



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](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**

**DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOLOGIA MOLECULAR  
FACULTAT DE VETERINÀRIA**

**CENTRE DE BIOTECNOLOGIA ANIMAL I TERÀPIA GÈNICA**

**TERÀPIA GÈNICA PER LA DIABETIS TIPUS 2  
DIRIGIDA AL SISTEMA NERVIÓS CENTRAL**

**IGNASI GRASS COSTA**



La present tesi doctoral s'ha dut a terme sota la direcció de la Dra. Fàtima Bosch i Tubert i la Dra. Ivet Elias Puigdomènech al Departament de Bioquímica i Biologia Molecular de la Facultat de Veterinària i al Centre de Biotecnologia Animal i Teràpia Gènica (CBATEG).

**IGNASI GRASS COSTA**

**FÀTIMA BOSCH I TUBERT**

**IVET ELIAS PUIGDOMÈNECH**

**ABRIL 2022**  
**BELLATERRA**



*Avui dormim junts,  
però sé que demà també.*

Els que em coneixeu sabeu que poder realitzar aquesta tesi doctoral era un objectiu personal que tenia des de ja fa més d'una dècada. Sembla que el més maco de tenir objectius sigui complir-los, però com ja se sap, això no és així. I és que no és important el *que* has complert sinó moltes altres preguntes com el *perquè*, el *com*, i sobretot amb *qui*. Aquesta tesi doctoral m'ha demostrat que tot té molt més sentit si ho fas acompanyat i que, per tant, unes simples frases com les que ara redactaré no seran suficients per poder mostrar tot l'agraïment que sento per cadascun de vosaltres. Hi ha una cita que m'agrada molt i que reflecteix molt bé el que sento:

*“No sempre ha estat un plaer, perquè a la vida no tot són flors i violes, però sempre ha estat un ORGULL tenir-vos a tots vosaltres”*

En primer lloc, volia agrair a la **Dra. Fàtima Bosch** la gran oportunitat de poder realitzar la tesi doctoral en el seu laboratori. La teva capacitat de treball i entusiasme genera una oportunitat única per tots nosaltres. Una oportunitat de formar-nos com a científics, com a treballadors i com a persones. Una de les coses més complicades avui en dia és que et donin la primera oportunitat per demostrar qui ets, i en el teu laboratori això va ser molt fàcil, gràcies a tu.

Una de les persones a qui també estic molt agraït és a la meva altra codirectora. **Ivet**. Vull agrair-te que em deixessis fer quan sabies que poder no estava en el camí correcte i que igualment estiguessis allà quan me n'adonava del meu error, que dediquessis hores incalculables a la meva formació com a científic, però també com a persona i que sempre tinguessis obert el paraigua per quan les coses no anaven del tot bé. Està clar que sense tu no estaríem on som ara!

Unes paraules que no poden faltar sens dubte és al meu grup d'adipós. El grup que em va acollir des de que vaig arribar i del que he après la majoria de coses del laboratori. **Victor**, des de que vaig començar en aquest laboratori que sempre he admirat la teva dedicació, la teva forma de treballar, i de fet, ja t'ho deia... que quan acabés la tesi m'agradaria tenir només una miqueta del teu nivell a l'hora de treballar, espero en certa manera haver-ho aconseguit, però si és així és només gràcies a la teva ajuda. Realment són incalculables les hores que hem passat fent cafè, esmorzant, fent comportament, etc.... **Nia**, gràcies per adoptar-me com un petit germanet des de que vaig arribar, el teu *Querubin* s'ha fet una mica gran, tot i que encara espero el sopar. **Claudia**, l'energia *arrolladora*, moltes gràcies per la teva vitalitat, per la teva manera de sentir les coses que moltes vegades m'han fet sentir com a casa. El meu codirector de tesina, **Sergio**, diuen que sempre et quedés marcat per la primera persona que et va

ensenyar, i si és així, jo vaig tenir molta sort... i sí, encara et dec un pernil. Gràcies també **Vero**, pel suport moral i els grans consells i idees en moltes ocasions durant tot aquest temps. Ai **Miquel**, quantes hores parlant de música, d'ètica, de la moral... i de *moltes altres coses*, gràcies per escoltar-me sempre que ho he necessitat i per la teva capacitat de relativitzar els problemes. **Jordi**, ara ja no estàs aquí, i no saps com trobo a faltar les xerrades castelleres, els nostres *piques* i el teu *descontrol organitzat*. I finalment la nostra última incorporació, **Marta**, suposo que no només hi ha una cosa a dir... ets la millor becària que he tingut, i tindrè mai.

Moltes gràcies a tot el *LSD Team*. **Victor**, diria que serà de les poques vegades que podré estar tan content de no fer-te cas... si no fos així, avui dia no et podria considerar un amic! Sempre t'ho he dit i sempre t'ho recordaré, la teva gran virtut és la teva capacitat per estar allà, quan menys t'ho esperes i quan més ho necessites, amb tu he après que les relacions personals són quelcom molt valuós i que s'ha de cuidar. **Albert**, sense tu el projecte de *Neuro* no hauria avançat tant en molts sentits, professionalment m'has ensenyat a cuidar els detalls i a qüestionar-te cadascun del passos, però personalment sense tu aquesta tesi no hagués sigut possible. **Gemma**, el *meu petit desastre*, portem junts des del principi i ara que arribem al final li dono encara més valor... companya de màster, companya de tesis, companya de taula, però sobretot, companya de castells, companya de *cotilleos* i companya de molts molts bons moments. **Xavi**, em costa trobar les paraules adequades... però diria que totes es poden resumir dient que simplement et trobo molt a faltar. **Sara**, la *gestora del caos*, ja saps que sense tu els principals experiments d'aquesta tesi no serien possibles, tens una capacitat de treball que fa molta enveja. Uns altres que ja no hi són, **Joan i Jenny**, moltes gràcies per donar-me ànims i fer-me riure en qualsevol moment.

A l'equip de *virus* moltíssimes gràcies per la seva dedicació a l'hora de produir els vectors, sense ells tots aquests resultats no serien possibles. **Xavi**, per les grans valuoses ensenyances però sempre mantenint el toc d'humor. **Carles**, tot i ser del Joventut, moltes gràcies per la teva meticulositat en el treball i **Meritxell** gràcies per fer del laboratori de la quarta un lloc molt més acollidor.

A les meves noies preferides. **Alba**, amb el temps i la quantitat d'hores compartides parlant de ciència, de la vida o de qualsevol cosa t'has convertit en una persona imprescindible per tot aquest llarg recorregut. Amb tu és tot més fàcil, sempre hi has sigut, i sé que sempre hi seràs. **Laia**, ja saps que al principi em vas fer una mica de respecte... res més lluny de la realitat, moltes gràcies per ajudar en aquest projecte sempre que ho hem necessitat i espero que algun dia em regalis el *rotulador màgic* dels



*Westerns*. **Maria**, gràcies per aquestes converses i debats tan enriquidors en el laboratori, gràcies per descobrir-me nova música i gràcies per donar-me ànims. **Marisa**, no hem treballat moltes vegades junts, però sempre que ho hem fet ha sigut molt fàcil gràcies a la teva dedicació, al teu *cuidado* del detall i la teva amabilitat.

A la Cuina. **Jenny** i **Lidia**, que fàcil que és tot amb vosaltres, amb quina cosa més senzilla es converteix tot gràcies a la vostra dedicació i saber fer. Només espero que algun dia ens n'anem a prendre la cervesa que de bon segur que us dec.

A l'equip d'Immunos. **Marta**, gràcies pel teu treball i per haver compartit el teu lloc de treball amb mi quan ho he necessitat. **Lorena**, has arribat en el tram final d'aquesta tesi i has decidit adoptar-me, cuidar-me i ajudar-me sempre que ho he necessitat. Moltíssimes gràcies.

Al despatx de la 4rta. **Tura**, moltíssimes gràcies per la teva dedicació en el projecte i per aquells *Bon dia* pel matí quan només estem nosaltres en aquesta planta. **Sylvie** gràcies per la teva amabilitat i disponibilitat, sense tu demanar la beca que ha fet possible aquest projecte hagués sigut impossible.

Al SER-CBATEG. Moltes gràcies a **tot el personal**, hi ha hagut moments de la tesi que amb la quantitat d'hores de comportament acumulades tot es feia més difícil, però vosaltres sempre vàreu facilitar-m'ho tot i em vau fer sentir com quasi un de vosaltres. A la UAT, **Anna P** i **Sandra**, sense vosaltres el CBATEG no seria el mateix.

Al suport administratiu. **Montse** i **Rosmi**, gràcies per facilitar-me tant tots els tràmits administratius, gràcies per fer-me fàcil procediments que jo no coneixia ni per on començar. I a tot el **personal de manteniment, neteja i seguretat** del centre, gràcies per fer del CBATEG un lloc on és molt més còmode treballar.

A la meva família. **Mama**, ja ho saps, molta part d'aquesta tesi és teva, gràcies per la dedicació, per estar sempre allà passés el que passés, per facilitar-me la vida inclús quan la teva no era fàcil, per fer de casa un lloc on estar segur i poder parlar de tot. **Papa**, t'admiro, la teva dedicació, constància, passió per les coses, la teva capacitat de treball i de sacrifici però sobretot la teva capacitat per inculcar-me tot això. Els dos sabem que el nostre camí no ha estat fàcil, però continuem lluitant i això per mi, és el més important. **Queralt**, petita, un dia et vaig demanar que necessitava que fossis tu la que cuidés la nostra relació, que ja saps que a mi no se'm donen bé aquestes coses. Moltes gràcies per fer-ho, et necessito. A tu també **Jordi**, gràcies per facilitar tant les coses, per estar sempre quan ho he necessitat, ja que només com exemple gràcies per

portar-me aquella calculadora sense la qual ara no estaria aquí. A tota la família **ALCE**, gràcies per acollir-me d'aquesta manera, per tota l'ajuda i la confiança en mi mateix que m'heu donat. A la iaia **Fina**, gràcies per tots els *bons dies*, gràcies per cuidar-me tant. L'avi **Jaume**, va per totes les hores que vam compartir, per tots els partits de bàsquet que vas venir, per tots els trajectes que vàrem arribar a fer junts, per la gran dedicació que vas tenir, i per totes les hores que ja no hem pogut compartir personalment però, que jo m'he imaginat parlant amb tu, crec que tu ets al gran motiu pel qual estic aquí, aquesta tesi va per TU!

A la meva altra petita família **Joanfe i Cris**, crec que amb vosaltres he descobert el veritable sentit de l'amistat. Mai se m'han donat bé les relacions personals, però amb vosaltres des del principi ha estat diferent. Us vaig conèixer al mateix moment que vaig començar aquesta etapa de la meva vida i sé que sense vosaltres tot això hagués sigut molt més complicat. Només espero a partir d'ara compartir la resta d'etapes que ens queden junts.

I per últim tu, **Carla**. No en tenia cap dubte que quan et necessités hi estaries, però tot i així, no tinc paraules per descriure com m'has cuidat, comprès, escoltat i abraçat en aquests últims mesos. Tu ja saps que a la vida jo necessito tenir-ho tot sota control, meditat i valorat però la nostra relació va començar sense voler-ho, simplement, va passar, sent quelcom que no vaig tenir mai sota control. I tot gràcies a tu, per demostrar-me que les coses que realment acaben important són les que menys t'esperes. T'estimo!

Aquesta tesi ha estat possible gràcies a la beca predoctoral Ayuda PRE2018-084309 financada por MCIN/AEI /10.13039/501100011033 y por FSE invierte en tu futuro. Les investigacions s'han dut a terme gràcies a la financiació rebuda del Proyecto SAF2014-54866-R financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO) y FEDER, Plan Nacional I+D+I, del Proyecto SAF2017-86266-R financiado por MCIN/AEI /10.13039/501100011033/ y por FEDER Una manera de hacer Europa, del Proyecto PID2020-113864RB-100 financiado por MCIN/ AEI /10.13039/501100011033 i de la Generalitat de Catalunya (2014 SGR 1669, 2017 SGR 01508).



<b>µg</b>	Micrograms
<b>AAP</b>	Proteïna Activadora de l'Assemblatge
<b>AAV</b>	Virus Adenoassociats
<b>ACTH</b>	<i>Adrenocorticotrofic Hormone</i>
<b>AFP</b>	<i>α-Fetoprotein</i>
<b>AKT</b>	<i>AKT Serine/Treonine Kinase</i>
<b>ALT</b>	Alanina Aminotransferasa
<b>ANOVA</b>	Anàlisi de Variància
<b>AST</b>	Aspartat Aminotransferasa
<b>AUC</b>	Àrea sota la corba
<b>BAT</b>	Teixit Adipós Marró
<b>BDNF</b>	<i>Brain Derived Neurotrophic Factor</i>
<b>BHE</b>	Barrera Hematoencefàlica
<b>BM</b>	<i>Barnes Maze</i>
<b>BMP8B</b>	<i>Bone Morphogenetic Protein 8B</i>
<b>BSA</b>	Albúmina Sèrica Bovina
<b>Cb</b>	Cerebel
<b>CD68</b>	<i>Cluster Of Differentiation 68</i>
<b>cDNA</b>	DNA Complementari
<b>CDS</b>	Seqüència Codificant
<b>Chow</b>	Dieta Estàndard de Laboratori
<b>Cidea</b>	<i>Cell Death Inducing Dffa Like Effector A</i>
<b>CMV</b>	<i>Human cytomegalovirus (CMV) immediate early enhancer and promoter</i>
<b>COL1A1</b>	<i>Collagen Type I Alpha 1 Chain</i>
<b>COL3A1</b>	<i>Collagen Type III Alpha 1 Chain</i>
<b>CRH</b>	<i>Corticotropin releasing hormone</i>
<b>CSF</b>	Líquid Cefalorraquidi
<b>Cx</b>	Còrtex
<b>DCL</b>	Dèficits Cognitius Lleus
<b>Dg</b>	Genomes Diploides
<b>dL</b>	Decilitres
<b>dmiRT</b>	Seqüència diana pels microRNAs

<b>DNA</b>	Àcid Desoxiribonucleic
<b>dNTPS</b>	Deoxinucleotids Trifosfats
<b>DPP4</b>	Dipeptidyl peptidase 4
<b>DT1</b>	Diabetis <i>mellitus</i> Tipus 1
<b>DT2</b>	Diabetis <i>mellitus</i> Tipus 2
<b>DUSP4</b>	<i>Dual Especific Phosphatase 4</i>
<b>EE</b>	Despesa Energètica
<b>EGR1</b>	<i>Early-growth response protein 1</i>
<b>ELISA</b>	<i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>
<b>ELOVL3</b>	<i>Elongation Of Very Long Chain Fatty Acids Protein 3</i>
<b>ETS</b>	<i>E26 Transformation-Specific</i>
<b>eWAT</b>	Teixit Adipós Blanc Epididimal
<b>F4/80</b>	<i>EGF-Like Module-Containing Mucin-Like Hormone Receptor-Like 1</i>
<b>FAP</b>	<i>Fibroblast Activation Protein</i>
<b>FBS</b>	Sèrum Boví Fetal
<b>FC</b>	<i>Fold Change</i>
<b>FDA</b>	<i>Food And Drug Association</i>
<b>FFA</b>	Àcids Grassos Lliures
<b>FGF</b>	Factor de Creixement de Fibroblasts
<b>FGF21</b>	Factor de Creixement de Fibroblasts 21
<b>FGFR</b>	Receptor dels Factors de Creixement de Fibroblasts
<b>FOXO1</b>	<i>Forkhead Box Protein O1</i>
<b>FRS2<math>\alpha</math></b>	<i>FGFR Substrate 2 Alpha</i>
<b>g</b>	Grams
<b>g</b>	Força g
<b>GFAP</b>	<i>Glial Fibrillary Acidic Protein</i>
<b>GFP</b>	Proteïna Verda Fluorescent
<b>GLP1</b>	<i>Glucagon-Like Peptide 1</i>
<b>GLPR1</b>	<i>Glucagon-Like Peptide 1 Receptor</i>
<b>GRB2</b>	<i>Growth Factor Receptor-Bound 2</i>
<b>GTT</b>	Test de Tolerància a la Glucosa
<b>h</b>	Hores
<b>Hc</b>	Hipocamp

---

<b>HFD</b>	Dieta Alta en Lípids
<b>HGFR</b>	<i>Hepatocyte Growth Factor Receptor</i>
<b>HSL</b>	Lipasa Sensible a Hormones
<b>HSPG</b>	<i>Heparan Sulfate Proteoglycan</i>
<b>Ht</b>	Hipotàlem
<b>IgG</b>	Immunoglobina G
<b>IL1<math>\beta</math></b>	<i>Interleukin 1 Beta</i>
<b>IL6</b>	<i>Interleukin 6</i>
<b>IMC</b>	Índex de Massa Corporal
<b>ITRs</b>	<i>Inverted Terminal Repeats</i>
<b>ITT</b>	Test de Tolerància a la Insulina
<b>iWAT</b>	Teixit Adipós Blanc Inguinal
<b>Kb</b>	Kilobases
<b>Kcal</b>	Kilocalories
<b>kDA</b>	Kilodalton
<b>kg</b>	Kilogram
<b>KLB</b>	Coreceptor B-Klotho
<b>KRT19</b>	<i>Keratin 19</i>
<b>LamR</b>	<i>Laminin Receptor</i>
<b>LB</b>	<i>Lysogeny Broth Medium</i>
<b>LY6</b>	<i>Lymphocyte Antigen 6</i>
<b>mA</b>	Miliampers
<b>MAC2</b>	<i>Galectin-3</i>
<b>Mb</b>	Mesencèfal
<b>Mcp-1</b>	<i>Monocyte Chemoattractant Protein-1</i>
<b>Mg</b>	Miligrams
<b>min</b>	Minuts
<b>miRNA</b>	microRNA
<b>mL</b>	Mililitres
<b>om</b>	Optimització Murina
<b>MODY</b>	<i>Maturity-Onset Diabetes of the Young</i>
<b>mRNA</b>	RNA Missatger
<b>NAFLD</b>	Malaltia del Fetge Gras no Alcohòlic

<b>NASH</b>	Esteatohepatitis No Alcohòlica
<b>ng</b>	Nanograms
<b>nm</b>	Nanòmetres
<b>NOR</b>	<i>Nobel Object Recognition</i>
<b>NPV</b>	Nucli Paraventricular
<b>NSQ</b>	Nucli Supraquiasmàtic
<b>NVM</b>	Nucli Ventromedial
<b>Ob</b>	Bulb Olfactori
<b>°C</b>	Graus Celsius
<b>OF</b>	<i>Open Field</i>
<b>OMS</b>	Organització Mundial de la Salut
<b>ORF</b>	Marc Obert de Lectura
<b>P</b>	Pons
<b>pb</b>	Parells de Bases
<b>PBS</b>	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
<b>PDK1</b>	<i>Pyruvate Dehydrogenase Kinase 1</i>
<b>PEG</b>	Polietilenglicol
<b>PEI</b>	Polietilamina
<b>pH</b>	Potencial d'Hidrogen
<b>PI3K</b>	<i>Phosphoinositide 3-kinase</i>
<b>poliA/pA</b>	Senyal De Poliadenilació
<b>PPARGC1<math>\alpha</math></b>	<i>Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma Coactivator 1 Alpha</i>
<b>PPAR<math>\alpha</math></b>	<i>Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Alpha</i>
<b>qPCR</b>	PCR Quantitativa
<b>RB</b>	<i>Roller Bottles</i>
<b>RNA</b>	Àcid Ribonucleic
<b>RPLP0</b>	<i>Ribosomal Protein Lateral Stalk Subunit P0</i>
<b>rWAT</b>	Teixit Adipós Marró Retroperitoneal
<b>s</b>	Segons
<b>SEM</b>	Error Estàndard de la Mitja
<b>SNC</b>	Sistema Nerviós Central
<b>St</b>	Estriat

<b>TE</b>	Buffer Tris-EDTA
<b>TG</b>	Triglicèrids
<b>TGF<math>\beta</math></b>	<i>Tumor Growth Factor Beta</i>
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	<i>Tumor Necrosis Factor Alpha</i>
<b>UA</b>	Unitats Arbitràries
<b>UAB</b>	Universitat Autònoma de Barcelona
<b>Ucp1</b>	<i>Thermogenin o Uncoupling Protein 1</i>
<b>UV</b>	Llum Ultraviolada
<b>V</b>	Volts
<b>Vg</b>	Genomes Virals
<b>WAT</b>	Teixit Adipós Blanc





<b>I. PRESENTACIÓ</b> .....	<b>1</b>
<b>II. INTRODUCCIÓ</b> .....	<b>5</b>
<b>1. DIABETIS MELLITUS</b> .....	<b>7</b>
1.1. Diabetis tipus 2 .....	8
<b>2. OBESITAT</b> .....	<b>12</b>
2.1. Tipus d'obesitat en humans .....	13
2.2. Complicacions de l'obesitat.....	14
<b>3. DÈFICITS COGNITIUS EN LA DIABETIS I L'OBESITAT</b> .....	<b>15</b>
3.1. El deteriorament cognitiu en la diabetis.....	16
3.2. El deteriorament cognitiu en l'obesitat.....	19
<b>4. TRACTAMENTS ACTUALS PER LA DIABETIS I L'OBESITAT</b> .....	<b>20</b>
4.1. Teràpies actuals pels pacients diabètics tipus 2.....	21
4.2. Teràpies actuals pels pacients obesos.....	22
<b>5. FACTOR DE CREIXEMENT DE FIBROBLASTS 21 (FGF21)</b> .....	<b>25</b>
5.1. Família de factors de creixement de fibroblasts .....	25
5.2. Expressió del FGF21 .....	26
5.3. Senyalització del FGF21 .....	27
5.4. Funcions del FGF21 a l'encèfal.....	29
5.5. El FGF21 com a fàrmac pel tractament de la diabetis i l'obesitat .....	32
<b>6. TERÀPIA GÈNICA</b> .....	<b>34</b>
6.1. Vectors virals adenoassociats.....	34
6.2. Transferència de gens al sistema nerviós central mitjançant vectors AAV ....	38
<b>III. OBJECTIUS</b> .....	<b>41</b>
<b>IV. RESULTATS</b> .....	<b>45</b>
<b><u>Part 1. Biodistribució de vectors AAV1-GFP després d'un administració inta-</u></b> <b><u>CSF</u></b> .....	<b>47</b>

<b>1. EVALUACIÓ DE LA CAPACITAT DEL VECTOR VIRAL AAV1 ADMINISTRAT INTRA-CSF PER TRANSDUIR ESPECÍFICAMENT EL SNC.....</b>	<b>49</b>
1.1. Anàlisi de la biodistribució del vector .....	50
1.2. Anàlisi de l'expressió de la proteïna GFP a l'encèfal.....	51
<b><u>Part 2. Estudi dels efectes de la sobreexpressió de FGF21 en el SNC.....</u></b>	<b>53</b>
<b>1. DISSENY I GENERACIÓ DEL VECTOR AAV PER L'EXPRESSIÓ DE FGF21 EN EL SNC.....</b>	<b>55</b>
<b>2. ESTUDI A LLARG TERMINI DELS EFECTES METABÒLICS DE L'ADMINISTRACIÓ INTRA-CSF DE VECTORS AAV1-FGF21 A RATOLINS SANS .....</b>	<b>56</b>
2.1. Evolució del pes corporal després de l'administració intra-CSF d'AAV1-FGF21 .....	57
2.2. Anàlisi dels canvis en el balanç energètic induïts pel tractament AAV1-FGF21. ....	58
2.3. El tractament amb AAV1-FGF21 millora el metabolisme de la glucosa.....	59
<b>3. SOBREEPRESSIÓ LOCAL DE FGF21 EN EL SISTEMA NERVIÓS CENTRAL I EFECTES A NIVELL METABÒLIC I COGNITIU EN RATOLINS OBESOS .....</b>	<b>62</b>
3.1. L'administració d'AAV1-FGF21 al SNC reverteix l'obesitat a llarg termini ....	63
3.2. Expressió de FGF21 al SNC a llarg termini en animals tractats amb el vector AAV1-FGF21 .....	66
3.3. Reversió de la hipertròfia i la inflamació del eWAT induïdes per la HFD .....	67
3.4. El tractament amb AAV1-FGF21 provoca un increment de la despesa energètica.....	70
3.5. El tractament amb AAV1-FGF21 reverteix l'esteatosi, la inflamació i la fibrosi hepàtica induïdes per la dieta alta en lípids .....	74
3.6. Reversió de la resistència a la insulina induïda per la dieta alta en lípids.....	79
3.7. Regulació de la despesa energètica mediada per l'acció central del FGF21.	82
3.8. Efectes del tractament amb AAV1-FGF21 a l'hipocamp .....	86
3.9. Prevenció dels dèficits cognitius associats amb l'obesitat i la diabetis .....	90

---

<b>V. DISCUSSIÓ.....</b>	<b>93</b>
<b>VI. CONCLUSIONS.....</b>	<b>105</b>
<b>VII. MATERIALS I MÈTODES .....</b>	<b>109</b>
<b>1. MATERIALS .....</b>	<b>111</b>
1.1. Animals.....	111
1.2. Soques bacterianes .....	111
1.3. Anticossos .....	111
1.4. Plasmidis .....	112
1.5. Reactius i materials.....	113
<b>2. MÈTODES .....</b>	<b>115</b>
2.1. Tècniques bàsiques de DNA.....	115
2.2. Producció, purificació i titulació de vectors virals adenoassociats .....	117
2.3. Quantificació dels genomes virals als teixits .....	121
2.4. Anàlisis d'expressió de RNAm per real-time PCR.....	122
2.5. Western blot.....	125
2.6. Determinació del contingut de triglicèrids i colesterol hepàtics .....	127
2.7. Determinació dels paràmetres sèrics .....	128
2.8. Anàlisi histològica .....	129
2.9. Administració intracisterna magna dels vectors AAV1 en ratolins .....	130
2.10. Determinació de la ingesta.....	131
2.11. Test de tolerància a la insulina.....	131
2.12. Test de tolerància a la glucosa.....	131
2.13. Calorimetria indirecta .....	132
2.14. Proves de comportament.....	132
<b>VIII. BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>137</b>



# **I. PRESENTACIÓ**



La DT2 i l'obesitat són dues patologies que estan estretament relacionades i que actualment presenten una gran prevalença a nivell mundial. Aquestes malalties augmenten el risc de patir altres patologies, entre les quals destaquen els problemes neurodegeneratius. En concret, els pacients amb DT2 i obesitat presenten una pèrdua de capacitat cognitiva i un risc més elevat de patir demència. Actualment, no existeix cap tractament eficaç pels problemes metabòlics associats a aquesta malaltia. A més, a dia d'avui, els dèficits cognitius associats a aquestes patologies no es poden ni prevenir ni curar. Per tant, és necessari desenvolupar noves aproximacions terapèutiques per contrarestar no només els problemes metabòlics sinó també els problemes neurològics.

Des del seu descobriment, el factor de creixement de fibroblasts 21 (FGF21) ha esdevingut un prometedor agent terapèutic per la DT2 i l'obesitat. Aquesta hormona actua sobre diferents teixits perifèrics i centrals. Específicament, l'acció del FGF21 a l'hipotàlem s'ha demostrat que és capaç de regular l'homeòstasi energètica. Recentment, també s'ha descobert que la seva acció en el cervell permet reduir els dèficits cognitius associats a diferents patologies. No obstant, les propietats farmacocinètiques de la proteïna nativa fan que aquesta no sigui adequada per ser utilitzada com a fàrmac ja que aquesta s'agrega amb facilitat i té una vida mitja molt curta en circulació. Per aquest motiu s'han desenvolupat anàlegs o mimètics que presenten unes propietats farmacològiques millorades. Tot i així, aquestes molècules segueixen necessitant la seva administració periòdica i al ser molècules diferents a la nativa poden generar problemes d'immunogenicitat i no desenvolupen una resposta cel·lular totalment igual que la proteïna original.

Una possible estratègia terapèutica que podria esdevenir eficaç és la teràpia gènica, ja que permet la sobreexpressió de la proteïna nativa a llarg termini després d'una sola administració de vector terapèutic. D'entre tots els vectors virals, els vectors virals adenoassociats (AAV) presenten un gran interès per la transferència gènica, ja que permeten l'expressió sostinguda del transgèn al mateix temps que presenten un bon perfil de seguretat i una molt baixa immunogenicitat.

El SNC ha estat àmpliament utilitzat com a òrgan diana en moltes aproximacions de teràpia gènica i tot i que existeixen diferents vies d'administració, la via intra-CSF (CSF, *Cerebrospinal Fluid*) ha estat una de les més utilitzades. Malgrat que diferents serotips de vectors AAV tenen capacitat per transduir les cèl·lules del SNC, el seu tropisme varia molt segons la ruta d'administració utilitzada. Els resultats presentats en aquesta tesi doctoral han demostrat que el vector adenoassociat de serotip 1 (AAV1)



administrat intra-CSF, a través de la cisterna magna, és capaç de transduir àmpliament el SNC.

D'aquesta manera, la teràpia basada en l'administració intra-CSF del vector AAV1-FGF21 va permetre l'increment específic del contingut de FGF21 en el SNC, sense provocar un augment d'aquesta hormona en circulació. En ratolins obesos alimentats amb una dieta alta en lípids, aquesta teràpia va induir una reducció del pes corporal. El tractament amb AAV1-FGF21 també va provocar una reducció en l'adipositat i la inflamació del teixit adipós i una reducció de l'acumulació ectòpica de greix en el fetge que va permetre revertir la inflamació, la fibrosi i els hepatocarcinomes associats. A més, els animals tractats amb FGF21 tenien el metabolisme de la glucosa millorat, ja que la insulinèmia en dejú estava normalitzada, presentaven una major sensibilitat a la insulina, una major tolerància a la glucosa i una reducció de l'hiperplàsia dels illots pancreàtics.

Totes aquestes millores estaven relacionades amb un augment de la despesa energètica produït com a conseqüència directa de la senyalització del FGF21 al SNC. En concret, l'acció del FGF21 en l'hipotàlem induïa un augment de la termogènesi en el teixit adipós marró i del *browning* en el teixit adipós blanc, possiblement a través de l'activació del sistema nerviós simpàtic. A part, el tractament amb AAV1-FGF21 en el SNC també va prevenir els dèficits cognitius associats al consum d'una dieta alta en lípids normalitzant els paràmetres de memòria i d'aprenentatge gràcies en part a la reducció de la neuroinflamació i de l'activació de FOXO1 i del augment del contingut de BDNF madurat.

Així, la teràpia gènica amb AAV1-FGF21 al SNC va permetre revertir l'obesitat, la resistència a la insulina i els dèficits cognitius associats en ratolins alimentats amb dieta alta i per tant, podria ser una bona teràpia pel tractament d'aquestes malalties.

## **II. INTRODUCCIÓ**



## 1. DIABETIS MELLITUS

La diabetis *mellitus* engloba un conjunt de malalties metabòliques d'etologies diverses caracteritzades per una hiperglucèmia crònica causada de defectes tant en la secreció com en l'acció de la insulina, hormona necessària per la captació de la glucosa per part dels teixit (World Health Organization, 2016; American Diabetes Association, 2021a). Aquesta hiperglucèmia crònica provoca l'aparició a llarg termini de complicacions secundàries greus tant a nivell macrovascular (problemes cardiovasculars) com a nivell microvascular (retinopatia, nefropatia o neuropaties). En els darrers anys també s'han descrit evidències que relacionen la diabetis amb el desenvolupament de la demència i la depressió (Zheng et al., 2018; Harding et al., 2019).

Actualment, la incidència de la diabetis està assolint proporcions epidèmiques, convertint-se en una de las majors emergències sanitàries a nivell mundial. Les estimacions apunten que a dia d'avui hi ha 537 milions de persones diabètiques, però es preveu que aquest número augmentarà més d'un 50% l'any 2045, arribant als 783 milions (IDF, 2021). Segons la Federació Internacional de la Diabetis, es calcula que arreu del món van morir uns 6,7 milions de persones l'any 2021 degut a la diabetis o a les seves complicacions. A més, un pacient diabètic genera aproximadament el doble de despeses mèdiques que una persona sana, representant per tant, un greu problema sanitari, econòmic i social. (IDF, 2021).

La diabetis es pot classificar en diferents categories segons quina sigui la seva causa. Principalment es diferencien dos grans grups que són els que afecten a la majoria de pacients: la diabetis tipus 1 (DT1) i la diabetis tipus 2 (DT2). La DT1, afecta entre un 5-10% dels pacients diabètics i es produeix per una destrucció autoimmunitària de les cèl·lules encarregades de la producció d'insulina, les cèl·lules  $\beta$  pancreàtiques. Els pacients amb DT1 solen ser diagnosticats durant la infantesa o la joventut i necessiten l'administració d'insulina exògena diària per mantenir la normoglicèmia. La DT2, afecta entre un 90-95% dels pacients diabètics i està causada per l'aparició d'una resistència a la insulina als teixits perifèrics (principalment al fetge, al múscul esquelètic i al teixit adipós) i per la disfunció de la cèl·lula  $\beta$  que comporta la pèrdua progressiva de la seva capacitat de produir i secretar insulina. La DT2 es sol diagnosticar en persones adultes (American Diabetes Association, 2021a; IDF, 2021).

A part d'aquestes dues grans categories, existeixen també altres tipus de diabetis com la gestacional o la causada per defectes monogènics que afecten a la funció de la

cèl·lula  $\beta$ . La diabetis gestacional es diagnostica quan apareix qualsevol tipus d'intolerància a la glucosa durant el primer o el segon trimestre de la gestació (American Diabetes Association, 2021a). Les diabetis monogèniques, afecten a menys d'un 5% dels pacients diabètics i són hereditàries de forma autosòmica dominant. Aquests tipus de diabetis engloben les diagnosticades abans dels 6 mesos d'edat, diabetis neonatals, i les *Maturity-Onset diabetes of the Young* (MODY), diagnosticades generalment abans dels 25 anys de vida (American Diabetes Association, 2021a; IDF, 2021).

## **1.1. Diabetis tipus 2**

La diabetis tipus 2 està molt associada amb l'obesitat, ja que n'és un dels principals factors de risc. Aquest fet comporta que la majoria de pacients amb DT2 diagnosticats són obesos, i els que no ho són per criteris de pes, si més no, presenten un increment del greix abdominal (Caspard et al., 2018; American Diabetes Association, 2021a). El diagnòstic es produeix normalment en edats adultes, tot i que de forma alarmant cada vegada és diagnosticada en edats més joves (IDF, 2021). Aquesta reducció en l'edat de diagnòstic està estretament lligada amb l'augment de l'obesitat infantil degut a la inactivitat física i a les dietes hipercalòriques (Cheng, 2005; Kahkoska and Dabelea, 2021). A part de l'obesitat, hi ha molts altres factors que fan augmentar la predisposició a patir DT2 i això provoca que sigui una malaltia amb una fisiopatologia i fenotip molt variats (Smith et al., 2010; Gregg et al., 2016). El fet que cada pacient pugui presentar un fenotip diferent dificulta el diagnòstic precoç de la malaltia (American Diabetes Association, 2021a). Aquest retard en el diagnòstic endarrereix l'inici del seguiment i del tractament dels pacients i per tant, augmenta la probabilitat de patir les complicacions associades aquesta malaltia.

### **1.1.1. Factors de risc de la diabetis tipus 2**

Com moltes malalties, els factors de risc de la DT2 són tant ambientals com genètics. Ara bé, els factors ambientals tenen un paper molt important en la DT2, ja que la prevalença de la DT2 està augmentant globalment a una velocitat que no pot ser explicada només amb les variacions genètiques. Es considera per tant, que les variants genètiques només contribueixen a l'augment de la susceptibilitat de patir la malaltia i que la causa principal de la DT2 són els canvis ambientals associats a l'estil de vida (Imamura and Maeda, 2011; Skyler et al., 2017). Concretament, el sedentarisme juntament amb el consum de dietes d'alt contingut calòric pròpies d'occident (*Western Diet*), són dos dels factors que contribueixen al desenvolupament de la DT2 i a l'augment de la incidència de l'obesitat i el sobrepès. El factor de risc més rellevant però, és

l'increment del greix visceral i l'acumulació ectòpica de greix, com per exemple al fetge, fet que explica que independentment del grau de sobrepès del pacient, aquells que tenen una major predisposició a patir la DT2 són el que presenten una major acumulació de greix ectòpic (Kolb and Martin, 2017).

Altres factors ambientals que augmenten el risc de la DT2 són l'edat, el tabaquisme, la pol·lució ambiental, l'estrès, la depressió i fins i tot algunes infeccions víriques (Kolb and Martin, 2017).

Pel que fa als factors genètics, existeixen moltes evidències que demostren la seva contribució al desenvolupament de la DT2 (Prasad and Groop, 2015). Per exemple, s'ha observat que els antecedents familiars amb DT2 tripliquen el risc de patir la malaltia o que algunes poblacions ètniques en particular en tenen un risc més elevat (Schäfer et al., 2011; Cornelis et al., 2015). Els estudis genètics de *Genome-wide association* (GWA) han permès associar més de 250 regions del genoma a un augment de la predisposició de patir la malaltia (Gaulton et al., 2015; Langenberg and Lotta, 2018). Cada una d'aquestes regions conté variacions en la seqüència que estan relacionades amb un major risc de patir DT2, tot i que en molts casos no se'n coneix el mecanisme molecular o es troben en regions no codificants del genoma.

### **1.1.2. Patogenicitat de la diabetis tipus 2**

La DT2 és un trastorn metabòlic complex associat a una resistència perifèrica a la insulina i a una disfunció de la cèl·lula  $\beta$ . Aquests dos processos estan molt relacionats entre sí i actualment no se sap si són causa o conseqüència l'un de l'altre.

Un dels fets que condiciona l'aparició d'una resistència a la insulina als teixits perifèrics és l'augment dels àcids greixosos lliures circulants (FFA, *free fatty acids*) i la creació d'un ambient proinflamatori. En condicions normals, l'excés d'energia consumida comporta un increment dels FFA que són emmagatzemats als adipòcits del teixit adipós blanc en forma de triacilglicèrids (TG). En persones obesas, l'excés continu de calories consumides sumat a la poca activitat física genera una hipertrofia i posteriorment una hiperplàsia dels adipòcits per intentar emmagatzemar la major quantitat de TG. En els adipòcits hipertrofiats es generen unes condicions d'hipòxia, d'estrès oxidatiu i/o d'estrès de reticle que provoca que s'iniciï una resposta proinflamatòria al teixit. Aquesta inflamació ve regulada principalment per la secreció de la interleucina  $1\beta$  (IL $1\beta$ ), la interleucina 6 (IL6) i el factor de necrosi tumoral alfa (TNF $\alpha$ ), l'acció sostinguda dels quals comporta una pèrdua progressiva de la sensibilitat a la insulina i una desregulació de la secreció d'adipocines (Figura 1) (Guilherme et al., 2008;

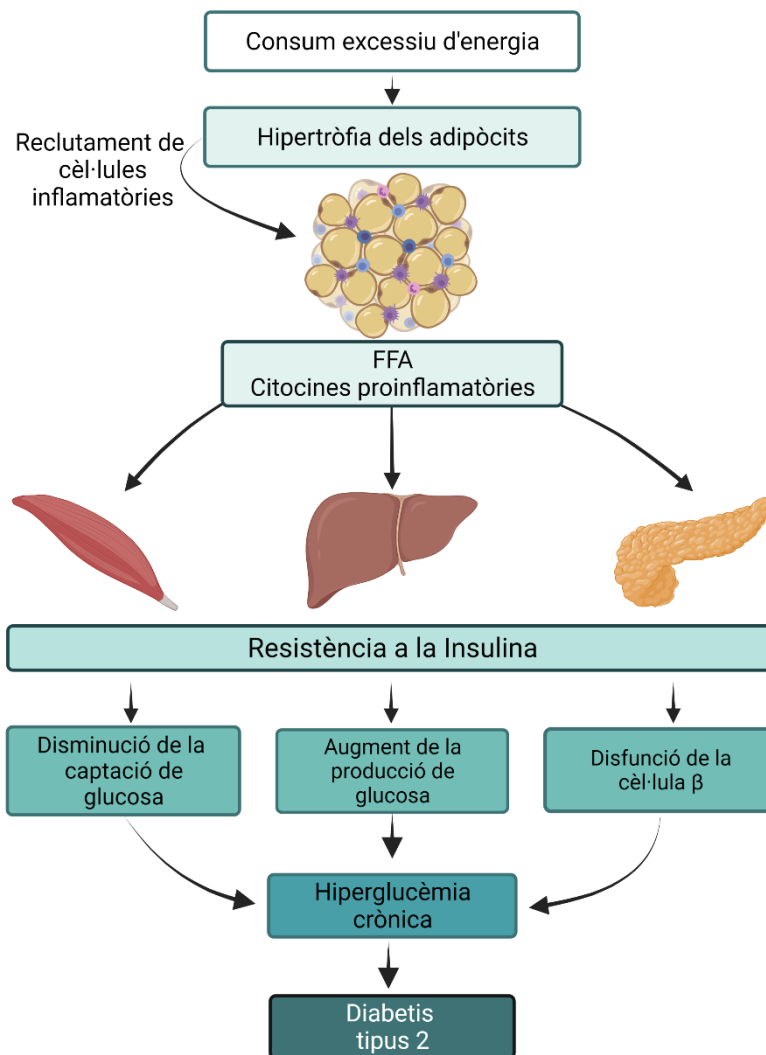
Hameed et al., 2015). Aquesta resposta inflamatòria també està mediada per macròfags residents del teixit adipós, limfòcits B i limfòcits T (McNelis and Olefsky, 2014; Strissel et al., 2014).

En situacions de demanda energètica, les reserves lipídiques del teixit adipós es mobilitzen mitjançant un procés conegut com la lipòlisi. Aquest procés està regulat per la lipasa sensible a hormona (HSL) i permet l'alliberació de FFA a partir de TG. En condicions fisiològiques, l'acció de la insulina en l'adipòcit és capaç de reduir la lipòlisi inhibint la HSL. En canvi, en condicions de resistència a la insulina, la HSL no pot ser inhibida i la lipòlisi es veu dràsticament augmentada, provocant així un increment dels FFA en circulació, que a més també es veuen augmentats per la superació del límit d'emmagatzematge del teixit adipós (Gustafson et al., 2015). L'aparició d'aquests FFA en circulació intensifica la resposta proinflamatòria del teixit adipós i per tant, fa augmentar encara més la resistència a la insulina i la lipòlisi. L'augment de FFA en circulació també produeix una acumulació ectòpica de lípids, és a dir, que s'acumulen en altres teixits perifèrics tals com el fetge, el múscul esquelètic o la zona perivascular, (Figura 1) (Guilherme et al., 2008; Sattar and Gill, 2014; Loher et al., 2016).

L'acumulació ectòpica d'aquets lípids provoca per una part la pèrdua de funcionalitat de les cèl·lules del teixit afectat i per l'altra, inicia una resposta proinflamatòria en el propi teixit. Aquest fet es veu agreujat per la presència de nivells circulants ja elevats de citocines i FFA provinents del teixit adipós. Com a conseqüència, també es genera una resistència a la insulina en tots aquests teixits perifèrics. Al múscul esquelètic aquesta resistència es tradueix en una reducció de la seva capacitat per captar glucosa (Abdul-Ghani and Defronzo, 2010). En canvi, al fetge la resistència a la insulina no permet que l'hormona inhibeixi ni la glucogenòlisi ni la gluconeogènesi, provocant així un augment de la producció de glucosa hepàtica i per tant contribueix a la hiperglucèmia (Figura 1) (Santoleri and Titchenell, 2019).

L'altre procés patològic clau en la DT2 és la disfunció de la cèl·lula  $\beta$  del pàncrees, encarregades de la producció d'insulina. Durant els diferents estadis de la DT2, les cèl·lules  $\beta$  passen per diferents fases (Cerf, 2015). En els individus prediabètics es pot observar un augment dels nivells d'insulina en sang. Aquest fet es produeix degut a que la cèl·lula  $\beta$  entra en un estat de "compensació" on experimenta una hiperplàsia i hipertròfia que comporta com a resultat aquest estat hiperinsulinèmic (Kahn et al., 2006; Yoneda et al., 2013). Aquesta compensació no és perfecta i la constant sobreproducció d'insulina, sumada a la presència de FFA, citocines proinflamatòries i nivells alts de glucosa acaba provocant que les cèl·lules  $\beta$  entrin en un estadi "d'esgotament" (Hameed

et al., 2015; Himanshu et al., 2020). Aquest estadi està caracteritzat per una hipoplàsia, hipotròfia i desdiferenciació de les cèl·lules  $\beta$ . Aquest ambient patològic cronificat acaba induint que la cèl·lula  $\beta$  entri en un estadi de “disfunció” on es redueix la síntesis i la secreció de la insulina per finalitzar amb la mort cel·lular (Figura 1) (Butler et al., 2003; Kahn et al., 2006; Yoneda et al., 2013; Cerf, 2015).



**Figura 1. Alteracions clau que desencadenen la diabetis tipus 2.** L'acumulació excessiva de lípids als adipòcits induïx un reclutament de cèl·lules inflamatòries que, juntament amb els adipòcits hipertrofiats, secreten citocines proinflamatòries i inhibeixen la lipòlisis. L'augment de FFA i citocines circulants afavoreix la deposició patològica de lípids al múscul i al fetge i induïx la resistència a la insulina en aquests teixits. Aleshores el fetge comença a augmentar la gluconeogènesi i la glucogenòlisi, que juntament amb la disminució de la captació de glucosa pel múscul, produeix una hiperoglucèmia sostinguda. Davant l'increment dels nivells de glucosa en sang, es causa una hiperplàsia de les cèl·lules  $\beta$  del pàncrees per tal de compensar la demanda d'insulina. Amb el temps, s'arriba a un esgotament de les cèl·lules  $\beta$  i disminueix la seva capacitat per sintetitzar i secretar insulina. Tot això comporta la cronificació de la hiperoglucèmia i l'establiment de la DT2.



## 2. OBESITAT

L'obesitat i el sobrepès estan causats per un desequilibri entre el consum i la despesa energètica. L'Organització Mundial de la Salut (OMS) defineix l'obesitat i el sobrepès com "el cúmul anormal o excessiu de greix que posa en risc la salut", ja que augmenta la probabilitat de patir malalties cardiovasculars, diabetis i càncers, entre d'altres (World Health Organization, 2021).

