificar la expresión relativa de los genes de interés se utilizó el método delta-delta-Ct ($2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$) descrito por Livak (Livak et al., 2001). En este método, ampliamente utilizado, se asume una duplicación óptima en cada ciclo de RT-PCR con una tasa de amplificación del 100%. Las Cts indican el número de ciclo al que la cantidad del cDNA del gen diana ha amplificado y tanto las muestras de ensayo como las de referencia, se ajustan a las Cts del gen normalizador, en este caso el gen Rplp0, para cada una de las muestras. El valor resultante sirve para determinar la diferencia de expresión respecto a un grupo control.

2.6. Extracción y análisis de proteínas

2.6.1. Extracción de proteínas

Se obtuvieron las proteínas totales mediante la homogenización de los fragmentos de iWAT e iBAT congelados en 1 mL de QIAzol Lysis Reagent (Qiagen) y se extrajo la fase proteica siguiendo las instrucciones del fabricante según el protocolo *Isolation of DNA and proteins from QIAzol Reagent-lysed samples* (RY16 May-04).

2.6.2. Determinación de la concentración de proteínas

A partir de la solución del extracto proteico se determinó la concentración mediante el método BCA (BCA Protein Assay Reagent, Thermo Scientific) siguiendo las instrucciones de la casa comercial. Este método se basa en la reducción del Cu^{2+} a Cu^+ por la proteína presente en un medio alcalino, detectada por un cambio colorimétrico altamente sensible. Brevemente, se mezclaron los componentes del reactivo BCA en una porción 1:50 y, por otro lado, se diluyeron las muestras (1:5) con H₂O Milli-Q. En una placa transparente de 96 pocillos se añadieron 10 μL de muestra

y 190 μL de reactivo de BCA a cada pocillo. Se incubó la placa 30 min a 37°C y se leyó la absorbancia a 565 nm. El cálculo de la concentración de proteína de las muestras se realizó a partir de la comparación con una recta patrón generada con BSA y albúmina (Albúmina 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) en sucesivas diluciones.

2.6.3. Análisis de la expresión de proteína mediante Western Blot

2.6.3.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida (SD-PAGE)

El análisis de la expresión proteica de UCP1 se realizó mediante electroforesis de los extractos proteicos de iBAT e iWAT en geles de poliacrilamida al 10% en presencia de SDS. El gel de poliacrilamida SDS-PAGE se formó a partir de la unión de dos geles. El primer gel es el de compactación o *stacking*, el cual contenía 3.9% de poliacrilamida y los pozos donde se depositaron las muestras. El segundo es un gel separador o *resolving* y contenía un 10% de poliacrilamida para permitir la separación de las proteínas en función del tamaño. La cantidad de proteína a cargar se mezcló en una proporción 1/5 de volumen con tampón de carga Laemli 5X (tampón fosfato 20 mM, glicerol 20%, SDS 4%, 2% 2- β -mercaptoetanol y azul de bromofenol como colorante). Una vez preparadas las muestras, las proteínas se desnaturalizaron a 90°C durante 2 min, se pusieron en hielo y se cargaron en el gel SDS-PAGE. La composición del tampón utilizado para la electroforesis fue: Tris base 5 mM, glicina 192 mM, SDS 0.1% (peso/volumen). La electroforesis se realizó a 50 V mientras las muestras cruzaban el gel de compactación y posteriormente a 80 V cuando pasaron al gel separador. Como referencia, se usó el marcador de peso molecular para proteínas *Spectra Multicolor Broad Range* (Thermo Scientific).

2.6.3.2. Transferencia de proteínas a membranas e inmunodetección

La electrotransferencia de las proteínas desde el gel a las membranas de PVDF (Hyperbond-P, Amersham Biosciences) se llevó a cabo en el aparato Transblot modelo 2051 de LKB/Pharmacia a 100 V durante 2 h a 4°C en un tampón de electrotransferencia (Tris 25 mM, glicina 150 mM y metanol 20%). Después de la transferencia, se bloquearon las membranas con TBS (Tris-HCL 25 mM, NaCl 137 mM) durante 1 h en agitación a temperatura ambiente. Posteriormente se incubaron las membranas con los anticuerpos primarios diluidos 1/1000 en la solución de bloqueo a 4°C durante toda la noche en agitación suave. A la mañana siguiente se lavaron las membranas con TBS-T 0.1% (Tris 25 mM, glicina 150 mM, metanol 20% y Tween20 0.1%) tres veces durante 5 min. Posteriormente se incubaron 1 h en agitación suave a temperatura ambiente con los correspondientes anticuerpos

secundarios conjugados con la peroxidasa y diluidos 1/20000 en la solución de bloqueo. Finalmente las membranas se lavaron de nuevo (3 lavados de 5 min) y se realizó la inmunodetección mediante el producto comercial *ECL+Western Blotting Analysis System* (Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, Alemania) siguiendo el protocolo del fabricante. La membrana tratada con ECL+ se expuso en un film fotográfico *High performance chemiluminescence film* (GE Healthcare Limited, 28906835) para visualizar la señal.

Los anticuerpos primarios y secundarios utilizados en este trabajo están detallados en el apartado 1.3 de Materiales y Métodos (Tabla 2). Las bandas obtenidas se cuantificaron por densitometría y analizadas con el programa ImageJ.

2.7. Análisis histológico

Inmediatamente después de sacrificar a los animales, una porción de eWAT, iWAT, iBAT e hígado se fijaron en formol al 10% durante 12-24 h para después incluirse en parafina y seccionarse en cortes de 2-3 μm de grosor. Los cortes se desparafinaron mediante 2 lavados con xilol durante 10 min, 2 lavados con etanol 100% 5 min y 2 lavados con etanol 96% 5 min.

2.7.1. Tinción con hematoxilina/eosina

Después de desparafinarse, las secciones se tiñeron con hematoxilina, se lavaron con agua destilada y se tiñeron de nuevo con eosina. Posteriormente se deshidrataron las muestras y se montaron sobre un portaobjetos para analizarse con un microscopio Nikon Eclipse E90i (Nikon, Tokyo, Japón) y captar imágenes mediante una videocámara (Nikon DS-Fi1) conectada al monitor.

2.7.2. Determinación del área media de los adipocitos

A partir de cortes histológicos de eWAT teñidos con hematoxilina/eosina se realizó un estudio morfométrico para cuantificar el área de los adipocitos y determinar su distribución por tamaño. Se tomaron imágenes de 6 campos de 2 cortes por animal a 200X. Mediante el analizador de imágenes AnalySIS 3.0 (Soft Imaging System, Center Valley, PA, EEUU) se determinó el área en μm^2 de cada adipocito entero presente en el campo. A partir de los datos obtenidos se calculó el área media de los adipocitos por grupo experimental y la distribución por tamaño en un histograma como porcentaje del número total de adipocitos contados por cada categoría de tamaño.

2.7.3. Inmunohistoquímica contra Mac-2

Para la detección inmunohistoquímica de Mac2, las secciones desparafinadas se incubaron a 4°C con el anticuerpo primario contra Mac2 (apartado 1.3 de Materiales y Métodos, Tabla 1) durante toda la noche. A continuación se lavaron 3 veces con PBS durante 5 min y se incubaron con el anticuerpo secundario biotinilado y se rebelaron con el producto comercial ABC Complex (Vector Laboratories Ltd., Reino Unido) que contiene diaminobenzidina (DAB) como sustrato cromógeno. Finalmente las secciones se tiñeron con hematoxilina de Mayer y se montaron para analizarse al microscopio.

2.7.4. Tinción Tricrómica de Masson

Para evaluar la fibrosis se realizó una tinción Tricrómica de Masson en la que primeramente se tiñó con hematoxilina férrica los cortes desparafinados, se lavaron con agua destilada y se tiñeron con una solución de escalata-fucsina ácida durante 5 minutos. A continuación se volvieron a lavar con agua destilada, se trataron con una solución de ácido fosfomolibdico-fosfotúngstico, se tiñeron con azul de anilina y, tras un último lavado con agua, se diferenciaron en una solución de ácido acético al 1% antes de deshidratarse y montarse sobre un portaobjetos.

2.8. Determinación del consumo de alimentos

La ingesta, tanto en dieta estándar como alta en lípidos, se determinó calculando la media de gramos consumidos al día por jaula, siendo del mismo grupo experimental todos los animales de cada jaula. La cantidad de comida ingerida se obtuvo mediante la diferencia de la cantidad añadida inicialmente y la remanente 7 días después. El resultado se expresó como las kcal ingeridas al día por animal.

2.9. Determinación de parámetros séricos

La sangre se obtuvo recogiéndola de la cola (v. caudal), o bien, a partir de la decapitación de los ratones al final de los experimentos. Cuando fue necesario obtener suero, la sangre se recogió en tubos no heparinizados y se dejó reposar durante 1 h a 4°C. Posteriormente se centrifugó a 12000 G durante 10 min a 4°C y seguidamente se congeló a -80°C hasta el momento de la determinación de los diferentes parámetros.

2.9.1. Glucosa

Los niveles de glucemia se determinaron a partir de una gota de sangre procedente de la cola de los ratones mediante el sistema Glucometer Elite™ (Bayer, Leverkusen, Alemania).

2.9.2. Insulina

La insulina circulante se determinó a partir de 5 µL de suero mediante el ensayo inmunoenzimático *Rat Insulin ELISA kit* (90010, Crystal Chem) siguiendo las instrucciones del fabricante. Dado que el nivel de detección máximo es de 10 ng/mL, se realizaron diluciones de la muestra cuando fue necesario.

2.9.3. Adiponectina

Los niveles séricos de adiponectina se midieron a partir de 5 µL de suero mediante el ensayo inmunoenzimático *Mouse Adiponectin ELISA* (805669, Crystal Chem) siguiendo las instrucciones de la casa comercial. Este método tiene un límite de detección máximo de 1 ng/mL y ya indica que es necesario realizar diluciones de la muestra.

2.9.4. FGF21

Los niveles de proteína FGF21 circulante se determinaron a partir de 50 µL de suero con el ensayo inmunoenzimático *Mouse/Rat FGF-21 ELISA kit* (MF2100, R&Dsystems) siguiendo las instrucciones del fabricante. El límite de detección máximo del ensayo es de 2 ng/ml y se realizaron las diluciones pertinentes para que las muestras de todas las dosis se encontrasen dentro del rango de detección.

2.9.5. Leptina

La leptina circulante se midió en 5 µL de suero mediante el ensayo inmunoenzimático *Mouse Leptin ELISA kit* (90030, Crystal Chem) tal como especificaban las instrucciones del fabricante. El límite máximo de detección de este método es de 12.8 ng/mL.

2.9.6. IGFBP1

Los niveles séricos de IGFBP1 se determinaron a partir de 100 µL de muestra usando el ensayo inmunoenzimático *IGFBP1 (Mouse) ELISA kit* (KA3054, Abnova) siguiendo las instrucciones del kit. El límite de detección máximo del ensayo es de 2 ng/mL.

2.9.7. IGF-1

El IGF-1 circulante se midió a partir de 50 μ L de una dilución 1:100 tal como indicaban las instrucciones del ensayo inmunoenzimático *m/r IGF-I-ELISA kit* (E25, Mediagnost). El rango de detección máximo el ensayo es de 18 ng/mL y ya incluye un pre-tratamiento para liberar IGF-1 de su unión a las proteínas IGFbps, principalmente la IGFbp3.

2.10. Determinación del contenido de triglicéridos hepáticos

Los triglicéridos se extrajeron del tejido hepático siguiendo el método de *Folch* utilizando una mezcla de cloroformo:metanol (2:1) (Folch et al., 1957). Para hacerlo, se pesaron fragmentos congelados de hígado de aproximadamente 100 mg que se homogenizaron en 15 mL de cloroformo:metanol (2:1). Las fases lipídicas y acuosas se separaron mediante la adición de 3 mL de H₂SO₄ al 0.05% y se mantuvieron toda la noche a 4°C. Una vez separadas las fases, se eliminó la fase superior mediante una pipeta Pasteur y se recuperó 1 mL de la fase inferior lipídica en un tubo de cristal de 5 mL. A continuación se les añadió 1 mL de una solución de cloroformo/Tritón100X al 1% y se incubaron a 90°C en un baño para evaporar el cloroformo, eliminando así los restos que pudiesen quedar de la fase acuosa. Para concentrar la muestra, se añadió cloroformo por las paredes del tubo de cristal y se volvieron a incubar las muestras a 90°C. Esta operación se repitió diversas veces hasta que toda la muestra quedó en el fondo del tubo. Una vez el sedimento estuvo completamente seco y concentrado, se resuspendió en 500 μ L de H₂O Milli-Q en un baño a 37°C y, posteriormente, se homogenizó totalmente con la ayuda de agitación y una pipeta. Una vez resuspendidos, se determinó la cantidad de triglicéridos por espectrofotometría usando un ensayo enzimático (Horiba-ABX) en un analizador Pentra 400 (Horiba-ABX).

2.11. Test de tolerancia a la insulina

El test de tolerancia a la insulina se usó para determinar si los ratones eran capaces de responder correctamente a una sobrecarga de insulina, cuantificando así su sensibilidad a dicha hormona. Inmediatamente después de retirar la comida a los animales se determinó la glucemia basal a partir de una gota de sangre de la vena de la cola mediante el sistema Glucometer Elite®. A continuación se inyectó una dosis intraperitoneal de 0.75 UI de insulina (Humulin Regular; Eli Lilly) por Kg de peso. A partir de este momento, se realizaron determinaciones de glucemia cada 15 minutos hasta 1.5 h después de la administración de insulina. Durante este proceso,

se privó a los animales de comida o agua. Los resultados se expresaron como el porcentaje de los niveles circulantes de glucosa en los diferentes puntos del experimento respecto a los niveles basales previos a la administración de la insulina.

2.12. Calorimetría indirecta

Para determinar el gasto energético se utilizó un circuito calorimétrico abierto (Oxylet, Panlab, Cornellà, España) para monitorizar el consumo de O₂ y la producción de CO₂ simultáneamente en ocho jaulas metabólicas. Los ratones se aclimataron a las cámaras metabólicas durante 24h y se tomaron datos durante 3 min a intervalos de 15 min en cada cámara. Los datos se midieron tanto en el ciclo diurno como el nocturno durante otras 24h y se ajustaron al peso corporal. Para calcular el gasto energético se usó el *software* Metabolism proporcionado por el fabricante.

2.13. Análisis óseo

La arquitectura y el volumen óseo se evaluaron mediante tomografía micro-computerizada (μ CT). Se fijaron las tibias izquierdas en formol al 4% y se escanearon usando el escáner eXplore Locus CT (General Electric) a una resolución de 27 μ m. Se analizó la estructura ósea en 1 mm³ de la epífisis proximal de la tibia y en 1.8 mm³ del hueso cortical de la diáfisis. Los parámetros óseos se calcularon con el programa *MicroView 3D Image Viewer & Analysis Tool*. La longitud de la tibia se determinó midiendo la distancia desde la eminencia intercondilar hasta el maléolo medial.

2.14. Test de Open-field

La actividad locomotora de los animales se analizó con el Test del Open-field realizado entre las 9:00 y las 13:00 h. Se situó a los animales en la esquina inferior izquierda de una cámara de 41x41x30 cm con iluminación intensa que era parte de una Unidad de Detección equipada con una red de células infrarrojas (LE8811, Panlab). Esta red determinó la magnitud de la actividad motora basándose en el análisis de la posición y la frecuencia a la que el animal interceptaba los haces de luz infrarroja. La Unidad de Detección estaba compuesta por dos marcos de 45x45 cm que emitían rayos infrarrojos cada 2.5 cm y estaba conectada a una Unidad Controladora que transformaba la interrupción de los haces infrarrojos en datos analíticos. A su vez, la Unidad Controladora estaba conectada a un ordenador.

El área dónde se situaba a los animales estaba dividida en tres cuadrados concéntricos: centro (14x14 cm), periferia (27x27 cm) y borde (41x41 cm). La actividad motora y exploradora de los animales se evaluó durante los primeros 6

minutos del test y la distancia total cubierta se determinó mediante un sistema de seguimiento por vídeo (SMART Junior, Panlab).

2.15. Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como la media \pm Error Estándar de la Media (EEM). La comparación de los resultados entre grupos experimentales se realizó mediante el test *t de Student* de datos no emparejados o a través de la tabla ANOVA de dos factores. Se consideró que las diferencias eran significativas cuando $p \leq 0.05$.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- Adams, A.C., Astapova, I., Fisher, F.M., Badman, M.K., Kurgansky, K.E., Flier, J.S., Hollenberg, A.N., and Maratos-Flier, E. (2010). Thyroid hormone regulates hepatic expression of fibroblast growth factor 21 in a PPARalpha-dependent manner. *J. Biol. Chem.* 285, 14078–14082.
- Adams, A.C., Cheng, C.C., Coskun, T., and Kharitonov, A. (2012b). FGF21 Requires β klotho to Act In Vivo. *PLoS One* 7, e49977.
- Adams, A.C., Coskun, T., Rovira, A.R.I., Schneider, M.A., Raches, D.W., Micanovic, R., Bina, H.A., Dunbar, J.D., and Kharitonov, A. (2012). Fundamentals of FGF19 and GF21 action in vitro and in vivo. *PLoS One* 7, e38438.
- Adams, A.C., Halstead, C.A., Hansen, B.C., Irizarry, A.R., Martin, J.A., Myers, S.R., Reynolds, V.L., Smith, H.W., Wroblewski, V.J., and Kharitonov, A. (2013b). LY2405319, an Engineered FGF21 Variant, Improves the Metabolic Status of Diabetic Monkeys. *PLoS One* 8, e65763.
- Adams, A.C., Yang, C., Coskun, T., Cheng, C.C., Gimeno, R.E., Luo, Y., and Kharitonov, A. (2013a). The breadth of FGF21's metabolic actions are governed by FGFR1 in adipose tissue. *Mol. Metab.* 2, 31–37.
- Ahn, S.M., Pomp, A., and Rubino, F. (2010). Metabolic surgery for type 2 diabetes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1212.
- Almind, K., and Kahn, C.R. (2004). Genetic determinants of energy expenditure and insulin resistance in diet-induced obesity in mice. *Diabetes* 53, 3274–3285.
- American Diabetes Association (2016). Classification and diagnosis of diabetes. *Diabetes Care* 39 (suplem, 13–22).
- American Diabetes Association. (2017). Obesity Management for the Treatment of Type 2 Diabetes. *Diabetes Care* 40, S57-S63.
- Arner, P., Pettersson, A., Mitchell, P.J., Dunbar, J.D., Kharitonov, A., and Ryde, M. (2008). FGF21 attenuates lipolysis in human adipocytes – A possible link to improved insulin sensitivity. *Diabetes* 57, 1725–1730.
- Ashcroft, F.M., and Rorsman, P. (2012). Diabetes mellitus and the beta cell: The last ten years. *Cell* 148, 1160–1171.
- Astrup, A., Carraro, R., Finer, N., Harper, A., Kunesova, M., Lean, M., Niskanen, L., and Rasmussen, M. (2011). Safety, tolerability and sustained weight loss over 2 years with the once-daily human GLP-1 analog, liraglutide. *Int. J. Obes.* 36, 843–854.
- Ayuso, E., Mingozi, F., and Bosch, F. (2010a). Production, purification and characterization of adeno-associated vectors. *Curr. Gene Ther.* 10, 423–436.
- Ayuso, E., Mingozi, F., Montane, J., Leon, X., Anguela, X.M., Haurigot, V., Edmonson, S.A., Africa, L., Zhou, S., High, K.A., et al. (2010b). High AAV vector purity results in serotype- and tissue-independent enhancement of transduction efficiency. *Gene Therapy*. 17, 503–510.
- Badman, M.K., Pissios, P., Kennedy, A.R., Koukos, G., and Flier, J.S. (2007). Hepatic Fibroblast Growth Factor 21 Is Regulated by PPARalpha and Is a Key Mediator of Hepatic Lipid Metabolism in Ketotic States.