Per classificar les persones obeses s'utilitza l'Índex de Massa Corporal (IMC), que en adults es calcula dividint el pes de la persona per la seva alçada al quadrat ( $\text{kg}/\text{m}^2$ ); en nens també es té en compte l'edat (Eknoyan, 2007). Es classifica una persona amb sobrepès quan presenta un IMC entre 25-30 i obesa quan supera un IMC de 30. S'ha de tenir en compte però que l'IMC és una mesura molt simple, que és molt útil per realitzar estudis poblacionals, però no és la mesura més correcta per predir el risc individual de patir obesitat i les seves complicacions associades, ja que no permet distingir entre la part del pes corporal associada a la massa muscular i l'associada al greix. La circumferència de la cintura, la ràtio entre el perímetre de la cintura i el maluc o tècniques d'imatge com l'absorciometria de rajos X d'energia dual són tècniques més específiques per determinar la distribució del greix corporal (Adab et al., 2018).

L'obesitat està considerada un problema de salut pública a nivell epidemiològic, ja que més d'un terç de la població mundial pateix obesitat o sobrepès. L'any 2016, es va estimar que existien més de 2,2 bilions d'adults amb problemes de sobrepès, 650 milions dels quals eren obesos. A més, el seu creixement en els darrers anys ha estat exponencial triplicant el nombre d'individus obesos des de 1975 (World Obesity Federation, 2020; World Health Organization, 2021). Inicialment, aquest augment de la prevalença estava associat a països desenvolupats, però en els darrers anys s'ha observat també un augment en els països en vies de desenvolupament, ara bé, en alguns països desenvolupats la quantitat de persones obeses ha assolit un nivell màxim o ha començat a disminuir (Bentham et al., 2017; Lin and Li, 2021). Es calcula que cada any moren 2,8 milions de persones com a conseqüència de les complicacions derivades del sobrepès i de l'obesitat. A més, una persona obesa genera una despesa en sanitat un 30% major que un individu no obès (WHO Consultation on Obesity (1999: Geneva and Obesity, 2000).

Més preocupant encara és l'increment del nombre de nens i adolescents amb sobrepès o obesitat ja que l'OMS ha determinat que en les últimes 4 dècades els adolescents obesos o amb sobrepès han augmentat 10 vegades, han passat d'11

milions l'any 1975 fins a 124 milions l'any 2016. Aquesta xifra significa que el 20% de la població d'entre 5-19 anys té sobrepès o és obesa (World Health Organization, 2021). Aquest fet provoca que a avui en dia també es diagnostiqui DT2 a una edat més prematura (Morigny et al., 2016).

## 2.1. Tipus d'obesitat en humans

La distribució del greix corporal és crucial per estimar el risc de patir malalties associades a l'obesitat. Aquesta distribució pot canviar entre individus depenent del sexe, l'edat, la genètica, l'estat hormonal, altres patologies presents, l'ètnia o en resposta a alguns fàrmacs (Tchkonina et al., 2013; Lin and Li, 2021). Es poden diferenciar dos tipus d'obesitat depenent d'on es trobi localitzat el greix corporal (Gesta et al., 2007; Stefan, 2020):

- **Obesitat central (forma de poma):** Es caracteritza per una acumulació intra-abdominal/visceral del greix, augmentant l'emmagatzematge al voltant de les vísceres en els dipòsits omental, mesentèric i retroperitoneal. És més comú en homes i per això també es coneix com a *obesitat androide*. Els individus que tenen aquesta distribució tenen una major predisposició a patir una resistència a la insulina i intolerància a la glucosa, lligada a un increment de la predisposició a desenvolupar complicacions metabòliques com la DT2 (Figura 2) (Sam, 2018; Stefan, 2020).
- **Obesitat perifèrica (forma de pera):** Es caracteritza per una acumulació subcutània del greix en músculs i malucs. És més comú en dones i per això també es coneix com a *obesitat ginoide*. Al contrari de l'obesitat central, no està tan associada a una resistència a la insulina o a un augment de la intolerància a la glucosa i per tant, els individus amb obesitat perifèrica no es veuen tan afectats per les complicacions metabòliques (Figura 2) (Sam, 2018; Stefan, 2020).

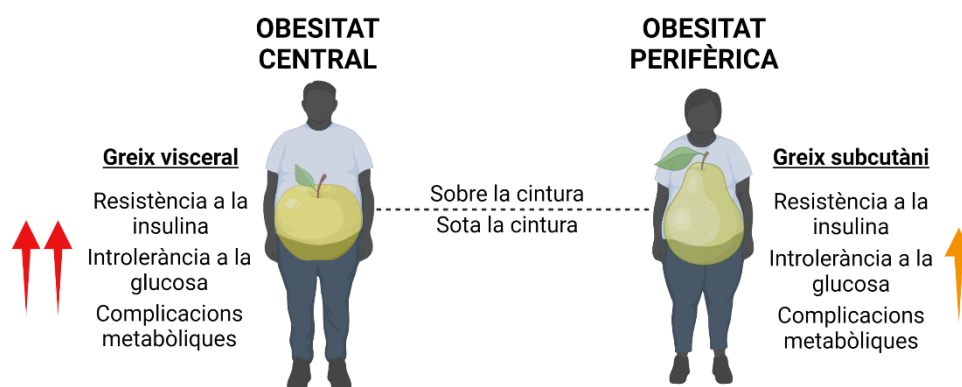


Figura 2. Classificació de l'obesitat en funció de la distribució del greix. Obesitat central i perifèrica

## 2.2. Complicacions de l'obesitat

Com ja s'ha descrit anteriorment, l'obesitat està associada a un major risc de mortalitat, disminuint l'esperança de vida entre 5 i 20 anys depenent de la severitat de les condicions del pacient (Blüher, 2019). Aquest augment de la mortalitat és degut a que l'obesitat predisposa a patir múltiples patologies amb una elevada mortalitat i morbiditat. Les complicacions associades a l'obesitat, a part de la DT2, són la dislipidèmia, problemes cardiovasculars (hipertensió, infart de miocardi i ictus entre d'altres), l'augment del risc de patir càncers (fetge, pròstata, còlon, pit i ovari principalment), problemes respiratoris (asma i apnees), problemes en el sistema immune (inflamació crònica, augment de la susceptibilitat de patir infeccions o mala resposta enfront les vacunes) i l'aparició del fetge gras no alcohòlic (NAFLD, *Non Alcoholic Fatty Liver Disease*). El NAFLD es produeix per l'acumulació ectòpica de greix al fetge provocant una esteatosi, la qual, si no es tracta, progressa i porta al desenvolupament d'una inflamació o esteatohepatitis no alcohòlica (NASH, *non alcoholic steatohepatitis*) que pot induir una fibrosi del fetge i desenvolupar finalment una cirrosi hepàtica (Bertot and Adams, 2016). A més, l'obesitat també redueix la qualitat de vida dels pacients ja que està associada a un augment de problemes musculoesquelètics com l'osteoartritis, la reducció de la fertilitat, la disfunció erèctil i fins i tot un augment de la probabilitat de patir depressió, dèficits cognitius i Alzheimer (Kinlen et al., 2018).

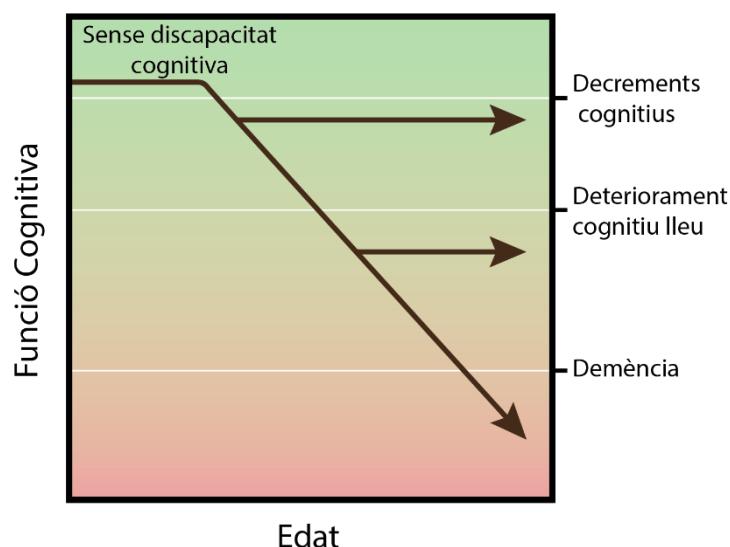
Els problemes respiratoris, cardiovasculars, inflamatoris, etc, també provoquen que les persones obeses siguin una població de més risc en front als problemes derivats de la infecció per COVID-19 (Popkin et al., 2020; Centers for Disease Control and Prevention, 2021; World Obesity Federation, 2021).

### 3. DÈFICITS COGNITIUS EN LA DIABETIS I L'OBESITAT

Tant la diabetis com l'obesitat són malalties que afecten a múltiples òrgans com el fetge, els pulmons, el cor i els ulls, entre d'altres. No obstant, també s'ha descrit que un dels sistemes més afectats és el Sistema Nerviós Central (SNC). La DT2 i l'obesitat estan associades a un deteriorament de la capacitat de l'encèfal per detectar els nivells de glucosa i de regular-ne la seva homeòstasi (Kullmann et al., 2020) però també estan associades a una important disfunció cognitiva (Srikanth et al., 2020).

La disfunció cognitiva es caracteritza per la pèrdua d'habilitats intel·lectuals com són l'aprenentatge, la memòria, la percepció o la capacitat de resoldre problemes. Existeixen diferents nivells de discapacitat cognitiva. Així es pot diferenciar entre la forma més severa, coneguda com a demència, i una forma menys severa, coneguda com a deteriorament cognitiu lleu (DCL). També, existeixen altres formes de discapacitat cognitiva molt més lleus, que moltes vegades són tan subtils que no superen els criteris neurofisiològics per ser considerades una disfunció cognitiva i que es coneixen com a decrements cognitius.

En la demència, la pèrdua de capacitat cognitiva afecta a diferents dominis cognitius (memòria, atenció, capacitats visuals-espaials, capacitats executives i llenguatge) i són prou incapacitants com per impossibilitar les activitats diàries. Les principals causes de la demència són l'Alzheimer i la demència vascular, tot i que n'existeixen moltes altres. En canvi, en el DCL, els dèficits cognitius només afecten a un o dos dominis cognitius i no impossibiliten les activitats quotidianes. El DCL es considera un estadi previ a la demència, ja que, tot i que no totes les persones que el pateixen acaben desenvolupant demència, sí que augmenta la probabilitat de patir-la (Hugo and Ganguli, 2014; Rose Mayeda et al., 2015; Munshi, 2017; Srikanth et al., 2020). La disfunció cognitiva es presenta principalment en edats avançades i el risc es dobla cada 5 anys a partir dels 65 anys d'edat (Figura 3) (Prince et al., 2013; Hugo and Ganguli, 2014; Nichols et al., 2019).



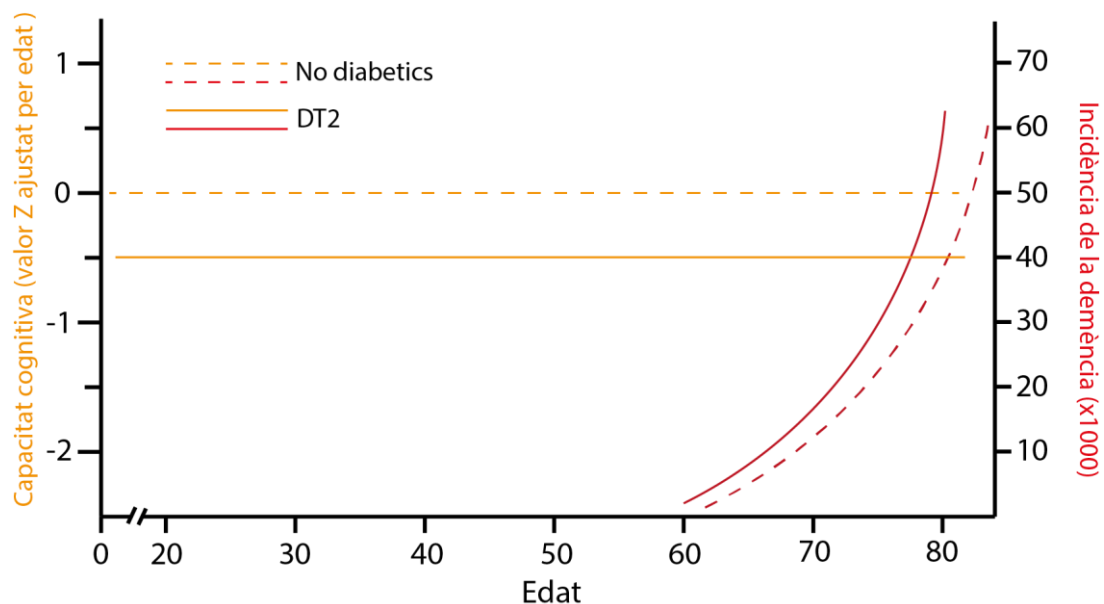
**Figura 3. Model d'evolució de la funció cognitiva amb l'edat.** La pèrdua de la funció cognitiva es pot dividir en tres estadis, i malgrat que assolir-ne un no implica l'assoliment de l'estadi posterior, sí que n'augmenta la probabilitat. Per tant, la disfunció cognitiva es produeix de forma contínua al llarg del temps. En primer lloc, s'assoleix l'estadi de decrements cognitius on només es perden petites capacitats cognitives. Normalment, aquest estadi és molt difícil de ser detectat i per tant no es diagnostica. En segon lloc, hi ha l'estadi catalogat com a deteriorament cognitiu lleu on es produeix la pèrdua d'un o màxim dos dominis cognitius, però es pot seguir desenvolupant una vida quasi normal. Finalment, s'assoleix la demència, l'últim estadi del deteriorament cognitiu, on s'experimenta la pèrdua de varis dominis cognitius i que afecta de forma molt directa al dia a dia. Amb l'edat també augmenta la probabilitat de patir una pèrdua de la funció cognitiva.

Es calcula que actualment el 6% de les persones més grans de 60 anys pateixen DCL i un 5% pateix demència. La prevalença de la disfunció ha augmentat en els últims anys degut a l'envelliment progressiu de la població. Es va calcular que entre el 1990 i el 2016 la població mundial d'individus amb demència va augmentar un 117%, passant de 20,2 milions de casos a 43,8 milions (Nichols et al., 2019). A més, la previsió és que aquesta xifra s'enfilí fins als 78 milions l'any 2030 (Gauthier et al., 2021).

### 3.1. El deteriorament cognitiu en la diabetis

Els estudis epidemiològics han demostrat que la DT2 augmenta en més d'un 50% el risc de patir DCL i/o demència. Això provoca que de mitjana les persones amb DT2 presentin demència o DCL en edats més primerenques en comparació amb persones sanes (Figura 4) (Biessels et al., 2014; Xue et al., 2019; Srikanth et al., 2020). A més, s'ha observat que la DT2 també està associada a patir decrements cognitius (Figura 4). Normalment, l'avaluació de les capacitats cognitives es fa mitjançant el rendiment cognitiu, que es calcula mitjançant diferents tests que avaluen una o varies funcions cognitives. El conjunt de resultats de tots aquests tests s'expressen mitjançant el valor Z. Aquest valor fa referència a quant de desviats es troben els valors obtinguts respecte la mitjana de la població testada. Estudis en pacients diabètics han demostrat que, de mitjana, la seva funció cognitiva es troba entre 0.3 i 0.5 valors Z per sota de la

població sana. Les persones amb demència tenen com a mínim 2 valors Z per sota i les persones amb DCL entre 1-2 valors Z (Srikanth et al., 2020). Mentre que la demència i la DCL afecten principalment a pacients diabètics d'edat avançada, els decrements cognitius associats a la diabetis són presents a qualsevol edat (Jan Biessels and Despa, 2018). De fet, els processos patològics que provoquen els decrements cognitius i la demència són diferents però additius, és a dir, els mecanismes que provoquen els decrements cognitius redueixen el llindar en què la demència comença a ser simptomàtica (Biessels et al., 2014).



**Figura 4. Trajectòries de la capacitat cognitiva en la diabetis tipus 2.** De mitjana, els pacients amb DT2 presenten una lleugera reducció de la capacitat cognitiva (línies grogues) en comparació amb els individus sans. Per aquest motiu es considera que els pacients diabètics tenen decrements cognitius. Aquesta petita pèrdua de la capacitat cognitiva és present a qualsevol edat. A més, la DT2 també està associada a un augment del risc de patir demència (línies vermelles) que afecta principalment a persones d'edat avançada. En el cas de les persones amb DT2, la simptomatologia de la demència apareix abans que en persones sanes.

Aquests decrements cognitius poden ser el resultat de l'atrofia de l'encèfal observada en els pacients diabètics. Es calcula que la diabetis és capaç de produir una reducció de l'encèfal d'un 0,5 a un 2% respecte a individus no diabètics, afectant a diverses zones (Saczynski et al., 2009; de Bresser et al., 2010; Espeland et al., 2013; Falvey et al., 2013). L'aparició d'aquesta atrofia es produeix ja en estadis prediabètics i estudis longitudinals han demostrat que la seva evolució és molt lenta. Aquest fet permetria explicar perquè els decrements cognitius apareixen ja en els estadis prediabètics però en canvi no es produeix un augment de la discapacitat cognitiva a mesura que

evoluciona la malaltia (de Bresser et al., 2010; van den Berg et al., 2010; Yaffe et al., 2012).

La neuropatologia associada a la diabetis agreuja el control de la malaltia per part dels pacients. Com a resultat, els individus amb DT2 que presenten un deteriorament cognitiu tenen una freqüència de complicacions i d'hospitalitzacions relacionades amb la diabetis més elevada. Per tots aquests motius, des de l'any 2014 ja existeixen guies mèdiques enfocades a detectar i tractar el més aviat possible els problemes cognitius en els pacients diabètics (Srikanth et al., 2020).

Tot i que l'associació entre la DT2, els dèficits cognitius i l'atrofia de l'encèfal és molt clara, existeix un gran desconeixement dels processos patològics a nivell cel·lular que relacionen aquests dos fets. S'ha observat que els pacients amb DT2 i deteriorament cognitiu no tenen incrementats els marcadors neuropatològics típics de la malaltia de l'Alzheimer tals com la presència de plaques amiloides o *tangles* neurofibrilars (creats per la proteïna tau hiperfosforilada) (Abner et al., 2016; dos Santos Matioli et al., 2017). Per aquest motiu, es considera que els processos neurodegeneratius implicats en la DT2 són diferents als mecanismes de l'Alzheimer (Jan Biessels and Despa, 2018). A nivell cel·lular existeixen altres alteracions que poden estar relacionades amb el dèficit cognitiu, com poden ser l'estrès de reticle endoplasmàtic (Lu et al., 2011), l'augment de la permeabilitat de la barrera hematoencefàlica (Tucsek et al., 2014), els defectes mitocondrials i/o l'augment de l'estrès oxidatiu (Morrison et al., 2010), el dipòsit de plaques d'amilina agregats en les parts de la barrera hematoencefàlica (Ly et al., 2017), així com també la neuroinflamació i la resistència a la insulina. Totes aquestes alteracions poden ser causa i/o conseqüència l'una de l'altra i són capaces de donar lloc al dany neuronal.

Com ja s'ha explicat la DT2 està associada a un procés inflamatori crònic que també es produeix a nivell cerebral (Muriach et al., 2014). El procés inflamatori a l'encèfal està regulat per la microglia, que són les cèl·lules del sistema immune innat residents en aquest teixit, i pels astròcits, que tenen la funció de mantenir i fer de suport a les neurones. Ara bé, davant de certs estímuls produïts per les neurones o per la microglia aquestes cèl·lules tenen la capacitat d'activar-se. Per tant, la neuroinflamació es caracteritza per una microgliosi i una astrogliosi que pot provocar un dany neuronal. (Guillemot-Legrís and Muccioli, 2017).

D'altra banda, cada vegada existeixen més evidències que indiquen que el procés de resistència a la insulina no és exclusiu dels teixits perifèrics i també es pot

donar a l'encèfal. El receptor de la insulina s'expressa a moltes zones de l'encèfal, entre elles a l'hipocamp (Hill et al., 1986; Marks et al., 1990), on aquesta hormona hi desenvolupa principalment funcions que tenen a veure amb el procés cognitiu. De fet, s'ha demostrat que la infusió d'insulina intranasal en persones i ratolins sans millora la seva funció cognitiva (Park et al., 2000; Benedict et al., 2004). El procés de resistència a la insulina tant pot estar associat a una reducció del transport de la insulina a través de la barrera hematoencefàlica (BHE), ja que la insulina es produeix principalment al pàncrees, com també a una pèrdua de la sensibilitat de les cèl·lules envers aquesta hormona (Banks et al., 2012). La pèrdua de sensibilitat a la insulina es pot donar a diferents nivells de la via de senyalització, tant en el receptor com en qualsevol de les proteïnes que formen part de la via de senyalització (Arnold et al., 2014; Jan Biessels and Reagan, 2015).

### **3.2. El deteriorament cognitiu en l'obesitat**

Les evidències que demostren la relació de l'obesitat i la disfunció cognitiva també són molt sòlides, però en aquest cas hi té molta rellevància l'edat de l'individu. Un IMC elevat en edat adulta està associat a un increment del risc de patir problemes neurològics en etapes posteriors de la vida (Whitmer et al., 2005; Beydoun et al., 2008). S'ha demostrat que l'IMC de l'individu a l'edat adulta és capaç de predir la pèrdua de matèria gris de l'encèfal, principalment del lòbul frontal i de les regions subcorticals de l'hipocamp (Raji et al., 2010). En canvi, un IMC elevat en la vellesa sembla que fins i tot ofereix protecció contra la disfunció cognitiva (Hughes et al., 2009; Kim et al., 2016). A més, cada vegada hi ha més nens i adolescents obesos, i s'ha demostrat que el seu rendiment cognitiu és menor (Yau et al., 2012; Liang et al., 2014a).

Els mecanismes que permeten explicar el procés neurodegeneratiu en persones obesos són els mateixos o molt similars als de les persones amb DT2. Molts pacients obesos acaben desenvolupant DT2 i viceversa i per tant, es fa difícil estudiar quins mecanismes neuropatològics són provocats per una patologia o per l'altra (Jan Biessels and Reagan, 2015).



#### 4. TRACTAMENTS ACTUALS PER LA DIABETIS I L'OBESITAT

Està àmpliament descrit que el control de l'obesitat pot millorar el tractament de la DT2 i fins i tot retardar la progressió de la malaltia (Diabetes Prevention Program Research Group, 2002; Jackness et al., 2013; Webb and Wadden, 2017). En pacients amb sobrepès o obesos diagnosticats amb DT2, s'ha demostrat que una pèrdua de pes modesta i mantinguda, mitjançant un augment de l'activitat física i una disminució de la ingesta, millora el control de la glucèmia i redueix la necessitat de l'ús de medicaments hipoglucemiants (UKPDS Group, 1990; Pastors et al., 2002; Webb and Wadden, 2017). Ara bé, quan aquestes estratègies no funcionen, és necessària la utilització de tractaments farmacològics que dependran de cada tipus de pacient. És important indicar que un bon control de la glucèmia, juntament amb un estil de vida saludable i una medicació eficaç en els casos que sigui necessari, permet que les persones amb DT2 puguin gaudir d'una vida més llarga i saludable (American Diabetes Association, 2021b).

Pel que fa a la disfunció cognitiva associada a la diabetis i l'obesitat, s'ha demostrat que fer exercici (Baker et al., 2010) o tenir una dieta més saludable redueix també el risc de patir demència (Clegg et al., 2011; van den Brink et al., 2019). A dia d'avui, s'estan realitzant molts assajos clínics per tal de provar l'eficàcia dels fàrmacs antidiabètics per tractar els dèficits cognitius associats a aquestes malalties. Els resultats obtinguts fins el moment però, són contradictoris i heterogenis perquè entre d'altres factors, moltes vegades no es té en compte ni la severitat ni el temps que el pacient ha estat diagnosticat amb DT2 (Biessels et al., 2014). Així, malgrat que hi ha fàrmacs que han demostrat tenir algun efecte en la disfunció cognitiva associada a la diabetis i l'obesitat, aquesta segueix sent impossible de prevenir i de curar (Gaspar et al., 2015).

S'ha de tenir en compte que tots els estudis de tractament de la disfunció cognitiva associada a la diabetis o a l'obesitat s'han fet amb fàrmacs específics per tractar els altres símptomes d'aquestes malalties. És a dir, no s'ha provat l'eficàcia que podrien tenir altres fàrmacs específics pel tractament de malalties neurodegeneratives (Srikanth et al., 2020). En canvi, molts fàrmacs aprovats pel tractament de la diabetis sí que estan sent provats com a possibles teràpies per la malaltia de l'Alzheimer, al considerar que aquesta malaltia té algunes característiques semblants a la DT2 com la resistència a la insulina a nivell central (Kellar and Craft, 2020).

#### 4.1. Teràpies actuals pels pacients diabètics tipus 2

L'objectiu dels tractaments per la DT2 és el de disminuir els nivells de glucosa en sang. Als pacients diabètics diagnosticats per primera vegada se'ls recomana una teràpia basada en els canvis dels hàbits alimentaris, en l'augment de l'activitat física i en deixar de fumar. Només aquests tres fets redueixen clarament el risc de la progressió de la intolerància a la glucosa i la resistència a la insulina (American Diabetes Association, 2021c). Si aquests canvis en l'estil de vida no són suficients, aleshores és quan es recorre a l'ús de fàrmacs que tenen la capacitat de reduir els nivells de glucosa en sang. En el cas que el tractament amb un dels fàrmacs no aconsegueixi normalitzar els valors de glucèmia en 3 mesos, la recomanació és afegir un segon fàrmac. Si tot i així els marcadors diabètics no es normalitzen, aleshores la recomanació és afegir al tractament l'administració de múltiples dosis d'insulina exògena (Inzucchi et al., 2012; American Diabetes Association, 2021b). Tot i que tenir un bon control glicèmic redueix el risc de patir la majoria de les complicacions associades amb la diabetis, s'ha demostrat que tenir un control de la glucèmia no genera cap millora de la funció cognitiva o del volum de l'encèfal (Launer et al., 2011; Murray et al., 2017).

Els fàrmacs disponibles a dia d'avui pel tractament de la DT2 són la *Metformina*, les sulfonilurees, les tiazolidinediones (TZD), els agonistes del *glucagon-like peptide 1 receptor* (GLP1R), els inhibidors de la *dipeptidyl peptidase 4* (DPP4) i els inhibidors de *sodium/glucose cotransporter* (SGLT2). De tots ells, el més utilitzat és la *Metformina* ja que és el més segur, barat i efectiu sobretot en estadis inicials de la malaltia. Els mecanismes d'acció de cada fàrmac són diferents però les estratègies utilitzades es basen principalment en augmentar la sensibilitat a la insulina per part dels teixits, principalment múscul esquelètic i fetge (*Metformina*, TZD, agonistes de GLP1R, inhibidors de DPP4), en millorar la secreció d'insulina (Sulfonilurees, agonistes de GLP1R, inhibidors DPP4), en inhibir la gluconeogènesi hepàtica (Sulfonilurees) i en augmentar l'excreció de glucosa per part del ronyó (inhibidors de SGLT2).

S'ha provat l'eficàcia d'alguns d'aquests fàrmacs pel tractament o la prevenció de la disfunció cognitiva associada amb la DT2. En pacients amb DT2, la *Metformina* i les sulfonilurees han sigut incapaces de produir cap efecte en la prevalença de la demència o en canvis estructurals a nivell cerebral (Weinstein et al., 2019). En canvi, en pacients no diabètics diagnosticats amb DCL, l'ús de *Metformina* diària durant 12 mesos va demostrar una millora en la capacitat cognitiva (Luchsinger et al., 2016). El *Liraglutide*®, un antagonista de GLP1R, és un dels fàrmacs dels que es tenen millors resultats pel que fa al tractament de la pèrdua de capacitat cognitiva associada a la

diabetis i l'obesitat. Malgrat que existeixen estudis contradictoris, el *Liraglutide*® ha demostrat prevenir o atenuar els dèficits neuronals i cognitius associats a la DT2. Els mecanismes que podrien explicar aquest fet és la capacitat dels agonistes de GLP1 de reduir la neuroinflamació, augmentar la neurogènesi i protegir la neurona de la mort cel·lular (Duarte et al., 2013; Candeias et al., 2015; Kellar and Craft, 2020). En l'actualitat, s'està duent a terme un assaig clínic en el que es vol estudiar l'eficàcia del tractament diari de *Liraglutide*® durant 12 mesos pel tractament de l'Alzheimer (NCT01843075, [www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov)).

Quan la patologia de la DT2 es troba molt avançada i hi ha hagut una disminució de la massa de cèl·lules  $\beta$ , el tractament necessita també una teràpia de reemplaçament amb insulina exògena. El tractament amb la insulina es pot fer mitjançant diferents estratègies com la insulina basal, el bolus d'insulina, la insulina pre-barrejada, els productes concentrats d'insulina o la insulina inhalada, depenent de les necessitats de cada pacient (American Diabetes Association, 2021b). S'ha de tenir en compte però, que l'administració d'insulina exògena s'ha de fer amb molta precaució ja que pot induir estadis d'hipoglucèmia severa i un increment del pes corporal (Turner et al., 1999). S'ha demostrat que l'administració d'insulina exògena millora els defectes cognitius (Kern et al., 2001). En aquest sentit, l'administració d'insulina intranasal és capaç de millorar les capacitats cognitives en persones sanes i en persones amb DCL i Alzheimer (Benedict et al., 2004, 2006; Claxton et al., 2013, 2015; Craft et al., 2020). En canvi, aquests efectes no es reproduïen pel tractament de la disfunció cognitiva associada a la diabetis i l'obesitat (Kellar and Craft, 2020).

#### **4.2. Teràpies actuals pels pacients obesos**

El principal objectiu dels tractaments per l'obesitat és la pèrdua de pes. Malgrat que la primera intervenció es basa en realitzar canvis en l'estil de vida i té un efecte modest però significatiu, la majoria de pacients només perd, de mitjana, un 4% del pes corporal al cap de 4 anys (Torgerson et al., 2004). Per aquest motiu és necessari que aquests canvis de l'estil de vida vagin acompanyats per tractaments farmacològics o fins i tot de cirurgia (Dyson, 2010). Es recomana iniciar un tractament farmacològic en pacients amb sobrepès que presentin un IMC superior o igual a 27 amb alguna comorbiditat persistent o en pacients obesos amb un IMC superior a 30. S'ha de tenir en compte que la farmacoteràpia és només un complement ja que cap fàrmac induïx la pèrdua involuntària i substancial de pes. Es considera que un fàrmac és eficaç contra l'obesitat quan permet reduir entre el 3-5% del pes corporal al cap de 3 mesos (American Diabetes Association, 2021c, 2021d).

Actualment, existeixen 6 fàrmacs aprovats pel tractament de l'obesitat que es poden adaptar segons les necessitats individuals de cada pacient (American Diabetes Association, 2021d). Només un dels fàrmacs s'utilitza com a tractament a curt termini, l'agonista del receptor de la noradrenalina, *Fentermina*. La resta de fàrmacs s'utilitzen com a tractament a llarg termini i són els agonistes de GLP-1 (*Liraglutide*® i *Semaglutide*®) (Pi-Sunyer et al., 2015; Kushner et al., 2020), l'inhibidor de la lipasa gàstrica i pancreàtica (*Orlistat*®) (Sumithran and Proietto, 2014), les combinacions duals de *Fentermina* amb inhibidors de l'anhidrasa carbònica (*Topiramaf*) (Verrotti et al., 2011) i antagonistes dels opioïdes combinats amb antidepressius (*Naltrexone-bupropion*) (Greenway et al., 2010). Fins fa molt poc també estava aprovat l'ús de l'agonista del 5-hydroxytryptamina receptor 2C (5-HT<sub>2C</sub>) (*Lorcaserin*®), però recentment la FDA (*Food and Drug Association*) ha sol·licitat la seva eliminació degut a que està relacionat amb un increment en el risc de patir diferents tipus de càncer (Sharretts et al., 2020).

Els tractaments farmacològics esmentats tenen com a objectiu reduir la ingesta d'energia. Tots els fàrmacs esmentats menys *l'Orlistat*®, que té la capacitat de limitar l'absorció de greix a l'intestí, actuen a nivell central i tenen la capacitat d'activar neurones que desenvolupen funcions anorexigèniques, és a dir, que tenen la capacitat d'incrementar la sacietat. El major inconvenient d'aquests fàrmacs és que a l'actuar sobre el SNC poden generar problemes d'addicció, com la *Fentermina*, o afectar l'estat d'ànim i augmentar la probabilitat de suïcidi, com la combinació d'antidepressius *Naltrexone-bupropion*

Una altre acció terapèutica és la cirurgia bariàtrica que cada vegada està sent més utilitzada com alternativa als tractaments farmacològics per la seva ràpida eficàcia. Aquestes cirurgies es basen en realitzar canvis en el sistema digestiu per intentar limitar la quantitat de menjar que es consumeix o per reduir la capacitat del cos per absorbir els nutrients. Aquest tipus de cirurgia està recomanada per pacients obesos severos amb un IMC superior a 40. Un dels factors que afavoreix molt la seva utilització és que la mortalitat de la cirurgia es troba per sota de l'1% mentre que s'aconsegueixen pèrdues de pes d'un 25-30% amb una ràpida normalització dels nivells glucèmics i de la pressió sanguínia. Tot i així, també comporta algunes desavantatges, com el fet que els pacients amb cirurgia bariàtrica han de seguir una dieta molt restrictiva, nutricionalment pobre i sense fruita ni vegetals. A més, existeix un risc afegit en els pacients que perden pes molt ràpidament, ja que el 38% d'aquests presenten càlculs biliars (Morais et al., 2016). Després de la cirurgia, els pacients tenen que millorar el seu estil de vida ja que sinó, els pacients experimenten una pèrdua de pes significativament durant els primers 18-24

mesos, un període que es coneix com a *lluna de mel*, però entre el 17 i el 64% dels pacients tornen a guanyar pes després d'aquest període ja que tornen a realitzar hàbits no saludables (Odom et al., 2010; Livhits et al., 2011; Tamboli et al., 2014; Weber and Chand, 2018).

Malgrat tots els tractaments descrits, cap d'ells és del tot eficaç i tots ells presenten efectes secundaris a tenir en compte. Per aquesta raó, el desenvolupament de noves teràpies pel tractament de l'obesitat, i la DT2, amb una eficàcia millorada i una acció sostinguda en el temps és un dels principals desafiaments actuals.

Una de les estratègies terapèutiques que esta sent més explorada és basa en l'augment de la despesa energètica mitjançant la termogènesi no associada a tremolor. Aquesta estratègia terapèutica està contraposada a l'estratègia que utilitzen els fàrmacs actuals que es centren principalment en la disminució del consum d'energia. La termogènesi no associada a tremolor es un procés mitjançant el qual l'organisme és capaç de generar calor sense augmentar l'activitat dels músculs (Betz and Enerbäck, 2017; Hussain et al., 2020). Aquest tipus de termogènesi és pot dur a terme gràcies als adipòcits marrons, ja que tenen la capacitat de generar calor a partir de l'energia sobrant dels processos catabòlics. La constant necessitat de generar calor acaba provocant que augmenti la despesa d'energia. Per tant, el procés de termogènesi no associada a tremolor implica l'activació del teixit adipós marró (BAT, *brown adipose tissue*) i el *browning* del teixit adipós blanc (WAT, *white adipose tissue*) que és el procés mitjançant el qual els adipòcits blancs es diferencien a adipòcits marrons, o també coneguts com adipòcits beige en el WAT de la zona inguinal/subcutània (un dipòsit ric en adipòcits blancs) (Smith and Hock, 1963; Wu et al., 2012).

En condicions fisiològiques, un dels mecanismes que pot activar aquest procés termogènic és l'exposició al fred. Així, degut a les baixes temperatures, es produeix una activació de l'hipotàlem que genera com a resposta un augment de l'activitat del sistema nerviós simpàtic en els dipòsits adiposos. Aquesta activació comporta que en les sinapsis dels nervis simpàtics es produeixi l'alliberament de la norepinefrina que és capaç d'activar els receptors  $\beta$ -adrenèrgics dels adipòcits marrons i dels adipòcits blancs provocant un activació de la termogènesi i el *browning*, respectivament (Ueta et al., 2012; Wu et al., 2012).

## 5. FACTOR DE CREIXEMENT DE FIBROBLASTS 21 (FGF21)

El factor de creixement de fibroblasts 21 (FGF21) és una hormona peptídica que, en condicions fisiològiques, té la capacitat de regular l'adaptació de tot l'organisme a diferents condicions estressants com la restricció calòrica, l'exposició al fred i el consum excessiu de carbohidrats. L'any 2005, es van descriure per primera vegada les seves capacitats per induir un augment de la captació de glucosa *in vitro* (Kharitononkov et al., 2005), i des d'aleshores diferents estudis han portat a considerar el FGF21 com una hormona amb capacitat per tractar l'obesitat, la DT2 i les seves comorbiditats, com el NASH (Fisher et al., 2014), les malalties cardíaques (Planavila et al., 2015) o els dèficits cognitius (Sa-nguanmoo et al., 2016a). L'augment farmacològic dels nivells de FGF21 circulants en ratolins provoca un augment de la despesa energètica i una millora de la sensibilitat a la insulina, reduint els nivells de glucosa en sang i millorant el perfil lipídic tant a nivell sèric com a nivell hepàtic, originant una pèrdua del pes corporal (Coskun et al., 2008; Xu et al., 2009a; Jimenez et al., 2018).

### 5.1. Família de factors de creixement de fibroblasts

El FGF21 forma part de la família de factors de creixement de fibroblasts (FGFs, *Fibroblast Growth Factors*) que està formada per 22 proteïnes (del FGF1 al FGF23, el FGF15 i el FGF19 són ortòlegs). Quan s'uneixen al seu receptor (FGFRs, *Fibroblast Growth Factor Receptors*), els FGFs tenen la capacitat de regular una gran quantitat de processos, entre els que destaquen el creixement i la diferenciació cel·lular, la modulació metabòlica, la reparació tissular i la resposta inflamatòria (Itoh and Ornitz, 2004; Kelleher et al., 2013; Ornitz and Itoh, 2015). En funció de la seva homologia i filogènia, els membres de la família es poden dividir en 7 subfamílies: la subfamília del FGF1, la del FGF4, la del FGF7, la del FGF9, la del FGF8, la del FGF11 i la del FGF19 (Itoh and Ornitz, 2004).

La majoria dels membres de la família FGF presenten una gran afinitat per l'heparina, una de les proteïnes que formen la matriu extracel·lular. Per tant, aquesta gran afinitat provoca que molts dels FGFs no puguin escapar-se de la matriu extracel·lular i que les seves funcions siguin únicament autocrines o paracrines i que a més necessitin l'heparan sulfat com a cofactor. Les accions autocrines i paracrines d'aquests membres són regular la proliferació i la diferenciació cel·lular, sobretot durant l'estadi embrionari. En canvi, la subfamília FGF19, formada per FGF19 (l'ortòleg murí de FGF15 humà), FGF21 i FGF23 presenta una afinitat menor per l'heparan sulfat i per tant, poden alliberar-se de la matriu extracel·lular i viatjar pel torrent circulatori per actuar

de forma endocrina. Aquesta subfamília també presenta una unió més dèbil amb els receptors FGFRs i per aquest motiu necessiten un co-receptor per actuar,  $\beta$ -Klotho (KLB) en el cas de FGF19 i FGF21 i Klotho en el cas de FGF23. Les funcions principals d'aquests 3 membres són la regulació de l'homeòstasi de la glucosa, dels àcids biliars, del colesterol, de la vitamina D i del fòsfat (Goetz et al., 2007; Ornitz and Itoh, 2015; Kuro-o, 2018).

## 5.2. Expressió del FGF21

El fetge és el principal responsable dels nivells circulants de FGF21 tot i que també hi ha altres teixits que l'expressen, com el pàncrees, el teixit adipós, el múscul esquelètic o fins i tot l'encèfal (Nishimura et al., 2000). Ara bé, en tots aquests altres teixits que l'expressen, aquesta hormona té una funció autocrina o paracrina i només augmenten la seva expressió en condicions patològiques (Fisher and Maratos-Flier, 2016; Staiger et al., 2017).

El gen *FGF21* presenta una gran homologia entre els mamífers i a més entre els rosegadors i els humans la seqüència d'aminoàcids té una similitud del 75% (Fisher and Maratos-Flier, 2016a; Nishimura et al., 2000) però, tant els teixits com els estímuls que provoquen un canvi en l'expressió de *FGF21* poden variar entre espècies (Staiger et al., 2017)

L'expressió hepàtica del *FGF21* augmenta principalment quan apareix una situació d'estrès nutricional com pot ser el dejú (Badman et al., 2007; Inagaki et al., 2007; Gälman et al., 2008), l'augment de consum de carbohidrats i d'etanol (Inagaki et al., 2007; Desai et al., 2017; Lundsgaard et al., 2017) o la restricció proteica (Laeger et al., 2014; Maida et al., 2016). També s'ha vist que l'exercici és capaç d'induir l'expressió del *FGF21* (Kim et al., 2013) així com també la presència d'alguns fàrmacs com els agonistes de PPAR $\alpha$  o algunes hormones com el glucagó (Arafat et al., 2013). A més, s'ha demostrat que els nivells de FGF21 presenten un ritme circadià, augmentant, en el cas dels humans, durant la nit (quan hi ha períodes llargs de dejú) i disminuint durant el dia (Oishi et al., 2008; Yu et al., 2011). Al teixit adipós, l'expressió del *FGF21* es produeix també en períodes de dejú o quan hi ha una exposició al fred (Hondares et al., 2011; Oishi et al., 2011; Dutchak et al., 2012; Lee et al., 2014), i al múscul esquelètic, l'augment de l'expressió es produeix principalment com a resposta a l'exercici. A més, els nivells circulants del FGF21 també augmenten en presència d'algunes patologies com és el cas de l'obesitat (Dushay et al., 2010), el fetge gras (Dushay et al., 2010; Yan et al., 2011), malalties òssies (Li et al., 2015), malalties musculars i mitocondrials

(Suomalainen et al., 2011), pancreatitis (Shenoy et al., 2016) i lipodistròfies (Miehle et al., 2016). Per aquest motiu, actualment el FGF21 es postula com un possible biomarcador de certes patologies (Keuper et al., 2020).

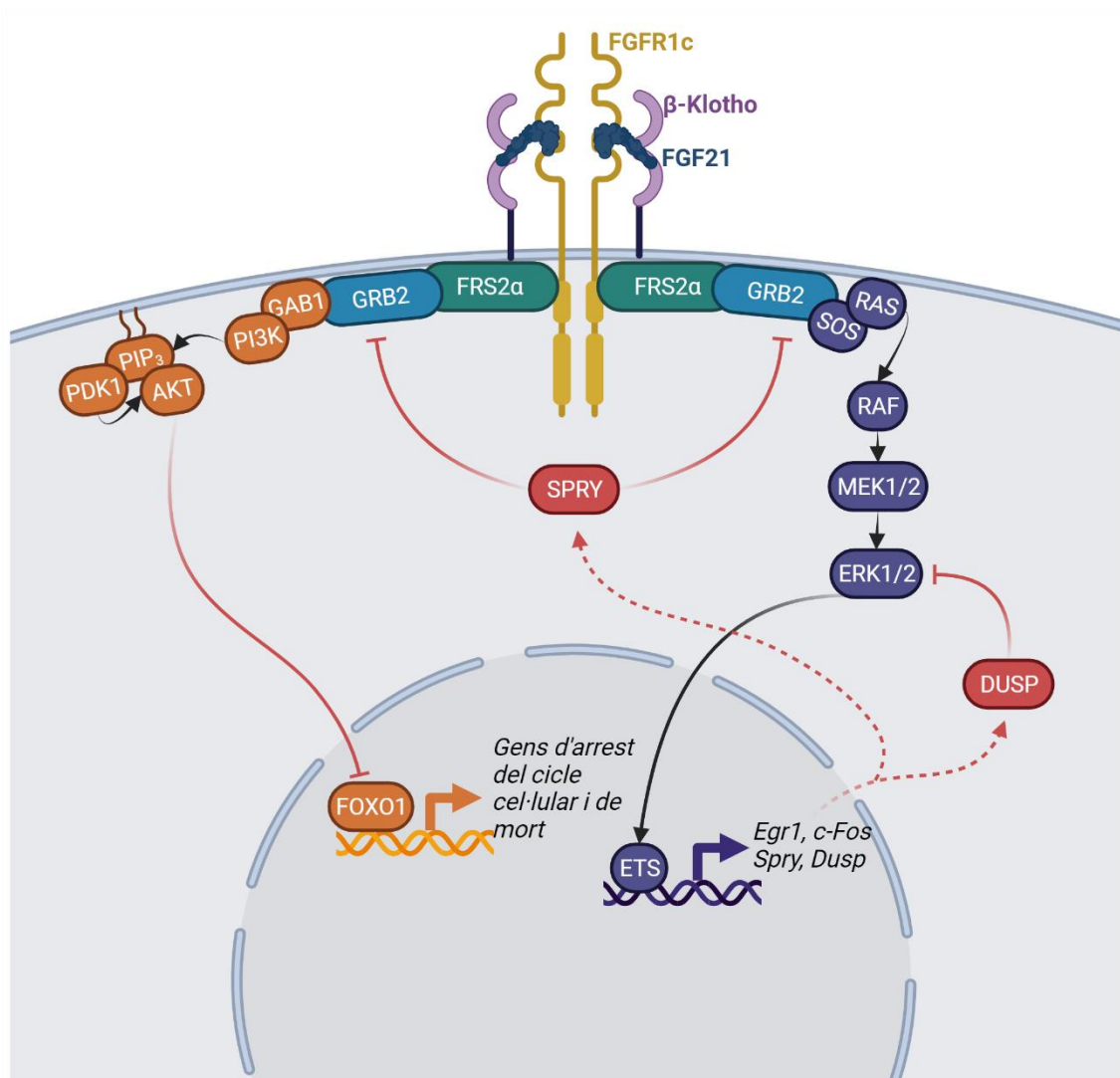
### 5.3. Senyalització del FGF21

La senyalització del FGF21 depèn de la seva unió a FGFRs i a KLB. El FGF21 activa múltiples FGFRs, incloent FGFR1c, 2c, 3c i 4 (Kurosu et al., 2007; Kharitonov et al., 2008). Entre tots ells, FGFR1c és el que sembla tenir una major importància per les accions del FGF21 *in vivo* (Adams et al., 2013a). Aquest receptor però es troba àmpliament expressat per tot l'organisme. Per aquest motiu, l'especificitat de teixit de l'acció del FGF21 la dona el KLB, sense el qual no es pot activar la via de senyalització. El KLB s'expressa al teixit adipós, al fetge (tot i que en aquest òrgan l'expressió de FGFR1c és baixa) (Kurosu et al., 2007), al pàncrees endocrí i exocrí (Johnson et al., 2009), i a certes regions de l'encèfal (Bookout et al., 2013; Sun et al., 2020).

La unió del FGF21 amb els receptors permet la formació del complex FGFR/KLB i que aquest dimeritzi amb un altre complex FGFR/KLB, formant així un homodímer (Ming et al., 2012). D'aquesta manera s'activa el domini tirosina quinasa del FGFR i es produeix l'autofosforilació en 6 residus (Furdui et al., 2006; Lew et al., 2009). Aquestes fosforilacions permeten la unió de la proteïna adaptadora *FGFR substrate 2 $\alpha$*  (FRS2 $\alpha$ ) que és fosforilada pel receptor. La fosforilació permet la unió del *Growth factor receptor-bound 2* (GRB2) a FRS2 $\alpha$  (Kouhara et al., 1997) a partir d'aquí, GRB2 és capaç d'activar la via PI3K-PDK1-AKT (Fosfatidil inositol 3 quinasa - Piruvat deshidrogenasa quinasa 1 – AKT Serina/treonina quinasa) mitjançant el reclutament de GAB1 i d'activar la via de RAS-ERK1/ERK2 MAPK (Proteïnes derivades del virus del sarcoma de ratolí – Quinases regulades extracel·lularment 1 i 2 i Proteïna quinasa activada per mitògens) mitjançant el reclutament de SOS (Figura 5) (Lamothe et al., 2004).

Entre moltes altres accions, la via PI3K-PDK1-AKT permet inhibir l'activitat de proteïnes diana com ara FOXO1 (Forkhead box protein O1) (Figura 5) (Manning and Cantley, 2007) i la via RAS-ERK1/ERK2 MAPK permet l'expressió de gens com *cFos* i *Egr1*, mitjançant l'activació del factor de transcripció *E26 transformation-specific* (ETS) (Hodge et al., 1998; Ge et al., 2011). Es fa difícil discernir quina participació té cada via en cadascuna de les accions que fa FGF21 a la cèl·lula, ja que a part de tenir accions complementàries, la mateixa via pot tenir respostes diferents depenent del teixit.





**Figura 5. Senyalització de FGF21.** La unió del FGF21 al receptor FGFR1c i al coreceptor  $\beta$ -klotho permet que aquest complex es dimeritzi. FRS2 $\alpha$  pot unir-se a un d'aquells residus fosforilats i actuar com a proteïna *scaffold* al mateix temps que també és fosforilada pel receptor. A FRS2 $\alpha$  fosforilada se li uneix la proteïna GRB2 que pot activar la via RAS-ERK1/ERK2 MAPK mitjançant el reclutament de les proteïnes RAS i SOS. Com a resultat de l'activació d'aquesta via es produeix la transcripció de gens *Egr1*, *c-Fos*, *Spry* o *Dusp4*, entre d'altres gràcies a l'activació del factor de transcripció ETS. DUSP i SPRY actuen de *feedback* negatiu de la via en diferents punts. Al mateix temps, GRB2 també pot activar la via PI3K-PDK1-AKT mitjançant el reclutament de GAB1. Una vegada AKT s'activa, és capaç de fosforilar una gran quantitat de substrats entre els que destaquen FOXO1. La fosforilació de FOXO1 per part d'AKT provoca la seva inhibició degut a que indueix que surti del nucli de la cèl·lula i no pugui actuar com a factor de transcripció.

La via RAS-ERK1/ERK2-MAPK també té sistemes d'autoinhibició. Concretament, el factor de transcripció ETS permet l'expressió dels gens *Spry* i *Dusp*. El gen *Spry* codifica per la proteïna Sprouty que és capaç d'interactuar amb GRB2 i inhibir la via RAS-ERK1/ERK2 MAPK i la via PI3K-PDK1-AKT (Thisse and Thisse, 2005; Guy et al., 2009). El gen *Dusp* codifica per la proteïna *Dual-specificity phosphatase*

(DUSP) que és capaç de defosforilar ERK1/ERK2 (Ekerot et al., 2008; Owen et al., 2014).

Tot i així, la via de senyalització de FGF21 encara no es coneix completament, per tant, altres gens poden tenir també un paper important en les seves funcions, sobretot a l'encèfal.

#### **5.4. Funcions del FGF21 a l'encèfal**

El FGF21 es pot expressar a l'encèfal (Mäkelä et al., 2014; Staiger et al., 2017) i a més, s'ha demostrat que el FGF21 circulant pot travessar la BHE per difusió passiva i accedir a l'encèfal (Hsuchou et al., 2007; Tan et al., 2011). Els receptors del FGF21 també s'expressen a l'encèfal, i més concretament, a l'hipotàlem, al bulb raquidi (Bookout et al., 2013) i recentment s'han aportat evidències de l'expressió de KLB a certes zones de l'hipocamp, l'amígdala i del còrtex (Hultman et al., 2019; Kang et al., 2020a; Marcela Santos et al., 2020; Sun et al., 2020). Totes aquestes evidències indiquen que el FGF21 té múltiples accions a l'encèfal. S'ha descrit que aquesta hormona té efectes sobre la regulació de la despesa energètica, la preferència per macronutrients, la fertilitat, el ritme circadià i la capacitat cognitiva. La majoria d'estudis però s'han fet en ratolins, i per tant moltes d'aquestes funcions no es coneix si es reproduïxen d'igual manera en humans (Staiger et al., 2017).

##### **5.4.1. Funcions de FGF21 a l'hipotàlem**

El FGF21 és capaç de senyalitzar a les neurones de l'hipotàlem. Aquesta regió de l'encèfal es una de les estructures més importants i, malgrat la seva mida reduïda, és capaç de regular moltes funcions. La majoria d'aquestes funcions estan relacionades amb l'homeòstasi metabòlica. Aquesta regió del cervell esta formada per diferents grups de neurones anomenats nuclis neuronals. Cada un d'ells és capaç de regular diferents funcions. La regulació de totes aquestes funcions la duu a terme a través de l'activació del sistema nerviós autònom i/o a través de síntesi i secreció de neurohormones que actuen sobre la glàndula pituïtària (Roger et al., 2022).

L'expressió hipotalàmica del KLB és específica del nucli supraquiasmàtic (NSQ), el nucli ventromedial (NVM) i el nucli paraventricular (NPV). Pel que fa a la preferència de macronutrients, l'acció de FGF21 en el NPV i en el NVM, és capaç de provocar una disminució del consum de carbohidrats (específicament dels sabors dolços) (Talukdar et al., 2016a; von Holstein-Rathlou et al., 2016; Matsui et al., 2018; Jensen-Cody et al., 2020) i un augment del consum d'aigua (Song et al., 2018) (Figura

6). La senyalització de FGF21 en aquests nuclis també és capaç de provocar una disminució del consum d'alcohol, tot i que recentment també s'ha vinculat aquest fet a l'acció del FGF21 a l'amígdala (Flippo et al., 2022) (Figura 6).

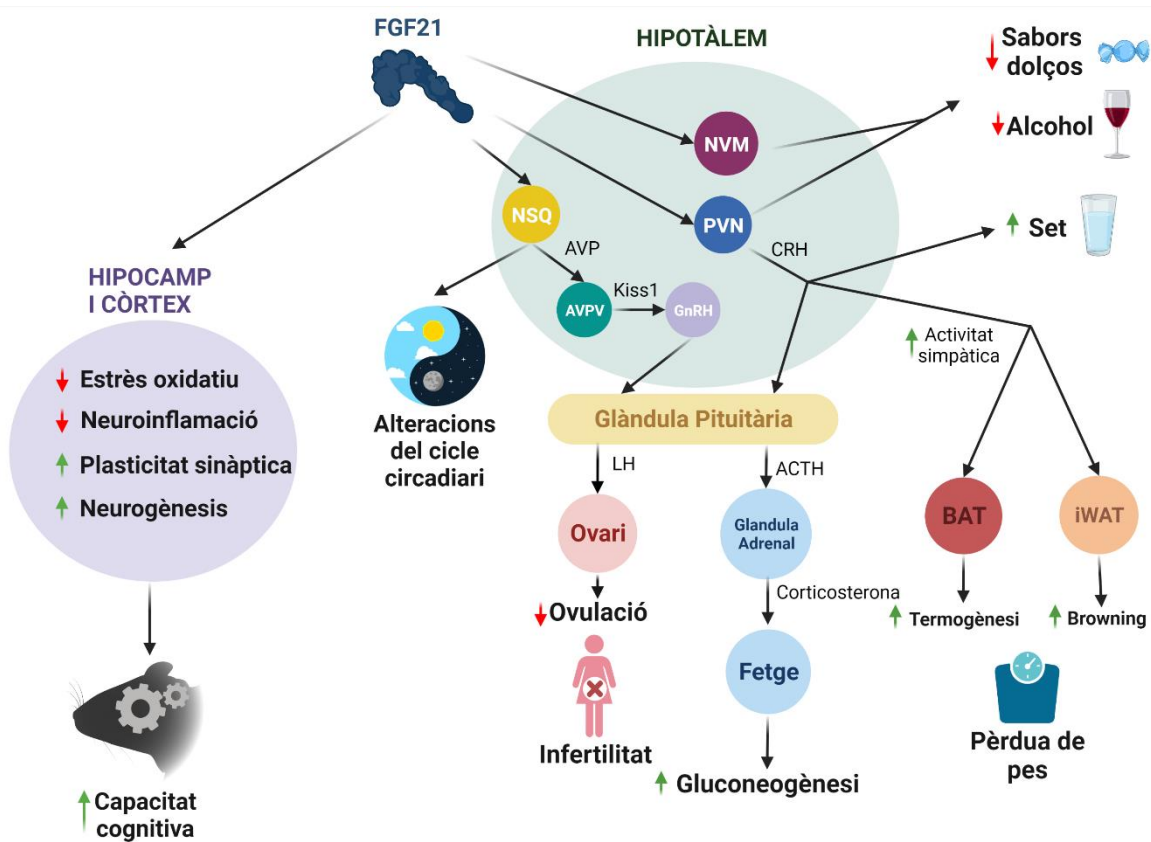
L'augment de la despesa energètica associada a FGF21 també ve regulada a nivell central, i específicament, per l'activació dels nuclis NSQ i NPV. De fet, l'acció de FGF21 en aquests nuclis és imprescindible per l'augment de la despesa energètica i per permetre la pèrdua de pes associada a aquesta hormona (Bondurant et al., 2017; Lan et al., 2017). El FGF21 provoca un augment de l'expressió del *Corticotropin releasing hormone* (Crh) que és capaç d'augmentar l'activitat dels nervis simpàtics que innerven el teixit adipós marró i del subcutani/inguinal, provocant una inducció de la termogènesi i del *browning*, respectivament, augmentant així la despesa energètica. (Owen et al., 2014; Douris et al., 2015). A més, Crh també provoca una activació de l'eix hipotalàmic-pituïtari-adrenal augmentant l'alliberació de l'hormona adrenocorticotròfica (ACTH) per part de la hipòfisi i un augment de corticosterona a les glàndules adrenals. La corticosterona pot arribar al fetge i induir l'augment de la gluconeogènesis hepàtica (Liang et al., 2014b) (Figura 6).

L'acció al NSQ per part del FGF21 és capaç de provocar canvis del ritme circadià augmentant l'activitat diürna i disminuint-ne la nocturna (Bookout et al., 2013). D'altra banda, alguns estudis mostren que el FGF21 també podria provocar problemes de fertilitat en ratolins femelles, tot i que altres publicacions contradiuen l'efecte directe del FGF21 en la regulació ovàrica i l'atribueixen a l'augment de la despesa energètica induïda pels nivells alts d'aquesta hormona (Owen et al., 2013; Singhal et al., 2016). (Figura 6)

#### **5.4.2. Funcions del FGF21 al còrtex i l'hipocamp**

A banda de la senyalització hipotalàmica, el FGF21 també pot senyalitzar a altres zones de l'encèfal, com el còrtex o l'hipocamp. En els darrers anys s'ha demostrat que aquesta hormona té una gran capacitat per millorar els dèficits cognitius associats a diferents trastorns neurològics com pot ser l'ictus (Wang et al., 2020a), la depressió (Usui et al., 2021), la lesió cerebral traumàtica (Chen et al., 2018; Jiang et al., 2020; Shahrer et al., 2020), l'envelliment (Yu et al., 2015; Ren et al., 2021), l'Alzheimer (Rühlmann et al., 2016, 2021; Amiri et al., 2018), el Parkinson (Fang et al., 2020) i l'obesitat i la diabetis (Sa-nguanmoo et al., 2016b, 2018; Wang et al., 2018; Kang et al., 2020b). Els mecanismes que regulen aquesta millora encara no es coneixen bé però alguns dels processos que hi poden participar serien: la protecció de la BHE (Chen et

al., 2018; Jiang et al., 2020), la disminució de la hiperfosforilació de Tau (Rühlmann et al., 2016; Sun et al., 2020), l'augment de la plasticitat sinàptica (Rühlmann et al., 2016, 2021), l'augment de la funció mitocondrial (Sa-nguanmoo et al., 2016b; Ren et al., 2021), la reducció de l'estrès oxidatiu (Yu et al., 2015; Kang et al., 2020b; Ren et al., 2021), l'augment de la neurogènesi (Wang et al., 2018; Shahror et al., 2020) i la disminució de l'apoptosi (Amiri et al., 2018). Un dels processos que està més descrit és la capacitat del FGF21 de reduir la neuroinflamació (Figura 6) (Yu et al., 2015; Amiri et al., 2018; Wang et al., 2018, 2020a, 2020b; Kang et al., 2020b; Ren et al., 2021)



**Figura 6. Representació esquemàtica dels efectes del FGF21 al SNC.** El FGF21 senyalitza a diferents nuclis de l'hipotàlem. Les accions al nucli paraventricular (PVN) augmenta l'expressió de CRH. D'una banda, CRH permet augmentar l'activitat simpàtica als dipòsits BAT i iWAT provocant un augment de la termogènesi i del *browning* respectivament, i permet augmentar la sensació de set. D'altra banda, provoca l'alliberació de l'hormona adrenocorticotròfica (ACTH) indueix la secreció de corticosterona de les glàndules adrenals, que fa incrementar la gluconeogènesi hepàtica. Les accions al PVN i NVM provoquen una disminució de la preferència del consum de sabors dolços i alcohol. La seva acció al NSQ provoca alteracions del cycle circadià al mateix temps que podria generar infertilitat a les femelles degut a problemes d'ovulació per inhibició de l'hormona LH. Quan FGF21 senyalitza al còrtex i a l'hipocàmp és capaç de reduir l'estrès oxidatiu, la neuroinflamació i augmentar la plasticitat sinàptica i la neurogènesi, millorant així la capacitat cognitiva. *Adaptada de Sa-nguanmoo, 2016*

## 5.5. El FGF21 com a fàrmac pel tractament de la diabetis i l'obesitat

Tots els estudis preclínic realitzats en ratolins i primats no humans han demostrat l'eficàcia terapèutica del FGF21 contra la diabetis i la obesitat. En models murins d'obesitat i DT2 com els ratolins *ob/ob*, *db/db*, rates *Zucker Diabetes Fatty* o models d'obesitat induïts per una dieta alta en lípids, el tractament amb el FGF21 ha donat lloc a una disminució del pes corporal, del pes del teixit adipós, així com també una millora de la sensibilitat a la insulina, del control glicèmic i en el perfil lipídic (Coskun et al., 2008; Berglund et al., 2009; Xu et al., 2009a; Jimenez et al., 2018). A més, el tractament amb el FGF21 també ha demostrat tenir efectes positius per contrarestar el NAFLD en ratolins als quals se'ls ha induït aquesta malaltia (Fisher et al., 2014). Tots aquests resultats també han estat validats en models animals més grans com els primats no humans (Kharitononkov et al., 2007; Adams et al., 2013b; Talukdar et al., 2016b; Stanislaus et al., 2017a). Així mateix, no s'ha observat cap efecte advers mitogènic ni cap episodi d'hipoglicèmia després de l'administració farmacològica del FGF21. (Charoenphandhu et al., 2016; Andersen et al., 2018).

Un dels principals inconvenients de la utilització del FGF21 com a tractament és la reduïda vida mitja de la seva forma proteica, d'entre 0.5 i 1.5 h degut a la seva proteòlisis per part dels enzims DPP4 i *Fibroblast activation protein* (FAP) i a la seva excreció pel ronyó (Kharitononkov et al., 2007, 2013; Xu et al., 2009a; Zhen et al., 2016; Zhao et al., 2019). A més, la proteïna també és molt inestable en solucions no biològiques, ja que té molta tendència per formar agregats (Hecht et al., 2012; Kharitononkov et al., 2013). Amb la finalitat d'augmentar la seva estabilitat i eficàcia, s'han generat anàlegs de la versió humana del FGF21 i agonistes de FGF21 (Geng et al., 2020). Els agonistes de receptors es basen en anticossos que tenen la capacitat d'unir-se a FGF1R o a KLB o als dos al mateix temps (Geng et al., 2020). Pel que fa als anàlegs, les estratègies que han tingut més èxit pel seu desenvolupament han sigut la conjugació del FGF21 amb polietilenglicol (PEG) o amb fragments d'immunoglobulines i la generació de molècules quimèriques (Taula 1). Amb aquests anàlegs experimentals, a dia d'avui ja s'han realitzat o s'estan realitzant més de 16 assajos clínics en pacients humans i els resultats descrits no han mostrat molta eficàcia pel que fa al control glicèmic ni a la reducció de pes corporal, però en canvi, alguns anàlegs han permès una gran eficàcia pel tractament del NASH ja que han millorat els perfils lipídics, sobretot de la fracció greixosa del fetge i dels marcadors de fibrosi hepàtica (Gaich et al., 2013; Weng et al., 2015; Talukdar et al., 2016b; Kim et al., 2017; Sanyal et al., 2018; Geng et al., 2020; Ritchie et al., 2020).

Actualment, la teràpia amb FGF21 per tractar el fetge gras i les seves complicacions (NAFLD i el NASH) es preveu molt prometedora i més si es té en compte que molts fàrmacs contra la DT2 i l'obesitat que tenen efectes en el control de la glicèmia no tenen cap efecte terapèutic en la dislipidèmia (Geng et al., 2020).

**Taula 1. Comparació dels efectes metabòlics en humans dels principals fàrmacs basats en FGF21.**

Nom del fàrmac	Descripció del fàrmac	Malaltia	Resultats obtinguts						
			Pes	Glucosa/HbA1c	Insulina	TG/CL	HDL	LDL	Marcadors hepàtics
<b>LY2405319</b>	hFGF21 amb un pont disulfur	DT2	↓	↔	↓	↓	↑	↓	-
<b>PF-05231023</b>	Dues molècules de FGF21 modificat ( $\Delta$ H,A129C) unides a un <i>Fragment antigen binding region (Fab)</i>	DT2	↓	↔	↔	↓	↑	↓	-
<b>AMG876/ AKR-001</b>	Dues molècules de FGF21 modificat (L98A, P171G) unides a un <i>Fragment crystallizable region (Fc)</i> de IgG1 humà.	DT2 i NASH	↓	↓	↓	↓	↑	↓	↓
<b>Pegbelfermin/B MS-986036</b>	hFGF21 conjugat a una molècula PEG de 30kDa	NAFLD, NASH, cirrosi i fibrosi hepàtica	↔	↔	↔	↓	↑	↔	↓

↓, disminueix; ↑, augmenta; ↔, sense canvis; -, Sense dades; TG, Triglicèrids; CL, Colesterol; HDL, Colesterol associat a lipoproteïnes d'alta densitat; LDL, Colesterol associat a lipoproteïnes de baixa densitat; DT2, Diabetis tipus 2; NASH, Hepatoesteatosi no alcohòlica; NAFLD, Fetge gras no alcohòlic; PEG, Polietilenglicol; kDa, KiloDaltons

Tot i les millores farmacocinètiques, pel que fa a l'estabilitat i la vida mitja descrites anteriorment, els anàlegs del FGF21 necessiten administrar-se periòdicament per tal d'assolir nivells terapèutics sostinguts en el temps. Al tractar-se de proteïnes exògenes modificades poden provocar que es desperti una resposta immunològica contra elles, limitant-ne la seva biodisponibilitat i impossibilitant la seva readministració a llarg termini (Gaich et al., 2013; Talukdar et al., 2016b; Hua et al., 2021). També, s'ha de tenir en compte que cap mimètic, per molt eficaç que sigui, genera una resposta 100% igual a la versió nativa del FGF21, degut a que presentaran diferències respecte a la seva biodistribució o senyalització cel·lular. A més, cap assaig clínic ha demostrat encara l'eficàcia del seu anàleg envers els dèficits cognitius associats a la DT2 i a l'obesitat tot i que com ja s'ha descrit, existeixen moltes dades preclíniques que demostren la capacitat del FGF21 per augmentar la capacitat cognitiva.

Davant de les limitacions dels tractaments actuals per la DT2, l'obesitat i les seves malalties relacionades, és necessari desenvolupar noves teràpies basades en el FGF21, com la teràpia gènica, que permetria expressar la pròpia proteïna endògena de manera sostinguda al llarg del temps amb una única administració terapèutica

## 6. TERÀPIA GÈNICA

La teràpia gènica és l'estratègia terapèutica basada en la modificació del material genètic de cèl·lules diana mitjançant la introducció de seqüències d'àcid nucleic (DNA i RNA) exogen amb la finalitat de prevenir o corregir una malaltia (Mulligan, 1993). Per aquest objectiu, es poden utilitzar diferents estratègies: introduir nous gens, modular l'expressió de gens existents (incrementar, silenciar o disminuir) o fins i tot corregir la seqüència nucleotídica dels gens mutats (edició gènica) (Naldini, 2015). La teràpia gènica es pot classificar segons el tipus d'administració entre teràpia *in vivo*, on el material genètic s'administra directament a l'individu, i la teràpia *ex vivo* on s'extreuen cèl·lules del pacient per ser modificades genèticament en el laboratori i posteriorment ser re-transplantades. La teràpia gènica també es pot classificar segons el tipus de vector entre teràpia viral, on els vectors estan formats a partir de virus modificats o no viral on els vectors es generen sintèticament per formar liposomes o polímers. Depenent de quines siguin les necessitats terapèutiques s'escull una estratègia o una altra (Chira et al., 2015; Zu and Gao, 2021).

Actualment, per la teràpia gènica *in vivo* els vectors virals derivats dels virus adenoassociats (AAV, *Adeno-Associated Virus*) són els més utilitzats degut al excel·lent perfil de seguretat, a la baixa immunogenicitat, a la no patogenicitat i a l'habilitat per induir una expressió del transgèn d'interès a llarg termini en una àmplia varietat de teixits. A més, els vectors derivats dels AAV estan molt ben caracteritzats, ja que estan sent utilitzats àmpliament en diversos protocols de teràpia gènica *in vivo* per diferents malalties en clínica humana (Mingozzi and High, 2011; Piguet et al., 2017).

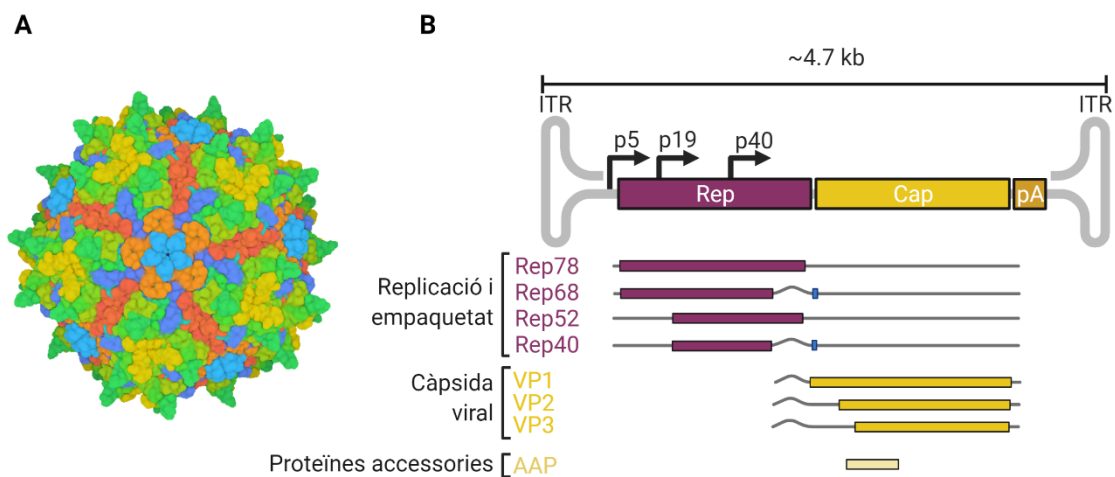
### 6.1. Vectors virals adenoassociats

Els virus AAV salvatges, dels quals en deriven els vectors AAV, pertanyen a la família *Parvoviridae* que forma part del gènere *Dependoviridae*. Els virus que formen part d'aquest gènere es caracteritzen per dependre d'una co-infecció amb un virus auxiliar o *helper* (adenovirus, herpesvirus, citomegalovirus humà o virus del papil·loma) per produir una infecció eficient (Carter, 2004; Balakrishnan and Jayandharan, 2014).

#### 6.1.1. Biologia dels virus adenoassociats

Els AAV estan formats per una càpsida icosaèdrica de 25 nm sense embolcall lipídic, i són molt resistents a la calor, al pH àcid i a l'acció de les proteases. Tenen un genoma de DNA de cadena senzilla d'aproximadament 4.7 kb (Samulski and Muzyczka, 2014; Wang et al., 2019).

El genoma de l'AAV està format per les repeticions terminals invertides (ITRs) en els extrems i els gens *Rep* i *Cap* repartit en 3 marcs oberts de lectura (ORFs) diferents. Les ITRs són seqüències palindròmiques de 145 pb amb una estructura en forma de T que serveixen com origen de replicació, senyal d'encapsidació del genoma viral i faciliten la recombinació del genoma viral amb el genoma cel·lular. El genoma dels AAVs codifica per un total de 8 proteïnes classificades com a proteïnes Rep (o reguladores) necessàries per a la replicació, o proteïnes Cap (o estructurals) que formen la càpsida del virus (Naso et al., 2017; Wang et al., 2019). El control de l'expressió d'aquestes proteïnes es fa mitjançant 3 promotors diferents, el *splicing* alternatiu i una única senyal de poliadenilació. El gens Rep codifiquen per 4 proteïnes (Rep78, Rep68, Rep52 i Rep40) i s'expressen sota el control dels promotors p5 i p19 i alguns d'ells pateixen *splicing* alternatiu (Figura 7). La Rep78 i la Rep68 són necessàries per la replicació del genoma viral i tenen activitat endonucleasa, helicasa i ATPasa. En canvi, la Rep52 i la Rep40 només tenen activitat helicasa i participen únicament en l'encapsidació del genoma viral (Büning et al., 2003; Samulski and Muzyczka, 2014). Els gens Cap codifiquen per 3 proteïnes: VP1, VP2 i VP3, expressades sota el control del promotor p40 i generades també mitjançant *splicing* alternatiu. La càpsida està formada per les proteïnes VP1, VP2 i VP3 en un ràtio 1:1:10, donant lloc a una càpsida icosaèdrica de 60 subunitats. El mRNA que codifica per VP2 i VP3 conté un segon ORF que codifica per la proteïna activadora de l'assemblatge (AAP) (Figura 7). La funció d'aquesta proteïna és facilitar l'entrada de VP3 al nucli i promoure la maduració de la càpsida (Xie et al., 2002; Naumer et al., 2012; Kotterman and Schaffer, 2014).



**Figura 7. Representació esquemàtica de la càpsida i el genoma dels AAVs.** (A) Estructura tridimensional de la càpsida de l'AAV generada per cristal·lografia. (B) Estructura del genoma dels AAV, on es mostren les ITR flanquejant els ORF dels gens *Rep* (morat) i *Cap* (groc), els promotors i la senyal de poliadenilació (pA). Adaptada de



Existeixen nombrosos serotips d'AAV, cadascun d'ells amb uns trets diferencials únics. Les proteïnes de la càpsida varien entre serotips, per aquest motiu cada serotip es pot unir a un receptor cel·lular diferent, i per tant, cada serotip té un tropisme diferent. A la Taula 2 es detallen alguns dels serotips més rellevants.

**Taula 2. Característiques dels serotips AAV del 1 al 12.**

Serotip	Origen	Receptor y co-receptors	Tropisme tissular
AAV1	Humà o PNH	N-linked sialic acid	Fetge <sup>1</sup> , múscul esquelètic <sup>1,2,3,6</sup> , SNC <sup>1,2,6</sup> , vies respiratòries <sup>1,2</sup> , retina <sup>1</sup> , pàncrees <sup>1</sup> , cor <sup>1,4,6</sup>
AAV2	Humà	HSPG, FGFR1, HGFR, LamR, CD9, integrina $\alpha_v\beta_5$ , $\alpha_5\beta_1$ ,	Fetge <sup>1,6</sup> , múscul esquelètic <sup>1,6</sup> , SNC <sup>1,6</sup> , retina <sup>1,2,3</sup> , ronyó <sup>1</sup>
AAV3	Humà o PNH	HSPG, FGFR, HGFR, LamR	Fetge <sup>5</sup> , Hepatocarcinoma <sup>6</sup> , múscul esquelètic <sup>1,6</sup> , oïda interna
AAV4	PNH	O-linked sialic acid	SNC <sup>1,6</sup> , retina <sup>1,3,6</sup> , pulmó <sup>1,2</sup> , ronyó <sup>1</sup>
AAV5	Humà	N-linked sialic acid, PDGFR	Fetge, múscul esquelètic, SNC <sup>1,3,6</sup> , pulmó <sup>1,2,6</sup> , retina <sup>1,6</sup>
AAV6	Humà	HSPG, N-linked sialic acid	Múscul esquelètic <sup>3,6</sup> , SNC <sup>1,6</sup> , pulmó <sup>6</sup> , cor <sup>1,3,4,6,7</sup> , pàncrees <sup>1</sup> , vies respiratòries <sup>1,2,3</sup>
AAV7	<i>Rhesus macaque</i>	Desconegut	Fetge <sup>1</sup> , múscul esquelètic <sup>1,6</sup> , SNC <sup>1,6</sup> , retina <sup>1</sup>
AAV8	<i>Rhesus macaque</i>	LamR	Fetge <sup>1,2,3,6</sup> , cor <sup>1</sup> , múscul esquelètic <sup>1,6</sup> , SNC <sup>1,2,3,6</sup> , pàncrees <sup>1,6</sup> , pàncrees <sup>6</sup> , retina <sup>1,3</sup> , ronyó <sup>1</sup> , teixit adipós <sup>1</sup>
AAV9	Humà	N-linked glycans, LamR	Fetge <sup>1,6</sup> , cor <sup>1,2,4</sup> , múscul esquelètic <sup>1,3</sup> , pulmó <sup>1</sup> , SNC <sup>1,2,6</sup> , pàncrees <sup>1</sup> , retina <sup>1,2</sup> , ronyó, testicle <sup>1</sup> , teixit adipós <sup>1</sup>
AAV10	PNH	Desconegut	Fetge, Múscul <sup>6</sup>
AAVrh10	<i>Rhesus macaque</i>	LamR	Fetge <sup>1</sup> , cor <sup>1</sup> , múscul esquelètic <sup>1,3</sup> , pulmó <sup>1</sup> , SNC <sup>1,8</sup> , pàncrees <sup>1</sup> , retina <sup>1</sup> , ronyó <sup>1</sup>
AAV11	PNH	Desconegut	Fetge
AAV12	PNH	Desconegut	Fetge <sup>1</sup> , cor <sup>1</sup> , múscul esquelètic <sup>1,3</sup> , pulmó <sup>1</sup> , SNC <sup>8</sup> , pàncrees <sup>1</sup> , retina <sup>1</sup> , ronyó <sup>1</sup>

Tropisme tissular en <sup>1</sup>ratolí, <sup>2</sup>Primat no humà, <sup>3</sup>gos, <sup>4</sup>porc, <sup>5</sup>mico, <sup>6</sup>humà, <sup>7</sup>ovella i <sup>8</sup>rata  
 Abreviacions: 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*; SNC, sistema nerviós central; HCC, *carcinoma hepatocellular*. Adaptat de (Jimenez et al., 2013; Balakrishnan and Jayandharan, 2014; Lisowski et al., 2015; Li and Samulski, 2020)

El procés d'infecció dels virus AAV s'inicia quan el virus interacciona amb un receptor de la cèl·lula. Aquest fet inicia el procés d'internalització mitjançant la formació de vesícules de clatrina que posteriorment s'incorporen als endosomes primerencs. El canvi de pH provocat per l'acidificació dels endosomes, per convertir-se en lisosomes,

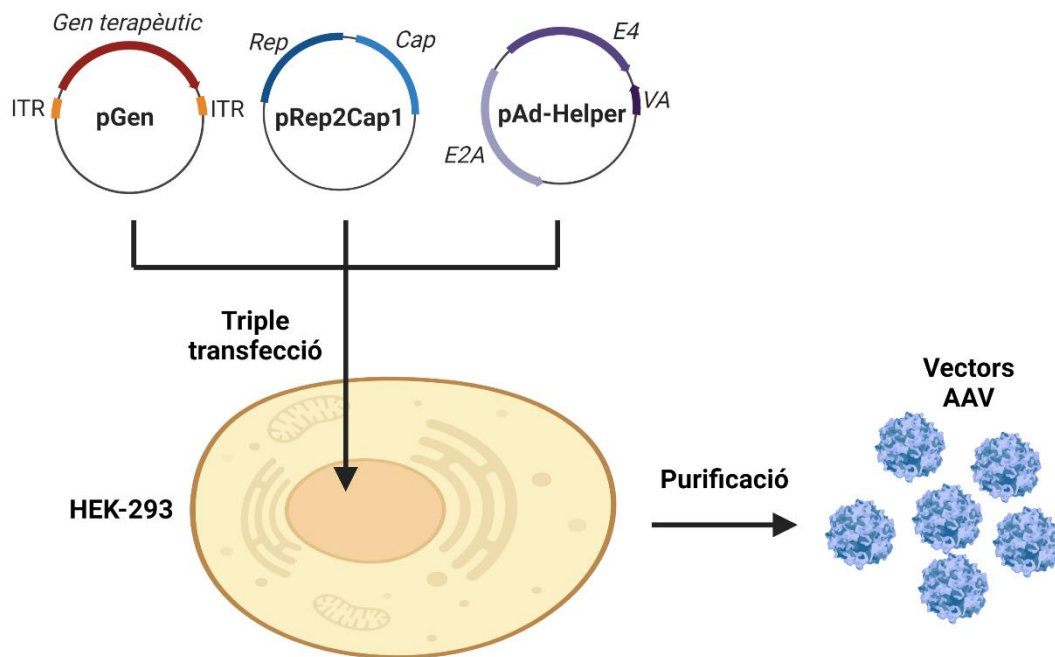
genera un canvi conformacional de la proteïna VP1 de la càpsida que indueix una activació de la seva activitat fosfolipasa (Wang et al., 2019). Com a resultat, els virus AAV es poden escapar dels endosomes i introduir el seu genoma al nucli de la cèl·lula (Büning et al., 2003). Sense la presència del virus *helper*, el genoma dels AAV es manté de forma episomal en el nucli formant grans concatèmers circulars o, en una freqüència molt més baixa, s'integra dins d'una regió específica del cromosoma 19 humà (19q13-qter) (McCarty et al., 2004).

### **6.1.2. Producció dels vectors AAV**

Els vectors AAV es generen mitjançant la substitució dels gens Rep i Cap (aproximadament el 96% del genoma viral) pel casset d'expressió d'interès. L'únic element que s'ha de mantenir són les ITRs dels extrems, ja que són imprescindibles per l'encapsidació del genoma (Büning et al., 2003). Per tant, el genoma recombinant resultant pot empaquetar-se dins la càpsida però en canvi no podrà ni integrar-se ni replicar-se una vegada hagi transduït la cèl·lula diana, ja que no presenta cap gen viral. (Hirata and Russell, 2000; Snyder et al., 2012; Balakrishnan and Jayandharan, 2014).

El serotip més ben caracteritzat és l'AAV2, per tant, les ITRs utilitzades en el camp de la teràpia gènica normalment pertanyen a aquest serotip (Samulski et al., 1982; Srivastava et al., 1983). Per tal que el casset d'expressió pugui codificar per una proteïna, aquest ha d'estar format per: un promotor, el gen o la seva seqüència codificant (*cds*, *coding sequence*) i la senyal de poliadenilació (poliA). Degut a la mida reduïda dels AAVs, el constructe, incloent les ITRs, no hauria de superar les 4.7 kb per tal de que es pugui encapsidar correctament (Samulski and Muzyczka, 2014).

Els vectors virals AAV es poden produir i purificar al laboratori a uns títols molt elevats i amb un alt grau de puresa gràcies al sistema de triple transfecció. Aquest sistema es basa en la co-transfecció de cèl·lules embrionàries de ronyó (HEK293) amb tres plasmidis diferents: el plasmidi amb el gen terapèutic flanquejat per les ITRs (pGen), el plasmidi que conté els gens auxiliars de l'adenovirus necessaris perquè es pugui produir el procés infectiu de l'AAV (pHelper) i el plasmidi que conté els gens virals Rep i Cap de l'AAV però sense les ITRs (pRep/Cap) (Ayuso et al., 2010) (Figura 8). Segons quin sigui el tropisme tissular d'interès, es poden utilitzar els plasmidis que continguin els gens Cap de cadascun dels serotips. D'aquesta manera, la co-transfecció d'aquests tres plasmidis permet que el constructe d'interès flanquejat per les ITRs es repliqui i les molècules resultants de DNA entrin a les càpsides pre-formades dels AAV (Figura 8).



**Figura 8. Representació esquemàtica de la producció dels vectors virals AAV pel protocol de triple transfecció.** Per a la producció de vectors AAV, els dos gens virals (Rep i Cap) són substituïts pel cassat d'expressió flanquejat pels senyals d'empaquetament viral (ITRs). Les proteïnes virals Rep i Cap s'aporten en *trans* pel plasmidi accessori pRep2Cap1. Les funcions del virus auxiliars també es proporcionen en *trans* mitjançant la transfecció d'un tercer plasmidi, anomenat plasmidi pAdHelper, codificant pels gens adenovirals necessaris per a la producció dels AAV. *Adaptat de Büning et al., 2008.*

Les partícules virals resultants es purifiquen del lisat cel·lular mitjançant una centrifugació amb gradient de densitat (CsCl o iodixanol) i/o cromatografia en columna. La preparació purificada del vector pot contenir càpsides buides, és a dir, sense genoma en el seu interior. El mètode de purificació que separa de forma més eficient les càpsides buides de les càpsides plenes és la purificació mitjançant un segon gradient de CsCl. Concretament, la precipitació amb PEG i la purificació mitjançant CsCl desenvolupades pel nostre laboratori redueixen pràcticament per complet el nombre de càpsides buides i les impureses de DNA i proteïna, donant lloc a lots d'AAV de gran puresa que permet augmentar l'eficiència de la transducció *in vivo* del teixit d'interès (Ayuso et al., 2009).

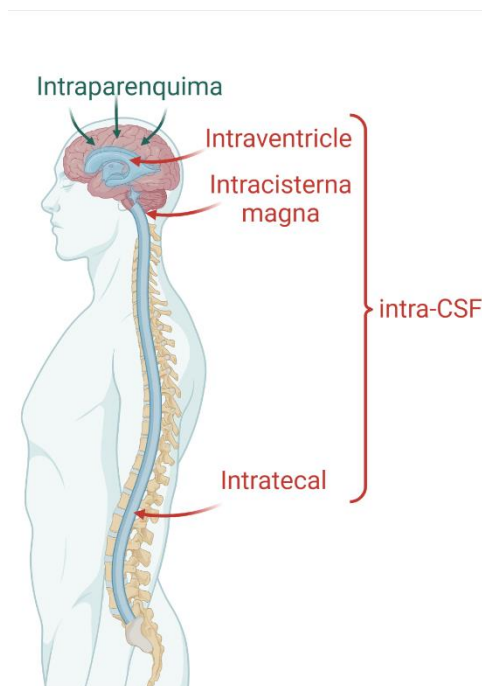
## 6.2. Transferència de gens al sistema nerviós central mitjançant vectors AAV

En els últims anys la teràpia gènica s'ha convertit en una eina terapèutica pel tractament de desordres neurològics. La gran versatilitat d'aquest tipus de teràpia ha obert la porta a estudiar la seva capacitat per tractar malalties amb etiologies molt diferents, entre les que destaquen les malalties d'acumulació lisosòmica, l'Alzheimer, el Parkinson, el Huntington, l'esclerosi lateral amiotròfica, l'atròfia muscular espinal, l'epilèpsia o fins i tot el dolor neuropàtic. Els vectors AAV són els vectors més utilitzats

per aconseguir una transducció eficient del SNC per les seves característiques, ja que tenen una baixa immunogenicitat, permeten l'expressió a llarg termini del transgèn i presenten un gran tropisme pels tipus cel·lulars que formen el SNC. El seu èxit en els estudis preclínics ha fet que avui en dia existeixin nombrosos assajos clínics basats en aquest tipus de teràpia (Hocquemiller et al., 2016; Piguet et al., 2017; Deverman et al., 2018; Marcó et al., 2019; Chen et al., 2020; Kimura and Harashima, 2020).

Per aconseguir una transducció eficient dels SNC mitjançant la teràpia gènica es poden utilitzar diferents vies d'administració. Bàsicament, es pot diferenciar entre l'administració sistèmica i la local (Hocquemiller et al., 2016; Marcó et al., 2019; Chen et al., 2020). La primera permet arribar al SNC d'una forma poc invasiva però l'encèfal i la medul·la espinal es troben protegits per diferents barreres, entre elles la BHE, i no tots els serotips d'AAV són capaços de travessar-la (Kimura and Harashima, 2020). Per tant, la via sistèmica queda limitada a uns serotips específics i a més, la dosi de vectors que cal administrar per permetre una bona transducció sempre haurà de ser molt més alta que amb una administració local (Hocquemiller et al., 2016; Deverman et al., 2018; Marcó et al., 2019). L'administració local dels AAV a SNC requereix procediments més invasius, no obstant, les vies utilitzades ja han estat aprovades i validades en la clínica per multitud de fàrmacs. Les vies més utilitzades són les que permeten l'administració directa del parènquima cerebral i l'administració directa del líquid cefalorraquidi (CSF, *Cerebrospinal Fluid*) que banya tot el SNC (Hocquemiller et al., 2016; Deverman et al., 2018; Ogawa et al., 2020). L'administració intraparenquima ha estat molt utilitzada sobretot quan es vol assolir una distribució local en alguna regió concreta del SNC, com podria ser per exemple per transduir la substància Nigra en els cas de la malaltia de Parkinson (Kells et al., 2009; Aschauer et al., 2013; Hadaczek et al., 2016). La via intra-CSF permet transduir vèries zones del SNC amb una sola administració del vector ja que els vectors són alliberats al CSF, i aquest arriba tant a les parts internes com externes de l'encèfal i a la medul·la espinal. D'aquesta manera, la via intra-CSF s'utilitza pel tractament de malalties que afecten a vèries regions del SNC com en el cas de les malalties d'acumulació lisosomal (Haurigot et al., 2013; Deverman et al., 2018; Marcó et al., 2019). Existeixen diferents rutes per administrar un fàrmac en el CSF entre les que trobem la via intrevètricle, la via intratecal i la via intracisterna magna (Hocquemiller et al., 2016; Deverman et al., 2018; Marcó et al., 2019) (Figura 9). De totes les administracions intra-CSF, en el nostre laboratori hem demostrat que la via intracisterna magna és una via segura, eficient i que permet una biodistribució dels vectors virals molt àmplia, tant en ratolins com en gossos (Ruzo et al., 2012; Haurigot et al., 2013; Ribera et al., 2015; Motas et al., 2016; Roca et al., 2017). En humans la via intra-CSF més

utilitzada és la intraventricle ja que és una via àmpliament utilitzada en el camp de la neurocirurgia i és més eficient tècnicament que la via intracisterna magna (Haurigot and Bosch, 2013).



**Figura 9. Vies d'administració utilitzades per la transducció del SNC mitjançant vectors AAV**

En l'actualitat, s'han descrit varis serotips amb capacitat per transduir el SNC (Taula 2), la seva eficiència però, depèn en gran mesura de la via d'administració utilitzada (Castle et al., 2016). La majoria d'estudis realitzats que utilitzen com a via d'administració la cisterna magna fan servir l'AAV9 com a vector terapèutic degut a la seva gran eficiència per transduir el SNC. Ara bé, un altre vector que ha demostrat ser capaç de transduir diferents tipus cel·lulars del SNC és l'AAV1. La principal diferència d'aquests dos vectors és la seva capacitat per passar des del CSF fins a la sang i la seva eficiència per transduir els òrgans perifèrics. Mentre que l'AAV9 administrat intra-CSF s'ha demostrat que arriba a la circulació i és capaç de transduir els òrgans perifèrics molt eficientment, l'AAV1 no presenta tanta facilitat per arribar al torrent sanguini i als òrgans perifèrics (Zincarelli et al., 2008; Ruzo et al., 2012; Haurigot et al., 2013; Hironaka et al., 2015; Ribera et al., 2015; Motas et al., 2016; Roca et al., 2017).

Així, la teràpia gènica basada l'administració intracisterna magna d'AAV1 podria esdevenir una bona estratègia per aconseguir la sobreexpressió més específica d'un gen terapèutic en el SNC i convertir-se per tant en una eina terapèutica de gran potencial pel tractament metabòlic i neurològic de la DT2 i l'obesitat.