- Balakrishnan, B., and Jayandharan, G.R. (2014). Basic Biology of Adeno-Associated Virus (AAV) Vectors Used in Gene Therapy. *Curr. Gene Ther.* 14, 86–100.
- Beenken, A., and Mohammadi, M. (2009). The FGF family: biology, pathophysiology and therapy. *Nat. Rev. Drug Discov.* 8, 235–253.
- Bendele, A., Seely, J., Richey, C., Sennello, G., and Shopp, G. (1998). Short Communication: Renal Tubular Vacuolation in Animals Treated with Polyethylene-Glycol-Conjugated Proteins. *Toxicol. Sci.* 42, 152–157.
- Berglund, E.D., Li, C.Y., Bina, H. a, Lynes, S.E., Michael, M.D., Shanafelt, A.B., Kharitonov, A., and Wasserman, D.H. (2009). Fibroblast growth factor 21 controls glycemia via regulation of hepatic glucose flux and insulin sensitivity. *Endocrinology* 150, 4084–4093.
- Bertot, L.C., and Adams, L.A. (2016). The natural course of non-alcoholic fatty liver disease. *Int. J. Mol. Sci.* 17.
- Billings, L.K., and Florez, J.C. (2010). The genetics of type 2 diabetes: What have we learned from GWAS? *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1212, 59–77.
- Birkenfeld, A.L., and Shulman, G.I. (2014). Nonalcoholic fatty liver disease, hepatic insulin resistance, and type 2 Diabetes. *Hepatology* 59, 713–723.
- Black, H. (2003). The burden of cardiovascular disease: following the link from hypertension to myocardial infarction and heart failure. *Am. J. Hypertens.* 16, 4–6.
- BonDurant, L.D., Ameka, M., Naber, M.C., Markan, K.R., Idiga, S.O., Acevedo, M.R., Walsh, S.A., Ornitz, D.M., and Potthoff, M.J. (2017). FGF21 Regulates Metabolism Through Adipose-Dependent and -Independent Mechanisms. *Cell Metab.* 25, 935–944.e4.
- Brunton, S.A. (2015). The potential role of sodium glucose co-transporter 2 inhibitors in the early treatment of type 2 diabetes mellitus. *Int. J. Clin. Pract.* 69, 1071–1087.
- Butler, A.E., Janson, J., Bonner-Weir, S., Ritzel, R., Rizza, R.A., and Butler, P.C. (2003). Beta-cell deficit and increased beta-Cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. *Diabetes* 52, 102–110.
- Camporez, J.P.G., Jornayvaz, F.R., Petersen, M.C., Pesta, D., Guigni, B.A., Serr, J., Zhang, D., Kahn, M., Samuel, V.T., Jurczak, M.J., et al. (2013). Cellular Mechanisms by Which FGF21 Improves Insulin Sensitivity in Male Mice. *Endocrinology* 154, 3099–3109.
- Castracane, V.D., and Henson, M.C. (2007). The Obese (ob/ob) Mouse and the Discovery of Leptin. In *Leptin*, V.D. Castracane, and M.C. Henson, eds. (Boston, MA: Springer US), pp. 1–9.
- Cerf, M.E. (2015). High fat programming of beta cell compensation, exhaustion, death and dysfunction. *Pediatr. Diabetes* 16, 71–78.
- Charoenphandhu, N., Suntornsaratoon, P., Krishnamra, N., Sa-nguanmoo, P., Tanajak, P., Wang, X., Liang, G., Li, X., Jiang, C., Chattipakorn, N., et al. (2017). Fibroblast growth factor-21 restores insulin sensitivity but induces aberrant bone microstructure in obese insulin-resistant rats. *J. Bone Miner. Metab.* 35, 142–149.
- Cheng, D. (2005). Prevalence, predisposition and prevention of type II diabetes. *Nutr. & Metab.* 2, 29.

- Choe, S.S., Huh, J.Y., Hwang, I.J., Kim, J.I., and Kim, J.B. (2016). Adipose tissue remodeling: Its role in energy metabolism and metabolic disorders. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. 7.
- Coskun, T., Bina, H. a, Schneider, M. a, Dunbar, J.D., Hu, C.C., Chen, Y., Moller, D.E., and Kharitonov, A. (2008). Fibroblast growth factor 21 corrects obesity in mice. *Endocrinology* 149, 6018–6027.
- Cyphert, H.A., Ge, X., Kohan, A.B., Salati, L.M., Zhang, Y., and Hillgartner, F.B. (2012). Activation of the farnesoid X receptor induces hepatic expression and secretion of fibroblast growth factor 21. *J. Biol. Chem.* 287, 25123–25138.
- Davidoff, A.M., Gray, J.T., Ng, C.Y.C., Zhang, Y., Zhou, J., Spence, Y., Bakar, Y., and Nathwani, A.C. (2005). Comparison of the ability of adeno-associated viral vectors pseudotyped with serotype 2, 5, and 8 capsid proteins to mediate efficient transduction of the liver in murine and nonhuman primate models. *Mol. Ther.* 11, 875–888.
- DeFronzo, R. (2004). Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Med. Clin. North Am.* 36, 197–209.
- Deyle, D.R., and Russell, D.W. (2009). Adeno-associated virus vector integration. *Curr. Opin. Mol. Ther.* 11, 442–447.
- Dimas, A.S., Lagou, V., Barker, A., Knowles, J.W., Mägi, R., Hivert, M.F., Benazzo, A., Rybin, D., Jackson, A.U., Stringham, H.M., et al. (2014). Impact of type 2 diabetes susceptibility variants on quantitative glycemic traits reveals mechanistic heterogeneity. *Diabetes* 63, 2158–2171.
- Ding, X., Boney-Montoya, J., Owen, B.M., Bookout, A.L., Coate, K.C., Mangelsdorf, D.J., and Kliewer, S.A. (2012). β Klotho Is Required for Fibroblast Growth Factor 21 Effects on Growth and Metabolism. *Cell Metab.* 16, 387–393.
- Disbrow, G.L., Sunitha, I., Baker, C.C., Hanover, J., and Schlegel, R. (2003). Codon optimization of the HPV-16 E5 gene enhances protein expression. *Virology* 311, 105–114.
- Donath, M.Y., and Halban, P.A. (2004). Decreased beta-cell mass in diabetes: significance, mechanisms and therapeutic implications. *Diabetologia* 47, 581–589.
- Donath, M.Y., Böni-Schnetzler, M., Ellingsgaard, H., Halban, P.A., and Ehses, J.A. (2010). Cytokine production by islets in health and diabetes: cellular origin, regulation and function. *Trends Endocrinol. Metab.* 21, 261–267.
- Dooko, C.B.A., Wit, S. De, Neuhaus, J., Palfreeman, A., Pepe, R., Pankow, J.S., Neaton, J.D., and Smart, I. (2015). Interleukin-6, High Sensitivity C-Reactive Protein, and the Development of Type 2 Diabetes among HIV Positive Patients taking Antiretroviral Therapy. *J Acquir Immune Defic Syndr* 67, 538–546.
- Douris, N., Stevanovic, D.M., Fisher, ffolliott M., Cisu, T.I., Chee, M.J., Nguyen, N.L., Zarebidaki, E., Adams, A.C., Kharitonov, A., Flier, J.S., et al. (2015). Central Fibroblast Growth Factor 21 Browns White Fat via Sympathetic Action in Male Mice. *Endocrinology* 156, 2470–2481.
- Drucker, D.J., and Nauck, M.A. (2006). The incretin system: glucagon-like peptide-1 receptor agonists and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in type 2 diabetes. *Lancet* 368, 1696–1705.

- Dupuis, J., Langenberg, C., Prokopenko, I., Saxena, R., Soranzo, N., Jackson, A.U., Wheeler, E., Glazer, N.L., Bouatia-Naji, N., Gloyn, A.L., et al. (2010). New genetic loci implicated in fasting glucose homeostasis and their impact on type 2 diabetes risk. *Nat. Genet.* 42, 105–116.
- Dutchak, P.A., Katafuchi, T., Bookout, A.L., Choi, J.H., Yu, R.T., Mangelsdorf, D.J., and Kliewer, S.A. (2012). Fibroblast Growth Factor-21 Regulates PPAR γ Activity and the Antidiabetic Actions of Thiazolidinediones. *Cell* 148, 556–567.
- Dyson, P.A. (2010). The therapeutics of lifestyle management on obesity. *Diabetes. Obes. Metab.* 12, 941–946.
- Emanuelli, B., Vienberg, S.G., Smyth, G., Cheng, C., Stanford, K.I., Arumugam, M., Michael, M.D., Adams, A.C., Kharitonov, A., and Kahn, C.R. (2014). Interplay between FGF21 and insulin action in the liver regulates metabolism. *J. Clin. Invest.* 124, 515–527.
- Ferrari, F.K., Samulski, T., Shenk, T., and Samulski, R.J. (1996). Second-strand synthesis is a rate-limiting step for efficient transduction by recombinant adeno-associated virus vectors. *J. Virol.* 70, 3227–3234.
- Fisher, f. M., Kleiner, S., Douris, N., Fox, E.C., Mepani, R.J., Verdeguer, F., Wu, J., Kharitonov, A., Flier, J.S., Maratos-Flier, E., et al. (2012). FGF21 regulates PGC-1 and browning of white adipose tissues in adaptive thermogenesis. *Genes Dev.* 26, 271–281.
- Fisher, F.M., and Maratos-Flier, E. (2016). Understanding the Physiology of FGF21. *Annu. Rev. Physiol.* 78, 223–241.
- Flegal, K.M., Carroll, M.D., Ogden, C.L., and Curtin, L.R. (2010). Prevalence and trends in obesity among US adults, 1999-2008. *JAMA* 303, 235–241.
- Foltz, I.N., Hu, S., King, C., Wu, X., Yang, C., Wang, W., Weiszmann, J., Stevens, J., Chen, J.S., Nuanmanee, N., et al. (2012). Treating Diabetes and Obesity with an FGF21-Mimetic Antibody Activating the Klotho/FGFR1c Receptor Complex. *Sci. Transl. Med.* 4, 162ra153–162ra153.
- Fon Tacer, K., Bookout, A.L., Ding, X., Kurosu, H., John, G.B., Wang, L., Goetz, R., Mohammadi, M., Kuro-o, M., Mangelsdorf, D.J., et al. (2010). Research Resource: Comprehensive Expression Atlas of the Fibroblast Growth Factor System in Adult Mouse. *Mol. Endocrinol.* 24, 2050–2064.
- Frühbeck, G., Becerril, S., Sáinz, N., Garrastachu, P., and García-Veloso, M.J. (2009). BAT: a new target for human obesity? *Trends Pharmacol. Sci.* 30, 387–396.
- Fu, L., John, L.M., Adams, S.H., Yu, X.X., Tomlinson, E., Renz, M., Williams, P.M., Soriano, R., Corpuz, R., Moffat, B., et al. (2004). Fibroblast growth factor 19 increases metabolic rate and reverses dietary and leptin-deficient diabetes. *Endocrinology* 145, 2594–2603.
- Gaich, G., Chien, J.Y., Fu, H., Glass, L.C., Deeg, M.A., Holland, W.L., Kharitonov, A., Bumol, T., Schilske, H.K., and Moller, D.E. (2013). The Effects of LY2405319, an FGF21 Analog, in Obese Human Subjects with Type 2 Diabetes. *Cell Metab.* 18, 333–340.

- Gaich, G., Chien, J.Y., Fu, H., Glass, L.C., Deeg, M.A., Holland, W.L., Kharitonov, A., Bumol, T., Schilske, H.K., and Moller, D.E. (2013). The Effects of LY2405319, an FGF21 Analog, in Obese Human Subjects with Type 2 Diabetes. *Cell Metab.* 18, 333–340.
- Gao, G.-P., Alvira, M.R., Wang, L., Calcedo, R., Johnston, J., and Wilson, J.M. (2002). Novel adeno-associated viruses from rhesus monkeys as vectors for human gene therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 11854–11859.
- Gavaldà-Navarro, A., Hondares, E., Giralt, M., Mampel, T., Iglesias, R., and Villarroya, F. (2015). Fibroblast growth factor 21 in breast milk controls neonatal intestine function. *Sci. Rep.* 5, 13717.
- Gesta, S., Tseng, Y.H., and Kahn, C.R. (2007). Developmental Origin of Fat: Tracking Obesity to Its Source. *Cell* 131, 242–256.
- Goetz, R., Beenken, A., Ibrahimi, O.A., Kalinina, J., Olsen, S.K., Eliseenkova, A. V, Xu, C., Neubert, T.A., Zhang, F., Linhardt, R.J., et al. (2007). Molecular Insights into the Klotho-Dependent, Endocrine Mode of Action of Fibroblast Growth Factor 19 Subfamily Members. *Mol. Cell. Biol.* 27, 3417–3428.
- Greenway, F.L., Fujioka, K., Plodkowski, R. a, Mudaliar, S., Guttadauria, M., Erickson, J., Kim, D.D., and Dunayevich, E. (2010). Effect of naltrexone plus bupropion on weight loss in overweight and obese adults (COR-1): a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet* 376, 595–605.
- Gregg, E.W., Sattar, N., and Ali, M.K. (2016). The changing face of diabetes complications. *Lancet. Diabetes Endocrinol.* 4, 537–547.
- Guilherme, A., Virbasius, J. V, Puri, V., and Czech, M.P. (2008). Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 367–377.
- Guo, L., Costanzo-Garvey, D.L., Smith, D.R., Zavorka, M.E., Venable-Kang, M., MacDonald, R.G., Lewis, R.E., Barker, D.J., Eriksson, J.G., Forsen, T.J., et al. (2016). Cell non-autonomous regulation of hepatic IGF-1 and neonatal growth by Kinase Suppressor of Ras 2 (KSR2). *Sci. Rep.* 6, 1–11.
- Hajer, G. (2008). Adipose tissue dysfunction in obesity, diabetes, and vascular diseases. *Eur. Hear.* 29, 2959–2971.
- Halban, P.A. (2008). Cell therapy for type 2 diabetes : is it desirable and can we get it? *10*, 205–211.
- Hale, C., Chen, M.M., Stanislaus, S., Chinookoswong, N., Hager, T., Wang, M., Véniant, M.M., and Xu, J. (2012). Lack of Overt FGF21 Resistance in Two Mouse Models of Obesity and Insulin Resistance. *Endocrinology* 153, 69–80.
- Haslam, D.W., and James, W.P.T. (2005). Obesity. *Lancet* 366, 1197–1209.
- Hecht, R., Li, Y.-S., Sun, J., Belouski, E., Hall, M., Hager, T., Yie, J., Wang, W., Winters, D., Smith, S., et al. (2012). Rationale-Based Engineering of a Potent Long-Acting FGF21 Analog for the Treatment of Type 2 Diabetes. *PLoS One* 7, e49345.
- Hecht, R., Li, Y.-S., Sun, J., Belouski, E., Hall, M., Hager, T., Yie, J., Wang, W., Winters, D., Smith, S., et al. (2012). Rationale-Based Engineering of a Potent Long-Acting FGF21 Analog for the Treatment of Type 2 Diabetes. *PLoS One* 7, e49345.

- Hill-Baskin, A.E., Markiewski, M.M., Buchner, D.A., Shao, H., DeSantis, D., Hsiao, G., Subramaniam, S., Berger, N.A., Croniger, C., Lambris, J.D., et al. (2009). Diet-induced hepatocellular carcinoma in genetically predisposed mice. *Hum. Mol. Genet.* 18, 2975–2988.
- Hirata, R.K., and Russell, D.W. (2000). Design and packaging of adeno-associated virus gene targeting vectors. *J. Virol.* 74, 4612–4620.
- Hondares, E., Iglesias, R., Giralt, A., Gonzalez, F.J., Giralt, M., Mampel, T., and Villarroya, F. (2011). Thermogenic activation induces FGF21 expression and release in brown adipose tissue. *J. Biol. Chem.* 286, 12983–12990.
- Hondares, E., Rosell, M., Gonzalez, F.J., Giralt, M., Iglesias, R., and Villarroya, F. (2010). Hepatic FGF21 Expression Is Induced at Birth via PPARAlpha in Response to Milk Intake and Contributes to Thermogenic Activation of Neonatal Brown Fat. *Cell Metab.* 11, 206–212.
- Hu, F.B., Manson, J.E., Stampfer, M.J., Colditz, G., Liu, S., Solomon, C.G., and Willett, W.C. (2001). Diet, lifestyle, and the risk of type 2 diabetes mellitus in women. *N. Engl. J. Med.* 345, 790–797.
- Huang, X., Yu, C., Jin, C., Yang, C., Xie, R., Cao, D., Wang, F., and McKeehan, W.L. (2006). Forced expression of hepatocyte-specific fibroblast growth factor 21 delays initiation of chemically induced hepatocarcinogenesis. *Mol. Carcinog.* 45, 934–942.
- Hunt, M.C., Nilsson, L., Sanyal, S., Angelin, B., Alexson, S.E.H., and Rudling, M. (2007). PPARAlpha is a key regulator of hepatic FGF21. 360, 437–440.
- Imamura, M., and Maeda, S. (2011). Genetics of type 2 diabetes : the GWAS era and future perspectives. 58, 723–739.
- Inagaki, T., Dutchak, P., Zhao, G., Ding, X., Gautron, L., Parameswara, V., Li, Y., Goetz, R., Mohammadi, M., Esser, V., et al. (2007). Endocrine Regulation of the Fasting Response by PPARAlpha-Mediated Induction of Fibroblast Growth Factor 21. *Cell Metab.* 5, 415–425.
- Inagaki, T., Dutchak, P., Zhao, G., Ding, X., Gautron, L., Parameswara, V., Li, Y., Goetz, R., Mohammadi, M., Esser, V., et al. (2007). Endocrine Regulation of the Fasting Response by PPARAlpha-Mediated Induction of Fibroblast Growth Factor 21. *Cell Metab.* 5, 415–425.
- Inagaki, T., Lin, V.Y., Goetz, R., Mohammadi, M., Mangelsdorf, D.J., and Kliewer, S.A. (2008). Inhibition of growth hormone signaling by the fasting-induced hormone FGF21. *Cell Metab.* 8, 77–83.
- International Diabetes Federation (IDF) (2015). *IDF Diabetes Atlas 7th edition.*
- Inzucchi, S.E., Bergenstal, R.M., Buse, J.B., Diamant, M., Ferrannini, E., Nauck, M., Peters, A.L., Tsapas, A., Wender, R., and Matthews, D.R. (2012). Management of Hyperglycemia in Type 2 Diabetes: A Patient-Centered Approach. *Diabetes Care* 35, 1364 LP- 1379.
- Ito, S., Kinoshita, S., Shiraishi, N., Nakagawa, S., Sekine, S., Fujimori, T., and Nabeshima, Y.I. (2000). Molecular cloning and expression analyses of mouse betaklotho, which encodes a novel Klotho family protein. *Mech. Dev.* 98, 115–119.