### **III. OBJECTIUS**



L'obesitat i la diabetis són dues malalties que han assolit valors epidèmics i s'han convertit en un dels problemes de salut pública més importants. A part de la patologia metabòlica, tant la diabetis com l'obesitat han estat associades amb un augment del deteriorament cognitiu. Estudis recents han demostrat el potencial terapèutic del factor de creixement fibroblàstic 21 (FGF21) enfront aquestes malalties. Tot i que s'han generat mimètics/anàlegs del FGF21 amb propietats farmacocinètiques millorades respecte a la proteïna nativa, aquestes molècules presenten alguns desavantatges com la necessitat de múltiples administracions de forma crònica i la dificultat per generar una resposta cel·lular igual que la proteïna nativa. La teràpia gènica ofereix un avantatge sobre els mimètics/anàlegs, ja que permet la sobreexpressió de la proteïna nativa a llarg termini després d'una sola administració de vectors adenoassociats. Molts dels efectes metabòlics beneficiosos del FGF21 necessiten la seva acció a nivell central i recentment, també s'ha demostrat que l'acció directa del FGF21 al SNC és capaç de prevenir i/o revertir els dèficits cognitius associats a diferents patologies. Per tant, la sobreexpressió de FGF21 al SNC podria esdevenir una possible eina terapèutica pel tractament dels dèficits metabòlics i neurològics associats a la DT2 i l'obesitat.

Per tant, el principal objectiu de la tesi doctoral va ser el **desenvolupament d'una teràpia gènica pel tractament de l'obesitat i la DT2 i els seus problemes cognitius associats basada en l'augment del FGF21 específicament en el SNC**. Aquest objectiu general es va subdividir en els següents objectius específics:

1. Determinar la capacitat del vector AAV1 administrat intra-CSF per transduir les diferents regions del SNC.
2. Avaluar els efectes metabòlics a llarg termini del FGF21 en animals sans després de l'administració intra-CSF d'un vector AAV1-FGF21.
3. Estudiar l'eficàcia terapèutica de l'aproximació de teràpia gènica basada en el vector viral AAV1-FGF21 administrat intra-CSF en un model murí d'obesitat, resistència a la insulina i dèficits cognitius associats, induït per una dieta alta en lípids.





## **IV. RESULTATS**



**Part 1. Biodistribució de vectors AAV1-GFP després  
d'una administració intra-CSF**

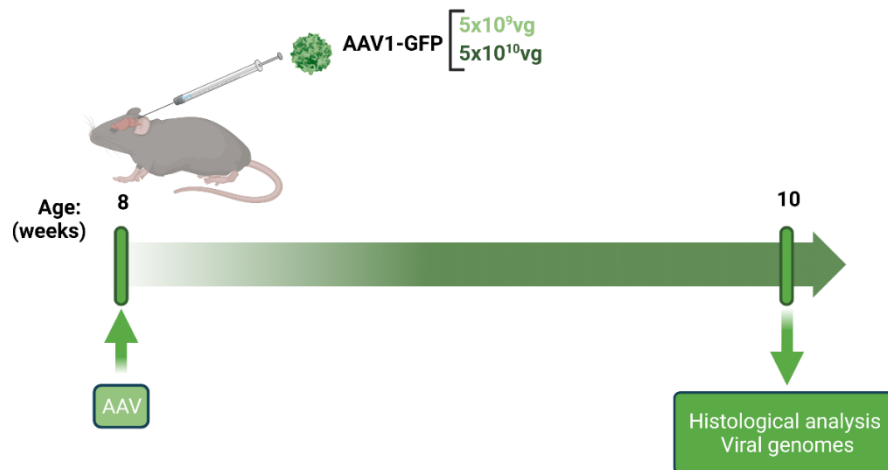


## 1. EVALUACIÓ DE LA CAPACITAT DEL VECTOR VIRAL AAV1 ADMINISTRAT INTRA-CSF PER TRANSDUIR ESPECÍFICAMENT EL SNC

Un dels problemes derivats de l'obesitat i la DT2 i que encara no està resolt és la pèrdua de les capacitats cognitives (Dye et al., 2017; Jan Biessels and Despa, 2018). Cada vegada és més evident que FGF21 és capaç de produir moltes accions beneficioses en el SNC (Sa-nguanmoo et al., 2016a), per tant, una estratègia terapèutica que permetés la sobreexpressió de FGF21 al SNC podria probablement contrarestar la diabetis, l'obesitat i els problemes cognitius associats.

L'administració intra-CSF, utilitzant com a via d'entrada la cisterna magna, ha estat àmpliament utilitzada en el nostre laboratori com a ruta d'administració per alliberar el vector en el líquid cefalorraquidi i ha demostrat ser segura i permetre que el vector AAV9 arribi a diferents regions de l'encèfal i la medulla espinal (Haurigot et al., 2013; Ribera et al., 2015; Motas et al., 2016; Roca et al., 2017). L'AAV1 ha demostrat poder transduir diferents tipus cel·lulars que formen part del SNC, utilitzant diferents vies d'administració (Boutin et al., 2010; Aschauer et al., 2013; Castle et al., 2016). Per aquest motiu, i previ al disseny d'una aproximació de teràpia gènica per sobreexpressar FGF21, es va dur a terme un anàlisi de la biodistribució dels vectors AAV1 administrats específicament utilitzant la cisterna magna.

Per tal de determinar la biodistribució dels vectors AAV del serotip 1 administrats per via intra-CSF utilitzant la cisterna magna es van administrar AAV1 codificants pel gen de la proteïna verda fluorescent (GFP; *Green Fluorescent Protein*), una proteïna àmpliament utilitzada com a marcador de distribució. El gen es va expressar sota el control d'un promotor ubic CAG (promotor sintètic format per l'*enhancer* del CMV i el primer intró i primer exó del gen de la  $\beta$ -actina de pollastre) que permet l'expressió del transgèn en qualsevol tipus cel·lular del SNC. Es va realitzar un estudi de dosi-resposta administrant AAV1-GFP a les dosis de  $5 \times 10^9$  i  $5 \times 10^{10}$  vg/animal per tal de detectar les diferents regions del SNC que eren transduïdes pel vector AAV1. L'estudi es va dur a terme en ratolins C57BL/6 mascles sans de 8 setmanes d'edat i al cap de 15 dies de l'administració es van eutanasiar i es va procedir a analitzar la quantitat de genomes virals i l'expressió de GFP de l'encèfal mitjançant un anàlisi histològic (Figura 10).



**Figura 10. Disseny experimental de l'estudi de biodistribució.** El vector viral AAV1-GFP es va administrar a ratolins C57BL/6 mascles de 8 setmanes d'edat localment en el SNC utilitzant la via intra-CSF amb dues dosis diferents,  $5 \times 10^9$  i  $5 \times 10^{10}$  vg/animal. Al cap de 2 setmanes de l'administració, es van eutanasiar els animals i es va dur a terme un anàlisi histològic i una quantificació dels genomes virals.

### 1.1. Anàlisi de la biodistribució del vector

Per tal de quantificar els nivells de transducció entre diferents teixits es van analitzar els genomes virals per genomes diploides (vg/dg) en les diferents regions del SNC i en teixits perifèrics. Els nivells dels vg/dg van indicar que l'administració d'AAV1 intra-CSF permetia la transducció eficient i dosi-dependent de l'encèfal. Les regions de l'encèfal on es van detectar més vg/dg van ser l'hipocamp, el còrtex i el bulb olfatori, seguides per l'hipotàlem i el cerebel (Taula 3). L'administració intra-CSF també va permetre la transducció de la medul·la espinal. En aquest cas la quantitat de vg eren més elevats en la part proximal al punt d'administració. A més, el canvi de dosi no provocava un canvi en la biodistribució del vector (Taula 3).

**Taula 3. Genomes virals en diferents regions del SNC.** Quantificació de genomes virals en ratolins, després de l'administració intra-CSF de  $5 \times 10^9$  i  $5 \times 10^{10}$  vg/animal del vector AAV1-GFP. n=5-8 per grup.

Tissues	vg/dg	
	$5 \times 10^9$ vg	$5 \times 10^{10}$ vg
Cortex	$0,38 \pm 0,05$	$1,06 \pm 0,19$
Hippocampus	$0,45 \pm 0,11$	$1,52 \pm 0,22$
Hypothalamus	$0,32 \pm 0,10$	$0,39 \pm 0,13$
Olfactory Bulb	$0,32 \pm 0,04$	$1,58 \pm 0,37$
Cerebellum	$0,18 \pm 0,03$	$0,42 \pm 0,05$
Pituitary Gland	$0,03 \pm 0,00$	$0,14 \pm 0,04$
Striatum	$0,05 \pm 0,01$	$0,10 \pm 0,04$
Proximal Spinal Cord	$0,19 \pm 0,04$	$1,01 \pm 0,29$
Distal Spinal Cord	$0,15 \pm 0,04$	$0,64 \pm 0,09$

L'anàlisi dels teixits perifèrics va permetre detectar genomes virals en la dosi més alta ( $5 \times 10^{10}$  vg/animal) en alguns teixits com el múscul toràcic semiespinal, el múscul masseter, el fetge, el ronyó o el teixit adipós marró, però els valors eren inferiors a 0.1 vg/dg, molt per sota dels nivells que es van assolir en les diferents regions del SNC (Taula 4). En canvi, amb la dosi més baixa ( $5 \times 10^9$  vg/animal) els vg/dg van ser indetectables en tots els teixits perifèrics analitzats (Taula 4).

**Taula 4. Genomes virals en diferents teixits perifèrics.** Quantificació dels genomes virals en ratolins després de l'administració intra-CSF de  $5 \times 10^9$  i  $5 \times 10^{10}$  vg/animal del vector AAV1-GFP. n=5-8 per grup.

Tissues	vg/dg	
	$5 \times 10^9$ vg	$5 \times 10^{10}$ vg
Liver	ND	0,05 ± 0,01
Heart	ND	ND
Masseter Muscle	ND	0,06 ± 0,02
Semispinalis thoracis Muscle	ND	0,13 ± 0,10
Brown Adipose Tissue	ND	0,03 ± 0,02
Inguinal White Adipose Tissue	ND	ND
Epididymal White Adipose Tissue	ND	ND
Adrenal Gland	ND	ND
Gonads	ND	ND
Lung	ND	ND
Spleen	ND	0,03 ± 0,01
Kidney	ND	ND
Thymus	ND	ND

Aquest estudi va demostrar que l'administració intra-CSF d'AAV1 permetia transduir àmpliament el SNC. A més, la utilització de dosis inferiors a  $5 \times 10^{10}$  permet que aquesta transducció estigui limitada únicament al SNC.

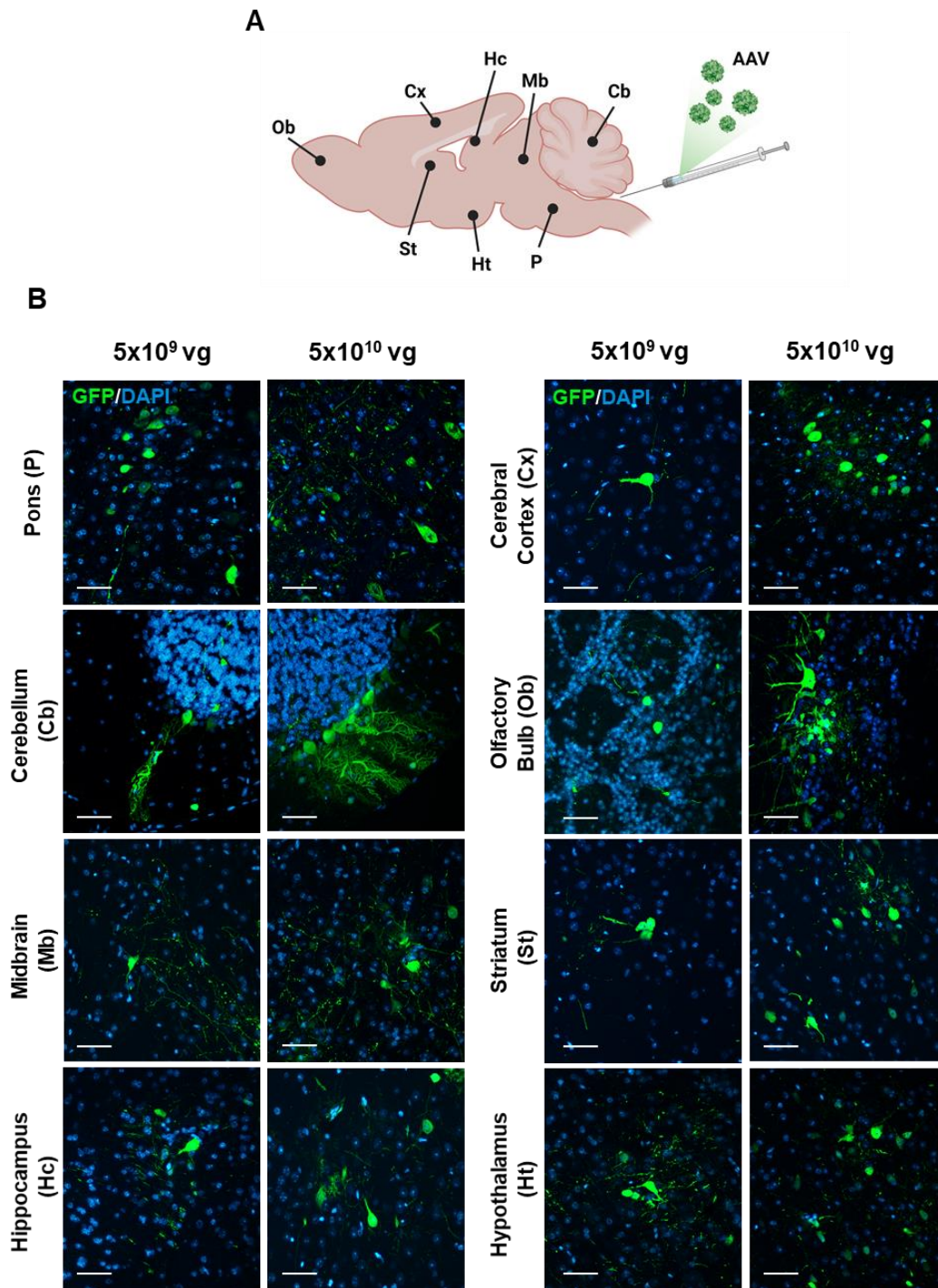
## 1.2. Anàlisi de l'expressió de la proteïna GFP a l'encèfal

Per corroborar la transducció de les diferents regions de l'encèfal després de l'administració intra-CSF del vector AAV1 es va realitzar un estudi immunohistoquímic que va permetre detectar aquelles regions de l'encèfal que expressaven el transgèn GFP (Figura 11).

Específicament, es va detectar senyal positiva per GFP en les regions de pons (P), del cerebel (Cb), del mesencèfal (Mb, *Midbrain*), de l'hipocamp (Hc), del còrtex (Cx), del bulb olfatori (Ob; *Olfactory bulb*), de l'estriat (St) i de l'hipotàlem (Ht) i aquesta senyal es veia més incrementada amb la dosi més alta dels vectors (Figura 11). Per tant,



l'anàlisi va demostrar una transducció eficient i dosis dependent de les diferents zones de l'encèfal.



**Figura 11. Expressió de GFP en diferents regions de l'encèfal després de l'administració intra-CSF del vector AAV1-GFP. (A)** Representació esquemàtica de les diferents regions de l'encèfal. **(B)** Anàlisi de l'expressió del transgèn mitjançant immunohistoquímica contra GFP en diferents regions de l'encèfal de ratolins, 15 dies després de l'administració intra-CSF de 5x10<sup>9</sup> i 5x10<sup>10</sup> vg/animal del vector AAV1-GFP. Escala: 50 µm

**Part 2. Estudi dels efectes de la sobreexpressió de  
FGF21 en el SNC**



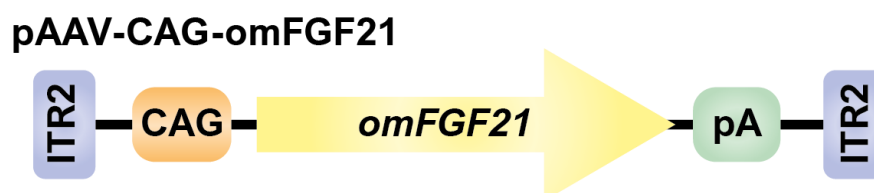
## 1. DISSENY I GENERACIÓ DEL VECTOR AAV PER L'EXPRESSIÓ DE FGF21 EN EL SNC

Una vegada demostrada la possibilitat de transduir eficientment les diferents regions del SNC administrant intra-CSF través de la cisterna magna vectors AAV1, es va generar un vector viral AAV1 codificant pel gen FGF21.

La baixa eficiència demostrada pel vector AAV1 per transduir els teixits perifèrics quan va ser administrat intra-CSF va obrir la porta a utilitzar un promotor ubic. Així, es podia evitar l'ús de promotors específics, que malgrat que permetrien una expressió restringida únicament en les diferents cèl·lules del SNC, els nivells d'expressió que generen sempre tendeixen a ser més baixos que els dels promotors ubics (Powell et al., 2015).

El vector AAV1 generat portava el cDNA (DNA complementari) optimitzat del gen FGF21 murí (omFGF21), és a dir, una seqüència gènica que permetia augmentar l'eficiència del gen d'interès tant a nivell de transducció com de traducció sense produir canvis en la seqüència d'aminoàcids de la proteïna (Disbrow et al., 2003; Ward et al., 2011). L'omFGF21 es va clonar sota el control del promotor ubic CAG i es va afegir la senyal de poliadenilació de la  $\beta$ -globina de conill. Tot aquest constructe va quedar flanquejat per les ITRs del vector AAV2 i es va anomenar pAAV-CAG-FGF21 (Figura 12).

La producció del vector viral es va dur a terme mitjançant el sistema de triple transfecció en cèl·lules HEK293 i posterior purificació mitjançant un gradient de CICs (veure Materials i Mètodes). El vector viral resultant es va denominar AAV1-CAG-omFGF21 (AAV1-FGF21).



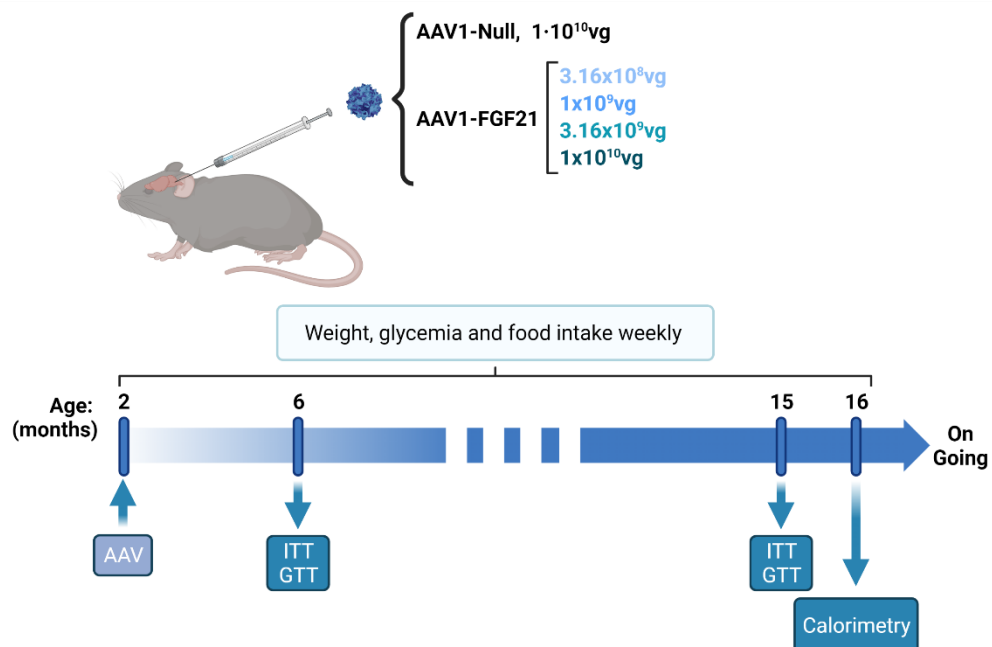
**Figura 12. Representació esquemàtica del constructe utilitzat per la producció de vectors virals.**

El vector terapèutic, flanquejat per les ITR2 conté la versió murina optimitzada del cDNA del FGF21 sota el control del promotor CAG i la senyal de poliadenilació. ITR2: *Inverted Terminal Repeats* del vector AAV2; CAG: promotor sintètic format per la unió de l'*enhancer* del promotor CMV i el primer intró i exó del gen de la  $\beta$ -actina de pollastre; omFGF21: seqüència optimitzada del cDNA FGF21 murí; pA: seqüència de poliadenilació de la  $\beta$ -globina de conill. El constructe no està representat a escala.

## 2. ESTUDI A LLARG TERMINI DELS EFECTES METABÒLICS DE L'ADMINISTRACIÓ INTRA-CSF DE VECTORS AAV1-FGF21 A RATOLINS SANS

Després de generar el vector terapèutic es van avaluar a llarg termini els efectes metabòlics de la sobreexpressió del FGF21 al SNC en animals sans. Amb aquest propòsit, es van administrar intra-CSF diferents dosis del vector AAV1-FGF21 a ratolins mascles C57BL/6 de 2 mesos d'edat alimentats amb dieta estàndard de laboratori (*chow*). Les dosis administrades van ser  $3.16 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^9$ ,  $3.16 \times 10^9$  i  $1 \times 10^{10}$  vg/animal. Els animals controls es van administrar amb la dosi més alta ( $1 \times 10^{10}$  vg/animal) d'un vector AAV1-Null, que transportava la mateixa seqüència del vector terapèutic però sense el gen d'interès (Figura 13).

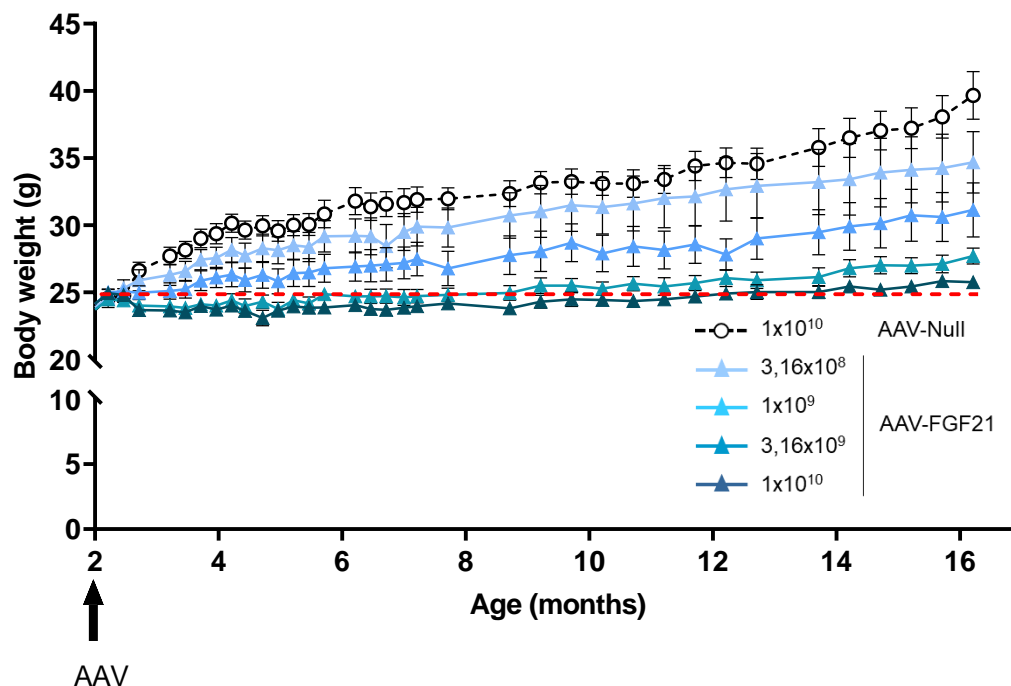
Després de l'administració dels vectors virals, es va dur a terme un seguiment setmanal del pes, de la glicèmia i de la ingesta. Per avaluar si els animals tractats presentaven una major sensibilitat a la insulina i tolerància a la glucosa es va realitzar un test de tolerància a la insulina (ITT) i un test de tolerància a la glucosa (GTT) als 6 i 15 mesos d'edat. Als 16 mesos, es va mesurar la despesa energètica dels ratolins mitjançant una calorimetria indirecta. Actualment, aquests animals estan en seguiment per tal d'avaluar la seguretat a llarg termini de l'expressió de FGF21 (Figura 13).



**Figura 13. Disseny experimental de l'administració intra-CSF de vectors AAV1-FGF21 o AAV1-Null a ratolins sans.** El vector viral AAV1-FGF21 es va administrar intra-CSF a ratolins mascles C57BL/6 de 2 mesos a les dosis de  $3.16 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^9$ ,  $3.16 \times 10^9$ ,  $1 \times 10^{10}$  vg/animal. Els animals controls es van administrar amb  $1 \times 10^{10}$  vg/animal d'AAV1-Null. Es va realitzar un seguiment setmanal del pes, la glicèmia i la ingesta i es van realitzar diferents proves metabòliques. ITT: test de tolerància a la insulina, GTT: Test de tolerància a la glucosa, AAV: Vector adenoassociat.  $n=8-10$  per grup.

## 2.1. Evolució del pes corporal després de l'administració intra-CSF d'AAV1-FGF21

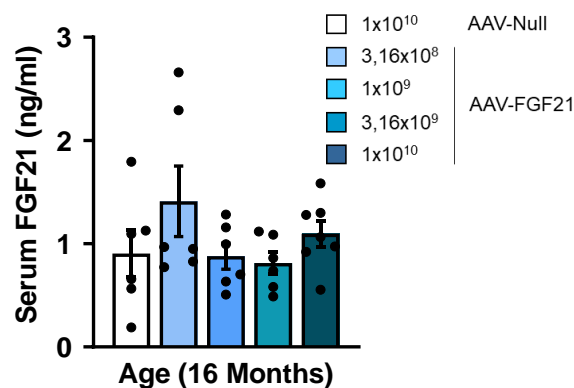
Després de l'administració dels vectors AAV1-FGF21 es va avaluar l'evolució del pes corporal dels animals. Els animals control tractats amb vector AAV1-Null van presentar un increment de pes progressiu amb l'edat tot i estar alimentats amb una dieta *chow* (Figura 14). Aquest increment de pes probablement és el resultat de la disminució de l'activitat metabòlica que es produeix durant l'envelliment (St-Onge and Gallagher, 2010). En canvi, els animals tractats amb AAV1-FGF21 presentaven un pes inferior al dels animals controls i depenent de la dosi del vector administrada. Als 16 mesos d'edat (14 mesos després de l'administració dels vectors) els animals controls presentaven un increment del pes corporal del 60%, en canvi, els animals tractats amb dosis creixents d'AAV1-FGF21 van experimentar un increment del pes molt menor, sobretot a les dosis altes del vector administrat (40%, 20%, 10% i 3%, respectivament) (Figura 14).



**Figura 14. Evolució del pes corporal en animals sans tractats amb AAV1-FGF21.** Pes corporal al llarg del temps dels ratolins sans administrats intra-CSF als 2 mesos d'edat amb les diferents dosis d'AAV1-FGF21. AAV: Vector adenoassociat. Els resultats s'expressen com la mitja  $\pm$ SEM. n=8-10 animals per grup.

Als 16 mesos d'edat també es van determinar els nivells circulants de FGF21 i es va observar que aquests eren similars als dels animals no tractats en qualsevol de les dosis administrades (Figura 15). Per tant, malgrat que l'administració intra-CSF

d'AAV1-FGF21 provocava canvis en el pes corporal, indicant que aquests no estaven associats a un increment dels nivells circulants de FGF21.

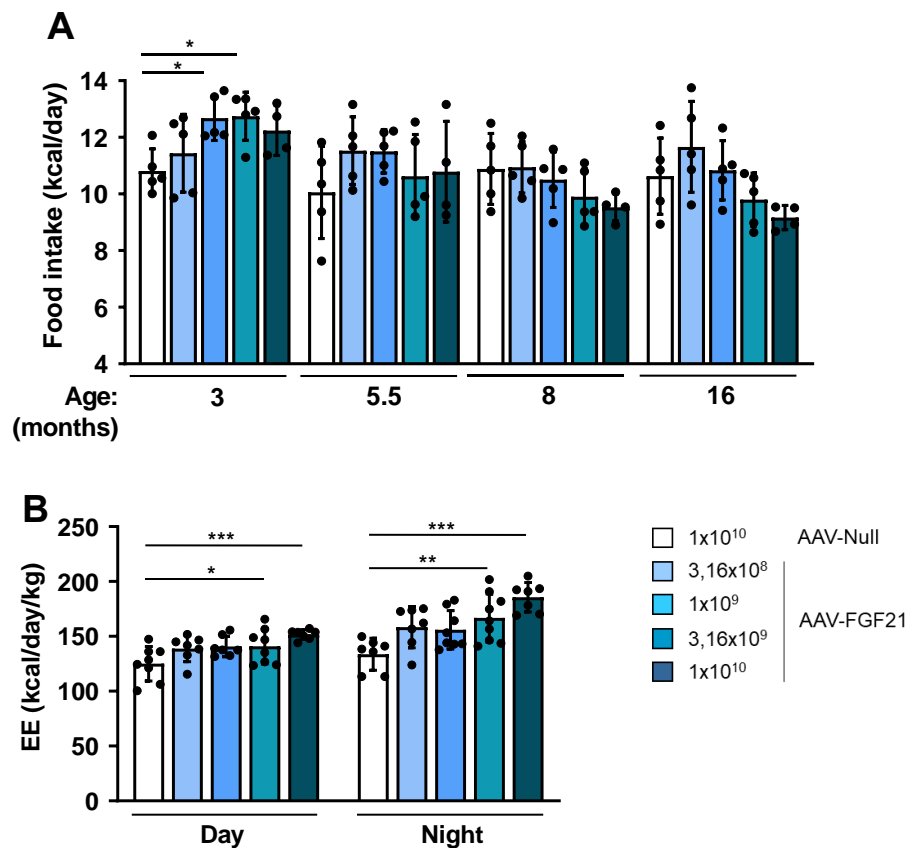


**Figura 15. Nivells circulants de FGF21.** Determinació dels nivells sèrics de FGF21, 14 mesos després de l'administració intra-CSF de les diferents dosis d'AAV1-FGF21 en ratolins sans. Els resultats s'expressen com la mitja  $\pm$ SEM. n=8-10 animals per grup.

## 2.2. Anàlisi dels canvis en el balanç energètic induïts pel tractament AAV1-FGF21.

La disminució en el guany de pes associat a l'envelliment observada amb el tractament amb AAV1-FGF21 podia resultar d'una disminució de la ingesta i/o un augment de la despesa energètica. Durant els primers mesos post-administració dels vectors, la ingesta dels ratolins tractats amb les diferents dosis de AAV1-FGF21 estava incrementada respecte els animals administrats amb AAV-Null. Al llarg del temps, aquest augment del consum de kcal va anar disminuint fins a igualar-se a la ingesta dels animals controls i en el tractament amb les dues dosis més altes del vector, aquesta va arribar a nivells lleugerament inferiors (Figura 16A).

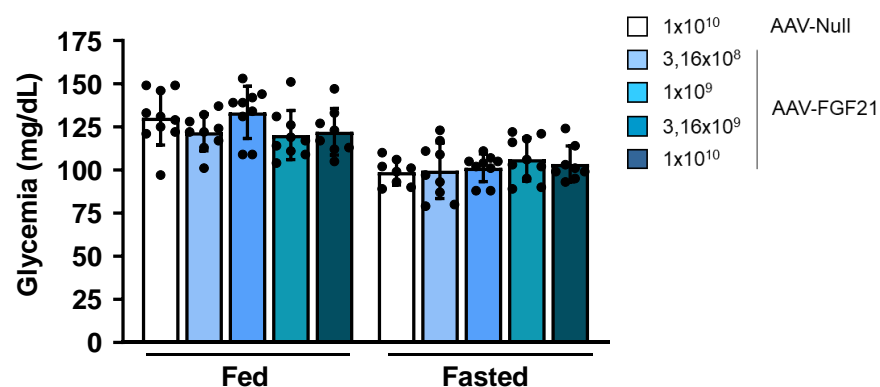
Per calcular la despesa energètica es va dur a terme una calorimetria indirecta als 16 mesos d'edat que va mostrar que després de l'administració d'AAV1-FGF21, els ratolins presentaven un augment de la despesa energètica, quan els ratolins són més actius. Aquests canvis eren més elevats i significatius en els animals tractats amb les dues dosis més altes (Figura 16B). Per tant, els canvis en el pes corporal produïts per l'acció del FGF21 en l'encèfal resultarien d'un augment de la despesa energètica.



**Figura 16. Anàlisi de la ingesta i la despesa energètica dels animals sans tractats amb AAV1-FGF21.** (A) Evolució de la ingesta diària en kilocalories als 3, 5.5, 8 i 16 mesos d'edat en animals sans administrats intra-CSF amb diferents dosis d'AAV1-FGF21. (B) Despesa energètica als 14 mesos de l'administració amb diferents dosis d'AAV1-FGF21, calculada mitjançant calorimetria indirecta i expressada en kilocalories gastades per dia i normalitzades pel pes de l'animal. Els resultats s'expressen com la mitja  $\pm$ SEM. n=8-10 animals per grup. \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001.

### 2.3. El tractament amb AAV1-FGF21 millora el metabolisme de la glucosa

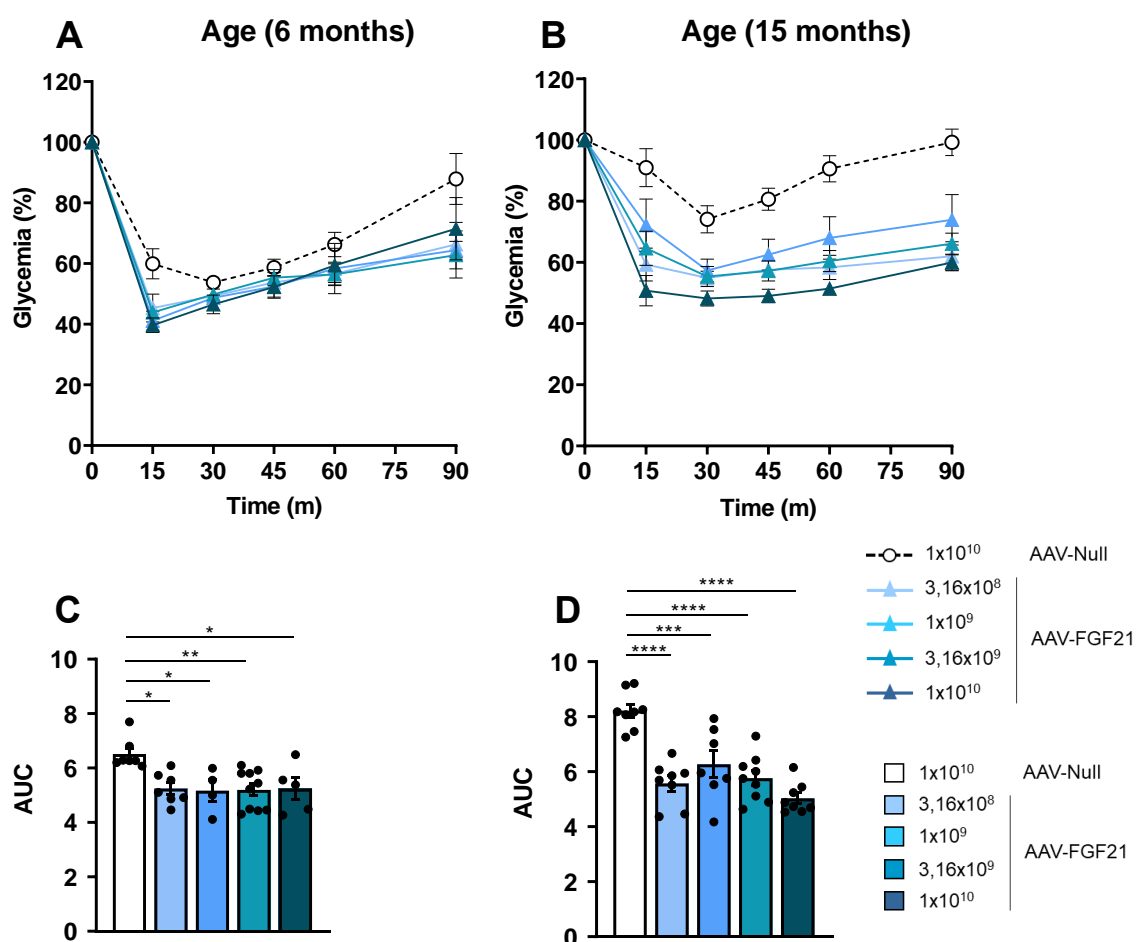
El tractament amb AAV1-FGF21 no va donar lloc a canvis en la glicèmia, ni en condicions d'alimentació ni en condicions de dejú (Figura 17).



**Figura 17. Determinació de la glucèmia.** Nivells de glucosa circulant de ratolins sans de 16 mesos d'edat tractats, intra-CSF amb diferents dosis d'AAV1-FGF21. En condicions de dejú i d'alimentació. Els resultats s'expressen com la mitja  $\pm$ SEM. n=8-10 animals per grup.

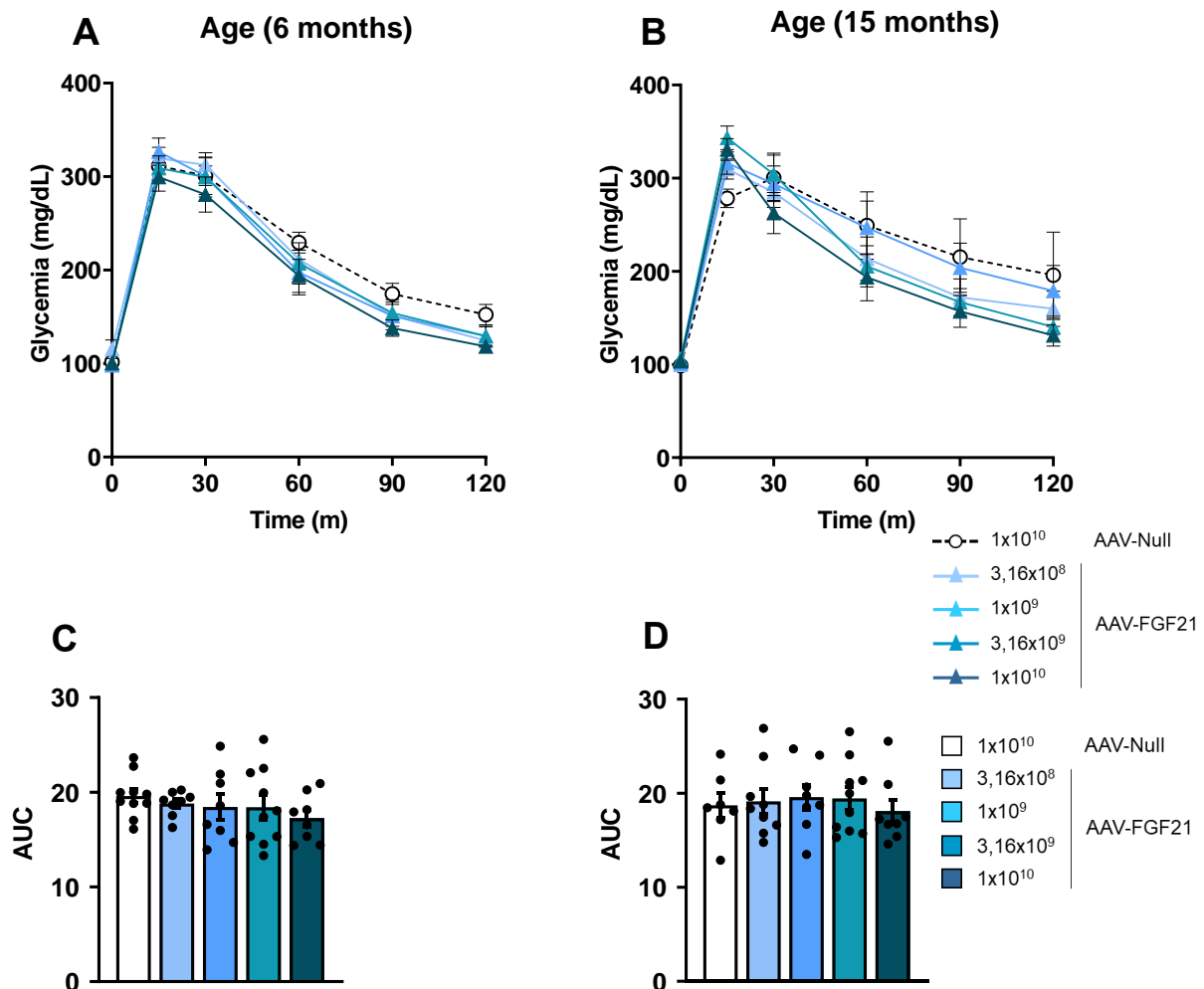


Per valorar la sensibilitat a la insulina es va realitzar un test de tolerància a l'hormona després d'administrar 0.375 UI/kg d'insulina als 4 (Figura 18A i 18C) i als 13 (Figura 18B i 18D) mesos després del tractament amb els vectors virals. En ambdós casos, els animals tractats presentaven una sensibilitat a la insulina major que els animals control (Figura 18). En el segon ITT, els animals controls ja van presentar una certa resistència a la hormona, possiblement deguda al seu envelliment mentre que tots els animals tractats amb les diferents dosis presentaven una resposta similar a quan eren joves. Per tant, en el segon ITT, les diferències dels animals tractats amb AAV1-FGF21 van ser més significatives respecte als animals no tractats (Figura 18B i 18D).



**Figura 18. Sensibilitat a la insulina en animals sans tractats amb AAV1-FGF21. (A,B)** Test de tolerància a la insulina (ITT). Els animals control i els animals tractats amb diferents dosis de AAV1-FGF21 es van injectar intraperitonealment amb 0.375 U d'insulina/kg de pes corporal i els nivells de glucosa en sang es van mesurar als temps indicats. El test es va realitzar als 6 mesos **(A)** i als 15 mesos **(B)** d'edat. Els resultats s'expressen com el % del canvi respecte a la glucosa inicial. **(C,D)** Representació de l'àrea sota la corba de l'ITT realitzat als 6 mesos **(C)** i als 15 mesos **(D)** d'edat. Els resultats s'expressen com la mitja  $\pm$ SEM. n=8-10 animals per grup. \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001\*\*\*\*p<0.0001.

A les mateixes edats, també es va realitzar un test de tolerància a la glucosa i es va observar que tots els ratolins presentaven una tolerància normal a la sobrecàrrega de glucosa (Figura 19).



**Figura 19. Tolerància a la glucosa en animals sans tractats amb AAV1-FGF21. (A,B)** Test de tolerància a la glucosa (GTT). Els animals control i els animals tractats amb diferents dosis de AAV1-FGF21 es van injectar intraperitonealment amb 1g de glucosa/kg de pes i els nivells de glucosa en sang es van mesurar als temps indicats. El test es va realitzar als 6 mesos (A) i als 15 mesos (B) d'edat. (C,D) Representació de l'àrea sota la corba del GTT realitzat als 6 mesos (C) i als 15 mesos (D) d'edat. Els resultats s'expressen com la mitja  $\pm$ SEM. n=8-10 animals per grup.

En conjunt aquests resultats demostraven que l'administració d'AAV1-FGF21 en el SNC era segura a llarg termini ja que els ratolins eren normoglicèmics, eren tolerants a la sobrecàrrega de glucosa, i fins i tot més sensibles a la insulina. El resultat també indicaven que la dosi mínima efectiva d'AAV1-FGF21 era de  $3.16 \times 10^8$  vg/animal i que el tractament amb AAV1-FGF21 era capaç de mantenir el pes corporal més baix que el que assolien els animals sans no tractats amb l'edat.

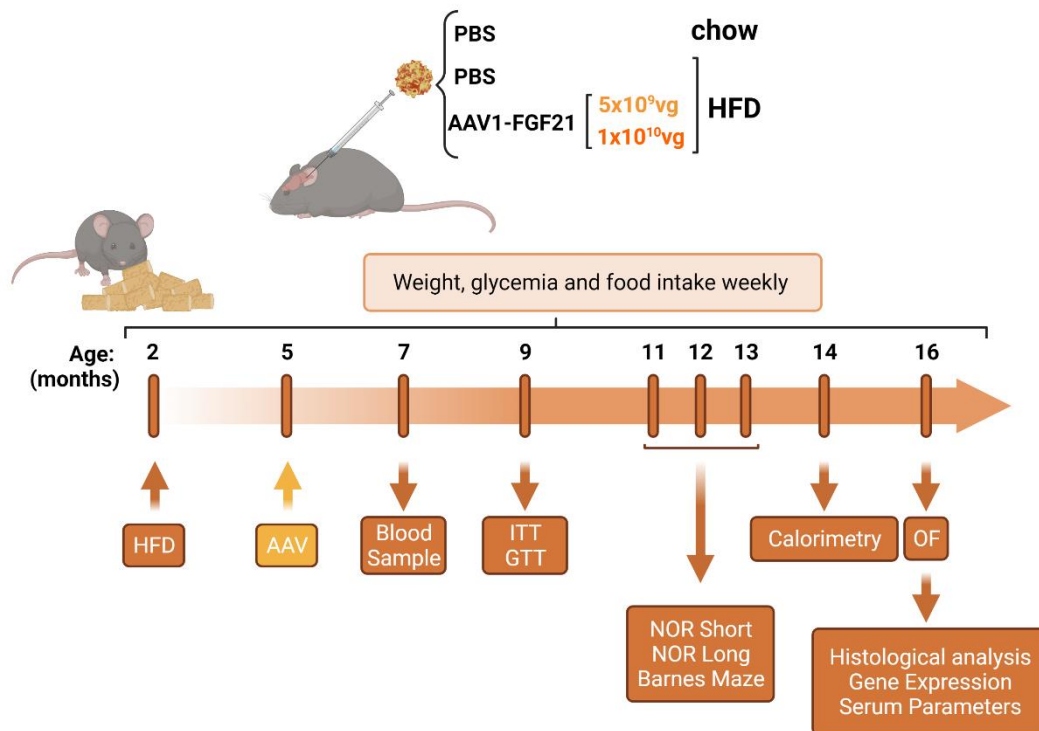
### 3. SOBREEXPRESSIÓ LOCAL DE FGF21 EN EL SISTEMA NERVIÓS CENTRAL I EFECTES A NIVELL METABÒLIC I COGNITIU EN RATOLINS OBESOS

Després de comprovar la seguretat de l'administració intra-CSF dels vectors AAV1-FGF21 i la seva eficàcia per disminuir l'increment en el pes corporal associat amb l'edat en ratolins sans, es va avaluar ratolins obesos la seva possible capacitat per revertir l'increment de pes en, la resistència a la insulina i el deteriorament cognitiu associat.

Un dels models murins d'obesitat més utilitzat, és l'induït mitjançant l'alimentació amb una dieta alta en lípids (HFD) (Surwit et al., 1998). Els ratolins alimentats amb HFD presenten un increment de pes que està associat amb la resistència a la insulina (tot i que normalment no acaben desenvolupant una DT2 oberta) i desenvolupen una esteatosi hepàtica que acaba resultant en l'aparició del NASH (Black et al., 1998; Almind and Kahn, 2004; Farrell et al., 2019).

Així, en aquest estudi es van alimentar ratolins mascles C57BL/6 de 2 mesos d'edat amb HFD i un altre grup d'animals amb dieta *chow*, que es van mantenir com a grup control sa. Després de 3 mesos (als 5 mesos d'edat), els animals alimentats amb HFD van esdevenir obesos. En aquest moment, es van administrar intra-CSF dues dosis dels vectors AAV1-FGF21;  $5 \times 10^9$  vg/animal o  $1 \times 10^{10}$  vg/animal, i es van seguir alimentant amb HFD. Un grup d'animals alimentats amb HFD no es va tractar amb AAV1-FGF21 es va mantenir com a grup control obès. Els dos grups controls, el *chow* i el HFD, es van administrar intra-CSF amb PBS (Figura 20).

Durant tot l'experiment es va anar controlant setmanalment el pes dels animals, la ingesta de menjar i la glucèmia. També es van realitzar assajos metabòlics com l'ITT, el GTT o la calorimetria indirecta. Per avaluar la capacitat cognitiva dels ratolins es van dur a terme diferents proves de comportament com el *Novel Object Recognition test* (NOR) a curt i a llarg termini, el *Barnes Maze*, i l'*Open Field* (OF). Els animals es van eutanasiar als 16 mesos d'edat i es van analitzar els teixits a nivell histològic, l'expressió de gens clau i també es van mesurar diferents paràmetres sèrics (Figura 20).

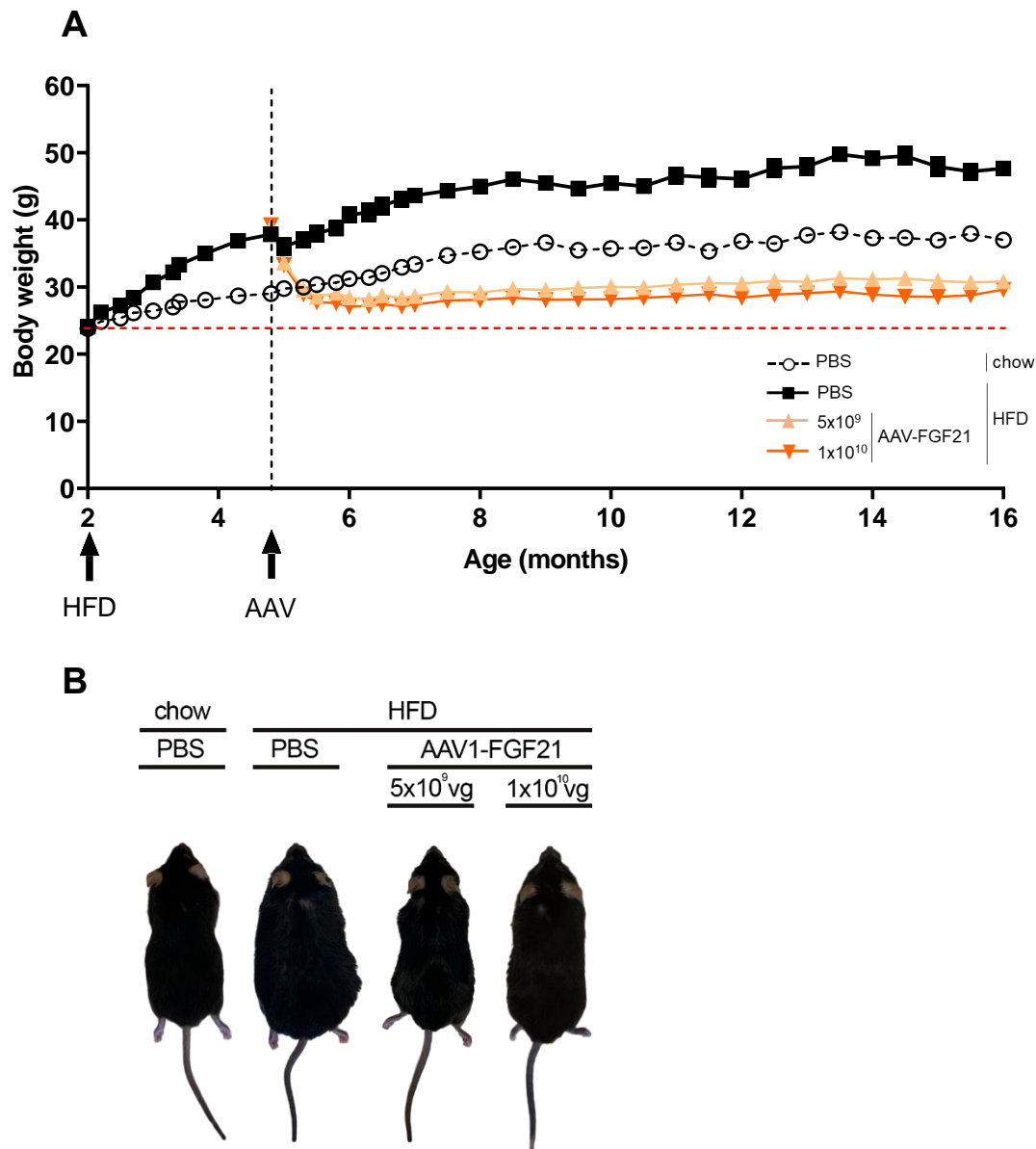


**Figura 20. Disseny experimental de l'administració intra-CSF de vectors AAV1-FGF21 en ratolins obesos induïts per dieta.** Les dosis de  $5 \times 10^9$  i  $1 \times 10^{10}$  vg de AAV1-FGF21 es van administrar localment en el SNC, utilitzant la via intra-CSF, a ratolins obesos de 5 mesos d'edat prèviament alimentats amb dieta alta en lípids durant 3 mesos. Els animals controls es van injectar intra-CSF amb PBS. Es va realitzar un seguiment setmanal del pes, la glicèmia i la ingesta. Es van realitzar diferents proves metabòliques i de comportament fins a l'eutanàsia als 16 mesos d'edat. ITT: test de tolerància a la insulina, GTT: Test de tolerància a la glucosa, AAV: Vector viral adenoassociat, HFD: Dieta alta en lípids, NOR: *Nobel Object Recognition test*, OF: *Open Field*.  $n=11-15$  per grup.

### 3.1. L'administració d'AAV1-FGF21 al SNC reverteix l'obesitat a llarg termini

Al cap de 3 mesos d'estar alimentats amb HFD els animals van incrementar el seu pes corporal al voltant d'un 40% respecte al seu pes inicial, moment en el qual es van tractar amb els vectors AAV1-FGF21 (Figura 21A). Mentre que el pes del grup HFD control va anar augmentant al llarg del temps fins arribar a un 105% de guany de pes respecte al seu pes inicial (Figura 21A), el tractament amb AAV1-FGF21 a les dues dosis van prevenir no només l'augment de pes corporal a causa de la dieta HFD, sinó que també va revertir el guany de pes assolit durant els 3 mesos anteriors (Figura 21A). De fet, els animals tractats van arribar a tenir un pes inferior al dels animals control de la mateixa edat alimentats en dieta *chow*, per tant, van revertir també el guany de pes associat a l'edat (Figura 21A i 21B). La pèrdua de pes induïda per la sobreexpressió de FGF21 al SNC va ser molt ràpida, ja que amb només 4 setmanes de tractament els animals van perdre el 40% del seu pes i aquest es va mantenir estable fins al final de

l'experiment. No es van observar diferències significatives entre les dues dosis d'AAV1-FGF21 administrades (Figura 21).



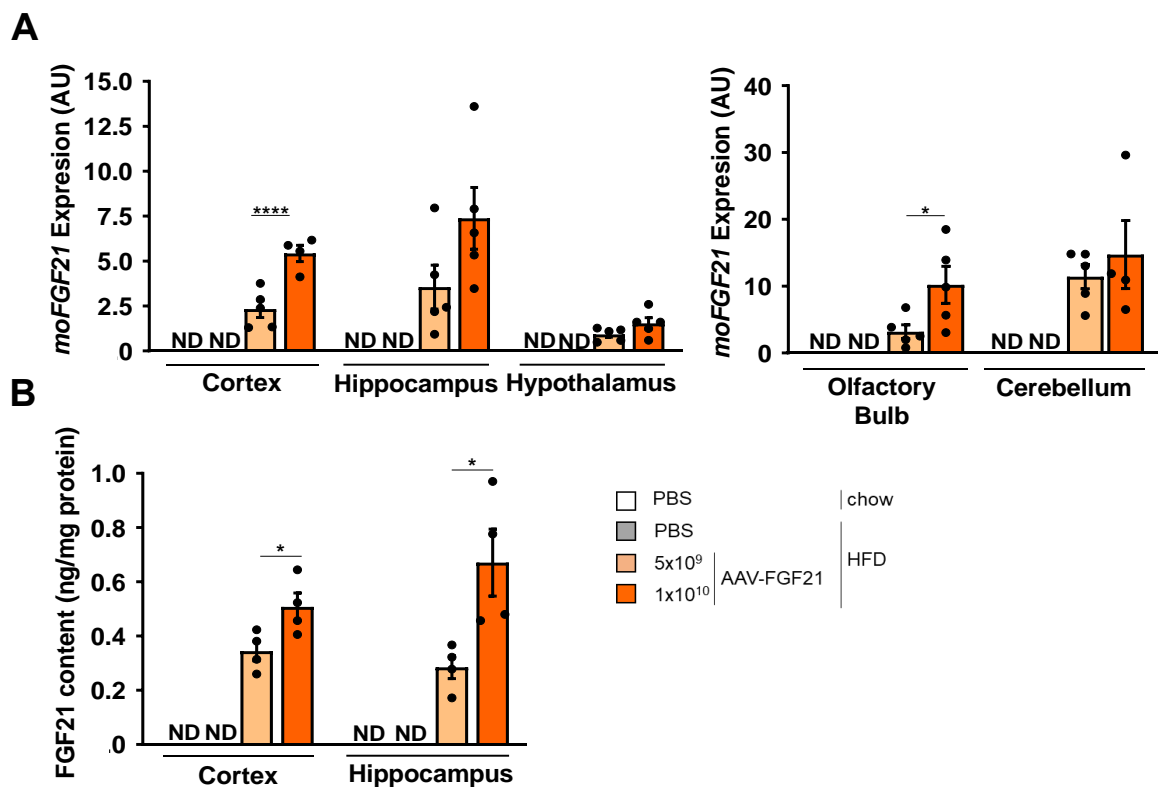
**Figura 21. Evolució del pes corporal en animals tractats amb AAV1-FGF21. (A)** Evolució del pes corporal de ratolins alimentats amb *chow* o amb obesitat induïda per dieta HFD. Als 5 mesos d'edat un grup d'animals es van tractar intra-CSF amb AAV1-FGF21 a dues dosis. Els animals control alimentat amb HFD o amb *chow* es van administrar intra-CSF amb PBS. **(B)** Imatges representatives dels animals dels diferents grups experimentals. AAV: Vector viral adenoassociat. Els resultats s'expressen com la mitja  $\pm$ SEM. n=11-15 animals per grup.

En finalitzar l'estudi es van obtenir i pesar els principals dipòsits adiposos blancs (WAT), l'adipós marró (BAT) i el fetge. L'increment del pes dels teixits adiposos i del fetge dels animals obesos es va normalitzar completament amb la transferència gènica de FGF21 (Figura 22 i 23).



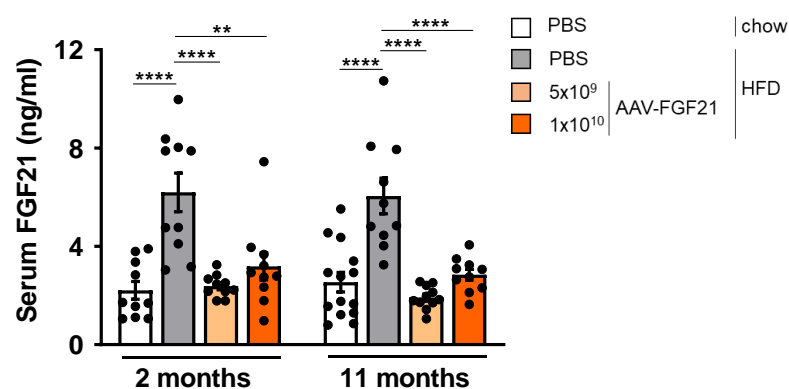
### 3.2. Expressió de FGF21 al SNC a llarg termini en animals tractats amb el vector AAV1-FGF21

Al finalitzar l'estudi, es va comprovar la sobreexpressió de FGF21 en les diferents parts de l'encèfal. Els animals tractats amb les dues dosis de AAV1-FGF21 presentaven un augment en els nivells de mRNA de FGF21 optimitzat en el còrtex, l'hipocamp, l'hipotàlem, el bulb olfatori i el cerebel, sent aquestes dues últimes les parts de l'encèfal que presentaven una major sobreexpressió del transgèn (Figura 24A). A conseqüència de la sobreexpressió del cDNA FGF21, aquests animals tractats van presentar un augment del contingut proteic de FGF21 en els teixits analitzats (còrtex i hipocamp) (Figura 24B). Tant els nivells d'expressió, com el contingut de FGF21 després del tractament amb AAV1-FGF21 van mostrar una relació dosi-depenent (Figura 24).



**Figura 24. Nivells d'expressió i contingut de FGF21 en diferents regions de l'encèfal. (A,B)** Nivells d'expressió de FGF21 murí optimitzat (*moFGF21*) (**A**) i de contingut proteic (**B**) en diferents regions de l'encèfal, 11 mesos després de l'administració intra-CSF de dues dosis d'AAV1-FGF21 a ratolins alimentats amb dieta *chow* o HFD. L'expressió es va mesurar mitjançant RT-PCR i normalitzat per *Rplp0* (n=5). El contingut de FGF21 es va mesurar per ELISA i el resultat es va normalitzar pel contingut total de proteïna (n=4). Els resultats s'expressen com la mitja  $\pm$ SEM. \* $p < 0.05$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ .

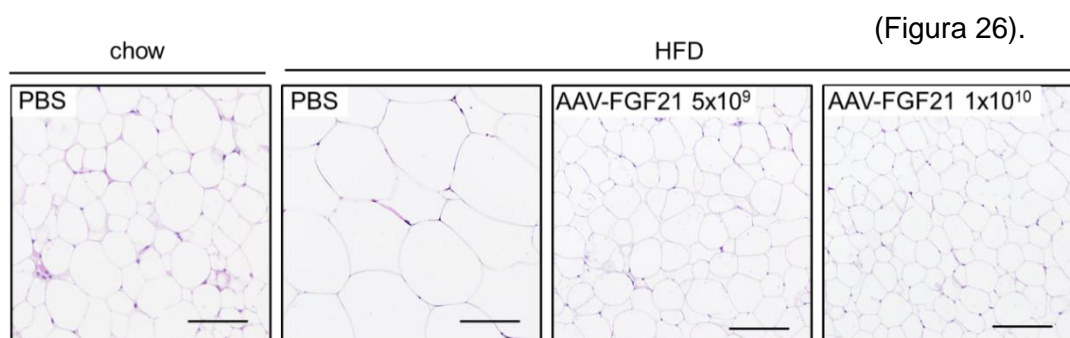
Tot i l'augment dels nivells de FGF21 en el SNC, els seus nivells circulants no estaven augmentats, ni als 2 ni als 11 mesos després de l'administració dels vectors AAV1-FGF21 (Figura 25). Per tant, la reversió de l'obesitat induïda per la sobreexpressió del FGF21 a nivell central no estava relacionada amb un augment dels seus nivells circulants. Els animals obesos control no tractats, en canvi, sí que van presentar un augment dels nivells circulants de FGF21, possiblement degut a una resistència a aquest factor (Dushay et al., 2010). De fet, els animals tractats amb AAV1-FGF21 van normalitzar aquest increment dels nivells de FGF21 associat a l'obesitat degut probablement a la millora produïda en el pes dels animals i per tant, a la millora en la sensibilitat a FGF21 (Figura 25).



**Figura 25. Nivells de FGF21 circulants.** Nivells sèrics de FGF21 mesurats mitjançant ELISA als 2 mesos i als 11 mesos després de l'administració intra-CSF de dues dosis d'AAV1-FGF21 a ratolins alimentats amb dieta *chow* o HFD. Els resultats s'expressen com la mitja  $\pm$ SEM (n=11-15). \*\*p<0.01, \*\*\*\*p<0.0001.

### 3.3. Reversió de la hipertrofia i la inflamació del eWAT induïdes per la HFD

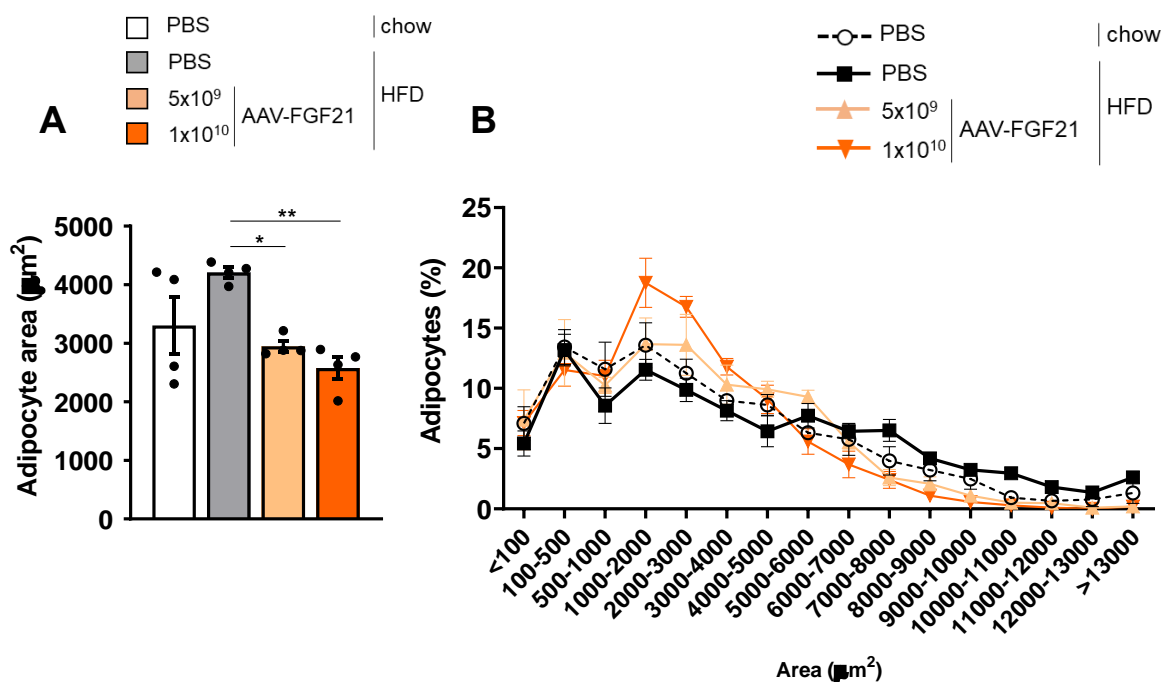
La dieta HFD indueix un increment del pes del teixit adipós blanc, que és el resultat de l'increment de la mida dels adipòcits degut a l'acumulació de lípids i que comporta una inflamació del teixit adipós (Choe et al., 2016). L'anàlisi dels talls histològics de l'eWAT tenyits amb hematoxilina/eosina va revelar una hipertrofia dels adipòcits produïda per la HFD que va ser revertida pel tractament amb AAV1-FGF21



**Figura 26. Anàlisi histològic del eWAT.** Imatges representatives de la tinció d'hematoxilina/eosina de seccions de l'eWAT de ratolins alimentats amb dieta *chow* o HFD, 11 mesos després de l'administració intra-CSF de dues dosis d'AAV1-FGF21. Escala: 100  $\mu$ m.



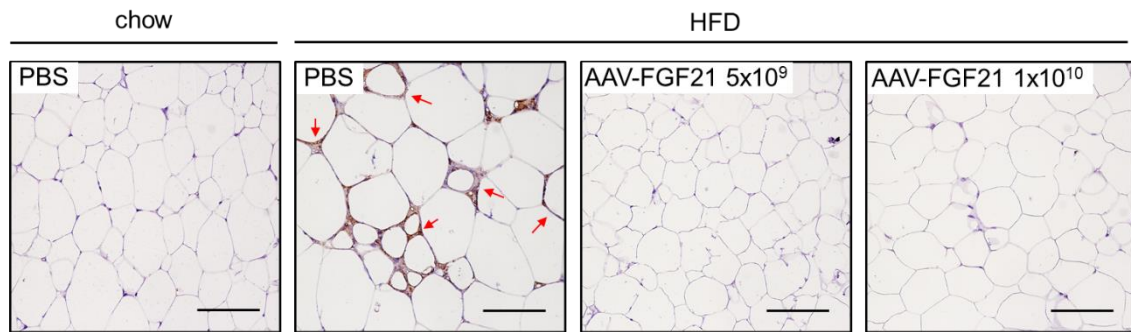
L'estudi morfològic de seccions de l'eWAT va corroborar que el tractament intra-CSF d'animals obesos amb AAV1-FGF21 reduïa de manera significativa la mida dels adipòcits respecte el grup control HFD (Figura 27A). A més, els animals tractats amb AAV1-FGF21 mostraven un increment del número d'adipòcits més petits i una reducció del número d'adipòcits més grans, una distribució inversa a la que presentaven els animals obesos no tractats (Figura 27B).



**Figura 27. Àrea mitjana i distribució de l'àrea dels adipòcits en l'eWAT.** (A,B) Estudi de l'àrea mitjana (A) i de la distribució de la freqüència de l'àrea (B) dels adipòcits blancs de l'eWAT de ratolins alimentats amb dieta *chow* o HFD, 11 mesos després de l'administració intra-CSF de dues dosis d'AAV1-FGF21. Els resultats s'expressen com la mitja  $\pm$ SEM (n=4). \*p<0.05, \*\*p<0.01

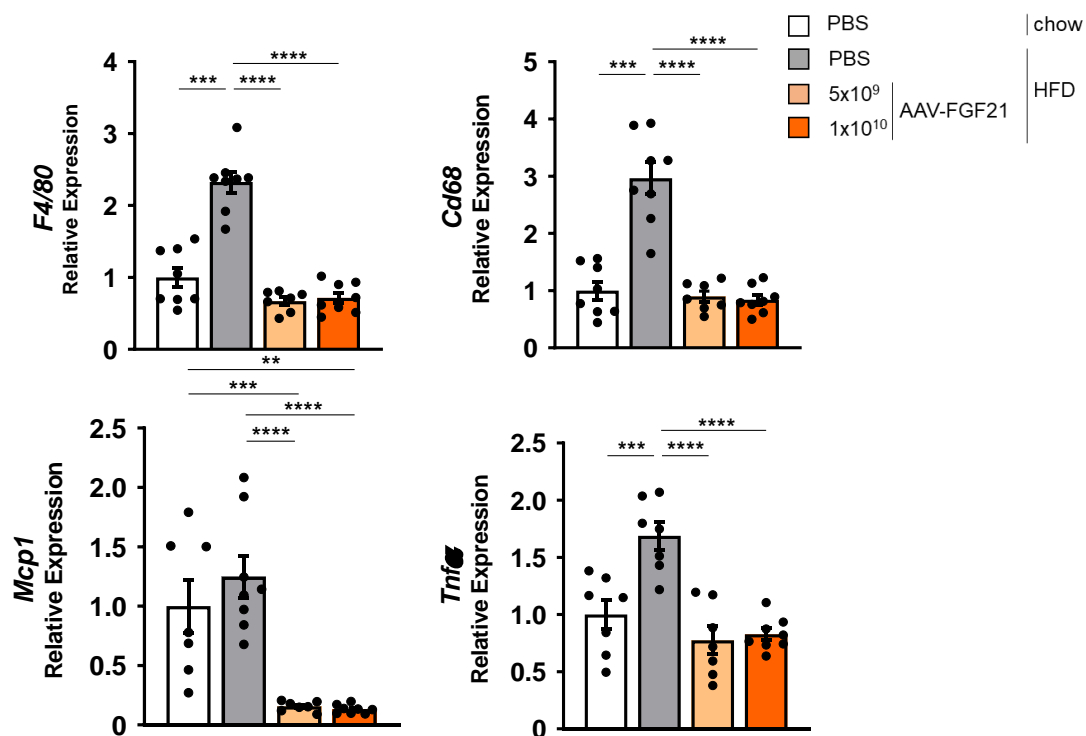
L'increment en l'acumulació de lípids en el teixit adipós blanc està relacionat amb un augment en la inflamació del teixit. Aquesta inflamació es caracteritza per un augment de la infiltració de macròfags pro-inflamatoris M1 que formen estructures en forma de corona (*crown-like*) i que desencadenen la resposta inflamatòria (Choe et al., 2016).

La inflamació del teixit adipós epididimal es va mesurar en primer lloc mitjançant un anàlisi immunohistoquímic contra MAC2 (*Galectin-3*, proteïna de la superfície cel·lular dels macròfags). Mentre que en els animals control alimentats amb HFD es van observar estructures *crown-like*, aquestes no es van detectar en cap dels animals tractats amb qualsevol de les dues dosis d'AAV1-FGF21. Per tant els resultats ens van indicar que la reducció de l'hipertrofia dels adipòcits produïda pel tractament amb aquests vectors permetia l'eliminació de la inflamació en aquest teixit induïda per la dieta HFD (Figura 28).



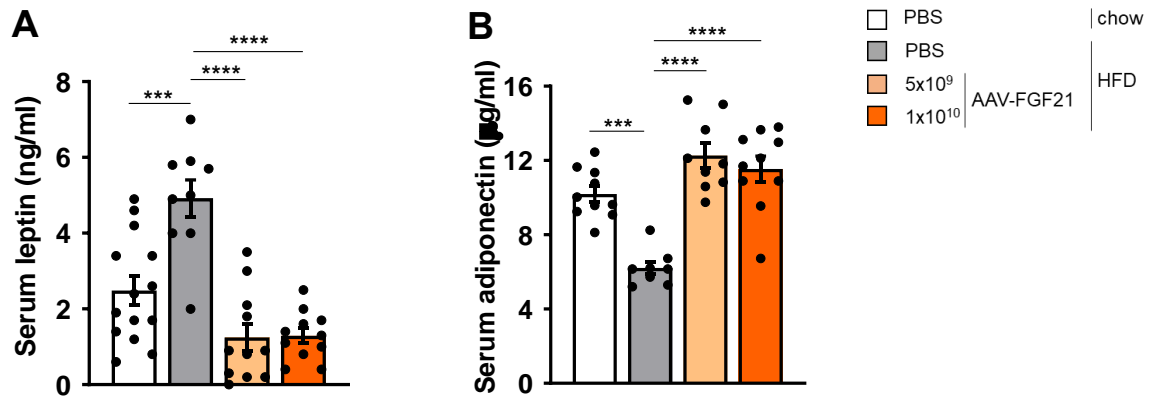
**Figura 28. Avaluació de la infiltració del eWAT.** Imatges representatives de la immunohistoquímica contra MAC2 (marró) en seccions de l'eWAT de ratolins alimentats amb dieta *chow* o HFD, 11 mesos després de l'administració intra-CSF de dues dosis d'AAV1-FGF21. Les fletxes vermelles indiquen la presència de macròfags. Escala: 100  $\mu$ m.

La inflamació del teixit adipós va resultar en un increment de l'expressió gènica de diversos marcadors de macròfags com el *F4/80* (*EGF-like module-containing mucin-like hormone receptor-like 1*), el *Cd68* (*Cluster of differentiation 68*) i de citocines proinflamàtores com *Mcp-1* (*Monocyte Chemoattractant Protein-1*) i *Tnf $\alpha$*  (*Tumor necrosis factor alfa*). En els ratolins control HFD l'expressió de tots aquests marcadors estava incrementada, en canvi, els animals tractats amb AAV1-FGF21 normalitzava o fins i tot disminuïa els nivells d'inflamació per sota dels nivells animals control *chow* (Figura 29).



**Figura 29. Avaluació de la inflamació del teixit adipós blanc epididimal (eWAT).** Nivells d'expressió de *F4/80*, *Cd68*, *Mcp1* i *Tnf $\alpha$*  en l'eWAT de ratolins alimentats amb dieta *chow* o HFD, 11 mesos després de l'administració intra-CSF de dues dosis d'AAV1-FGF21. Els resultats estan mesurats mitjançant RT-PCR i normalitzats per *Rplp0*. Els resultats s'expressen com la mitja  $\pm$ SEM. (n=8), \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001, \*\*\*\*p<0.0001

El tractament amb AAV1-FGF21 normalitzava els nivells circulants d'algunes adipocines, ja que va induir també una reducció significativa dels nivells circulants de leptina i un augment dels nivells circulants d'adiponectina (Figura 30), possiblement degut a la reducció observada de l'adipositat.



**Figura 30. Determinació dels nivells circulants d'adipocines.** Nivells sèrics circulants de leptina (A) i adiponectina (B) de ratolins alimentats amb dieta *chow* o HFD, 11 mesos després de l'administració intra-CSF de dues dosis d'AAV1-FGF21. Els resultats s'expressen com la mitja ± SEM. (n=7-14), \*\*\*p<0.001, \*\*\*\*p<0.0001.

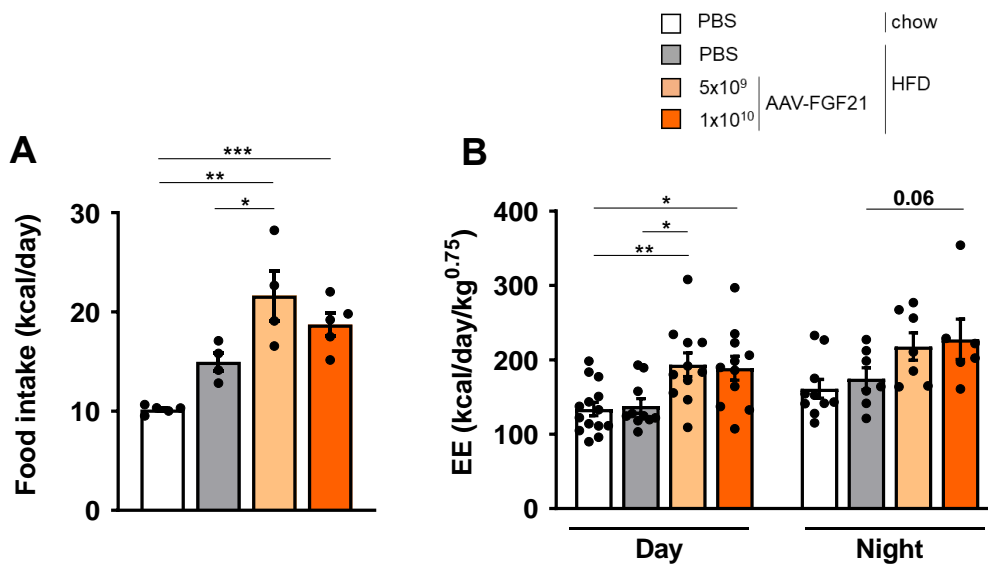
Per tant, la sobreexpressió de FGF21 en SNC, no només va ser capaç de reduir el pes corporal i el pes de l'eWAT sinó també de revertir la hipertròfia i la inflamació d'aquest teixit induïdes per la dieta.

### 3.4. El tractament amb AAV1-FGF21 provoca un increment de la despesa energètica

Els canvis en el pes corporal poden ser deguts a una disminució de la ingesta i/o a un augment de la despesa energètica (Keeseey and Powley, 2008).

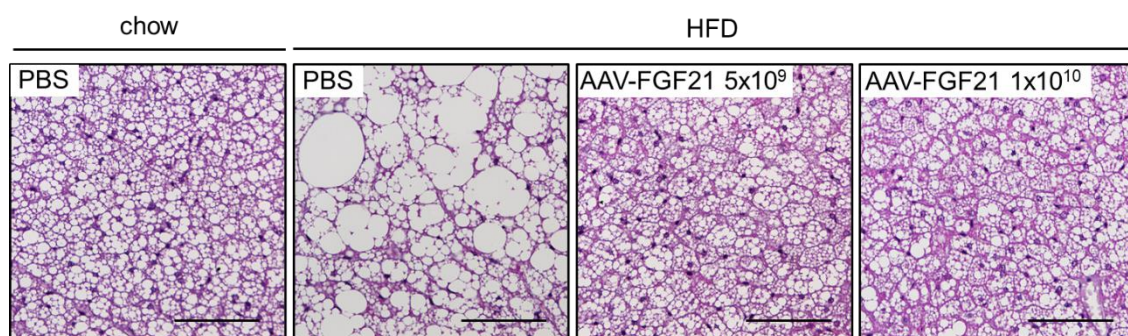
Per determinar si la reversió del guany de pes corporal induïda pel tractament amb AAV1-FGF21 era deguda a canvis en la ingesta, es van mesurar les kilocalories (kcal) diàries que consumia cada animal. Es va observar que el tractament amb AAV1-FGF21 no disminuïa la ingesta de kcal, sinó que aquesta fins i tot augmentava (Figura 31A).

Per estudiar la despesa energètica es va realitzar un anàlisi de calorimetria indirecta als 14 mesos d'edat (9 mesos post tractament). Aquest anàlisi va mostrar que totes les dosis d'AAV1-FGF21 provocaven un augment de la despesa energètica (Figura 31B).



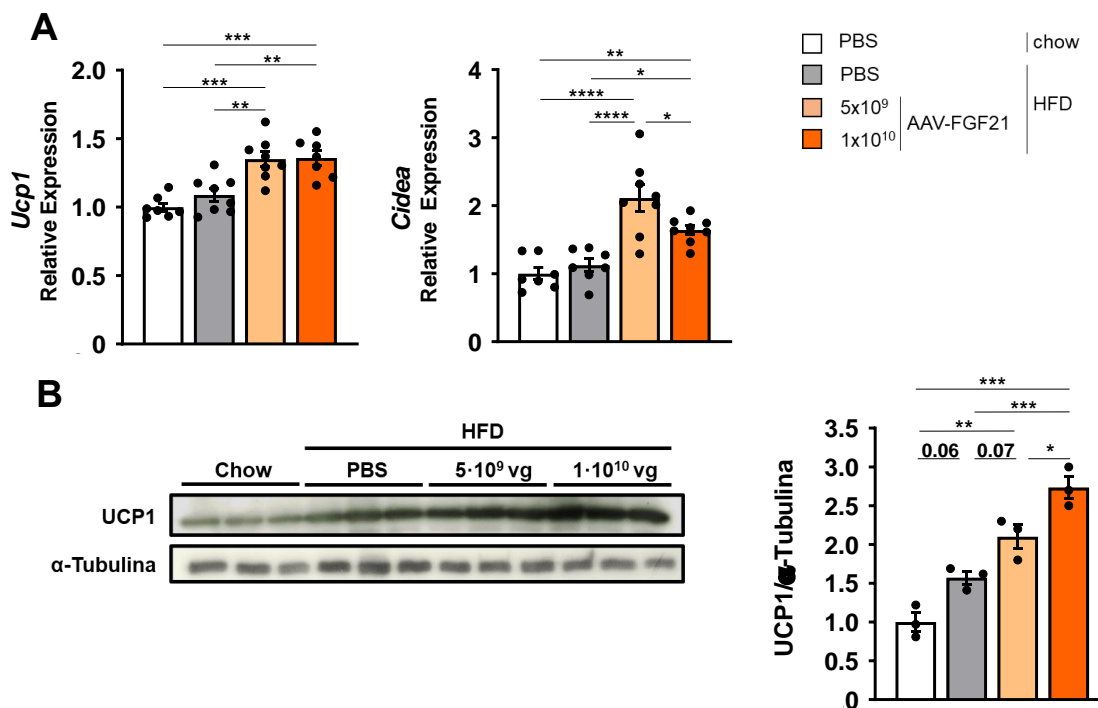
**Figura 31. Anàlisi de la ingesta i de la despesa energètica.** (A) Ingesta diària en kilocalories de ratolins alimentats amb dieta *chow* o HFD i tractats intra-CSF amb dues dosis d'AAV1-FGF21 (B) Anàlisi de la despesa energètica dels mateixos ratolins mesurada durant el dia i durant la nit, 9 mesos després de ser tractats. Els resultats s'expressen en kilocalories gastades per dia normalitzades pel pes de l'animal i s'expressen com la mitja  $\pm$ SEM. (n=10-15), \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001.

L'increment de la despesa energètica està estretament lligat amb un augment de la termogènesi no associada a tremolor, que es produeix principalment al teixit adipós marró i en certes situacions al teixit adipós blanc subcutani (Hussain et al., 2020). Per determinar si els canvis en la despesa energètica observats després de l'administració intra-CSF de AAV1-FGF21 eren deguts a canvis en la termogènesi en primer lloc es va realitzar un estudi morfològic del teixit adipós marró. L'anàlisi de les seccions d'aquest teixit tenyides amb hematoxilina/eosina va mostrar que l'administració d'AAV1-FGF21 revertia l'augment en el cúmul de lípids dels adipòcits marrons induït per la dieta alta en lípids (Figura 32).



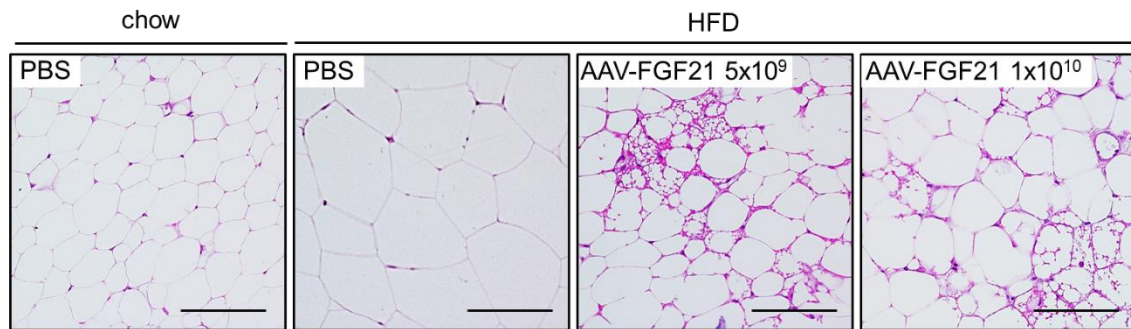
**Figura 32. Anàlisi histològic del BAT.** Imatges representatives de la tinció d'hematoxilina/eosina de seccions de BAT de ratolins alimentats amb dieta *chow* o HFD, 11 mesos després de l'administració intra-CSF de dues dosis d'AAV1-FGF21. Escala: 100  $\mu$ m.

Es va analitzar també l'expressió en el BAT de diferents gens claus associats amb la termogènesi com són el gen *Ucp1* (*termogenina* o *proteïna desacobladora 1*) i *Cidea* (*Cell Death Inducing DFFA Like Effector A*). Els animals que sobreexpressaven FGF21 a SNC presentaven uns nivells d'expressió de *Cidea* més alts que els ratolins control i, a més, tant l'expressió com el contingut d'UCP1 també es veien incrementats, indicant que la termogènesi estava augmentada en els ratolins tractats (Figura 33).



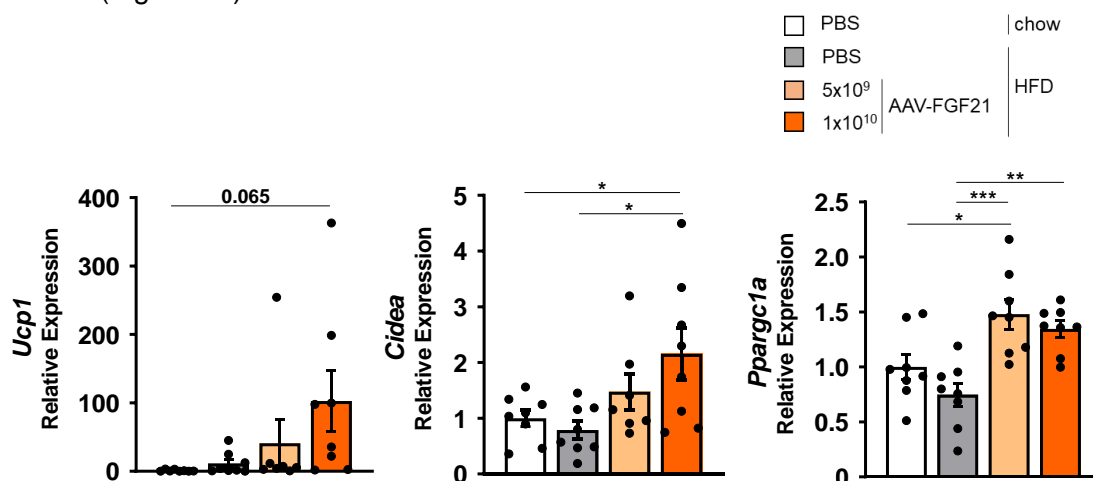
**Figura 33. Avaluació dels marcadors termogènics en el teixit adipós marró (BAT).** Anàlisi de l'expressió del contingut de marcadors termogènics en el BAT de ratolins alimentats amb dieta *chow* o HFD 11 mesos després de l'administració intra-CSF de dues dosis d'AAV1-FGF21. **(A)** Nivells d'expressió de *Ucp1* i *Cidea*. Els resultats estan mesurats mitjançant RT-PCR i normalitzats per *Rplp0*. **(B)** Anàlisi per Western-Blot del contingut d'UCP1 i normalitzats per  $\alpha$ -Tubulina. Els resultats s'expressen com la mitja  $\pm$ SEM (n=8 i n=4). \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001, \*\*\*\*p<0.0001.

L'augment de la despesa energètica mitjançant termogènesi també pot ser el resultat de l'increment del *browning* de l'iWAT (Hussain et al., 2020). Aquest procés de *browning* es produeix en els dipòsits adiposos subcutanis i es basa en l'aparició de cèl·lules adiposes "*beige*", multiloculars i positives per UCP1, amb capacitat termogènica. D'aquesta manera un dipòsit adipós blanc adquireix un fenotip de dipòsit adipós marró (Wu et al., 2012). L'anàlisi histològic del teixit adipós inguinal va permetre observar que la mida dels adipòcits dels animals tractats amb AAV1-FGF21 era menor i que a més presentaven petites zones amb adipòcits multiloculars (Figura 34).



**Figura 34. Anàlisi histològic de l'iWAT.** Imatges representatives de la tinció d'hematoxilina/eosina de seccions d'iWAT de ratolins alimentats amb dieta *chow* o HFD, 11 mesos després de l'administració intra-CSF de dues dosis d'AAV1-FGF21. Escala: 100  $\mu$ m.

Aquests resultats es van confirmar analitzant l'expressió en l'iWAT de diferents marcadors propis de cèl·lules termogènicaament actives, com *Ucp1*, *Cidea* i *Ppargc1 $\alpha$*  (*Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma Coactivator 1-Alpha*). L'expressió de tots aquests gens estava incrementada després del tractament amb AAV1-FGF21, corroborant per tant que aquest teixit era termogènicaament més actiu que el dels animals control (Figura 35).

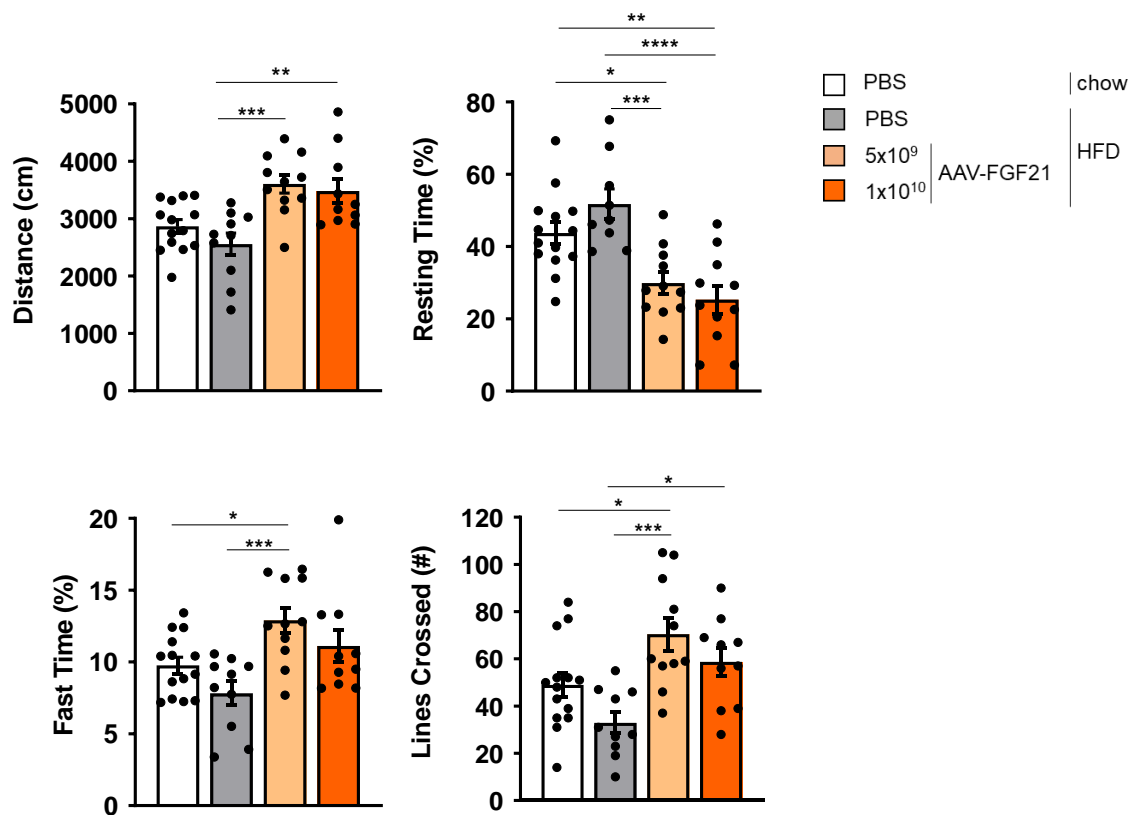


**Figura 35. Avaluació dels marcadors de *browning* en l'iWAT.** Anàlisi de l'expressió dels marcadors termogènics *Ucp1*, *Cidea* i *Ppargc1 $\alpha$*  en l'iWAT de ratolins alimentats amb dieta *chow* o HFD, 11 mesos després de l'administració intra-CSF de dues dosis d'AAV1-FGF21. Els resultats estan mesurats mitjançant RT-PCR i normalitzats per *Rplp0* i s'expressen com la mitja  $\pm$ SEM (n=8). \*p<0.05, \*\*p<0.01

L'augment de la despesa energètica també podria estar relacionat, en part, amb un increment de l'activitat locomotora, que es va poder determinar mitjançant l'anàlisi del comportament de l'animal en l'*Open-Field*. Els ratolins obesos controls recorrien una menor distància, estaven més temps en repòs i feien menys moviments ràpids i creuaven menys línies, presentant per tant una menor activitat que els ratolins control



chow. En canvi, el tractament intra-CSF amb AAV1-FGF21 revertia aquesta situació (Figura 36).