- James, W.P.T. (2008). The epidemiology of obesity: The size of the problem. *J. Intern. Med.* 263, 336–352.
- Janský, L. (1995). Humoral thermogenesis and its role in maintaining energy balance. *Physiol. Rev.* 75.
- Jansson, P.A., Larsson, A., Smith, U., and Lönnroth, P. (1994). Lactate release from the subcutaneous tissue in lean and obese men. *J. Clin. Invest.* 93, 240–246.
- Kahn, S.E., Hull, R.L., and Utzschneider, K.M. (2006). Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature* 444, 840–846.
- Karaderi, T., Drong, A.W., and Lindgren, C.M. (2015). Insights into the Genetic Susceptibility to Type 2 Diabetes from Genome-Wide Association Studies of Obesity-Related Traits. *Curr. Diab. Rep.* 15, 83.
- Kasim, N.B., Huri, H.Z., Vethakkan, S.R., Ibrahim, L., and Abdullah, B.M. (2016). Genetic polymorphisms associated with overweight and obesity in uncontrolled Type 2 diabetes mellitus. *Biomark. Med.* 10, 403–415.
- Kattenhorn, L.M., Tipper, C.H., Stoica, L., Geraghty, D.S., Wright, T.L., Clark, K.R., and Wadsworth, S.C. (2016). Adeno-Associated Virus Gene Therapy for Liver Disease. *Hum. Gene Ther.* 27, 947–961.
- Keipert, S., Ost, M., Johann, K., Imber, F., Jastroch, M., van Schothorst, E.M., Keijzer, J., and Klaus, S. (2014). Skeletal muscle mitochondrial uncoupling drives endocrine cross-talk through the induction of FGF21 as a myokine. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 306, E469–82.
- Kharitonkov, A., and DiMarchi, R. (2015). FGF21 Revolutions: Recent Advances Illuminating FGF21 Biology and Medicinal Properties. *Trends Endocrinol. Metab.* 26, 608–617.
- Kharitonkov, A., and DiMarchi, R. (2017a). Fibroblast growth factor 21 night watch: advances and uncertainties in the field. *J. Intern. Med.* 281, 233–246.
- Kharitonkov, A., Shiyanova, T.L., Koester, A., Ford, A.M., Micanovic, R., Galbreath, E.J., Sandusky, G.E., Hammond, L.J., Moyers, J.S., Owens, R.A., et al. (2005a). FGF-21 as a novel metabolic regulator. *J. Clin. Invest.* 115, 1627–1635.
- Kharitonkov, A., Wroblewski, V.J., Koester, A., Chen, Y.-F., Clutinger, C.K., Tigno, X.T., Hansen, B.C., Shanafelt, A.B., and Etgen, G.J. (2007). The Metabolic State of Diabetic Monkeys Is Regulated by Fibroblast Growth Factor-21. *Endocrinology* 148, 774–781.
- Kilborn, S.H., Trudel, G., and Uthoff, H. (2002). Review of growth plate closure compared with age at sexual maturity and lifespan in laboratory animals. *Contemp. Top. Lab. Anim. Sci.* 41, 21–26.
- Kim, A.M., Somayaji, V.R., Dong, J.Q., Rolph, T.P., Weng, Y., Chabot, J.R., Gropp, K.E., Talukdar, S., and Calle, R.A. (2017). Once-weekly administration of a long-acting fibroblast growth factor 21 analogue modulates lipids, bone turnover markers, blood pressure and body weight differently in obese people with hypertriglyceridaemia and in non-human primates. *Diabetes, Obes. Metab.*

- Kim, H.W., Lee, J.E., Cha, J.J., Hyun, Y.Y., Kim, J.E., Lee, M.H., Song, H.K., Nam, D.H., Han, J.Y., Han, S.Y., et al. (2013). Fibroblast growth factor 21 improves insulin resistance and ameliorates renal injury in db/db mice. *Endocrinology* 154, 3366–3376.
- Kim, J.Y., Van De Wall, E., Laplante, M., Azzara, A., Trujillo, M.E., Hofmann, S.M., Schraw, T., Durand, J.L., Li, H., Li, G., et al. (2007). Obesity-associated improvements in metabolic profile through expansion of adipose tissue. *J. Clin. Invest.* 117, 2621–2637.
- Kitade, H., Chen, G., Ni, Y., and Ota, T. (2017). Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Insulin Resistance: New Insights and Potential New Treatments. *Nutrients* 9, 387.
- Kliwer, S.A., and Mangelsdorf, D.J. (2010). Fibroblast growth factor 21: from pharmacology to physiology 1 – 4. *Am J Clin Nutr* 91, 254S–257S.
- Kolb, H., and Martin, S. (2017). Environmental/lifestyle factors in the pathogenesis and prevention of type 2 diabetes. *BMC Med.* 15, 131.
- Kotterman, M.A., and Schaffer, D. V (2014). Engineering adeno-associated viruses for clinical gene therapy. *Nat. Rev. Genet.* 15, 445–451.
- Kusminski, C.M., Bickel, P.E., and Scherer, P.E. (2016). Targeting adipose tissue in the treatment of obesity-associated diabetes. *Nat. Publ. Gr.* 15, 639–660.
- Laeger, T., Baumeier, C., Wilhelmi, I., Würfel, J., Kamitz, A., and Schürmann, A. (2017). FGF21 improves glucose homeostasis in an obese diabetes-prone mouse model independent of body fat changes. *Diabetologia*.
- Leahy, J.L. Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Arch. Med. Res.* 36, 197–209.
- Lee, M.S., Choi, S.E., Ha, E.S., An, S.Y., Kim, T.H., Han, S.J., Kim, H.J., Kim, D.J., Kang, Y., and Lee, K.W. (2012). Fibroblast growth factor-21 protects human skeletal muscle myotubes from palmitate-induced insulin resistance by inhibiting stress kinase and NF- κ B. *Metabolism.* 61, 1142–1151.
- Li, H., Gao, Z., Zhang, J., Ye, X., Xu, A., Ye, J., and Jia, W. (2012). Sodium butyrate stimulates expression of fibroblast growth factor 21 in liver by inhibition of histone deacetylase 3. *Diabetes* 61, 797–806.
- Li, X., Stanislaus, S., Asuncion, F., Niu, Q.-T., Chinookoswong, N., Villasenor, K., Wang, J., Wong, P., Boyce, R., Dwyer, D., et al. (2017). FGF21 Is Not a Major Mediator for Bone Homeostasis or Metabolic Actions of PPAR α and PPAR γ Agonists. *J. Bone Miner. Res.* 32, 834–845.
- Li, Y., Wong, K., Walsh, K., Gao, B., and Zang, M. (2013). Retinoic acid receptor β stimulates hepatic induction of fibroblast growth factor 21 to promote fatty acid oxidation and control whole-body energy homeostasis in mice. *J. Biol. Chem.* 288, 10490–10504.
- Lindström, P. (2007). The Physiology of Obese-Hyperglycemic Mice [ob/ob mice]. *Sci. World J.* 7, 666–685.
- Lipkin, E. (1999). New strategies for the treatment of type 2 diabetes. *J. Am. Diet. Assoc.* 99, 329–334.
- Lisowski, L., Tay, S.S., and Alexander, I.E. (2015). Adeno-associated virus serotypes for gene therapeutics. *Curr. Opin. Pharmacol.* 24, 59–67.