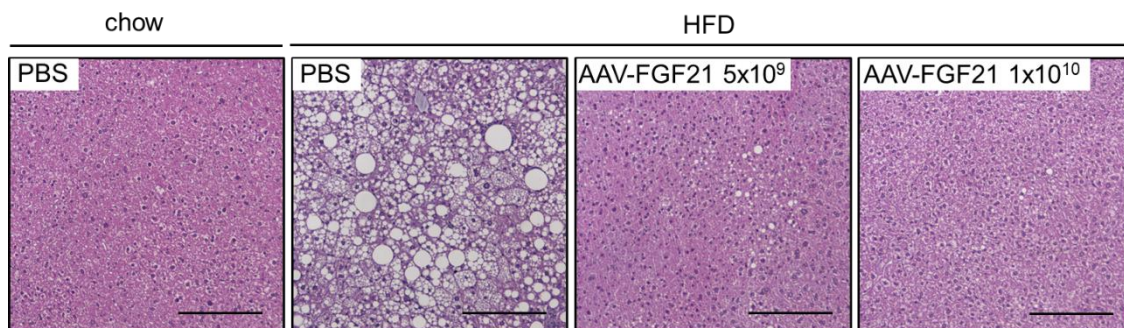
**Figura 36. Estudi de l'activitat locomotora.** Paràmetres d'activitat locomotora en el test *Open-Field* realitzat en ratolins alimentats amb dieta *chow* o HFD, 11 mesos després de ser tractats intra-CSF amb dues dosis d'AAV1-FGF21. Els resultats s'expressen com la mitja ±SEM (n=10-15) \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001, \*\*\*\*p<0.0001.

Per tant, la pèrdua de pes induïda per la sobreexpressió de FGF21 en l'encèfal en animals obesos podria estar regulada, per un augment de la despesa energètica. Aquest augment de la despesa energètica seria degut tant a un increment de l'activitat locomotora, com a una activació de la termogènesi en el teixit adipós marró i al *browning* observat en el teixit adipós blanc inguinal.

### 3.5. El tractament amb AAV1-FGF21 reverteix l'esteatosi, la inflamació i la fibrosi hepàtica induïdes per la dieta alta en lípids

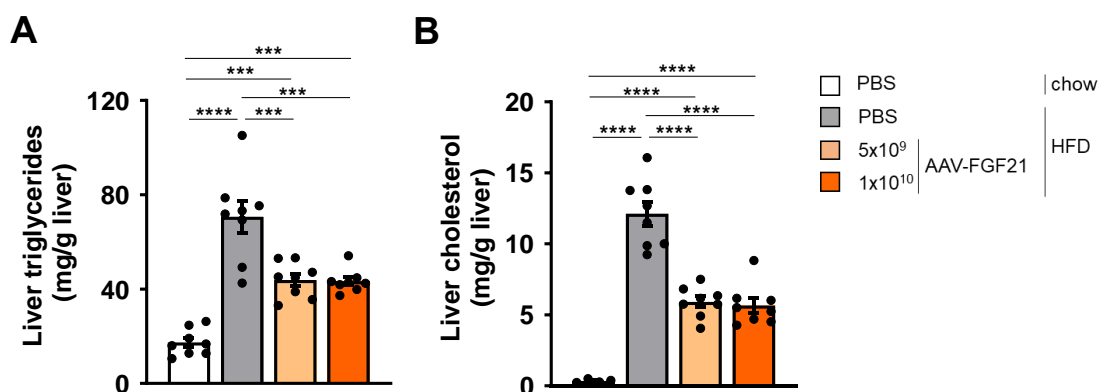
L'exposició prolongada a una dieta alta en lípids provoca que l'excés de lípids no només s'acumuli en els dipòsits adiposos sinó que també s'acumuli ectòpicament en altres teixits, com pot ser el fetge. Aquesta acumulació al fetge acaba derivant a una esteatosi hepàtica i posteriorment a la inflamació del teixit i a la fibrosi (Bertot and Adams, 2016).

L'anàlisi histològic del fetge va mostrar que els ratolins obesos control tenien una elevada hepatoesteatosi (Figura 37). En canvi, en els animals tractats amb AAV1-FGF21 es va observar una clara reversió d'aquest cúmul patològic de lípids (Figura 37).



**Figura 37. Anàlisi histològic del fetge.** Imatges representatives de la tinció d'hematoxilina/eosina de seccions de fetge de ratolins alimentats amb dieta *chow* o HFD, 11 mesos després de l'administració intra-CSF de dues dosis d'AAV1-FGF21. Escala: 200  $\mu$ m.

Paral·lelament, es va analitzar el contingut hepàtic de triglicèrids i de colesterol i es va observar que mentre que ambdós paràmetres estaven molt elevats en els animals obesos control, el tractament amb AAV1-FGF21 produïa en una disminució molt marcada d'aquets metabòlits (Figura 38).

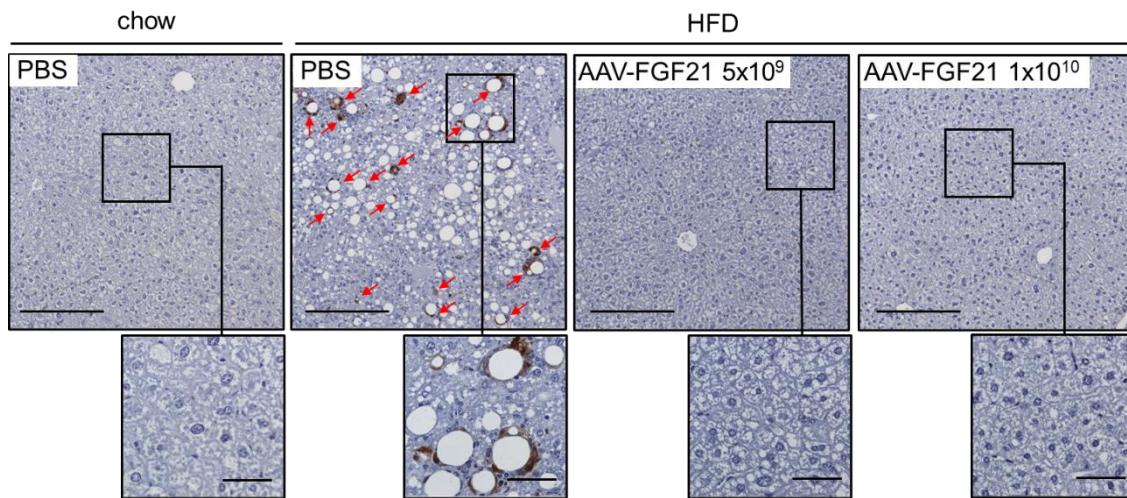


**Figura 38. Determinació del contingut de triglicèrids i colesterol en el fetge. (A,B)** Contingut de triglicèrids (A) i colesterol (B) en el fetge de ratolins alimentats amb dieta *chow* o HFD, 11 mesos després de l'administració intra-CSF de dues dosis d'AAV1-FGF21. Els resultats s'expressen com la mitja  $\pm$ SEM (n=7-8). \*\*\*p<0.001, \*\*\*\*p<0.0001.

L'acumulació de lípids en el fetge posa en marxa un important procés inflamatori en aquest teixit. Per valorar la inflamació en el fetge es va realitzar un anàlisi immunohistoquímic contra MAC2. Es va poder observar que els animals obesos control presentaven una gran quantitat de macròfags, indicativa d'inflamació, mentre que el

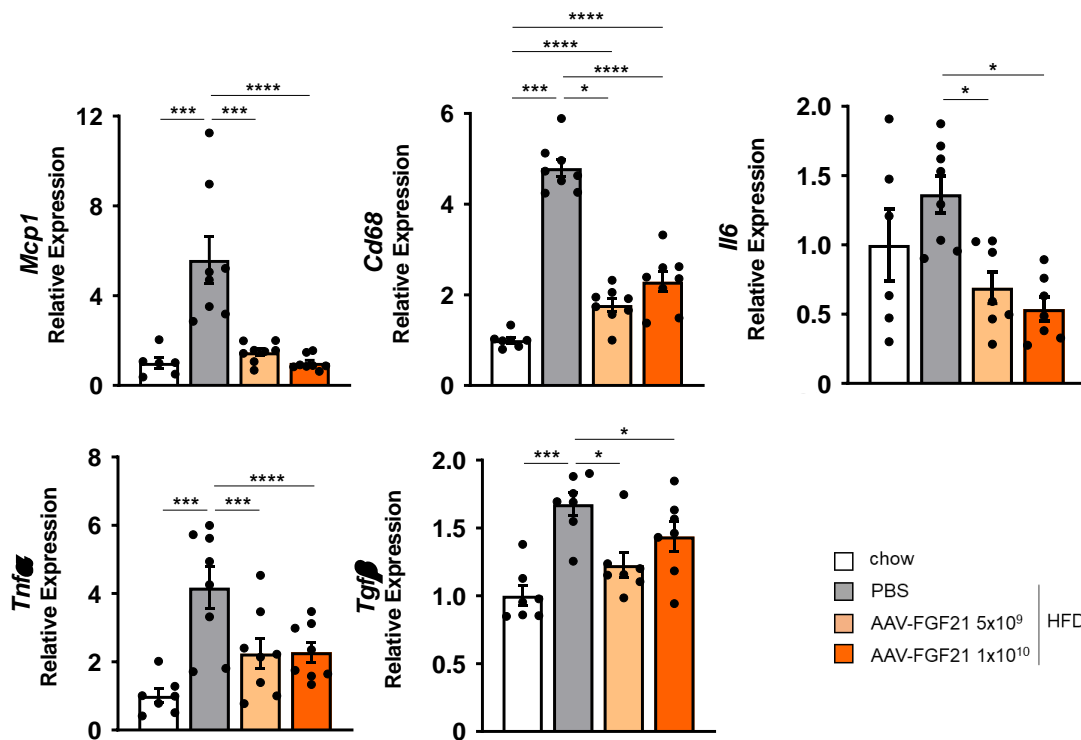


tractament amb AAV1-FGF21 era capaç de revertir completament aquest procés inflamatori (Figura 39).



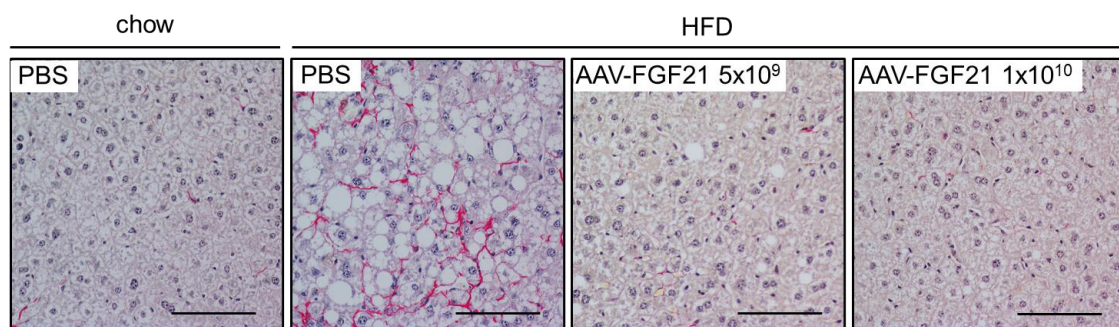
**Figura 39. Avaluació de la infiltració del fetge.** Imatges representatives de la immunohistoquímica contra MAC2 (marró) en seccions del fetge de ratolins alimentats amb dieta *chow* o HFD, 11 mesos després de l'administració intra-CSF de dues dosis d'AAV1-FGF21. Les fletxes vermelles indiquen la presència de macròfags. Escala: 200  $\mu\text{m}$  (Ampliació 50  $\mu\text{m}$ ).

El nivell d'inflamació es va poder quantificar mitjançant l'anàlisi de l'expressió gènica de marcadors de macròfags com el *Cd68* i de citocines inflamatòries com *Mcp1*, *TNF $\alpha$* , *TGF $\beta$*  (*Tumor growth factor beta*), *Il1 $\beta$*  i *Il6*. L'expressió de tots aquests marcadors en el fetge d'animals tractats amb AAV1-FGF21 estava normalitzada respecte els animals control alimentats amb HFD i fins i tot en alguns casos es trobava per sota dels animals control *chow* (Figura 40).

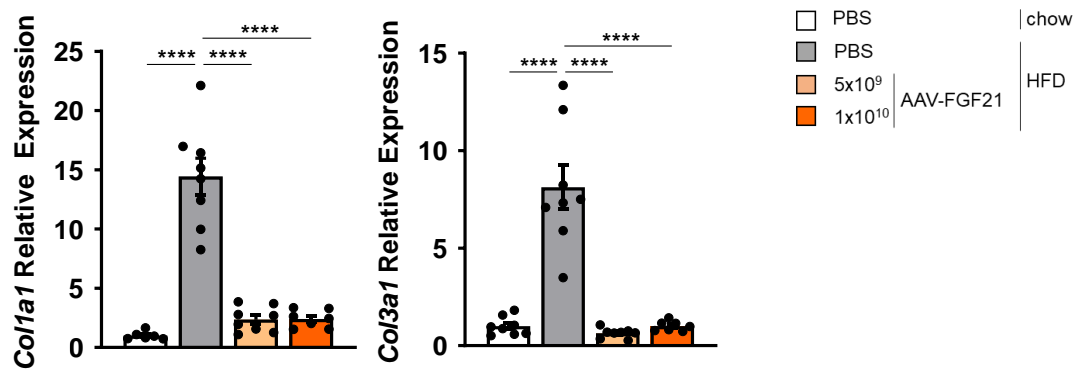


**Figura 40. Avaluació de la inflamació del fetge.** Nivells d'expressió de *Mcp1*, *CD68*, *Il1 $\beta$* , *Tnfa*, *Tgfb*, *Il6* en el fetge de ratolins alimentats amb dieta *chow* o HFD, 11 mesos després de l'administració intra-CSF de dues dosis d'AAV1-FGF21. Els resultats estan mesurats mitjançant RT-PCR i normalitzats per *Rplp0*. Els resultats s'expressen com la mitja  $\pm$ SEM (n=8) \*p<0.05, \*\*\*p<0.001, \*\*\*\*p<0.0001.

Posteriorment, es va estudiar la fibrosi hepàtica, per una banda, mitjançant l'anàlisi histoquímica de seccions del fetge tenyides amb *PicroSirius Red*, que marca de color vermell les fibres de col·lagen de la matriu extracel·lular (Figura 41). Per l'altre, es va realitzar la determinació de l'expressió del gen *Col1a1* i *Col3a1* que codifica per la cadena 1 $\alpha$  i 3 $\alpha$  del col·lagen tipus 1 (Figura 42). Aquestes dues tècniques van permetre determinar que els animals obesos controls tenien una marcada fibrosi hepàtica i que aquesta es va veure revertida amb la sobreexpressió de FGF21 en el SNC.

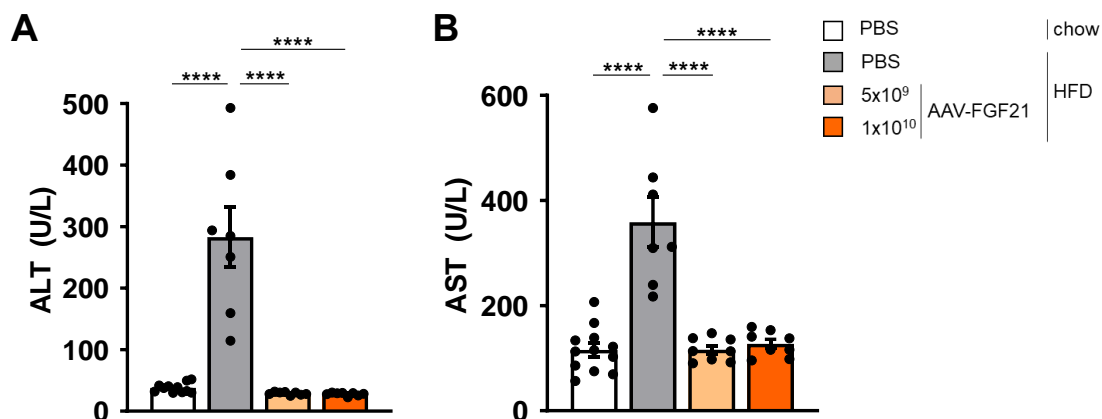


**Figura 41. Avaluació histològica de la fibrosi hepàtica.** Imatges representatives de la tinció PicroSirius Red de seccions de fetge de ratolins alimentats amb dieta *chow* o HFD, 11 mesos després de l'administració intra-CSF de dues dosis d'AAV1-FGF21. Escala: 100  $\mu$ m.



**Figura 42. Avaluació de la fibrosi del fetge** Nivells d'expressió de *Col1a1* i *Col3a1* en el fetge de ratolins alimentats amb dieta *chow* o HFD, 11 mesos després de l'administració intra-CSF de dues dosis d'AAV1-FGF21. Els resultats estan mesurats mitjançant RT-PCR i normalitzats per *Rplp0*. Els resultats s'expressen com la mitjana ±SEM. \*\*\*\*p<0.0001.

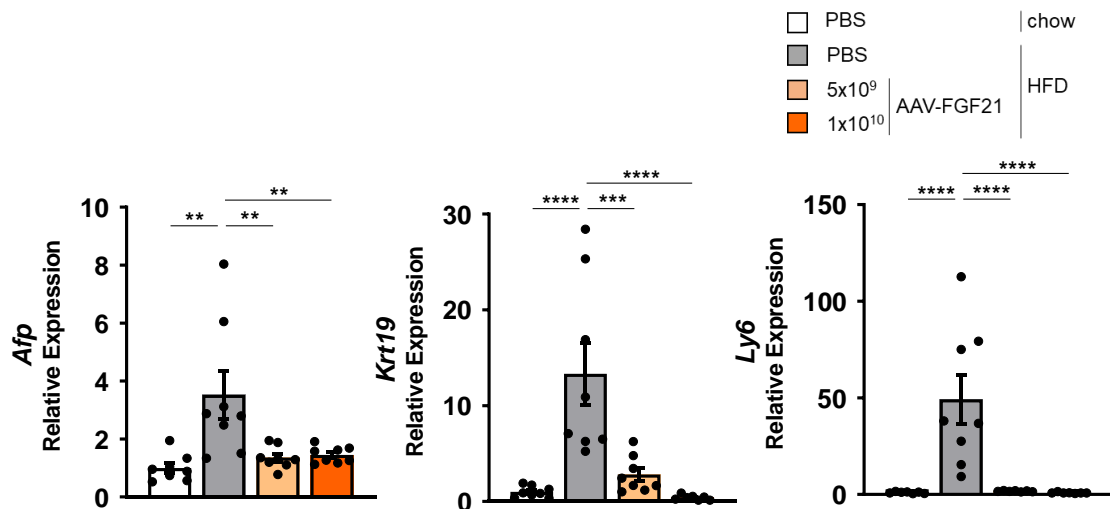
La inflamació i la fibrosi hepàtica en els animals control obesos va provocar que els nivells sèrics dels marcadors de dany hepàtic Alanina Aminotransferasa (ALT) i Aspartat Aminotransferasa (AST) fossin molt elevats respecte al grup control *chow* (Figura 43). En canvi, aquests marcadors estaven completament normalitzats després del tractament amb qualsevol de les dues dosis d'AAV1-FGF21 (Figura 43).



**Figura 43. Determinació dels nivells circulants d'ALT i AST.** (A,B) Nivells sèrics de marcadors de dany hepàtic ALT (A) i AST (B) en ratolins alimentats amb dieta *chow* o HFD, 11 mesos després de l'administració intra-CSF de dues dosis d'AAV1-FGF21. Els resultats es van expressar com la mitjana ±SEM (n=7) \*\*\*\*p<0.0001.

En ratolins C57BL/6, la ingesta de dieta HFD durant molt de temps (>12 mesos) està associada al desenvolupament de neoplàsies en el fetge (Cuadrado et al., 2005; Hill-Baskin et al., 2009). Al cap de 14 mesos d'estar alimentats amb HFD, els animals van presentar un augment de l'expressió de diferents marcadors tumorals com *Afp* ( $\alpha$ -Fetoprotein), *Krt19* (Keratin 19) i *Ly6* (Lymphocyte antigen 6) (Figura 44). A més, el 40% (4/10) dels ratolins obesos control presentaven tumors hepàtics. En canvi, els animals

tractats amb qualsevol de les dosis van presentar tots els marcadors tumorals normalitzats i cap d'ells va desenvolupar tumors (Figura 44). D'aquesta manera es va demostrar que el tractament amb AAV1-FGF21 no només era eficaç revertint respecte l'hepatoesteatosi, la inflamació i la fibrosi del fetge, sinó que en fer-ho portava a la prevenció del desenvolupament d'hepatocarcinomes associats a la dieta HFD. Per tant, aquest estudi demostra que el tractament amb AAV1-FGF21 va ser capaç de prevenir el procés de desenvolupament de NASH com a conseqüència de la dieta alta en lípids.

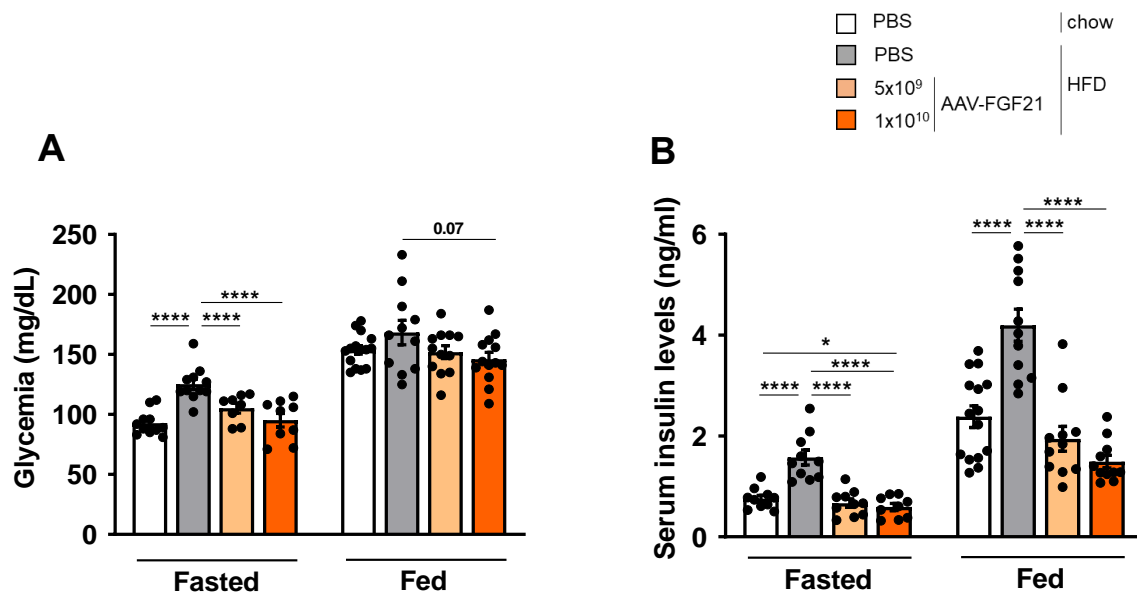


**Figura 44. Avaluació de marcadors tumorals** Nivells d'expressió d'*Afp*, *Krt19* i *Ly6* en el fetge de ratolins alimentats amb dieta *chow* o HFD, 11 mesos després de l'administració intra-CSF de dues dosis d'AAV1-FGF21. Els resultats estan mesurats mitjançant RT-PCR i normalitzats per *Rplp0*. Els resultats s'expressen com la mitja ±SEM (n=8). \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001, \*\*\*\*p<0.0001.

### 3.6. Reversió de la resistència a la insulina induïda per la dieta alta en lípids

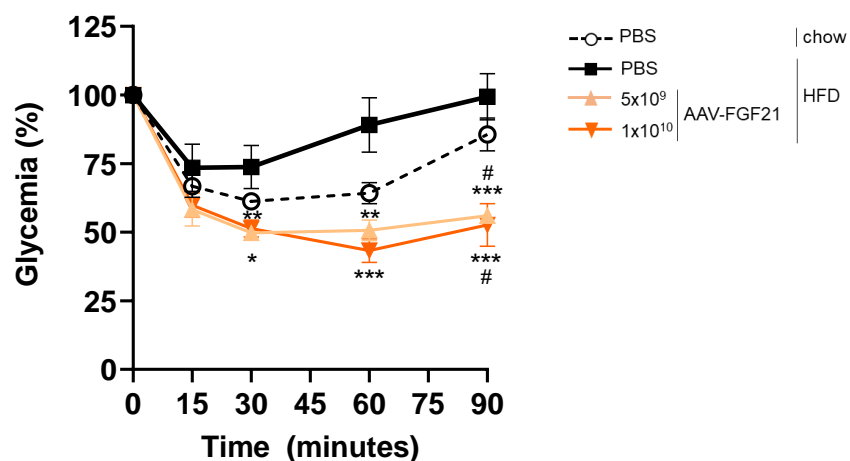
L'alimentació amb HFD indueix no només un increment en el pes corporal sinó també una resistència a la insulina. Donat que l'administració intra-CSF d'AAV1-FGF21 era capaç de revertir l'obesitat i la inflamació, es va determinar si també era capaç d'incrementar la sensibilitat a la insulina i de millorar l'homeòstasi de la glucosa.

Es van mesurar les insulinèmies i les glucèmies dels ratolins en condicions d'alimentació i de dejú i es va observar que la dieta alta en lípids provocava un lleuger augment dels nivells de glucosa en sang, però que el tractament amb AAV1-FGF21 va ser capaç de revertir (Figura 45A). Aquestes diferències eren més evidents en condicions de dejú (Figura 45A). Pel que fa als nivells sèrics d'insulina, els animals controls obesos presentaven una marcada hiperinsulinèmia, que va ser revertida mitjançant el tractament amb AAV1-FGF21 (Figura 45B).



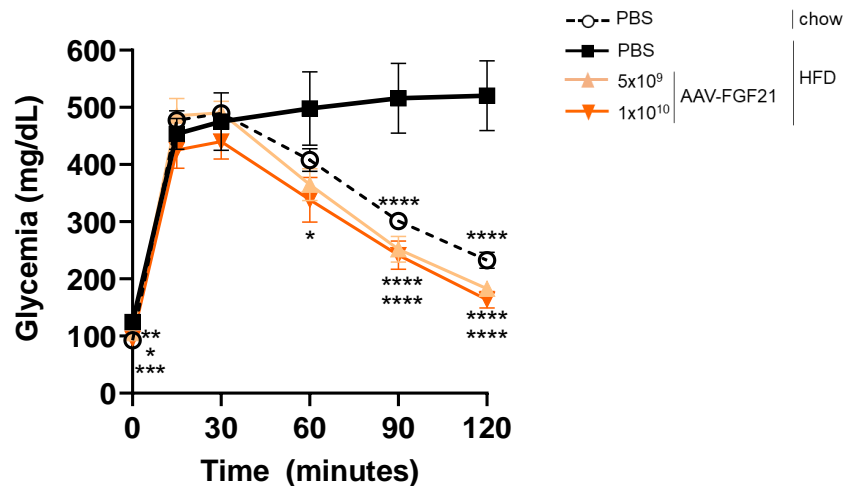
**Figura 45. Determinació de la glucèmia i la insulinèmia.** (A,B) Avaluació del metabolisme de la glucosa de ratolins alimentats amb dieta *chow* o HFD tractats intra-CSF amb dues dosis d'AAV1-FGF21. (A) Glucèmies en dejú i en alimentació mesurades als 9 mesos d'edat (4 post-AAV). (B) Insulinèmies en dejú i en alimentació mesurades als 15 mesos (10 post-AAV) i 16 mesos d'edat (11 post-AAV), respectivament. Els resultats s'expressen com la mitja  $\pm$ SEM (n=11). \* $p$ <0.05, \*\*\*\* $p$ <0.0001.

Per avaluar la resistència a la insulina, 4 mesos després de l'administració dels vectors, es va realitzar un test de tolerància a l'hormona (ITT). Aquest test va permetre corroborar que els animals alimentats amb HFD mostraven una marcada resistència a la insulina. En canvi, els animals tractats amb AAV1-FGF21 presentaven una elevada sensibilitat a l'hormona, fins i tot més gran que els animals control *chow* (Figura 46).



**Figura 46. Avaluació de la sensibilitat a la insulina.** Test de tolerància a la insulina (ITT). Els animals control i tractats amb AAV1-FGF21 es van injectar intraperitonealment amb 0.75 U d'insulina/kg de pes i els nivells de glucosa en sang es van mesurar als temps indicats. El test es va realitzar 4 mesos després de l'administració intra-CSF de dues dosis d'AAV1-FGF21. Els resultats s'expressen com el % del canvi respecte a la glucosa inicial (n=11-15). \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01, \*\*\* $p$ <0.001 vs HFD-PBS. # $p$ <0.05 vs *chow*-PBS.

Per altra banda, també es va realitzar un test de tolerància a la glucosa que va demostrar que el tractament amb AAV1-FGF21 era capaç de revertir la intolerància a la glucosa provocada per la dieta alta en lípids (Figura 47).

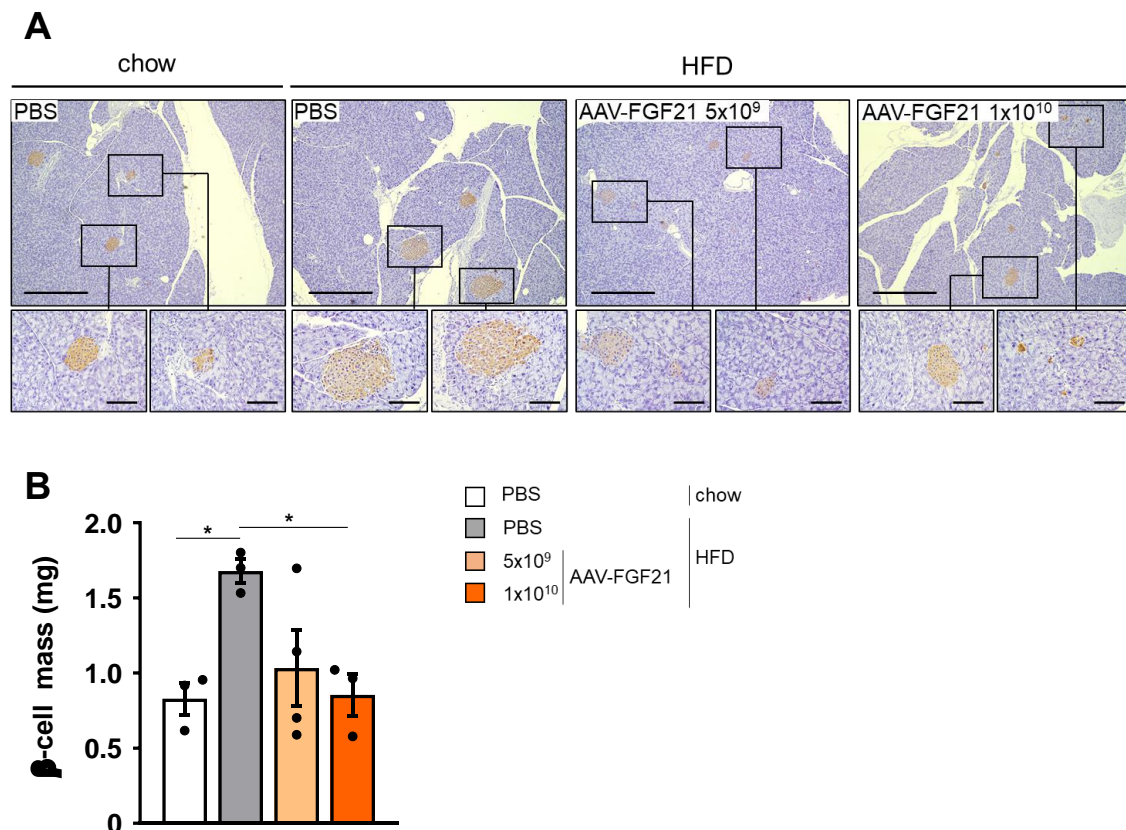


**Figura 47. Avaluació de la tolerància a la glucosa.** Test de tolerància a la glucosa (GTT). Els animals control i els animals tractats amb AAV1-FGF21 dejunats durant 18h es van injectar intraperitonealment amb 2 g de glucosa/kg de pes i els nivells de glucosa en sang van ser mesurats als temps indicats. El test es va realitzar 4 mesos després de l'administració intra-CSF de dues dosis d'AAV1-FGF21. Els resultats s'expressen com la mitja  $\pm$ SEM (n=11-15). \* vs HFD-PBS \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001, \*\*\*\*p<0.0001.

La resistència a la insulina té associada un procés d'hiperinsulinèmia. Les cèl·lules productores d'insulina, les cèl·lules  $\beta$  dels illots pancreàtics, desenvolupen una hiperplàsia per la necessitat de secretar més insulina degut a la resistència perifèrica a l'hormona (Cerf, 2013). Mitjançant l'anàlisi immunohistoquímic contra la insulina en seccions del pàncrees es va determinar que els animals control obesos presentaven un augment de la massa de la cèl·lula beta. En canvi, el tractament amb AAV1-FGF21 va ser capaç de normalitzar el tamany dels illots pancreàtics, d'acord amb la normoinsulinèmia i la sensibilitat a l'hormona que presentaven aquests animals (Figura 48).

Per tant, aquests resultats indicaven que el tractament intra-CSF amb AAV1-FGF21 era capaç de millorar la tolerància a la glucosa i revertir la resistència a la insulina per part dels teixits perifèrics, provocada per la dieta alta en lípids.





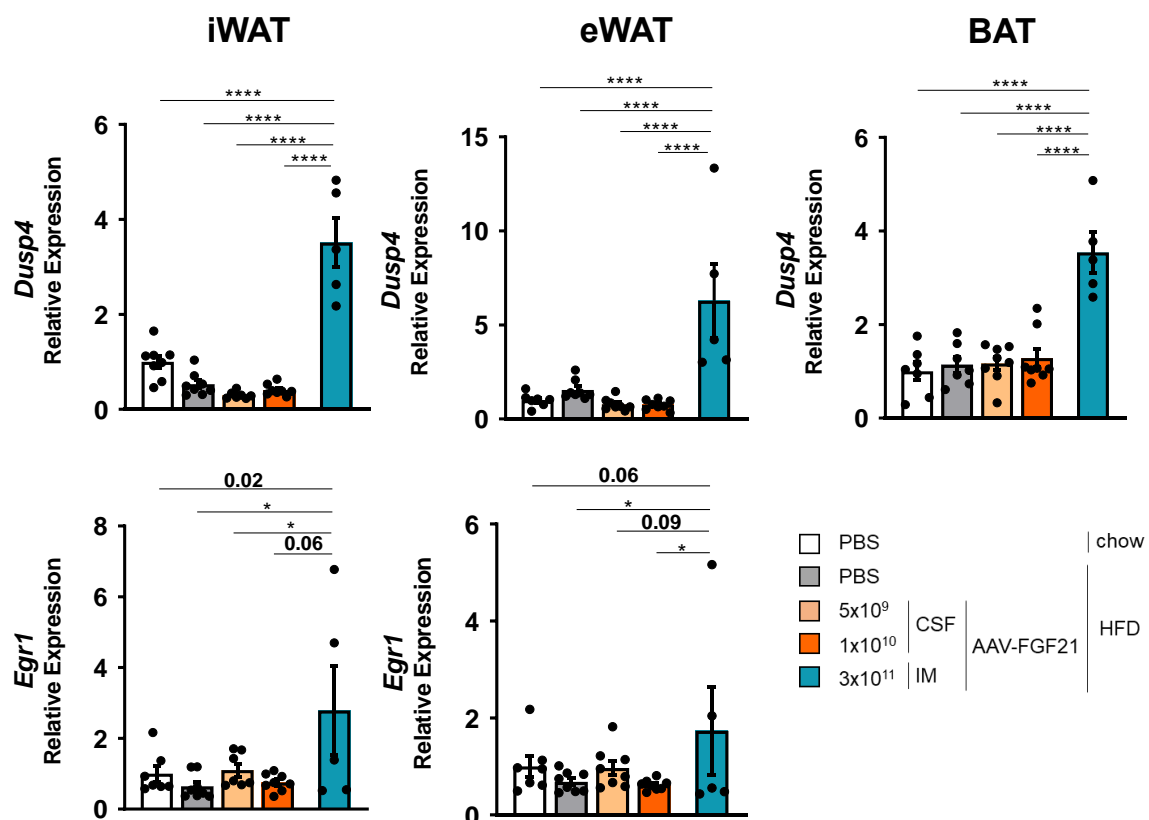
**Figura 48. Estudi de la hiperplàsia dels illots pancreàtics.** Anàlisi de la massa de cèl.lules  $\beta$ -pancreàtiques de ratolins alimentats amb dieta *chow* o HFD 11 mesos després de ser tractats intra-CSF amb dues dosis d'AAV1-FGF21. **(A)** Imatges representatives de l'anàlisi immunohistoquímic contra Insulina (marró) en seccions del pàncrees. **(B)** Quantificació morfomètrica de la massa de cèl.lula  $\beta$  del pàncrees. Escala: 500  $\mu$ m (Ampliacions: 100  $\mu$ m). Els resultats s'expressen com la mitja  $\pm$ SEM (n=8). \*p<0.05

### 3.7. Regulació de la despesa energètica mediada per l'acció central del FGF21

La despesa energètica pot estar regulada per diferents factors. Una de les principals vies reguladores té lloc a nivell central i específicament ve mediada a nivell hipotalàmic mitjançant l'augment de l'activitat del sistema nerviós simpàtic (Ueta et al., 2012; Wu et al., 2012).

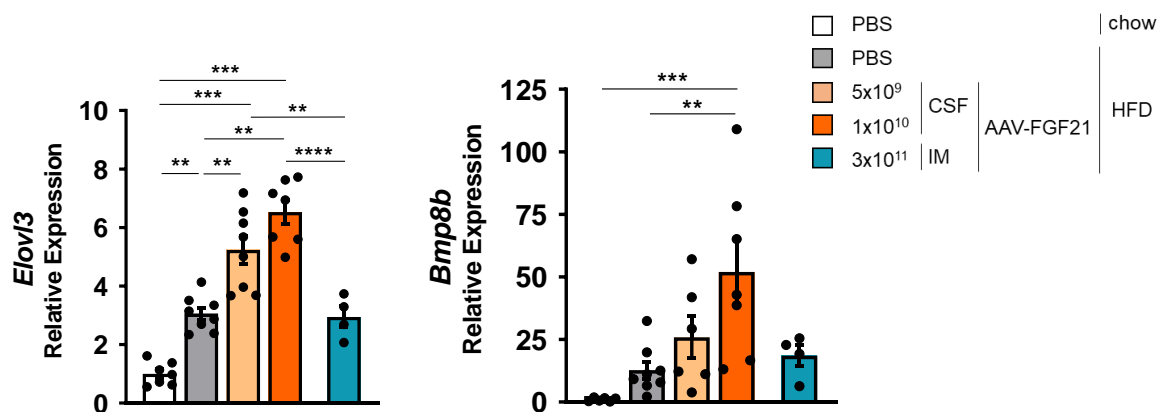
L'acció directa de FGF21 en els adipòcits és capaç de fer augmentar la termogènesi i/o el *browning* (Fisher et al., 2012; Abu-Odeh et al., 2021). El fet de que els animals tractats intra-CSF amb AAV1-FGF21 no presentessin nivells sèrics del factor de creixement incrementats ja indicava que possiblement l'augment de la despesa energètica dels animals tractats no era deguda a la senyalització directa de FGF21 en els diferents dipòsits greixosos. Per això, es van analitzar específicament els nivells d'mRNA de gens clau que augmenten la seva expressió quan hi ha una senyalització directa de FGF21 en el teixit adipós com són el *Dusp4* (*Dual Specificity Phosphatase 4*)

i l'*Egr1* (*Early Growth Response 1*). Com a control positiu dels efectes directes del FGF21 als teixits adiposos es van utilitzar ratolins alimentats amb HFD tractats amb  $3 \times 10^{11}$ vg d'AAV1-FGF21 administrat per via intramuscular. A diferència dels animals tractats intra-CSF, en el nostre laboratori s'ha demostrat que l'administració intramuscular d'AAV1-FGF21 és capaç d'augmentar l'expressió de FGF21 en aquest teixit i produir un augment de la secreció d'aquesta hormona cap a la circulació sanguínia provocant un augment molt significatiu dels nivells sèrics (Jimenez et al., 2018). Els resultats obtinguts en el nostre estudi van indicar que els animals administrats intramuscularment presentaven una elevada expressió de *Dusp4* i d'*Egr1* en els diferents teixits adiposos analitzats, però en canvi, aquesta sobreexpressió no es va detectar en cap dels animals alimentats amb HFD i tractats amb les dues dosis d'AAV1-FGF21 administrades intra-CSF (Figura 49). Així doncs, la despesa energètica observada en els dels ratolins administrats intra-CSF amb AAV1-FGF21 no estava regulada per una acció directa del FGF21 en els adipòcits.





Per avaluar si els efectes que estava exercint FGF21 sobre els teixits perifèrics eren mediatos pel sistema nerviós simpàtic es va analitzar l'expressió de l'*Elovl3* (*Elongation Of Very Long Chain Fatty Acids Protein 3*) i *Bmp8b* (*Bone morphogenetic protein 8B*) al BAT dels animals tractats. *Elovl3* és un marcador termogènic que està descrit que s'indueix per l'acció de l'activitat simpàtica (Jørgensen et al., 2007) i *Bmp8b* a part d'induir-se per l'acció simpàtica també és capaç de sensibilitzar el teixit a l'acció termogènica de la norepinefrina (Whittle et al., 2012). El BAT dels animals tractats intra-CSF amb AAV1-FGF21 presentava uns nivells d'expressió d'*Elovl3* i *Bmp8b* incrementats respecte els controls, mentre que els animals amb la injecció intramuscular de AAV1-FGF21 no mostraven cap increment en l'expressió d'aquest dos gens (Figura 50). Aquest resultat suggeriria que l'augment de la despesa energètica en animals amb sobreexpressió de FGF21 específica al SNC podia venir regulada per un augment de l'activitat simpàtica.

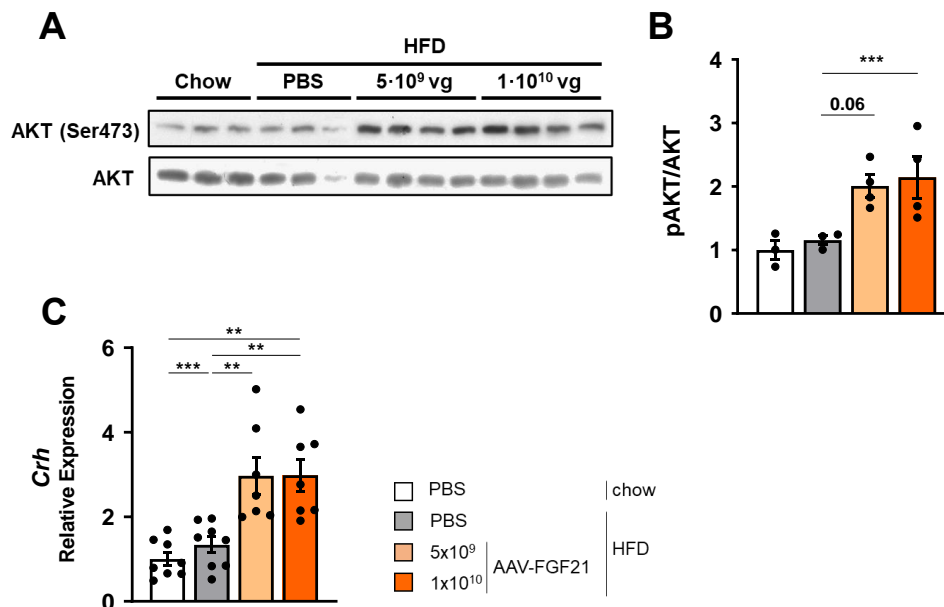


**Figura 50. Avaluació de l'activitat simpàtica en el BAT.** Anàlisi de l'expressió de gens regulats per la senyalització del sistema nerviós simpàtic en el BAT, *Elovl3* i *Bmp8b*, de ratolins alimentats amb dieta chow o HFD 11 mesos després de l'administració intra-CSF de dues dosis d'AAV1-FGF21 de dues dosis d'AAV1-FGF21 o després de l'administració intramuscular d'aquests vectors. Els resultats estan mesurats mitjançant RT-PCR i normalitzats per *Rplp0*. Els resultats s'expressen com la mitjana  $\pm$ SEM (n=5-8) \* $p < 0.05$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ .

S'ha descrit que la unió de FGF21 al receptor FGF1Rc i al co-receptor  $\beta$ -Klotho activa la via PI3K-PDK1-AKT, i també que en l'hipotàlem, FGF21 pot induir un augment en el to simpàtic a través del *Corticotropin releasing hormone* (CRH) (Owen et al., 2014).

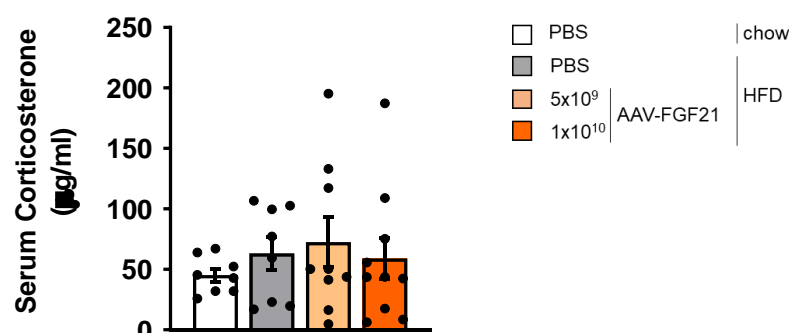
Per estudiar si la sobreexpressió de FGF21 tenia un efecte directe en l'hipotàlem i en l'activació del sistema nerviós simpàtic es va estudiar aquesta via de senyalització. Els resultats obtinguts van mostrar que l'administració intra-CSF d'AAV1-FGF21 incrementava a l'hipotàlem els nivells d'AKT fosforilat (Figura 51A i 51B) i l'expressió de *Crh* (Figura 51C). Així, molt probablement a través del CRH, la sobreexpressió de

FGF21 específica del SNC permetria activar el sistema nerviós simpàtic i aquest seria el responsable de l'increment en la despesa energètica, ja que s'ha descrit que és capaç induir la termogènesi i el *browning* del teixit adipós (Egawa et al., 1990; Vinkers et al., 2009; Wu et al., 2012).



**Figura 51. Accions de FGF21 en l'hipotàlem.** (A,B) Es van analitzar els efectes de l'acció de FGF21 en l'hipotàlem d'animals alimentats amb dieta *chow* o HFD, 11 mesos després de l'administració intra-CSF de dues dosis d'AAV1-FGF21. Es van mesurar mitjançant Western-Blot els nivells d'AKT fosforilat (Ser473) i AKT total (A) i es va quantificar la ratio pAKT/AKT (B). (C) També es va analitzar l'expressió de *Crh* en l'hipotàlem dels mateixos animals mitjançant RT-PCR i normalitzat per *Rplp0* i s'expressen com la mitja  $\pm$ SEM (n=4 i n=8). \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001.

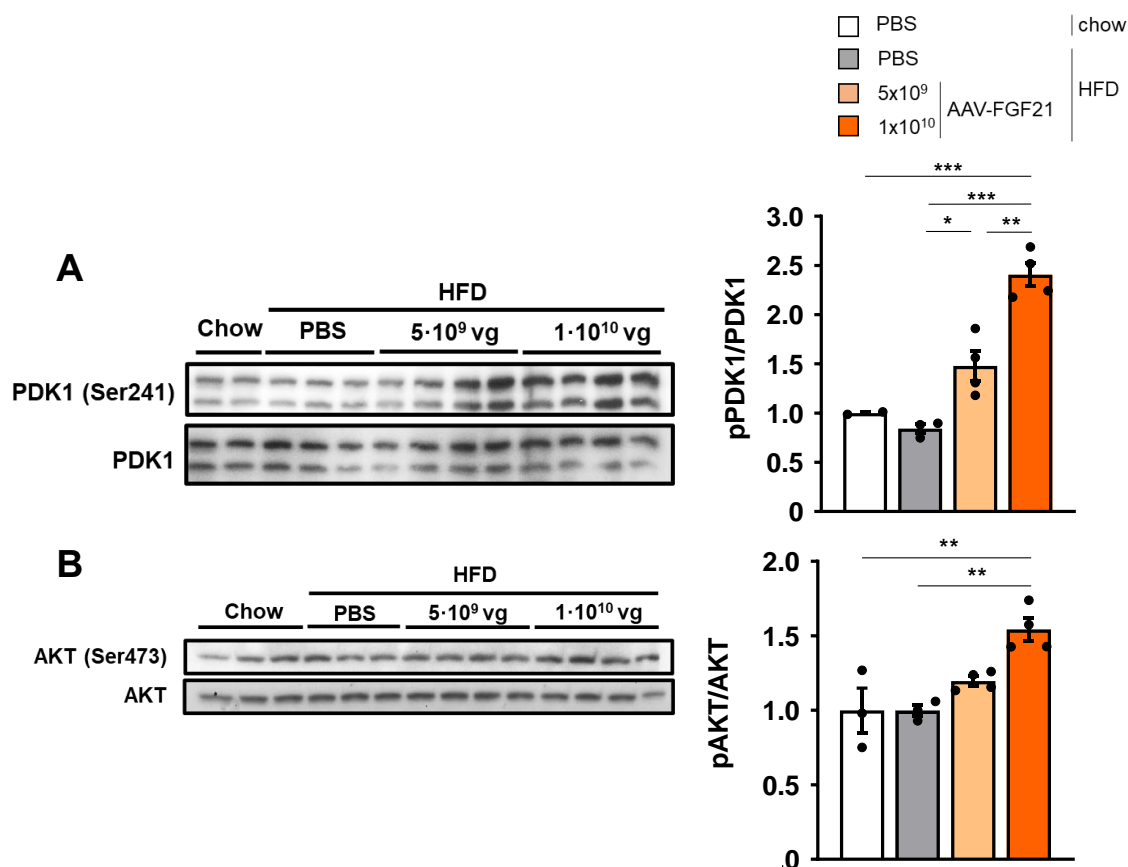
L'augment de CRH pot estar associat amb un augment de corticosterona per part de les glàndules adrenals (Liang et al., 2014b). L'anàlisi dels nivells sèrics d'aquesta hormona esteroidea van demostrar que 11 mesos després del tractament amb AAV1-FGF21 aquests no es veien augmentats. Per tant, la sobreexpressió de FGF21 en el SNC no estava associat a un increment en els nivells sèrics de corticosterona els seus nivells eren (Figura 52).



**Figura 52. Nivells de corticosterona.** Anàlisi dels nivells sèrics de corticosterona en animals alimentats amb dieta *chow* o HFD, 11 mesos després de l'administració intra-CSF de dues dosis d'AAV1-FGF21. Els resultats s'expressen com la mitja  $\pm$ SEM (n=9).

### 3.8. Efectes del tractament amb AAV1-FGF21 a l'hipocamp

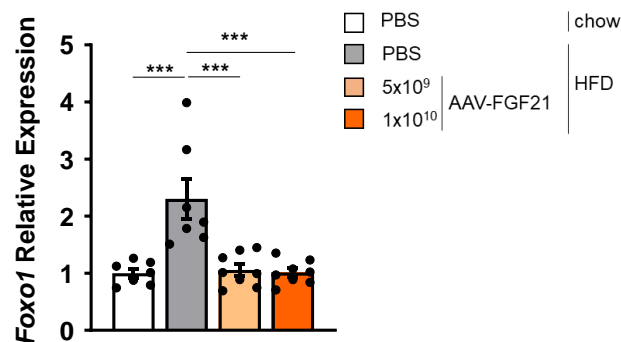
Recentment, s'ha demostrat la presència dels receptors  $\beta$ -Klotho i FGF1Rc en l'hipocamp (Hultman et al., 2019; Marcela Santos et al., 2020). Com ja s'ha descrit anteriorment en l'hipotàlem, la unió del FGF21 al seus receptors provoca l'activació de la via PI3K-PDK1-AKT. Per estudiar la senyalització de FGF21 directament a l'hipocamp es va mesurar la fosforilació de PDK1 i d'AKT en aquest teixit. Els resultats obtinguts van mostrar que la sobreexpressió de FGF21 a SNC induïa un increment dosis-dependent en la fosforilació del dos enzims (Figura 53). Per tant, aquests resultats indicaven que el FGF21 també activava aquesta via en aquesta regió de l'encèfal.



**Figura 53. Avaluació de l'acció del FGF21 en l'hipocamp.** (A) Nivells de PDK1 fosforilat (Ser241) i PDK total i (B) Nivells de AKT fosforilat (Ser473) i AKT total analitzats per Western-Blot en hipocamp de ratolins alimentats amb dieta *chow* o HFD, 11 mesos després de l'administració intra-CSF de dues dosis d'AAV1-FGF21. Els panells de la dreta mostren la quantificació de les imatges dels Western-Blots respectius. Els resultats s'expressen com la mitja  $\pm$ SEM (n=4). \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001.

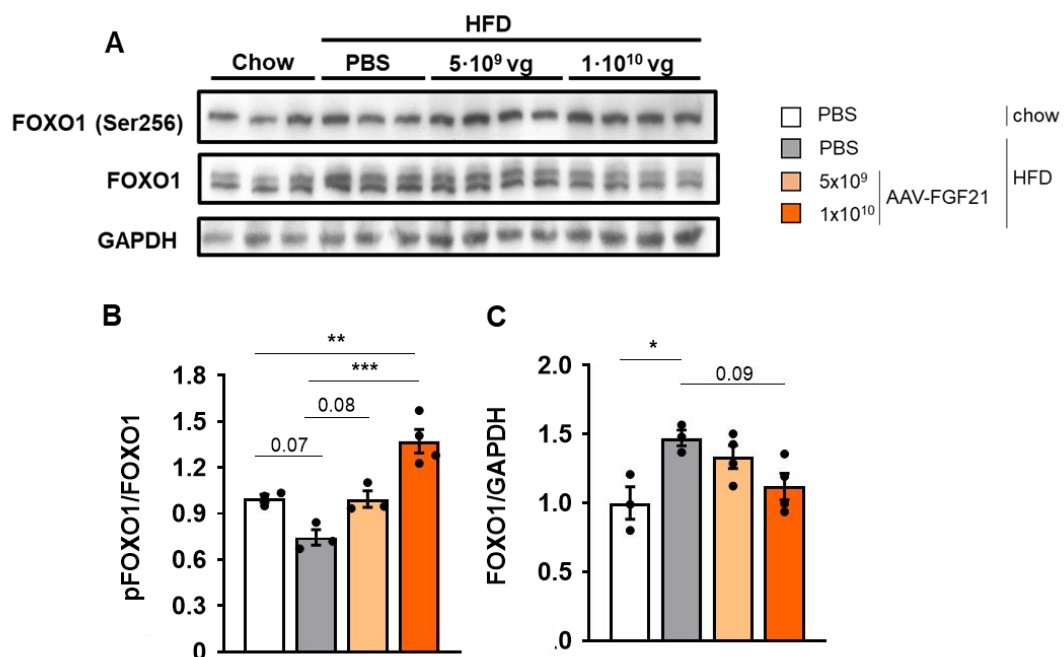
El factor de transcripció *Foxo1* (*Forkhead Box O1*) regula una gran quantitat de processos cel·lulars que ajuden a mantenir l'homeòstasi enfront a condicions d'estrès, com pot ser una HFD. La fosforilació de FOXO1, mediada per AKT, induïx la translocació de la proteïna des del nucli al citoplasma, inhibint la seva funció (Eijkelenboom and Burgering, 2013; Arnold et al., 2014). L'estudi de l'expressió de

*Foxo1* va revelar que els animals controls obesos sobreexpressaven aquest factor de transcripció, en canvi el tractament era capaç de normalitzar-ne els valors (Figura 54).



**Figura 54. Expressió del factor de transcripció *Foxo1* a l'hipocamp.** Anàlisi de l'expressió de *Foxo1* en l'hipocamp de ratolins alimentats amb dieta *chow* o HFD, 11 mesos després de l'administració intra-CSF de dues dosis d'AAV1-FGF21 analitzat mitjançant RT-PCR i normalitzat per *Rplp0*. Els resultats s'expressen com la mitja  $\pm$ SEM n=8. \*\*\*p<0.001.

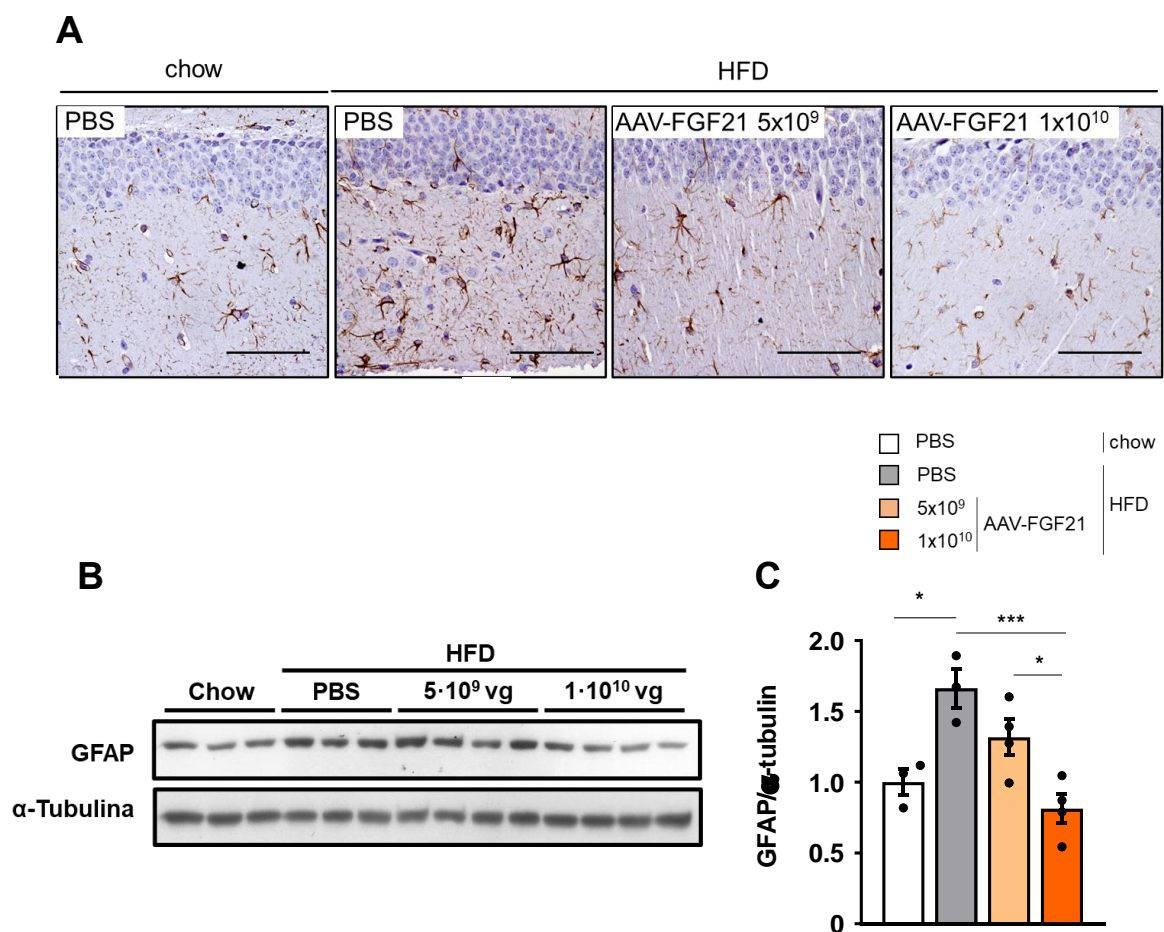
A continuació es va analitzar tant el contingut, com el grau de fosforilació de FOXO1. Els resultats obtinguts van mostrar que, igual que als nivells de mRNA, el contingut de FOXO1 augmentava en l'hipocamp d'animals HFD controls, però estava disminuït en els animals administrats intra-CSF amb AAV1-FGF21 (Figura 55A i 55B). A més, la fosforilació de FOXO1 estava incrementada en els animals tractats respecte els animals controls, indicant així la seva inactivació (Figura 55A i 55C).



**Figura 55. Avaluació del contingut i del grau de fosforilació de FOXO1 a l'hipocamp.** (A) Anàlisi mitjançant Western-Blot dels nivells de FOXO1 fosforilat (Ser256) i FOXO1 total normalitzat per GAPDH en l'hipocamp de ratolins alimentats amb dieta *chow* o HFD, 11 mesos després de l'administració intra-CSF de dues dosis d'AAV1-FGF21. (B,C) Quantificació del contingut total de FOXO1 (B) i de la ratio de fosforilació (C). Els resultats s'expressen com la mitja  $\pm$ SEM n=8. \*p<0.05 \*\*\*p<0.001.

### 3.8.1. El tractament amb AAV1-FGF21 redueix l'astrogliosi

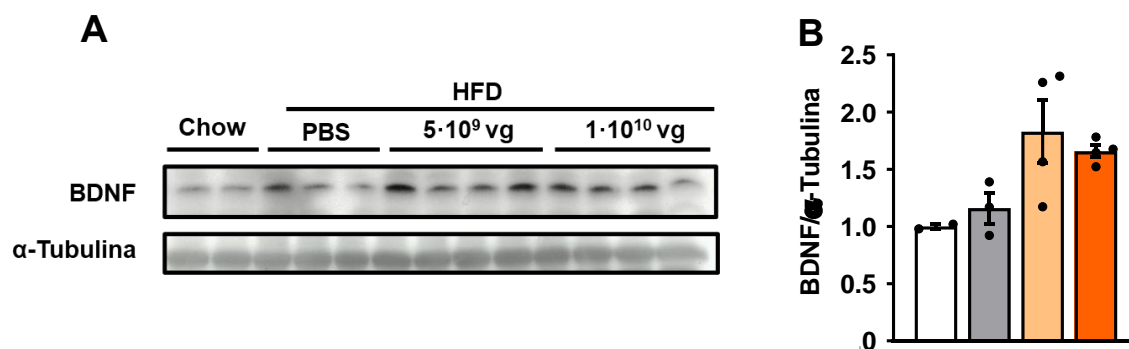
La ingesta a llarg termini d'una dieta alta en lípids indueix una inflamació en diferents regions de l'encèfal que es pot manifestar per una hipertrofia o hiperplàsia dels astròcits (Guillemot-Legrís and Muccioli, 2017). Per aquest motiu es va analitzar el grau d'astrogliosi en el hipocamp. L'estudi, tant a nivell immunohistoquímic, com per Western-Blot va revelar que els animals controls obesos presentaven un augment de la proteïna específica d'astròcits GFAP (*Glial fibrillary acidic protein*). Aquesta astrogliosi estava parcialment revertida amb la dosi de  $5 \times 10^{10}$  vg i totalment normalitzada amb la dosi més alta (Figura 56).



**Figura 56. Astrogliosi en l'hipocamp.** (A) Imatges representatives de la immunohistoquímica contra GFAP (marró) en seccions de l'hipocamp (B) Nivells de GFAP analitzats per Western-Blot en hipocamp de ratolins alimentats amb dieta *chow* o HFD, 11 mesos després de l'administració intra-CSF de dues dosis d'AAV1-FGF21 (C) Quantificació del contingut de GFAP del Western-Blot. Els resultats s'expressen com la mitja  $\pm$ SEM (n=4). \*p<0.05, \*\*\*p<0.001.

### 3.8.2. El tractament amb AAV1-FGF21 augmenta els nivells de BDNF

El BDNF (*Brain Derived Neurotrophic Factor*) és una neurotrofina que pot regular una gran quantitat de processos involucrats en la millora de la memòria i l'aprenentatge. La seva forma madura i activa es genera a partir de la proteòlisi del proBDNF i entre altres funcions és capaç d'augmentar la plasticitat sinàptica i promoure la supervivència de les cèl·lules, per aquest motiu s'ha considerat un candidat terapèutic per diferents malalties neurodegeneratives (Kowiański et al., 2017). L'estudi de l'expressió d'aquesta neurotrofina va revelar que el tractament amb AAV1-FGF21 amb qualsevol de les dosis va produir un augment de la forma madura i monomèrica de BDNF (Figura 57).



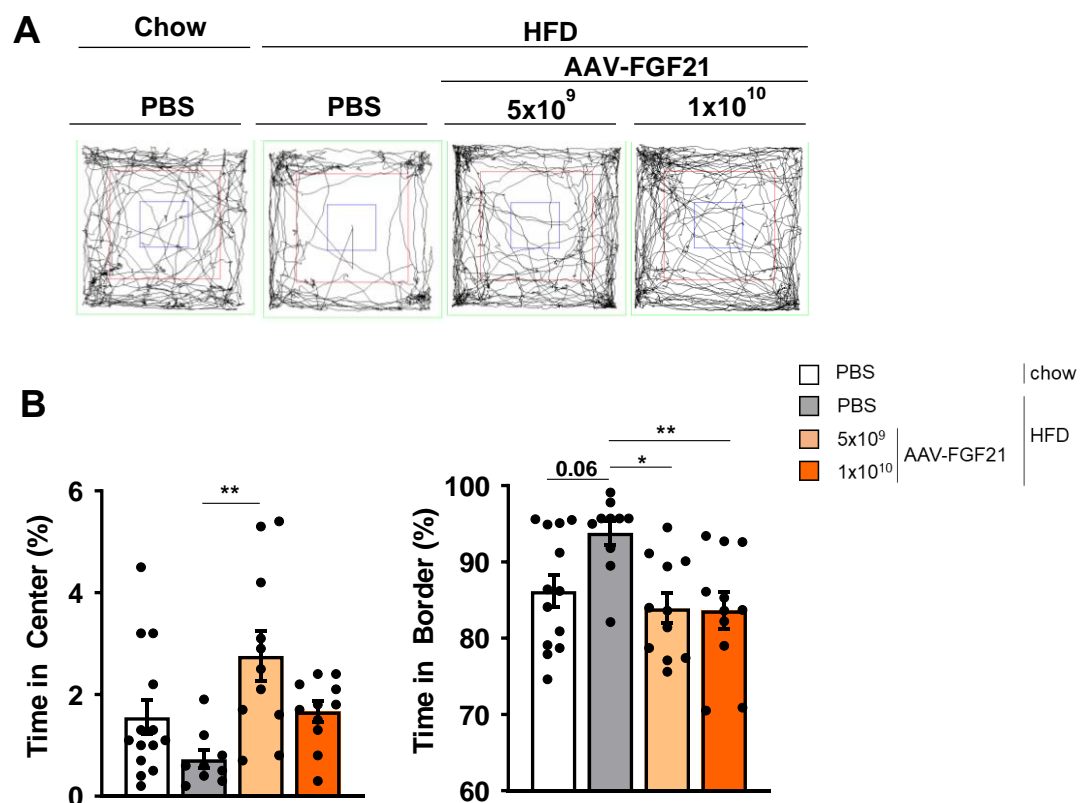
**Figura 57. Expressió de BDNF (A)** Nivells de BDNF analitzats per Western-Blot i normalitzats per Tubulina en hipocamp de ratolins alimentats amb dieta *chow* o HFD, 11 mesos després de l'administració intra-CSF de dues dosis d'AAV1-FGF21 **(B)** Quantificació del contingut de BDNF del Western-Blot. Els resultats s'expressen com la mitja  $\pm$ SEM (n=4).

Tots aquests resultats van permetre corroborar que el tractament amb AAV1-FGF21 permetia revertir molts dels canvis patològics que es produeixen a l'hipocamp com a conseqüència de la dieta HFD, ja sigui per l'acció directa de FGF21 sobre aquesta regió de l'encèfal o per la millora que produeix el tractament de les condicions metabòliques associades amb l'obesitat.

### 3.9. Prevenció dels dèficits cognitius associats amb l'obesitat i la diabetis

La diabetis i l'obesitat estan associades amb un deteriorament cognitiu que a dia d'avui no es pot ni prevenir ni curar (Dye et al., 2017; Jan Biessels and Despa, 2018). Per avaluar si el tractament amb AAV1-FGF21 podia prevenir l'aparició dels dèficits cognitius induïts per la dieta HFD a llarg termini es van realitzar diferents proves de comportament.

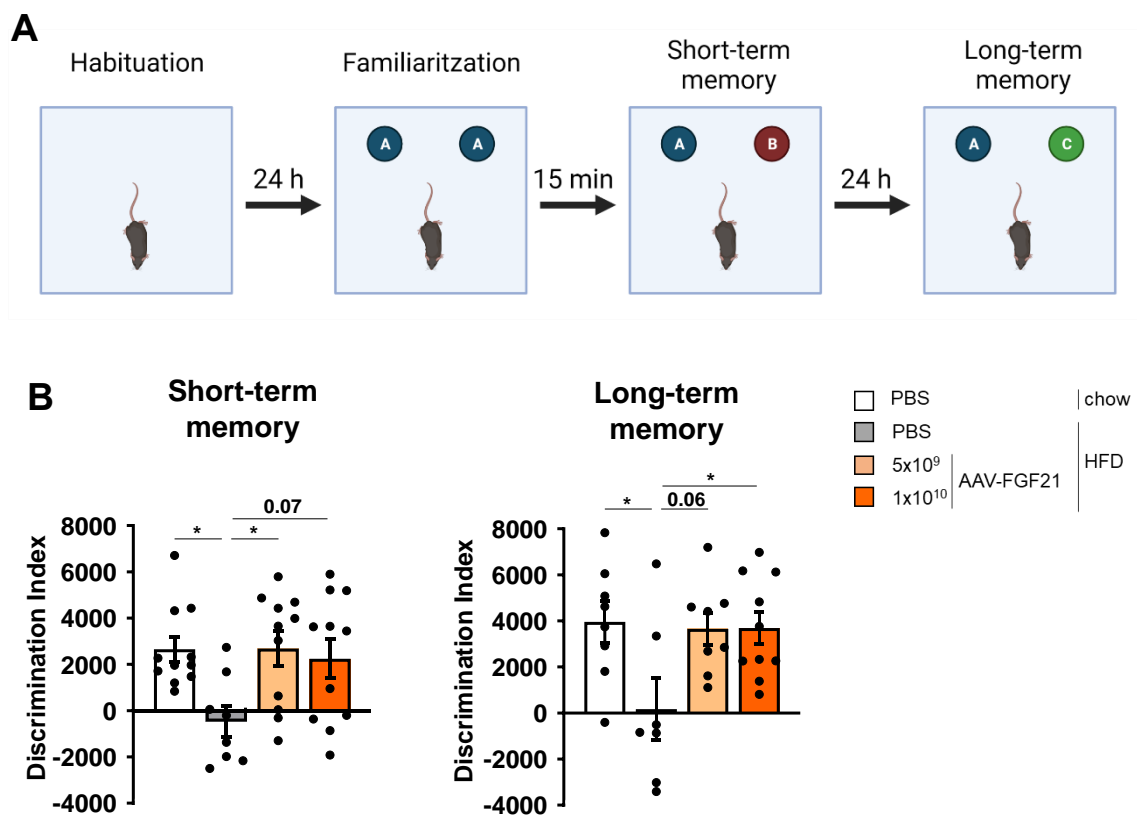
Per avaluar l'ansietat, es van analitzar els patrons d'exploració que els animals van realitzar al test de l'*Open-Field* (OF). L'anàlisi va permetre determinar que els animals obesos presentaven un grau d'ansietat major, ja que durant el temps que va durar la prova van estar menys temps explorant la part central de l'arena i molt més temps explorant-ne el marge (Figura 58). Els animals tractats amb AAV1-FGF21 exploraven en canvi molt més el centre de l'arena (Figura 58), demostrant que no presentaven ansietat.



**Figura 58. Avaluació de l'ansietat mitjançant el test de l'*Open-Field* (OF).** (A) Imatges representatives del moviment a l'arena de l'OF de ratolins alimentats amb dieta *chow* o HFD, 11 mesos després de l'administració intra-CSF de dues dosis d'AAV1-FGF21. (B) Temps en el centre i temps en el marge del test OF en %. Els resultats s'expressen com la mitja  $\pm$ SEM (n=11-15). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ .



Per avaluar la memòria dels ratolins, tant a curt com a llarg termini, es va realitzar la prova *Novel Object Recognition* (NOR) als diferents grups d'animals (Figura 59A). Els resultats van demostrar que els animals obesos tenien problemes per recordar quin objecte ja havien explorat amb anterioritat i per tant exploraven durant el mateix temps els dos objectes (el nou i el vell) i com a conseqüència, presentaven un Índex Discriminatori proper a 0 (Figura 59B). En canvi, l'Índex Discriminatori dels animals tractats amb AAV1-FGF21 i dels animals sans control era molt elevat, ja que exploraven durant molt més temps l'objecte nou. Per tant, el tractament amb AAV1-FGF21 millorava la memòria tant a curt (15 min) com a llarg termini (24 h) (Figura 59B).

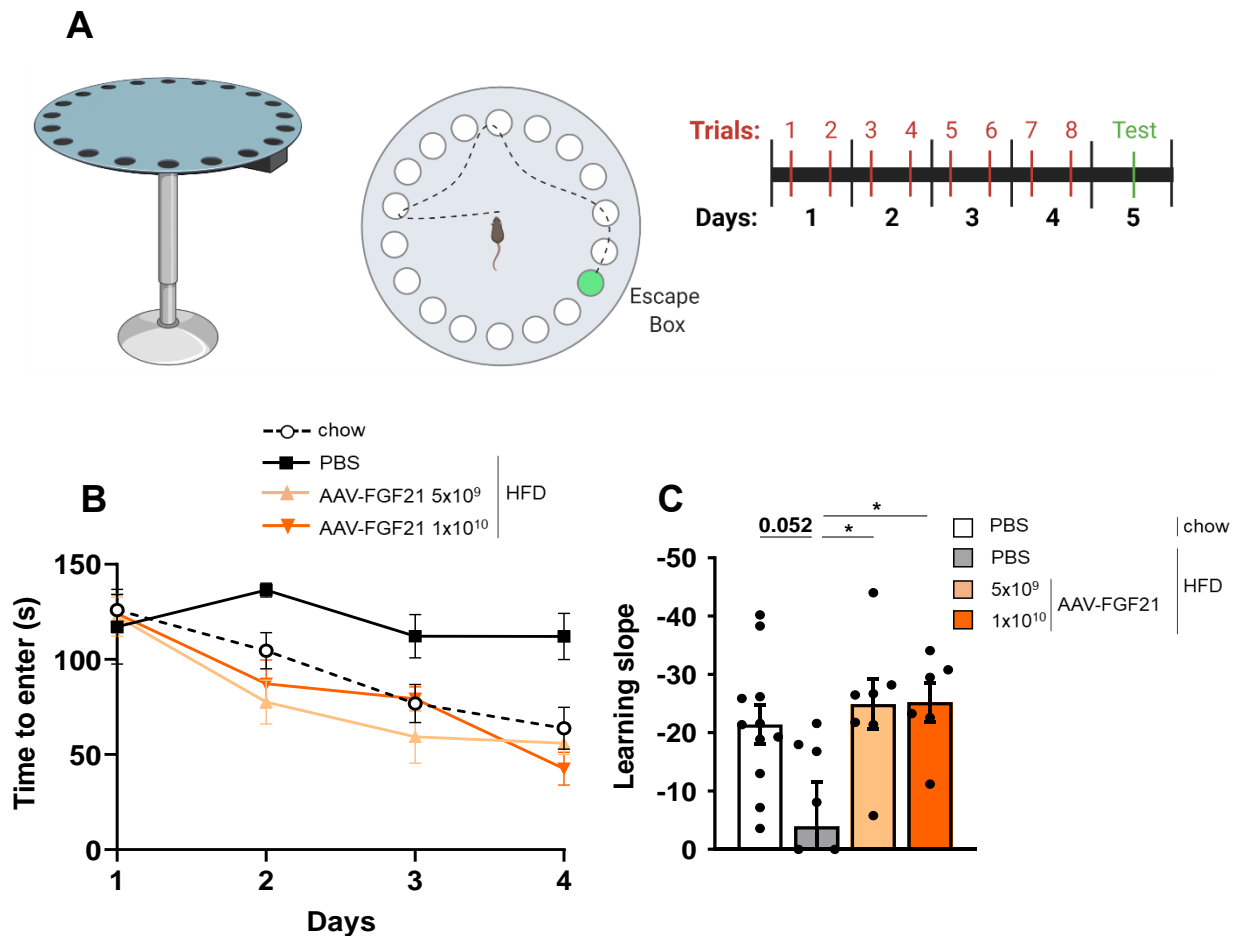


**Figura 59. Estudi de la memòria a curt i a llarg termini.** (A) Representació esquemàtica del NOR i la cronologia experimental. (B) Índex Discriminatori a curt termini (15 min) i a llarg termini (24 h) calculat a partir de la prova *Novel Object Recognition*, realitzada als ratolins alimentats amb dieta chow o HFD, 6-8 mesos després de l'administració intra-CSF de dues dosis d'AAV1-FGF21. Els resultats s'expressen com la mitja  $\pm$ SEM (n=11-15) \*p<0.05.

Per avaluar la capacitat d'aprenentatge es va realitzar la prova del *Barnes Maze* (BM) (Figura 60A). Al llarg dels dies, els animals controls obesos no van millorar el temps que tardaven a entrar en l'*Escape Box*, que és l'objectiu de la prova, indicant així una capacitat d'aprenentatge molt reduïda (Figura 60B i 60C). Els animals tractats amb



AAV1-FGF21 tenien la mateixa capacitat d'aprenentatge que els animals controls sans (Figura 60B i 60C).



**Figura 60. Avaluació de la memòria i l'aprenentatge** Representació esquemàtica del Barnes Maze i la cronologia experimental. **(A)** Temps en entrar a l'Escape Box. **(B)** Pendents de les rectes d'aprenentatge **(C)** calculats al llarg dels dies en la prova del Barnes Maze, realitzada en ratolins alimentats amb dieta chow o HFD 6-8 mesos després de l'administració intra-CSF de dues dosis d'AAV1-FGF21. Els resultats s'expressen com la mitja  $\pm$ SEM (n=11-15) \*p<0.05.

L'estudi de totes aquestes proves de comportament va posar de manifest que el tractament amb AAV1-FGF21 era capaç de prevenir els problemes cognitius associats a l'obesitat induïda per una dieta alta en lípids. La millora de les capacitats cognitives dels animals tractats probablement és el resultat dels canvis que és capaç de produir el tractament el hipocamp dels ratolins.

## **V. DISCUSSIÓ**



L'obesitat i la diabetis són dues malalties metabòliques amb una patofisiologia molt complexa, però que entre elles estan molt relacionades. En les últimes dècades han assolit valors epidèmics i s'han convertit en un dels problemes més importants de la salut pública. Aquestes dues malalties augmenten el risc de patir nombrosos processos patològics, com la demència, ja que s'ha demostrat que les persones diabètiques i/o obeses presenten un deteriorament cognitiu a edats més avançades que la població sana (Biessels and Reijmer, 2014; Dye et al., 2017; Jan Biessels and Despa, 2018; Xue et al., 2019; Srikanth et al., 2020). Malgrat que existeixen fàrmacs pel tractament de la DT2 i l'obesitat, cap d'ells representa una cura real de la malaltia i tots presenten efectes secundaris. A més, cap dels tractaments actuals tenen algun efecte sobre el deteriorament cognitiu associat a aquestes malalties. Això provoca que a dia d'avui, els dèficits cognitius que puguin patir els pacients diabètics i/o obesos no es puguin ni prevenir ni curar (Gaspar et al., 2015; Kellar and Craft, 2020). Per tant, en el context actual, és necessari la creació de noves estratègies terapèutiques que puguin curar tant la diabetis, l'obesitat com el deteriorament cognitiu associat.

El FGF21 és un molt bon candidat pel tractament d'aquestes malalties metabòliques i les seves complicacions i per aquest motiu actualment existeixen diversos assajos clínics amb fàrmacs mimètics de FGF21 (Geng et al., 2020). A més, estudis previs del nostre laboratori han demostrat l'eficàcia de la teràpia gènica basada en aquest factor pel tractament de la DT2 i l'obesitat (Jimenez et al., 2018). Actualment, no es coneixen tots els mecanismes mitjançant els quals aquest factor de creixement és capaç de dur a terme tots els seus efectes terapèutics però, en la última dècada, s'ha demostrat que una gran majoria de les seves accions a nivell metabòlic es regulen a partir de la seva senyalització a nivell central (Sarruf et al., 2010; Owen et al., 2014; Singhal et al., 2016; Lan et al., 2017). Més rellevants han estat els descobriments de que el FGF21 podria ser un bon candidat pel tractament de problemes neurodegeneratius (Sa-nguanmoo et al., 2016a; Chen et al., 2019; Fang et al., 2020). Per tant, el principal objectiu d'aquesta tesi doctoral va ser el desenvolupament d'una teràpia gènica pel tractament de l'obesitat i la DT2 i els seus problemes cognitius associats basada en l'administració d'un vector AAV codificant pel factor de creixement FGF21 administrat directament al líquid cefalorraquidi, a través de la cisterna magna, per tal de transduir el SNC.

Per tal de sobreexpressar el FGF21 únicament al SNC es van explorar les capacitats de transducció del vector AAV1 administrat intra-CSF. A diferència d'altres vectors de teràpia gènica, els AAV no estan associats a cap patologia en humans i a més presenten una molt baixa immunogenicitat i un excel·lent perfil de seguretat (Li and

Samulski, 2020). L'eficàcia de la teràpia gènica del SNC utilitzant aquests vectors s'està utilitzant per tractar nombroses malalties com la malaltia de Parkinson (Eberling et al., 2008; Mittermeyer et al., 2011), la deficiència de AADC (Hwu et al., 2012), la malaltia de Baten (Katz et al., 2015) i l'atrofia muscular espinal (Mendell et al., 2017), entre d'altres. Específicament el vector AAV1 és un dels molts serotips que té la capacitat de transduir el SNC (Aschauer et al., 2013; Watakabe et al., 2015). Ara bé, l'eficiència de la transducció dels vectors varia molt segons quina sigui la via d'administració (Castle et al., 2016). Una de les vies d'administració utilitzades per l'enginyeria genètica del SNC es basa en l'alliberament dels AAVs en el líquid cefalorraquídi, sobretot quan es vol garantir una distribució del vector per vèries zones de l'encèfal i de la medul·la espinal. A més en el nostre laboratori s'ha demostrat que l'administració de vectors AAV9 utilitzant aquesta ruta d'administració és eficient i segura (Haurigot et al., 2013; Ribera et al., 2015; Motas et al., 2016; Roca et al., 2017; Wang et al., 2019). Malgrat l'àmplia utilització del AAV1 per la transferència gènica en el SNC, l'administració d'aquest vector via intra-CSF utilitzant la cisterna magna no ha estat del tot caracteritzada.

Els resultats obtinguts després de l'administració intra-CSF del vector AAV1, mitjançant la injecció directa a la cisterna magna, van permetre demostrar que aquesta estratègia permetia una transducció eficient i àmplia del SNC, ja que el vector es va distribuir per diferents regions de l'encèfal i de la medul·la espinal. Tenint en compte que en l'obesitat i la DT2 es poden trobar alteracions a múltiples regions del SNC (Biessels and Reijmer, 2014; Moran et al., 2017), aquesta ruta d'administració podria esdevenir molt adient.

L'estudi de biodistribució va demostrar clarament que l'AAV1 administrat intra-CSF tenia una eficàcia molt baixa per transduir els altres teixits fora del SNC. En concret, utilitzant aquesta via d'administració i dosis inferiors a  $5 \cdot 10^{10}$  vg/animal s'aconseguia una transducció local del SNC. La incapacitat del vector AAV1 per travessar els endotelis (Wang et al., 2011) podria explicar també la baixa efectivitat d'aquest vector per arribar a la circulació, i una vegada a la sang transduir els teixits perifèrics (Hironaka et al., 2015; Albright et al., 2018)

En ratolins obesos l'administració intra-CSF d'AAV1-FGF21 a les dosis  $5 \cdot 10^9$  i  $1 \cdot 10^{10}$  vg/animal va mediar la sobreexpressió i l'augment del contingut de FGF21 únicament en diferents regions de l'encèfal, sense augmentar-ne els nivells en circulació. Diferents estudis sobre el transport del FGF21 a través de la BHE indiquen que, en rosegadors, el flux d'aquesta proteïna és bàsicament unidireccional, des de la perifèria cap a l'encèfal (Hsuchou et al., 2007) i només dosis superiors a 0.4 µg/dia de

FGF21 administrat intracerebroventricular permeten que la hormona es pugui detectar a la sang. Aquests fets demostren que el FGF21 presenta una molt baixa eficiència per arribar a la sang des del líquid cefalorraquidi i per tant podrien explicar com les dosis administrades en aquest treball produeixen un augment del contingut de FGF21 en el líquid cefalorraquidi però no en circulació.

Els ratolins amb obesitat induïda per dieta alta en lípids utilitzats en aquesta tesis doctoral són un dels models que reproduïx amb més similitud la fisiopatologia de pacients humans obesos i per tant, són adequats per testar l'eficàcia de la teràpia gènica proposada (Nilsson et al., 2012; Kleinert et al., 2018). L'augment del FGF21 específicament en el SNC en ratolins obesos va provocar una reducció del pes corporal. Aquesta reducció del pes es va produir molt ràpidament, però de seguida es va establir, i en cap cas el pes dels animals va assolir nivells per sota el pes corporal observat en l'inici de l'estudi. A més, l'estudi realitzat a llarg termini utilitzant només animals sans no obesos també va corroborar que les dosis administrades no induïen cap baixada en el pes per sota dels nivells inicials i per tant, van demostrar la seguretat de l'aproximació a llarg termini. La disminució en el pes induïda per l'acció del FGF21 ja ha estat descrita nombroses vegades, en ratolins transgènics que sobreexpressen FGF21 en el fetge (Kharitonkov et al., 2005; Inagaki et al., 2007), o també en animals tractats amb la proteïna nativa o amb anàlegs de FGF21 (Kharitonkov et al., 2005; Coskun et al., 2008; Berglund et al., 2009; Xu et al., 2009a; Adams et al., 2012; Hecht et al., 2012; Emanuelli et al., 2014; Stanislaus et al., 2017b; Jimenez et al., 2018; Kaufman et al., 2020). A més, també s'ha observat en models animals més grans com primats no humans i porcs (Kharitonkov et al., 2007; Foltz et al., 2012; Adams et al., 2013b; Smith et al., 2013; Talukdar et al., 2016b; Christoffersen et al., 2019). Ara bé, tots aquests tractaments es caracteritzaven per un augment dels nivells circulants de l'hormona o de l'anàleg. Per tant, era molt difícil diferenciar quines funcions realitzava el FGF21 de forma directa en els teixits perifèrics i quines estaven regulades per la seva acció en el SNC.

La reducció del pes corporal va estar lligada amb la reducció del pes dels diferents teixits amb capacitat d'emmagatzemar greix, com els diferents dipòsits adiposos o el fetge. L'estudi d'un dels principals dipòsits adiposos, l'eWAT, va demostrar que el tractament intra-CSF amb AAV1-FGF21 revertia la hipertròfia dels adipòcits i els nivells d'inflamació d'aquest teixit. Com a resultat de la millora de l'homeòstasi del teixit adipós, els nivells sèrics de l'adiponectina i la leptina es van normalitzar.

Una de les accions directes més descrites del FGF21 al teixit adipós és l'augment de l'expressió de l'adiponectina mitjançant l'activació de PPAR $\gamma$  (Holland et al., 2013; Lin et al., 2013). A més, aquesta funció del FGF21 estaria molt conservada entre espècies i per tant, s'ha convertit en un dels indicadors de l'eficàcia dels tractaments en humans (Geng et al., 2020). No obstant, en el tractament descrit en aquest treball, l'augment de l'expressió de l'adiponectina no podia venir regulat per l'acció directa de FGF21 i per tant, només es pot explicar per la millora de l'homeòstasi del teixit adipós.

La pèrdua de pes, i per tant també la millora de l'homeòstasi dels teixits adiposos, és el resultat d'un balanç energètic negatiu entre el consum i la despesa energètica. Els resultats obtinguts en aquesta tesi van indicar que la disminució del pes corporal dels ratolins obesos injectats amb les dues dosis terapèutiques de AAV1-FGF21 no es produïa per canvis en la ingesta sinó venia regulada bàsicament per un increment en la despesa energètica deguda a augment de l'activitat locomotora i a un augment de la termogènesi no associada a tremolor. Aquesta termogènesi no associada a tremolor es va produir per un augment tant de l'activació del BAT com del *browning* del WAT.

En els humans adults, tot i que s'ha detectat la presència de teixit adipós marró, la quantitat d'aquest no és molt gran, ja que va degenerant des del naixement, per tant, la capacitat termogènica és molt residual (Cannon et al., 2020). D'aquesta manera, la inducció del *browning* observada en el tractament amb AAV1-FGF21 administrat intra-CSF permetria un augment de la despesa energètica independentment del teixit adipós marró, augmentant així les probabilitats de que aquesta estratègia terapèutica pogues produir una reducció de pes en humans.

En l'experiment portat a terme a llarg termini amb animals sans en dieta chow, va mostrar com els animals injectats amb les mateixes dosis que en l'experiment amb HFD, la despesa energètica també estava augmentada però el balanç energètic negatiu en aquest cas també podia estar relacionat amb la disminució en la ingesta. Molts dels articles publicats avui en dia relacionen la baixada de pes induïda per FGF21 amb un augment de la despesa energètica però habitualment no relacionat amb una disminució de la ingesta, tal i com succeeix en l'experiment amb animals obesos (Coskun et al., 2008; Jimenez et al., 2018). Ara bé, l'augment i la disminució de la ingesta, respecte els animals controls respectius, observats en els diferents experiment d'aquest estudi podrien venir explicats pel context diferent en el que es trobaven els animals, ja que uns estaven alimentats amb dieta chow i els altres amb HFD i s'ha demostrat que el mecanisme mitjançant el qual FGF21 modula l'homeòstasi energètica varia segons el context i fins i tot segons l'espècie (Flippo and Potthoff, 2021).

La reducció de la quantitat de greix del teixit adipós va anar acompanyada d'una reducció de l'esteatosi hepàtica. En els animals obesos controls alimentats durant 14 mesos amb HFD, aquesta acumulació de greix va comportar el desenvolupament d'un procés inflamatori acompanyat per un procés fibròtic i de dany hepàtic que el tractament va ser capaç de revertir. En persones obeses, el fetge gras pot acabar desencadenant en una esteatohepatitis no alcohòlica (NASH), que a més també està molt lligada amb la resistència a la insulina en el fetge (Birkenfeld and Shulman, 2014), i a la llarga l'evolució natural d'aquesta patologia deriva en la formació de cirrosis hepàtica i l'aparició d'hepatocarcinomes (Bertot and Adams, 2016). Actualment, aquesta condició patològica no disposa d'un tractament eficaç aprovat. Els tractaments amb la proteïna nativa o amb anàlegs del FGF21 han demostrat tant a nivell preclínic, com en alguns assajos clínics que són capaços de reduir el contingut de lípids en el fetge i probablement esdevenir un tractament efectiu pel NASH (Coskun et al., 2008; Xu et al., 2009a; Fisher et al., 2014; Lee et al., 2016; Jimenez et al., 2018; Talukdar and Kharitononkov, 2021). En aquest sentit, el FGF21 també ha demostrat la seva capacitat per reduir la incidència d'hepatocarcinomes (Huang et al., 2006). Els resultats de la teràpia basada en l'administració intra-CSF de l'AAV1-FGF21 també han demostrat reduir el greix hepàtic, els marcadors fibròtics i prevenir la formació d'hepatocarcinomes.