- Liu, S.Q., Roberts, D., Kharitonov, A., Zhang, B., Hanson, S.M., Li, Y.C., Zhang, L.-Q., and Wu, Y.H. (2013). Endocrine Protection of Ischemic Myocardium by FGF21 from the Liver and Adipose Tissue. *Sci. Rep.* 3, 2767.
- Loher, H., Kreis, R., Boesch, C., and Christ, E. (2016). The flexibility of ectopic lipids. *Int. J. Mol. Sci.* 17.
- Lundåsen, T., Hunt, M.C., Nilsson, L.-M., Sanyal, S., Angelin, B., Alexson, S.E.H., and Rudling, M. (2007). PPAR α is a key regulator of hepatic FGF21. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 360, 437–440.
- Luo, Y., and McKeehan, W.L. (2013). Stressed liver and muscle call on adipocytes with FGF21. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. 4, 1–6.
- MacDONALD, R.A. (1961). “Lifespan” of Liver Cells. *Arch. Intern. Med.* 107, 335.
- Manno, C.S., Pierce, G.F., Arruda, V.R., Glader, B., Ragni, M., Rasko, J.J., Rasko, J., Ozelo, M.C., Hoots, K., Blatt, P., et al. (2006). Successful transduction of liver in hemophilia by AAV-Factor IX and limitations imposed by the host immune response. *Nat. Med.* 12, 342–347.
- Markan, K.R., and Potthoff, M.J. (2016). Metabolic fibroblast growth factors (FGFs): Mediators of energy homeostasis. *Semin. Cell Dev. Biol.* 53, 85–93.
- Markan, K.R., Naber, M.C., Ameka, M.K., Anderegg, M.D., Mangelsdorf, D.J., Kliewer, S.A., Mohammadi, M., and Potthoff, M.J. (2014). Circulating FGF21 is liver derived and enhances glucose uptake during refeeding and overfeeding. *Diabetes* 63, 4057–4063.
- Martino, A.T., Herzog, R.W., Anegon, I., and Adjali, O. (2011). Measuring immune responses to recombinant AAV gene transfer. *Methods Mol. Biol.* 807, 259–272.
- Mashili, F.L., Austin, R.L., Deshmukh, A.S., Fritz, T., Caidahl, K., Bergdahl, K., Zierath, J.R., Chibalin, A. V, Moller, D.E., Kharitonov, A., et al. (2011). Direct effects of FGF21 on glucose uptake in human skeletal muscle: implications for type 2 diabetes and obesity. *Diabetes. Metab. Res. Rev.* 27, 286–297.
- McCarty, D.M., Monahan, P.E., and Samulski, R.J. (2001). Self-complementary recombinant adeno-associated virus (scAAV) vectors promote efficient transduction independently of DNA synthesis. *Gene Ther* 8, 1248–1254.
- McCarty, D.M., Young, S.M., and Samulski, R.J. (2004). Integration of adeno-associated virus (AAV) and recombinant AAV vectors. *Annu. Rev. Genet.* 38, 819–845.
- McGarry, J.D. (2002). Banting lecture 2001: dysregulation of fatty acid metabolism in the etiology of type 2 diabetes. *Diabetes* 51, 7–18.
- Miao, C.H., Ohashi, K., Patijn, G.A., Meuse, L., Ye, X., Thompson, A.R., and Kay, M.A. (2000). Inclusion of the Hepatic Locus Control Region, an Intron, and Untranslated Region Increases and Stabilizes Hepatic Factor IX Gene Expression in Vivo but Not in Vitro. *Mol. Ther.* 1, 522–532.
- Mingozzi, F., and High, K.A. (2011). Therapeutic in vivo gene transfer for genetic disease using AAV: progress and challenges. *Nat. Rev. Genet.* 12, 341–355.
- Mingozzi, F., and High, K.A. (2013). Immune responses to AAV vectors: Overcoming barriers to successful gene therapy. *Blood* 122, 23–36.

- Mohammadi, M., Olsen, S.K., and Ibrahimi, O.A. (2005). Structural basis for fibroblast growth factor receptor activation. *Cytokine Growth Factor Rev.* 16, 107–137.
- Morigny, P., Houssier, M., Mouisel, E., and Langin, D. (2016). Adipocyte lipolysis and insulin resistance. *Biochimie* 125, 259–266.
- Morris, A., Voight, B., and Teslovich, T. (2012). Large-scale association analysis provides insights into the genetic architecture and pathophysiology of type 2 diabetes. *Nat. Genet.* 44, 981–990.
- Mount, J.D., Herzog, R.W., Tillson, D.M., Goodman, S.A., Robinson, N., McClelland, M.L., Bellinger, D., Nichols, T.C., Arruda, V.R., Lothrop, C.D., et al. (2002). Sustained phenotypic correction of hemophilia B dogs with a factor IX null mutation by liver-directed gene therapy. *Blood* 99, 2670–2676.
- Mulvihill, E.E., and Drucker, D.J. (2014). Pharmacology, physiology, and mechanisms of action of dipeptidyl peptidase-4 inhibitors. *Endocr. Rev.* 35, 992–1019.
- Nakagawa, H. (2015). Recent advances in mouse models of obesity- and nonalcoholic steatohepatitis-associated hepatocarcinogenesis. *World J. Hepatol.* 7, 2110.
- Naldini, L. (2015). Gene therapy returns to centre stage. *Nature* 526, 351–360.
- Naumer, M., Sonntag, F., Schmidt, K., Nieto, K., Panke, C., Davey, N.E., Popa-Wagner, R., and Kleinschmidt, J.A. (2012). Properties of the Adeno-Associated Virus Assembly-Activating Protein. *J. Virol.* 86, 13038–13048.
- Nayerossadat, N., Ali, P., and Maedeh, T. (2012). Viral and nonviral delivery systems for gene delivery. *Adv. Biomed. Res.* 1, 27.
- Negro, F. (2014). Facts and fictions of HCV and comorbidities: Steatosis, diabetes mellitus, and cardiovascular diseases. *J. Hepatol.* 61, S69–S78.
- Nishimura, T., Nakatake, Y., Konishi, M., and Itoh, N. (2000). Identification of a novel FGF, FGF-21, preferentially expressed in the liver. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Struct. Expr.* 1492, 203–206.
- Nolan, C.J., Damm, P., and Prentki, M. (2011). Type 2 diabetes across generations: From pathophysiology to prevention and management. In *The Lancet*, pp. 169–181.
- Nygaard, E.B., Vienberg, S.G., Orskov, C., Hansen, H.S., and Andersen, B. (2012). Metformin stimulates FGF21 expression in primary hepatocytes. *Exp. Diabetes Res.*
- Ogawa, Y., Kurosu, H., Yamamoto, M., Nandi, A., Rosenblatt, K.P., Goetz, R., Eliseenkova, A. V., Mohammadi, M., and Kuro-o, M. (2007). betaKlotho is required for metabolic activity of fibroblast growth factor 21. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104, 7432–7437.
- Oishi, K., and Tomita, T. (2011). Thiazolidinediones are potent inducers of fibroblast growth factor 21 expression in the liver. *Biol. Pharm. Bull.* 34, 1120–1121.
- Oishi, K., Konishi, M., Murata, Y., and Itoh, N. (2011). Time-imposed daily restricted feeding induces rhythmic expression of Fgf21 in white adipose tissue of mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 412, 396–400.
- Olsen, S.K., Garbi, M., Zampieri, N., Eliseenkova, A. V., Ornitz, D.M., Goldfarb, M., and Mohammadi, M. (2003). Fibroblast Growth Factor (FGF) Homologous Factors Share Structural but Not Functional Homology with FGFs. *J. Biol. Chem.* 278, 34226–34236.

- Owen, B.M., Bookout, A.L., Ding, X., Lin, V.Y., Atkin, S.D., Gautron, L., Kliewer, S.A., and Mangelsdorf, D.J. (2013). FGF21 contributes to neuroendocrine control of female reproduction. *Nat. Med.* 19, 1153–1156.
- Owen, B.M., Ding, X., Morgan, D.A., Coate, K.C., Bookout, A.L., Rahmouni, K., Kliewer, S.A., and Mangelsdorf, D.J. (2014). FGF21 Acts Centrally to Induce Sympathetic Nerve Activity, Energy Expenditure, and Weight Loss. *Cell Metab.* 20, 670–677.
- Paniagua, J.A. (2016). Nutrition, insulin resistance and dysfunctional adipose tissue determine the different components of metabolic syndrome. *World J. Diabetes* 7, 483.
- Patel, R., Bookout, A.L., Magomedova, L., Owen, B.M., Consiglio, G.P., Shimizu, M., Zhang, Y., Mangelsdorf, D.J., Kliewer, S.A., and Cummins, C.L. (2015). Glucocorticoids regulate the metabolic hormone FGF21 in a feed-forward loop. *Mol. Endocrinol.* 29, 213–223.
- Peeters, A., Barendregt, J.J., Willekens, F., Mackenbach, J.P., Al Mamun, A., and Bonneux, L. (2003). Obesity in adulthood and its consequences for life expectancy: a life-table analysis. *Ann. Intern. Med.* 138, 24–32.
- Pellegrinelli, V., Carobbio, S., and Vidal-Puig, A. (2016). Adipose tissue plasticity: how fat depots respond differently to pathophysiological cues. *Diabetologia* 59, 1075–1088.
- Pi-Sunyer, X., Astrup, A., Fujioka, K., Greenway, F., Halpern, A., Krempf, M., Lau, D.C.W., le Roux, C.W., Violante Ortiz, R., Jensen, C.B., et al. (2015). A Randomized, Controlled Trial of 3.0 mg of Liraglutide in Weight Management. *N. Engl. J. Med.* 373, 11–22.
- Planavila, A., Redondo, I., Hondares, E., Vinciguerra, M., Munts, C., Iglesias, R., Gabrielli, L.A., Sitges, M., Giralt, M., van Bilsen, M., et al. (2013). Fibroblast growth factor 21 protects against cardiac hypertrophy in mice. *Nat. Commun.* 4, 1–12.
- Potthoff, M.J., Inagaki, T., Satapati, S., Ding, X., He, T., Goetz, R., Mohammadi, M., Finck, B.N., Mangelsdorf, D.J., Kliewer, S.A., et al. (2009). FGF21 induces PGC-1 α and regulates carbohydrate and fatty acid metabolism during the adaptive starvation response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 10853–10858.
- Potthoff, M.J., Kliewer, S.A., and Mangelsdorf, D.J. (2012). Endocrine fibroblast growth factors 15/19 and 21: from feast to famine. *Genes Dev.* 26, 312–324.
- Pryor, R., and Cabreiro, F. (2015). Repurposing metformin: an old drug with new tricks in its binding pockets. *Biochem. J.* 471, 307–322.
- Quan, W., Jo, E.-K., and Lee, M.-S. (2013). Role of pancreatic beta-cell death and inflammation in diabetes. *Diabetes, Obes. Metab.* 15, 141–151.
- Reaven, G.M., Hollenbeck, C., Jeng, C.Y., Wu, M.S., and Chen, Y.D.I. (1988). Measurement of plasma glucose, free fatty acid, lactate, and insulin for 24 h in patients with NIDDM. *Diabetes* 37, 1020–1024.
- Rehman, A.G., Tyson, M., Egger, M., Heller, R.F., and Zwahlen, M. (2008). Body-mass index and incidence of cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective observational studies. *Lancet* 371, 569–578.
- Rodriguez, A.R., Plascencia-villa, G., Witt, C.M., Yu, J., José-yacamán, M., Chambers, J.P., Perry, G., Guentzel, M.N., and Arulanandam, B.P. (2015). Chlamydia pneumoniae promotes dysfunction of pancreatic beta cells. *Cell. Immunol.* 295, 83–91.

- Rosen, E.D., and Spiegelman, B.M. (2014). What we talk about when we talk about fat. *Cell* 156, 20–44.
- Rouet, P., Raguenez, G., Tronche, F., Yaniv, M., N'Guyen, C., and Salier, J.P. (1992). A potent enhancer made of clustered liver-specific elements in the transcription control sequences of human alpha 1-microglobulin/bikunin gene. *J. Biol. Chem.* 267, 20765–20773.
- Ruan, H., Hacohen, N., Golub, T.R., Van Parijs, L., and Lodish, H.F. (2002). Tumor necrosis factor-alpha suppresses adipocyte-specific genes and activates expression of preadipocyte genes in 3T3-L1 adipocytes: nuclear factor-kappaB activation by TNF-alpha is obligatory. *Diabetes* 51, 1319–1336.
- Samulski, R.J., Berns, K.I., Tan, M., and Muzyczka, N. (1982). Cloning of adeno-associated virus into pBR322: rescue of intact virus from the recombinant plasmid in human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 79, 2077–2081.
- Sarruf, D. a, Thaler, J.P., Morton, G.J., German, J., Fischer, J.D., Ogimoto, K., and Schwartz, M.W. (2010). Fibroblast Growth Factor 21 Action in the Brain Obese Rats. *Diabetes* 59, 1817–1824.
- Sattar, N., and Gill, J.M.R. (2014). Type 2 diabetes as a disease of ectopic fat? *BMC Med.* 12, 123.
- Scallan, C.D., Jiang, H., Liu, T., Patarroyo-White, S., Sommer, J.M., Zhou, S., Couto, L.B., and Pierce, G.F. (2006). Human immunoglobulin inhibits liver transduction by AAV vectors at low AAV2 neutralizing titers in SCID mice. *Blood* 107, 1810–1817.
- Schäfer, S.A., Machicao, F., Fritsche, A., Häring, H., and Kantartzis, K. (2011). New type 2 diabetes risk genes provide new insights in insulin secretion mechanisms. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 93, S9–S24.
- Shao, M., Yu, L., Zhang, F., Lu, X., Li, X., Cheng, P., Lin, X., He, L., Jin, S., Tan, Y., et al. (2015). Additive protection by LDR and FGF21 treatment against diabetic nephropathy in type 2 diabetes model. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* 309, E45–E54.
- Singhal, G., Douris, N., Fish, A.J., Zhang, X., Adams, A.C., Flier, J.S., Pissios, P., and Maratos-Flier, E. (2016b). Fibroblast growth factor 21 has no direct role in regulating fertility in female mice. *Mol. Metab.* 5, 690–698.
- Singhal, G., Fisher, F.M., Chee, M.J., Tan, T.G., El Ouaamari, A., Adams, A.C., Najarian, R., Kulkarni, R.N., Benoist, C., Flier, J.S., et al. (2016a). Fibroblast Growth Factor 21 (FGF21) Protects against High Fat Diet Induced Inflammation and Islet Hyperplasia in Pancreas. *PLoS One* 11, 1–20.
- Smith, R., Duguay, A., Bakker, A., Li, P., Weiszmann, J., Thomas, M.R., Alba, B.M., Wu, X., Gupte, J., Yang, L., et al. (2013). FGF21 Can Be Mimicked In Vitro and In Vivo by a Novel Anti-FGFR1c/\$\beta\$-Klotho Bispecific Protein. *PLoS One* 8, e61432.
- Smith, R.J., Nathan, D.M., Arslanian, S.A., Groop, L., Rizza, R.A., and Rotter, J.I. (2010a). Individualizing therapies in type 2 diabetes mellitus based on patient characteristics: what we know and what we need to know. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 95, 1566–1574.

- Smith, S.R., Weissman, N.J., Anderson, C.M., Sanchez, M., Chuang, E., Stubbe, S., Bays, H., and Shanahan, W.R. (2010b). Multicenter, placebo-controlled trial of lorcaserin for weight management. *N. Engl. J. Med.* 363, 245–256.
- Snyder, R.O., Audit, M., and Francis, J.D. (2011). rAAV vector product characterization and stability studies. *Methods Mol. Biol.* 807, 405–428.
- So, W.Y., and Leung, P.S. (2016). Fibroblast Growth Factor 21 As an Emerging Therapeutic Target for Type 2 Diabetes Mellitus. *Med. Res. Rev.* 36, 672–704.
- Srivastava, A., Lusby, E.W., and Berns, K.I. (1983). Nucleotide sequence and organization of the adeno-associated virus 2 genome. *J. Virol.* 45, 555–564.
- Stanislaus, S., Hecht, R., Yie, J., Hager, T., Hall, M., Spahr, C., Wang, W., Weiszmann, J., Li, Y., Deng, L., et al. (2017). A Novel Fc-FGF21 With Improved Resistance to Proteolysis, Increased Affinity Toward β -Klotho, and Enhanced Efficacy in Mice and Cynomolgus Monkeys. *Endocrinology* 158, 1314–1327.
- Stommel, M., and Schoenborn, C.A. (2009). Variations in BMI and Prevalence of Health Risks in Diverse Racial and Ethnic Populations. *Obesity* 18, 1821–1826.
- Strissel, K.J., Denis, G. V, and Nikolajczyk, B.S. (2014). Immune regulators of inflammation in obesity-associated type 2 diabetes and coronary artery disease. *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes. Obes.* 21, 330–338.
- Stumvoll, M., Goldstein, B., and Haeften, T. van (2005). Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy. *Lancet* 365.
- Sumithran, P., and Proietto, J. (2014). Benefit-risk assessment of orlistat in the treatment of obesity. *Drug Saf.* 37, 597–608.
- Surwit, R.S., Feinglos, M.N., Rodin, J., Sutherland, A., Petro, A.E., Opara, E.C., Kuhn, C.M., and Rebuffe-Scrive, M. (1995). Differential effects of fat and sucrose on the development of obesity and diabetes in C57BL/6J and A/J mice. *Metabolism* 44, 645–651.
- Surwit, R.S., Wang, S., Petro, E., Sanchis, D., Raimbault, S., Ricquier, D., Collins, S., and Sciences, B. (1998). Diet-induced changes in uncoupling proteins in obesity-prone and obesity-resistant strains of mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 4061–4065.
- Suzuki, M., Uehara, Y., Motomura-Matsuzaka, K., Oki, J., Koyama, Y., Kimura, M., Asada, M., Komi-Kuramochi, A., Oka, S., and Imamura, T. (2008). betaKlotho is required for fibroblast growth factor (FGF) 21 signaling through FGF receptor (FGFR) 1c and FGFR3c. *Mol. Endocrinol.* 22, 1006–1014.
- Pischoon, T., Boeing, H., Hoffmann, K., Bergmann, M., Schulze, MB., van der Schouw, YT., Spencer, E., Moons, KG., Tionneland, A., et al. (2008). General and Abdominal Adiposity and Risk of Death in Europe. *N. Engl. J. Med.* 359, 2105–2120.
- Talukdar, S., Zhou, Y., Li, D., Rossulek, M., Dong, J., Somayaji, V., Weng, Y., Clark, R., Lanba, A., Owen, B.M., et al. (2016). A Long-Acting FGF21 Molecule, PF-05231023, Decreases Body Weight and Improves Lipid Profile in Non-human Primates and Type 2 Diabetic Subjects. *Cell Metab.* 23, 427–440.

- Talukdar, S., Zhou, Y., Li, D., Rossulek, M., Dong, J., Somayaji, V., Weng, Y., Clark, R., Lanba, A., Owen, B.M., et al. (2016). A Long-Acting FGF21 Molecule, PF-05231023, Decreases Body Weight and Improves Lipid Profile in Non-human Primates and Type 2 Diabetic Subjects. *Cell Metab.* 23, 427–440.
- Taylor, R. (2008). Pathogenesis of type 2 diabetes: tracing the reverse route from cure to cause. *Diabetologia* 51, 1781–1789.
- Tchernof, A., and Després, J.-P. (2013). Pathophysiology of human visceral obesity: an update. *Physiol. Rev.* 93, 359–404.
- Tchkonia, T., Thomou, T., Zhu, Y., Karagiannides, I., Pothoulakis, C., Jensen, M.D., and Kirkland, J.L. (2013). Mechanisms and metabolic implications of regional differences among fat depots. *Cell Metab.* 17, 644–656.
- Thompson, A.C.S., Bruss, M.D., Nag, N., Kharitonov, A., Adams, A.C., and Hellerstein, M.K. (2014). Fibroblast Growth Factor 21 Is Not Required for the Reductions in Circulating Insulin-Like Growth Factor-1 or Global Cell Proliferation Rates in Response to Moderate Calorie Restriction in Adult Mice. *PLoS One* 9.
- Turner, R.C., Cull, C.A., Frighi, V., and Holman, R.R. (1999). Glycemic control with diet, sulfonylurea, metformin, or insulin in patients with type 2 diabetes mellitus: progressive requirement for multiple therapies (UKPDS 49). UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. *JAMA* 281, 2005–2012.
- Van Gaal, L.F., Mertens, I.L., and De Block, C.E. (2006). Mechanisms linking obesity with cardiovascular disease. *Nature* 444, 875–880.
- Véniant, M.M., Komorowski, R., Chen, P., Stanislaus, S., Winters, K., Hager, T., Zhou, L., Wada, R., Hecht, R., and Xu, J. (2012). Long-Acting FGF21 Has Enhanced Efficacy in Diet-Induced Obese Mice and in Obese Rhesus Monkeys. *Endocrinology* 153, 4192–4203.
- Véniant, M.M., Sivits, G., Helmering, J., Komorowski, R., Lee, J., Fan, W., Moyer, C., and Lloyd, D.J. (2015). Pharmacologic Effects of FGF21 Are Independent of the “Browning” of White Adipose Tissue. *Cell Metab.* 21, 731–738.
- Verrotti, A., Scaparrotta, A., Agostinelli, S., Di Pillo, S., Chiarelli, F., and Grosso, S. (2011). Topiramate-induced weight loss: A review. *Epilepsy Res.* 95, 189–199.
- Voight, B.F., Scott, L.J., Steinthorsdottir, V., Andrew, P., Aulchenko, Y.S., Thorleifsson, G., Mcculloch, L.J., and Ferreira, T. (2010). Twelve type 2 diabetes susceptibility loci identified through large-scale association analysis. *Nat. Genet.* 42, 579–589.
- Vollmar, B., and Menger, M.D. (2009). The Hepatic Microcirculation: Mechanistic Contributions and Therapeutic Targets in Liver Injury and Repair. *Physiol. Rev.* 89.
- Wang, B., Chandrasekera, P., and Pippin, J. (2014). Leptin- and Leptin Receptor-Deficient Rodent Models: Relevance for Human Type 2 Diabetes. *Curr. Diabetes Rev.* 10, 131–145.
- Wang, L., Calcedo, R., Nichols, T.C., Bellinger, D.A., Dillow, A., Verma, I.M., and Wilson, J.M. (2005). Sustained correction of disease in naive and AAV2-pretreated hemophilia B dogs: AAV2/8-mediated, liver-directed gene therapy. *Blood* 105.

- Wang, L., Wang, H., Bell, P., McCarter, R.J., He, J., Calcedo, R., Vandenberghe, L.H., Morizono, H., Batshaw, M.L., and Wilson, J.M. (2010). Systematic Evaluation of AAV Vectors for Liver directed Gene Transfer in Murine Models. *Mol. Ther.* 18, 118–125.
- Wang, X., Wei, W., Krzeszinski, J.Y., Wang, Y., and Wan, Y. (2015). A Liver-Bone Endocrine Relay by IGFBP1 Promotes Osteoclastogenesis and Mediates FGF21-Induced Bone Resorption. *Cell Metab.* 22, 811–824.
- Ward, N.J., Buckley, S.M.K., Waddington, S.N., VandenDriessche, T., Chuah, M.K.L., Nathwani, A.C., McIntosh, J., Tuddenham, E.G.D., Kinnon, C., Thrasher, A.J., et al. (2011). Codon optimization of human factor VIII cDNAs leads to high-level expression. *Blood* 117, 798–807.
- Webster, R., Didier, E., Harris, P., Siegel, N., Stadler, J., Tilbury, L., and Smith, D. (2007). PEGylated proteins: evaluation of their safety in the absence of definitive metabolism studies. *Drug Metab. Dispos.* 35, 9–16.
- Wei, W., Dutchak, P.A., Wang, X., Ding, X., Wang, X., Bookout, A.L., Goetz, R., Mohammadi, M., Gerard, R.D., Dechow, P.C., et al. (2012). Fibroblast growth factor 21 promotes bone loss by potentiating the effects of peroxisome proliferator-activated receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, 3143–3148.
- Wei, W., Dutchak, P.A., Wang, X., Ding, X., Wang, X., Bookout, A.L., Goetz, R., Mohammadi, M., Gerard, R.D., Dechow, P.C., et al. (2012). Fibroblast growth factor 21 promotes bone loss by potentiating the effects of peroxisome proliferator-activated receptor γ . *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 3143–3148.
- Wente, W., Efanov, A.M., Brenner, M., Kharitonov, A., Ko, A., Sandusky, G.E., Sewing, S., Treinies, I., Zitzer, H., and Gromada, J. (2006). Fibroblast Growth Factor-21 Improves Pancreatic β -Cell Function and Survival by Activation of Extracellular Signal-Regulated Kinase 1/2 and Akt Signaling Pathways. *Diabetes* 55, 2470–2478.
- WHO (1999). Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus and its Complications.
- WHO (2016). GLOBAL REPORT ON DIABETES. ISBN 978, 92–94.
- Winzell, M.S., and Ahrén, B. (2004). The high-fat diet-fed mouse: a model for studying mechanisms and treatment of impaired glucose tolerance and type 2 diabetes. *Diabetes* 53 Suppl 3, S215-9.
- Wolf, D.A., Banerjee, S., Hackett, P.B., Whitley, C.B., Mclvor, R.S., and Low, W.C. (2015). Gene therapy for neurologic manifestations of mucopolysaccharidoses. *Expert Opin. Drug Deliv.* 12, 283–296.
- Xu, J., Lloyd, D.J., Hale, C., Stanislaus, S., Chen, M., Sivits, G., Vonderfecht, S., Hecht, R., Li, Y.-S., Lindberg, R.A., et al. (2009). Fibroblast growth factor 21 reverses hepatic steatosis, increases energy expenditure, and improves insulin sensitivity in diet-induced obese mice. *Diabetes* 58, 250–259.
- Xu, P., Zhang, Y., Wang, W., Yuan, Q., Liu, Z., Rasoul, L.M., Wu, Q., Liu, M., Ye, X., Li, D., et al. (2015). Long-Term Administration of Fibroblast Growth Factor 21 Prevents Chemically-Induced Hepatocarcinogenesis in Mice. *Dig. Dis. Sci.* 60, 3032–3043.
- Yki-Järvinen, H. (2004). Thiazolidinediones. *N. Engl. J. Med.* 351, 1106–1118.

- Zhang, C., Huang, Z., Gu, J., Yan, X., and Lu, X. (2015). Fibroblast growth factor 21 protects the heart from apoptosis in a diabetic mouse model via extracellular signal-regulated kinase 1 / 2-dependent signalling pathway. *Diabetologia* 1937–1948.
- Zhang, J., and Li, Y. (2015). Fibroblast Growth Factor 21 Analogs for Treating Metabolic Disorders. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. 6, 168.
- Zhang, Y., Xie, Y., Berglund, E.D., Coate, K.C., He, T.T., Katafuchi, T., Xiao, G., Potthoff, M.J., Wei, W., and Wan, Y. (2012). The starvation hormone, fibroblast growth factor-21, extends lifespan in mice. *Elife* 1.
- Zincarelli, C., Soltys, S., Rengo, G., and Rabinowitz, J.E. (2008). Analysis of AAV Serotypes 1–9 Mediated Gene Expression and Tropism in Mice After Systemic Injection. *Mol. Ther.* 16, 1073–1080.
- Zinman, B., Wanner, C., Lachin, J.M., Fitchett, D., Bluhmki, E., Hantel, S., Mattheus, M., Devins, T., Johansen, O.E., Woerle, H.J., et al. (2015). Empagliflozin, Cardiovascular Outcomes, and Mortality in Type 2 Diabetes. *N. Engl. J. Med.* 373, 1–12.
- Zolotukhin, S., Byrne, B., Mason, E., Zolotukhin, I., Potter, M., Chesnut, K., Summerford, C., Samulski, R., and Muzyczka, N. (1999). Recombinant adeno-associated virus purification using novel methods improves infectious titer and yield. *Gene Ther.* 6, 973–985.