Aquesta millora tant en el teixit adipós com en el fetge dels animals tractats amb AAV1-FGF21 pot explicar, en part, la reversió de la resistència a la insulina induïda per la HFD. Els animals tractats van normalitzar la glicèmia i la insulinèmia i van presentar una major tolerància a la glucosa. La millora en la resistència a la insulina també va estar relacionada amb una millora de la hiperplàsia dels illots pancreàtics. Les accions beneficioses del FGF21 sobre el metabolisme de la glucosa ja s'han descrit prèviament (Kharitononkov et al., 2007; Coskun et al., 2008; Berglund et al., 2009; Xu et al., 2009b, 2009a; Adams et al., 2012, 2013b; Foltz et al., 2012; Hecht et al., 2012; Smith et al., 2013; Emanuelli et al., 2014; Stanislaus et al., 2017b; Christoffersen et al., 2019). No obstant, de la mateixa manera que en la sobreexpressió de l'adiponectina, està descrit que l'acció directa de FGF21 augmenta la sensibilitat a la insulina (Holland et al., 2013; Owen et al., 2014; Lan et al., 2017), per tant, en el nostre cas, tampoc podem atribuir aquesta millora a l'acció directa que fa FGF21 sobre els teixits perifèrics, sinó a conseqüència del control central d'aquests teixits perifèrics per part del factor de creixement.

Els animals tractats intra-CSF no presentaven un augment dels nivells circulants del FGF21. Utilitzant com a controls positius uns animals tractats intramuscularment amb AAV1-FGF21 que sí que presentaven uns nivells de FGF21 circulants elevats



(Jimenez et al., 2013) es va poder demostrar que en els nostres animals tractats no existia una senyalització directa de FGF21 en els diferents dipòsits adiposos i per tant, la inducció de la termogènesi i del *browning* només podia venir regulada a nivell central. Com a resultat de la presència de FGF21 en l'hipotàlem es va observar un augment de l'activació de la via PI3K-PDK1-AKT, i un augment en l'expressió de CRH (*Corticotropin releasing hormone*), tal i com està descrit a la literatura (Owen et al., 2014). La CRH pot regular l'homeòstasi energètica de l'organisme, ja que produeix un augment del to simpàtic en el BAT i en el WAT, que pot induir la termogènesi i el *browning*, respectivament, augmentant així la despesa energètica. A part d'aquestes accions sobre el SNC, el CRH també intervé en l'eix hormonal hipotalàmic-hipofisari-adrenal induint l'alliberament d'ACTH (*Adrenocorticotropic hormone*) per part de la hipòfisi, i aquesta permet l'alliberament de glucocorticoides de la glàndula adrenal. Els resultats presentats demostren que 11 mesos després de l'administració del vector AAV1-FGF21, els animals tractats no presentaven uns nivells de corticosterona sèrica més elevats que els animals controls. Per tant, malgrat que està descrit que l'acció a curt termini de FGF21 en l'hipotàlem activa l'eix hipotàlem-hipofisari-adrenal, aquesta acció no es manté quan l'exposició a FGF21 és crònica, però en canvi si que es manté l'acció sobre el sistema nerviós simpàtic (Bookout et al., 2013; Liang et al., 2014b; Owen et al., 2014).

A part de totes les millores metabòliques, el tractament intra-CSF amb AAV1-FGF21 també va ser eficaç per prevenir els dèficits cognitius associats al consum d'una dieta hipercalòrica. L'anàlisi de les proves de comportament van mostrar que la sobreexpressió del FGF21 millorava l'ansietat, la memòria i l'aprenentatge dels animals tractats.

El control d'aquests paràmetres cognitius està regulat per diferents àrees de l'encèfal, però una de les que té un paper més important és l'hipocamp. El tractament amb AAV1-FGF21 va provocar tant un augment de la sobreexpressió com del contingut de FGF21 en aquesta regió de l'encèfal. De manera similar al que es va observar en l'hipotàlem, en l'hipocamp també es va detectar una activació de la via PI3K-PDK1-AKT. S'ha de tenir en compte que igual que el FGF21, la insulina també té la capacitat d'activar aquesta mateixa via. Els processos neurodegeneratius associats a la diabetis i l'obesitat també es troben associats a una pèrdua de la sensibilitat a la insulina per part de les cèl·lules del SNC (Kullmann et al., 2016). Per tant, l'augment de l'activació d'aquesta via de senyalització observada en els animals tractats podria venir deguda tant per una senyalització directa de FGF21, com per una millora de la sensibilitat a la insulina en aquest teixit produïda per FGF21.

(Eijkelenboom & Burgering, 2013) Un dels factors de transcripció regulats per AKT és FOXO1, que és capaç de regular una gran quantitat de gens que es troben implicats en processos cel·lulars necessaris per produir una resposta a un estrès, com el provocat pel consum continu de HFD. Aquest factor de transcripció és inactivat quan és fosforilat per AKT, ja que indueix la seva sortida del nucli (Eijkelenboom & Burgering, 2013). Els animals obesos van presentar un augment de l'expressió i del contingut de FOXO1 i una disminució de la seva fosforilació/inactivació en el hipocamp. Per contra, el tractament amb AAV1-FGF21 va ser capaç de revertir aquesta situació, disminuint la seva expressió i augmentant-ne la inactivació. Per tant la inactivació de FOXO1 suposaria la inactivació d'algunes de les vies que regula, com l'apoptosi o la inhibició del cicle cel·lular i d'aquesta manera es podrien explicar alguns dels canvis en el comportament dels animals.

La millora del comportament també pot venir donada per la disminució de l'astrogliosi en l'hipocamp observada en els animals tractats. No es pot descartar que la millora metabòlica i inflamatòria de tot l'organisme estigués implicada en aquesta reducció de la neuroinflamació. No obstant, els descobriments recents sobre de la capacitat del FGF21 per millorar la neuroinflamació fan pensar que la millora de l'astrogliosi va venir regulada per l'acció directa del FGF21 en l'hipocamp (Kang et al., 2020b; Wang et al., 2020b; Rühlmann et al., 2021).

L'augment del contingut de la forma madura de BDNF en l'hipocamp també podia explicar la millora en el comportament dels animals tractats amb AAV1-FGF21. Aquest factor neurotròfic s'ha demostrat que pot augmentar la plasticitat sinàptica i que té propietats neuroprotectores, i per tant, es relaciona directament amb la millora de les capacitats cognitives (Kowiański et al., 2017). A més, ja existeixen publicacions que descriuen la capacitat del FGF21 per produir augments d'aquesta neurotrofina (Kang et al., 2020b).

A part de l'eficàcia terapèutica demostrada en els animals obesos, el tractament d'animals sans també va demostrar que la sobreexpressió de FGF21 en el SNC permet induir un envelliment més saludable. Els resultats demostren que el tractament és capaç de prevenir tant l'augment del pes, com la pèrdua de la sensibilitat a la insulina associada amb l'edat. La capacitat de FGF21 per regular un millor envelliment ja ha estat descrit a nivell preclínic (Yan et al., 2021).

El potencial terapèutic del FGF21 contra l'obesitat, la resistència a la insulina, el NASH i altres malalties metabòliques ha provocat que la indústria farmacèutica generi anàlegs de FGF21 o agonistes dels seus receptors (Hecht et al., 2012; Adams et al.,

2013b; Camacho et al., 2013; Smith et al., 2013; Zhao et al., 2019). Però aquests fàrmacs presenten certs inconvenients que la teràpia gènica és capaç de solucionar. Per una banda, tant els anàlegs com els agonistes de FGF21 necessiten la readministració periòdica en canvi, una sola administració de FGF21 amb la teràpia gènica permet mantenir uns nivells de FGF21 elevats i estables durant el temps. Per altra banda, els anàlegs estan formats a partir de modificacions de la proteïna nativa i els agonistes a partir d'anticossos, en canvi, amb la teràpia gènica se sobreexpressa directament la proteïna endògena. Tots aquests fàrmacs sintètics han demostrat la seva capacitat per activar algunes de les vies de senyalització de la proteïna nativa FGF21, ara bé, aquests fàrmacs mai reproduiran exactament la resposta cel·lular que produeix la proteïna nativa i a part poden estar activant altres vies de senyalització i com a conseqüència podrien generar efectes secundaris no desitjats (Geng et al., 2020). A més, la utilització de la proteïna nativa evita també els problemes d'immunogenicitat, ja que el sistema immunitari la reconeix com una proteïna endògena, en canvi, s'ha descrit que alguns anàlegs de FGF21 generen respostes immunitàries (Adams et al., 2013b; Gaich et al., 2013; Kim et al., 2017; Stanislaus et al., 2017b).

En el nostre laboratori ja s'ha desenvolupat una teràpia gènica amb FGF21 en el que els òrgans diana eren el fetge, el múscul o el teixit adipós. L'enginyeria genètica d'aquests teixits va comportar un augment dels nivells circulants de FGF21 que va ser capaç de revertir eficientment l'obesitat i la resistència a la insulina en ratolins alimentats amb una dieta alta en lípids i en ratolins ob/ob (Jimenez et al., 2018). Respecte a aquesta estratègia terapèutica, l'administració intra-CSF de vectors AAV1-FGF21 comporta certs avantatges, el més important dels quals és la baixa dosi de vector requerida per obtenir els efectes terapèutics (Penaud-Budloo et al., 2018). A més, el fet de que el SNC sigui una zona immunoprivilegiada sumat les baixes dosis requerides redueix la probabilitat d'una resposta immunològica contra la càpsida (Forrester et al., 2018; Ronzitti et al., 2020). També, a diferència dels diferents tractaments perifèrics, el tractament intra-CSF amb AAV1-FGF21 va ser capaç d'induir el *browning* del WAT en animals alimentats amb HFD, augmentant per tant les probabilitats d'eficàcia del tractament en humans (Jimenez et al., 2018).

En conclusió, en aquesta estudi s'ha demostrat que l'enginyeria genètica del SNC mitjançant vectors AAV codificant per FGF21 és una teràpia segura i eficaç pel tractament de l'obesitat i la resistència a la insulina i que els beneficis terapèutics obtinguts es regulen per l'acció del FGF21 únicament en el SNC. Tot i que els resultats presentats estaven d'acord amb les evidències que demostren que l'acció del FGF21 en el SNC és imprescindible per poder regular algunes de les seves funcions metabòliques

(Sarruf et al., 2010; Owen et al., 2014; Douris et al., 2015; Bondurant et al., 2017; Lan et al., 2017) aquest és l'únic estudi que avalua l'exposició crònica del FGF21 específica al SNC. Els resultats exposats també demostren que el tractament és capaç de prevenir els dèficits cognitius associats al consum d'una dieta HFD. D'aquesta manera representa una estratègia terapèutica que ha demostrat la seva eficàcia per la prevenció dels dèficits cognitius associats aquestes malalties.

Els resultats obtinguts poden construir la base per la translació clínica d'aquesta aproximació de teràpia gènica pel tractament de l'obesitat i la DT2 en un futur i obra la porta a una possible utilització d'aquesta aproximació terapèutica pel tractament d'altres malalties neurodegeneratives.



## **VI. CONCLUSIONS**



1. L'administració de vectors AAV1 intra-CSF, a través de la cisterna magna, permetia transduir eficientment diferents regions del SNC i presentava una molt baixa eficiència per transduir els teixits perifèrics.
2. L'administració intra-CSF del vector AAV1-FGF21 va permetre l'augment específic de l'expressió de FGF21 i del contingut proteic de l'hormona en l'encèfal, sense augmentarne els nivells circulants.
3. L'increment del FGF21 específic al SNC en ratolins C57BL/6 sans era segura i va prevenir el guany de pes i la resistència a la inulina associats amb l'edat.
4. En ratolins C57BL/6 alimentats amb una dieta alta en lípids l'administració de l'AAV1-FGF21 va reduir el pes, la hipertròfia i la inflamació dels teixits adiposos en ratolins alimentats amb la HFD.
5. El tractament amb AAV1-FGF21 va permetre revertir l'esteatosi, la inflamació i la fibrosi hepàtica produïda per la dieta HFD. A més, també va prevenir la formació d'hepatocarcinomes.
6. Els animals tractats amb AA1-FGF21 van experimentar un augment de la despesa energètica, mitjançant un augment de l'activitat locomotora i també per un augment de la termogènesi no associada a tremolor com a resultat de l'activació del BAT i el *browning* del iWAT.
7. L'augment de la termogènesi no associada a tremolor estava regulada per l'acció central del FGF21 ja que incrementava l'expressió de CRH en l'hipotàlem, i induïa per tant l'activitat del sistema nerviós simpàtic, sense incrementar els nivells de corticosterona.
8. L'administració del vector AAV1-FGF21 va permetre millorar el metabolisme de la glucosa associada als animals obesos, ja que va augmentar la sensibilitat a la insulina i la tolerància a la glucosa.
9. El tractament amb AAV1-FGF21 va prevenir el desenvolupament dels dèficits cognitius associats a l'obesitat gràcies, en part, a la millora de les alteracions de l'hipocamp produïdes per la dieta alta en lípids.
10. En resum, aquest resultats demostren l'eficàcia terapèutica de l'FGF21 administrat intra-CSF per revertir l'obesitat, la resistència a la insulina i els dèficits cognitius associats.





## **VII. MATERIALS I MÈTODES**



## 1. MATERIALS

### 1.1. Animals

En els estudis d'aquesta tesi doctoral s'han utilitzat ratolins mascle consanguinis de la soca C57BL/6J01aHsd de 8 setmanes d'edat. Els animals es van estabular en una instal·lació lliure de patògens (*SER-CBATEG, UAB*) i es van mantenir en unes condicions de temperatura ( $22^{\circ}\text{C} \pm 2$ ), llum (cicles de llum-fosc de 12 h) i humitat controlades i s'alimentaven *ad libitum* amb una dieta estàndard (chow) (*2018S Teklad Global Diets, Envigo*) o una dieta alta en lípids (HFD) (*TD.88137 Teklad Diets, Envigo*).

Abans de la presa de les mostres, els animals es van anestesiar amb anestèsia inhalatòria (Isoflorano, IsoFlo®, *Abbott Animal Health*) i es van eutanasiar per decapitació. Les mostres de teixits i sang es van obtenir al matí i immediatament es van conservar en formaldehid al 4% (*Panreac*) o congelades en N<sub>2</sub> líquid per posteriorment emmagatzemar a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Les mostres de sang es van centrifugar a 10000 g, a  $4^{\circ}\text{C}$  durant 10 min i el sèrum obtingut es va mantenir a  $-80^{\circ}\text{C}$  fins a la determinació dels paràmetres circulants. Tots els procediments experimentals van ser aprovats pel comitè d'Ètica i Experimentació Animal i Humana de la Universitat Autònoma de Barcelona.

### 1.2. Soques bacterianes

Per generar els constructes de DNA plasmídic es van utilitzar les soques d'*E.coli* *XL2-Blue (Agilent Technologies)*, *Stb13* i *Dh5 $\alpha$*  (*Thermo Fisher Scientific*). Tots els plasmidis contenien un gen de resistència a la kanamicina o a l'ampicil·lina per la seva selecció en cultius bacterians, motiu pel qual aquests cultius es van fer créixer en medi LB (*Conda*) amb 30  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de kanamicina o 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  d'ampicil·lina. Quan les condicions experimentals feien necessari el creixement dels cultius en medi sòlid, s'hi va afegir un 2 % d'agar.

### 1.3. Anticossos

Els anticossos enumerats a les taules 5 i 6 es van utilitzar per realitzar les immunohistoquímiques i els *Western-Blot*, respectivament.

Taula 5. Llista d'anticossos utilitzats a les immunohistoquímiques

Immunohistoquímica				
	Hoste	Proveïdor	Referència	Dilució
<b>Anticossos Primaris</b>				
Anti-Mac2	Rata	Cerdelane	CL8942AP	1/50
Anti-Insulina	Cobaia	Invitrogen	PA1-26938	1/50
Anti-GFAP	Conill	Dako	Z0334	1/1000
Anti-GFP	Cabra	Abcam	ab6673	1/300
<b>Anticossos Secundaris</b>				
Anti-Conill IgG biotinilated	Cabra	ThermoFisher	31820	1/300
Anti-Rata IgG biotinilated	Conill	Dako	E0467	1/300
Anti-Cobaia IgG biotinilated	Cabra	Abcam	ab6907	1/300
Anti-Cabra 488	Ruc	Invitrogen	A11055	1/100

Taula 6. Llista d'anticossos utilitzats a als *Western-Blot*

Western blot				
	Hoste	Proveïdor	Referència	Dilució
<b>Anticossos Primaris</b>				
Anti-Akt (Ser473)	Conill	Cell Signaling	9271	1/1000
Anti-Akt	Conill	Cell Signaling	9272	1/1000
Anti-PDK1 (Ser241)	Conill	Cell Signaling	3488	1/1000
Anti-PDK1	Conill	Cell Signaling	5662	1/1000
Anti-Foxo1 (Ser256)	Conill	Cell Signaling	9461	1/1000
Anti-Foxo1 (L27)	Conill	Cell Signaling	9454	1/1000
Anti-UCP1	Conill	Abcam	ab10983	1/1000
Anti-BDNF	Conill	Abcam	ab108319	1/5000
Anti-GFAP	Conill	Dako	D0334	1/12000
Anti- $\alpha$ Tubulina	Conill	Abcam	ab4074	1/1000
Anti-GAPDH	Cabra	Abcam	ab9483	1/1000
<b>Anticossos Secundaris</b>				
Anti-Conill IgG HRP Conjugate	Porc	Dako	P0217	1/20000
Anti-Cabra IgG HRP Conjugate	Conill	Dako	P0449	1/20000

#### 1.4. Plasmidis

Els plasmidis utilitzats per la producció dels vectors virals AAV s'indiquen a la Taula 7.

Taula 7. Llista de plasmidis

Plasmidi	Promotor	Gen d'interès	Senyal de poliadenilació
pAAV-CAG-omFGF21	CAG	omFGF21	$\beta$ -globina de conill
pAAV-CAG-Null	CAG	-	$\beta$ -globina de conill
pAAV-CAG-GFP-WPRE	CAG	GFP	SV40

om: seqüència murina optimitzada; CAG: *CMV early enhancer/chicken  $\beta$ -actin promoter*

El CAG és un promotor híbrid sintètic format per l'*enhancer* del CMV i el primer intró i primer exó del gen de la  $\beta$ -actina de pollastre. Com a resultat s'aconsegueix un promotor que dona una expressió forta i ubiqua. La seqüència del gen d'interès *Fgf21* murina es va optimitzar per tal d'obtenir una major transcripció, estabilitat del mRNA i millor traducció. Per l'optimització es van utilitzar algoritmes comercials que tenen en compte diversos paràmetres, com l'ús de codó, el contingut de CG, possibles estructures secundàries, etc. El plasmidi generat també conté les seqüències ITR imprescindibles per l'encapsidació dels vectors AAV.

Las estratègies utilitzades en la generació dels plasmidis es resumeixen a la Taula 8.

Taula 8. Estratègies per a l'obtenció dels plasmidis d'interès.

Nom		Estratègia de clonatge	Origen
pAAV-CAG-omFGF21	Vector	pAAV-CAG-FGF21-dmirT digerit amb <i>NotI</i> i <i>Pac1</i> i relligat	CBATEG
pAAV-CAG-Null	Vector	CBATEG	CBATEG
pAAV-CAG-GFP-WPRE	Vector	CBATEG	CBATEG

om: seqüència murina optimitzada; CAG: *CMV early enhancer/chicken  $\beta$ -actin promoter*; dmiRT: seqüència diana pels microRNAs 122a i 1

## 1.5. Reactius i materials

Els reactius de biologia molecular i els materials utilitzats pel desenvolupament d'aquesta tesi s'han obtingut dels següents fabricants: *Abcam* (Cambridge, Regne Unit), *DakoCytomation* (Glostrup, Dinamarca) *Life Technologies* (Carlsbad, CA, EUA), *Sigma-Aldrich* (St. Louis, MO, EUA), *Panreac* (Barcelona, Espanya), *Promega Corporation* (Madison, WI, EUA), *Qiagen* (Gilden, Alemanya), *Swant* (Marly, Suïssa), *New England Biolabs* (Ipswich, MA, EUA), *Roche* (Basilea, Suïssa), *Fermentas* (St. Leon-Rot, Alemanya), *Thermo Fisher Scientific* (Waltham, MA, EUA), *Stratagene-Agilent Technologies* (Santa Clara, CA, EUA), *Merck* (Darmstadt, Alemanya), *Invitrogen* (Carlsbad, CA, EUA), *Lucigen* (Middleton, WI, EUA), *Bio-Rad Laboratories* (Hercules,

CA, EUA), *Vector Laboratories Ltd* (Burlingame, CA, EUA), *Electron Microscopy Science* (Hatfield, PA, EUA), *Millipore* (Burlington, MA, EUA), *Epicentre Biotechnologies Ecogen* (Barcelona, Espanya), *Santa Cruz Biotechnology* (Dallas, TX, EUA), *Cedarlane* (Burlington, ON, Canadà), *Novus Biologicals* (Littleton, CO, EUA), *iNtRON Biotechnology* (Sangdaewon, Corea del Sud), *Greiner Bio-One* (Kremsmünster, Àustria), *Hamilton Company* (Reno, NV, EUA), *Philips* (Amsterdam, Països Baixos), *Carbosynth* (Thal, Suïssa), *Horiba* (Kyoto, Japó) *Sonics & Materials INC* (Newton, CT, EUA), *Applied Biosystems* (Waltham, MA, EUA), *Prozess & Labortechnik GmbH & Co.* (Mullheim, Alemanya), *Sarstedt* (Nümbrecht, Alemanya) *BD* (Franklin Lakes, NJ, EUA), *Bayer* (Leverkusen, Alemanya), *Crystal Chem* (Elk Grove Village, IL, EUA), *R&D Systems* (Minneapolis, MN, EUA), *Nikon Instruments* (Minato, Japó), *Leica Biosystems* (Wetzlar, Alemanya), *Abbott Animal Health* (Chicago, IL, EUA), *Prozess & Labortechnik GmbH & Co. KG* (Mullheim, Alemanya)

## 2. MÈTODES

### 2.1. Tècniques bàsiques de DNA

#### 2.1.1. Preparació de DNA plasmídic

Per l'obtenció de petites quantitats de DNA plasmídic (2-3 µg) es van realitzar *minipreparacions (minipreps)* seguint el protocol basat en una lisi alcalina (Bimboim and Doly, 1979). Per això s'utilitzen bacteris amb que han estat transformats amb DNA plasmídic i han crescut en 1.5 mL de medi de cultiu (LB amb ampicil·lina). En primer lloc es degrada la paret bacteriana per acció de l'enzim lizozim, per posteriorment realitzar una lisi alcalina i d'una precipitació selectiva del DNA genòmic i proteïnes desnaturalitzades amb una solució d'acetat de potassi a pH àcid. Durant l'obtenció de el DNA, el RNA bacterià es degrada mitjançant l'addició de l'enzim RNAsa.

D'altra banda, per l'obtenció de grans quantitats de DNA plasmídic es van realitzar *maxipreparacions (maxipreps)* que permeten obtenir com a màxim 1 mg, o *megapreparacions (megapreps)* que permeten obtenir un màxim de 2,5 mg a partir de 200 o 500 mL de medi de cultiu, respectivament. Igual que en les minipreps, el mètode està basat en una lisi alcalina, però en aquest cas, la purificació de DNA es fa mitjançant la utilització del kit *Pure Yield™ Plamid MaxiPrep System (Promega Corporation)* per les *maxipreps* i el kit *EndoFree Plasmid Mega Kit (QIAGEN)* per les *megapreps*.

#### 2.1.2. Digestió de DNA plasmídic amb enzims de restricció

Cadascun dels enzims de restricció utilitzats necessita unes condicions de reacció específiques pel que fa al pH, la força iònica, el temps i la temperatura. Per aquest motiu, en cada cas es van seguir les instruccions dels proveïdors (*New England, Biolabs, Roche* o *Fermentas*). En termes generals, per cada µg de DNA es va utilitzar 1 unitat d'enzim durant 1 hora a la temperatura òptima de cada enzim. En el cas que fos necessària la utilització de dos enzims de restricció, si aquests actuaven eficientment amb el mateix tampó i temperatura, les dues digestions es van dur a terme simultàniament. En canvi, si els dos enzims tenien requeriments diferents, primer es realitzava una digestió i abans de la segona es purificava l'DNA mitjançant el *kit* comercial *GeneJET™ Gel Extraction kit (Fermentas)* per tal d'eliminar les sals, els enzims i altres restes de la reacció.



### **2.1.3. Generació d'extrems roms**

Quan el clonatge dels constructes requeria la lligació d'extrems roms, es van tractar els fragments de DNA amb extrems cohesius amb el fragment Klenow de la DNA polimerasa 1 (*DNA Polymerase I, Large (Klenow) Fragment, Fermentas*) seguint el protocol del fabricant. El fragment Klenow, en presència de dNTPs, presenta activitat polimerasa 5'→3' permetent així que empleni els extrems protuberants 5', en canvi, en absència de dNTPs, presenta activitat exonucleasa 3'→5', permetent així que elimini els extrems protuberants 3' i per tant la generació dels extrems roms.

### **2.1.4. Desfosforilació dels fragments de DNA**

Per evitar la religació del DNA plasmídic després de la seva digestió s'eliminen els residus fosfat dels extrems 5'. Per això es va utilitzar 1 unitat de fosfatasa alcalina per cada 1-5 µg de DNA i es van seguir les especificacions del kit *FastAP™ Thermosensitive Alkaline Phosphatase (Fermentas)*.

### **2.1.5. Construcció de les molècules híbrides: lligació**

Per tal de construir molècules híbrides de DNA a partir de diferents fragments, s'utilitza un procediment conegut com a lligació. Aquesta es pot dur a terme gràcies a l'acció de l'enzim lligasa, específicament es va utilitzar la *T4 DNA ligase (New England Biolabs)*. Per la lligació, els fragments de DNA d'interès es van barrejar amb diferents ràtios molars de vector:insert (normalment 1:5, 1:10 i 1:20). La reacció de lligació es va dur a terme seguint el protocol establert pel fabricant.

### **2.1.6. Transformació de les cèl·lules competents**

Depenent de cada situació, els productes de lligació es van transformar en cèl·lules competents *E. Coli* de la soca *XL2blue* (electrocompetents), *Dh5α* o *Stbl3* (quimiocompetents).

Per introduir l'DNA a l'interior de les cèl·lules electrocompetents *XL2blue* es va utilitzar el procés de transformació elèctrica o electroporació. Es van utilitzar 40 µl de bacteris *XL2blue* ( $2 \times 10^{10}$  cèl·lules/mL) prèviament descongelats en gel als quals s'hi va afegir 1 µL (aproximadament 10 ng) de la reacció de lligació de l'DNA o de l'DNA control. La barreja es va incubar en gel durant 5 minuts i després es van electroporar els bacteris a 2500 V mitjançant un electroporador (*Bio-Rad*). A continuació es van afegir 200 µL de medi LB pre-escalfat a 37°C, es van sembrar en plaques de LB amb l'antibiòtic corresponent i es van incubar a 37°C durant tota la nit.

Per introduir l'DNA a l'interior de les cèl·lules quimiocompetents *Dh5α* i *StbI3* es va utilitzar un procés de xoc tèrmic. Es van barrejar les cèl·lules i el producte de lligació amb les mateixes condicions descrites prèviament. Posteriorment, es va deixar la barreja en gel durant 30 min. A continuació es va realitzar un xoc tèrmic a 37°C durant uns 20 s per les cèl·lules *Dh5α* o a 42°C durant 45 s per les cèl·lules *StbI3*. Finalment, es va deixar reposar 60 s en gel, es van sembrar en plaques LB amb l'antibiòtic corresponent i es van incubar a 37°C durant tota la nit.

### **2.1.7. Separació i visualització dels fragments de l'DNA**

Per la separació, identificació i purificació de fragments de DNA es van utilitzar gels d'agarosa a l'1% p/v. Els gels es van preparar mitjançant la dissolució de l'agarosa amb el tampó d'electroforesi 1x TAE (Tris-acetat pH 8,3, 40mM i EDTA 1mM) juntament amb bromur d'etidi (0.5 µg/mL) o *RedSafe* (1x) (*iNtRON Biotechnology*) per permetre la visualització de les bandes. Les mostres es van carregar amb el gel amb el tampó de càrrega 10x (*Invitrogen*) i la separació es va realitzar en el tampó d'electroforesi 1x TAE al voltant de 90 V. Per tal de visualitzar els gels, es van exposar a llum ultraviolada de baixa longitud d'ona (310 nm) des d'un transil·luminador que també presentava un sistema de càmeres (*Syngene*). Com a marcadors de pes molecular, es van utilitzar els marcadors comercials *DNA ladder 1 kb* i/o *DNA ladder 100 bp* (*Invitrogen*).

Quan es feia necessària l'extracció i purificació d'algun dels fragments de DNA separats, aquest es realitzava amb el *kit* comercial *GeneJET™ Gel Extraction kit* (*Fermentas*). Finalment, la quantificació de l'DNA es va dur a terme en un espectrofotòmetre (*Nanodrop 1000 spectrophotometer, Thermo Fisher Scientific*).

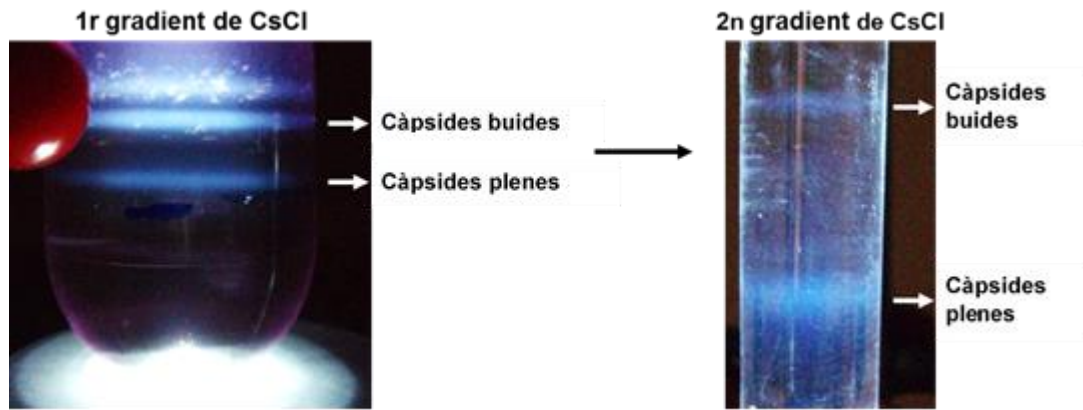
## **2.2. Producció, purificació i titulació de vectors virals adenoassociats**

### **2.2.1. Producció i purificació**

Els vectors virals AAV1 es van generar en cultius cel·lulars de HEK-293 cultivats en *Roller bottles* (RB) (*Greiner Bio-One*) mitjançant el protocol de triple transfecció. Les cèl·lules es van cultivar en medi DMEM suplementat amb 10% de FBS (Serum Fetal Bovi) + 1% Penicil·lina/estreptomicina i es van deixar créixer fins que van assolir una confluència d'aproximadament el 70%. La co-transfecció es va dur a terme amb 15 mL de PEI (Polietilamina) MAX (*Polysciences*) – DNA plasmídic (en una proporció 2:1 p/p) en DMEM +1% de Penicil·lina/estreptomicina per cada RB. L'DNA plasmídic està format per la barreja dels 3 plasmidis necessaris: 20 µg del plasmidi d'interès (pAAV-CAG-omFGF21 o pAAV-CAG-Null), 100 µg del plasmidi accessori pRep2Cap1 (plasmidi

d'expressió codificant per les proteïnes de la càpsida proteica i per les proteïnes necessàries per a la replicació viral) i 100 µg de plasmidi pAdHelper (plasmidi d'expressió codificant per a les proteïnes adenovirals auxiliars necessàries). El plasmidi pRep2/Cap1 va ser cedit per la Dra. Katherine High del *Children's Hospital of Philadelphia*.

Al cap de 72 hores de la co-transfecció es va iniciar el protocol de purificació basat en la utilització de polietilenglicol (PEG) i la ultracentrifugació en gradients de CsCl. En aquest punt els vectors virals es trobaven tant al medi de cultiu, com a l'interior de les cèl·lules. En primer lloc, es van recollir i centrifugar les cèl·lules a 2500 g durant 15 min a 4°C. El medi de cultiu que formava el sobrenedant es va guardar a 4°C i el *pellet* cel·lular es va reconstituir en tampó TMS (50 mM TrisHCl, 150mM NaCl, 2mM MgCl<sub>2</sub>, pH 8.0), es va sonicar i es van lissar les cèl·lules per finalment centrifugar-les a 2500 g durant 30 min i recuperar el sobrenedant (que contenia els vectors virals que es trobaven l'interior de la cèl·lula). Aquest sobrenedant es va barrejar amb el medi de cultiu recuperat anteriorment. El següent pas de purificació va ser la precipitació de les partícules virals, i per això, es van incubar durant 15 h en PEG 8000 (*Sigma*) a 4°C per posteriorment centrifugar-les a 4000 g durant 30 min. El *pellet* format es va reconstituir amb TMS tractat amb benzonasa (*Merk*) durant 1 h a 37°C per tal d'eliminar tots els àcids nucleics que no estaven encapsidats. Després d'aquesta incubació es va realitzar una centrifugació de 10000 g durant 10 min i es va obtenir el sobrenedant. Per la purificació mitjançant les ultracentrifugacions en gradients de CsCl, el sobrenedant obtingut es va carregar en tubs de 37,5 mL *Ultra clear* (*Beckman*) que contenien un gradient de CsCl de densitat 1,5 g/L (5mL) i 1,3 g/L (10mL). A continuació, van ser centrifugats durant 17 h a 27000 rpm en un rotor SW28 (*Beckman*). Les bandes que contenien els vectors es van recollir amb agulles de 18 G i es van transferir a tubs *Ultra clear* de 12,5 mL i la resta del tub es va omplir CsCl a 1,379 g/mL per tal de generar un gradient continu. Aquests tubs es van centrifugar a 38000 rpm en un rotor SW40Ti (*Beckman*) durant 48 h. Per acabar, es van recollir les bandes que contenien les càpsides plenes i es van dialitzar amb PBS + 0,001% Plurònic F68 mitjançant una membrana de 10 kDa (*Thermo Fisher Scientific*), i posteriorment es van filtrar mitjançant filtres de 0,22 µm (Millipore) (Figura 61).



**Figura 61. Purificació dels vectors AAV.** El primer gradient de CsCl permet separar els vectors que contenen el transgèn (càpsides plenes) de la majoria d'impureses i càpsides buides. El segon gradient permet separar els vectors que contenen el transgèn (càpsides plenes), de bona part de les impureses i càpsides buides, i també permet separar les càpsides plenes d'impureses de densitat similar a la de les càpsides plenes, d'espècies intermitjies i de càpsides buides. Adaptat (Ayuso et al., 2010).

### 2.2.2. Titulació dels genomes virals

Per la titulació dels genomes virals, en primer lloc, es van lisar les càpsides afegint 2  $\mu\text{L}$  de cada preparació del vector viral a 8  $\mu\text{L}$  de PBS + 0,001% Pluronic F68 i 10  $\mu\text{L}$  de tampó de lisi (20 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl i 0.2 % SDS, pH 7.4). Posteriorment, es va incubar 1 h a 70°C i s'hi van afegir 180  $\mu\text{L}$  de tampó TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8) per obtenir un volum total de 200  $\mu\text{L}$ . Els AAV presenten un DNA de cadena simple, per tant, quan es lisen les càpsides, les cadenes positives i negatives es poden hibridar i generar DNA de cadena doble.

Malgrat tot el procés de purificació, la preparació viral pot contenir contaminació de DNA. Aquest fet podria provocar una sobreestimació del valor del títol dels genomes virals. Per aquest motiu es va processar en paral·lel una mostra de vectors virals sense lisar. En aquest cas, es va afegir 2  $\mu\text{L}$  de cada preparació viral a 8  $\mu\text{L}$  de tampó TE i es van deixar les mostres a temperatura ambient. Al final també se l'hi van afegir 180  $\mu\text{L}$  de tampó TE per obtenir un volum total de 200  $\mu\text{L}$ . També es va realitzar una dilució seriada de DNA de referència (fag lambda) amb tampó TE per generar una corba de calibratge.

El mètode utilitzat per quantificar els genomes virals va ser el del *PicoGreen* (Thermo Fisher Scientific). El *PicoGreen* és un fluorocrom que s'uneix amb una alta sensibilitat a l'DNA de cadena doble i que emet molt poca fluorescència davant la contaminació per proteïnes, DNA de cadena simple o RNA. En una placa negra de 96 pous es van afegir 180  $\mu\text{L}$  de *PicoGreen* 1X en tampó TE i a continuació, es van afegir per triplicat 20  $\mu\text{L}$  de l'DNA de referència (DNA viral d'un vector de titulació coneguda

com a control positiu), de les mostres lisades, de les mostres no lisades i dels blancs (tampó TE). La determinació es va fer amb un fluorímetre *Synergy HTX* (*BioTek Instrument*) que va excitar les mostres a 485 nm i va llegir la fluorescència a 535 nm. La fluorescència final es va obtenir per la diferència dels valors obtinguts en els pous de les mostres lisades menys els valors obtinguts als pous dels blancs (soroll de fons) i als pous de les mostres no lisades. El títol de les diferents produccions de vectors utilitzats es va obtenir per interpolació de la fluorescència obtinguda a la regressió lineal de la fluorescència de la corba de calibratge (Taula 9).

**Taula 9. Quantificació dels genomes virals**

<i>Vector Viral</i>	Títol (vg/mL)
<i>AAV1-CAG-omFGF21</i>	$1.19 \times 10^{13}$
<i>AAV1-CAG-Null</i>	$3.32 \times 10^{13}$
<i>AAV1-CAG-GFP-WPRE</i>	$1.10 \times 10^{13}$

### 2.2.3. Quantificació de partícules virals

Es va utilitzar l'anàlisi per electroforesis en gels d'acrilamida SDS-PAGE i la tinció *Sypro Ruby* per tal de poder determinar el percentatge de càpsides buides (genomes virals/nombre de càpsides) i el grau de contaminació amb altres proteïnes no virals que poden alterar la capacitat d'infectivitat *in vivo* dels vectors AAV. Es va barrejar el volum apropiat de la preparació viral i diferents dilucions d'un vector de referència de concentració coneguda amb Laemmli 4x fins obtenir un volum final de 20 µL. Les mostres es van incubar 5 min a 95°C i després es van carregar en un gel d'acrilamida SDS-PAGE (*Thermo Fisher Scientific*) i es van córrer a 150 V durant 2 h i 30 min. Les proteïnes es van fixar amb Metanol-Acètic i es va tenyir el gel afegint 100 mL de *Sypro Ruby Protein Gel Staining* (*Thermo Fisher Scientific*) i deixant-lo incubar O/N. El matí següent es van fer dos rentats del gel, primer amb Metanol-Acètic i després amb aigua Mili-Q. La fluorescència es va mesurar mitjançant un transil·luminador UV (*Syngene*) i el títol de les partícules virals es va obtenir per densitometria. Es va generar una corba de calibratge a partir de la intensitat de la proteïna VP3 de cada una de les dilucions del vector de referència que es va utilitzar per interpolat la concentració de les preparacions dels vectors analitzades.

### 2.3. Quantificació dels genomes virals als teixits

Per quantificar els genomes virals del vector AAV1-CAG-GFP-WPRE es va extreure el DNA amb *MasterPure™ DNA Purification Kit (Lucigene)*, seguint les instruccions del fabricant. Breument, aproximadament 5 mg del teixit es van digerir en 300 µl de tampó *Tissue and Cell Lysis Solution* amb proteïnasa K i es va incubar O/N a 56 °C. Els teixits més fibrosos/durs com els músculs es van deixar O/N a 56°C en agitació. L'endemà, en primer lloc, es va degradar el RNA mitjançant l'addició d'1 µL de RNasa A i una incubació de 30 min a 37 °C. Es va recuperar el sobrenedant, que contenia el DNA, i es va fer precipitar mitjançant isopropanol i després dels rentats amb etanol es va ressuspendre en el volum adequat d'H<sub>2</sub>O segons cada teixit.

La quantificació dels genomes virals es va realitzar mitjançant qPCR amb una sonda TaqMan (Taula 10) que permetia detectar la seqüència WPRE amb el kit LightCycler® 480 Probes Master (*Roche*), segons les condicions del fabricant (Taula 11). Les mostres utilitzades es van portar a una concentració de 20 ± 3 ng/µL abans de fer la qPCR. La quantificació es va realitzar per extrapolació d'una corba de calibratge amb concentracions conegudes del plasmidi de producció pAAV-CAG-GFP-WPRE.

**Taula 10. Seqüències dels oligonucleòtids utilitzats per TaqMan.**

Diana	Seqüències (5'→3')
WPRE	<i>Forward</i> CGGCTGTTGGGCACTGA
	<i>Reverse</i> GGAAGGTCCGCTGGATTGA
	<i>Sonda</i> ATGGCTGCTCGCCTGTGTTGCC

**Taula 11. Components de la qPCR mitjançant Probe Master.**

Reactiu	Volums per 1 reacció (µL)
2x LightCycler 480 Probe Master	5
<i>Primer Forward</i> (10 mM)	0.2
<i>Primer Reverse</i> (10 mM)	0.2
<i>Sonda</i>	0.1
Aigua Mili-Q	2.5
DNA (20 ng/µL ± 3)	2
<b>Volum total</b>	<b>10</b>

## 2.4. Anàlisi d'expressió de RNAm per real-time PCR

### 2.4.1 Homogeneïtzació del teixit per obtenir RNA

Abans d'aïllar el RNA es va haver d'homogeneïtzar el teixit utilitzant un homogeneïtzador mecànic: *Tissue Lyser LT (QIAGEN)* i seguint el protocol recomanat pel fabricant. En primer lloc es transfereixen uns 30 mg de teixit en un tub de 2 mL que contenia una bola d'acer inoxidable de 5 mm de diàmetre i que prèviament es va deixar en gel sec perquè es refredés durant un mínim de 15 minuts. El teixit es va deixar dins del tub durant 15 minuts més en gel sec. Posteriorment, es van incubar els tubs durant 2 minuts a temperatura ambient. Passat aquest temps, es va afegir 1 mL de QIAzol (*QIAGEN*) pels teixits adiposos o 1 mL de Tripure (*Roche*) per la resta de teixits. Els teixits es van homogeneïtzar en el *Tissue Lyser* durant 3 min a 50 Hz. El teixit disgregat es va transferir a tub nou i en el cas dels teixits adiposos es va realitzar una centrifugació de 10000 g a 4°C per tal d'eliminar el greix de la mostra. Finalment, les mostres es van emmagatzemar a -80°C fins a la seva utilització.

### 2.4.2. Purificació i aïllament del RNA

L'obtenció del RNA es va fer utilitzant el protocol comercial *RNeasy Mini Kit (QIAGEN)*. Abans de passar per les columnes per tal de separar la fracció de RNA es va afegir 0.2 mL de cloroform per cada mL de buffer de lisi i es van centrifugar les mostres durant 15 min a 10000 g. Posteriorment es va barrejar la fase aquosa superior amb el mateix volum de etanol 70% i es va introduir a les columnes. Una vegada dins de les columnes, les mostres es van tractar amb DNAasa I del *kit RNase-Free DNase Set (QIAGEN)* amb la finalitat d'eliminar tota possible contaminació de DNA genòmic. Finalment, les mostres es van eluir amb l'addició de 30-50 µL d'aigua Mili-Q i la concentració i la qualitat de les mostres de RNA es va determinar mitjançant la mesura de l'absorbància al rang ultraviolat amb l'espectrofotòmetre *NanoDrop ND-1000 (Termo Fisher Scientific)*

### 2.4.3. Síntesi del cDNA

La retrotranscripció es va fer a partir d'1 µg de RNA i es va utilitzar el *kit* comercial *Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche)* i el termociclador *MasterCycler Eppendorf Gradient S (Eppendorf)*. La reacció està dividida en dues etapes. En la primera etapa el RNA es va barrejar amb oligonucleòtids Oligo-dT i hexàmers aleatoris i es va realitzar la primera incubació (Taula 12). Una vegada finalitzada, es van afegir a la reacció inhibidors de les RNases, el tampó de reacció, els deoxinucleotids i la

transcriptasa reversa i es va procedir a la segona incubació (Taula 12). Aquest control permet detectar possibles contaminacions de DNA genòmic. Una vegada finalitzada la incubació, els cDNAs es van diluir 1/10 i es van guardar a -20°C fins a la seva utilització.

**Tabla 12. Etapes de la reacció de retrotranscripció**

	Temperatura	Temps
Primera incubació	65 °C	10 min
	4 °C	Pausa
Segona incubació	25 °C	15 min
	55 °C	45 min
	85 °C	5 min
	4 °C	Fi

#### 2.4.4. Quantificació de l'expressió del RNAm per qPCR a temps real

L'anàlisi de l'expressió dels diferents gens llistats en la Taula 14 es va realitzar mitjançant la PCR quantitativa i utilitzant *LightCycler® 480 SYBR Green I Master (Roche)* (Taula 13) com a reactiu i les màquines *LightCycler® 480 (Roche)* i *QuantStudio 5 (Applied Biosystems)*.

**Taula 13. Components de la qPCR mitjançant SYBR Green.**

Reactiu	Volums per 1 reacció (µL)
2x LightCycler 480 SybrGreen I Master	5
Primer Forward (10 mM)	0.2
Primer Reverse (10 mM)	0.2
Aigua Mili-Q	2.6
cDNA diluït 1/10	2
<b>Volum total</b>	<b>10</b>



Taula 14. Llistat d'oligonucleòtids utilitzats a la qPCR.

Gen	Oligonucleòtid (5'→3')	
<i>mmRplp0</i>	<b>Forward</b>	ACT GGT CTA GGA CCC GAG AAG
	<b>Reverse</b>	TCC CAC CTT GTC TCC AGT CT
<i>omFgf21</i>	<b>Forward</b>	CCT AAC CAG GAC GCC ACA AG
	<b>Reverse</b>	GTT CCA CCA TGC TCA GAG GG
<i>mmF4/80</i>	<b>Forward</b>	CTT TGG ATG GGC TTC CAG TC
	<b>Reverse</b>	GCA AGG AGG ACA GAG TTT ATC
<i>mmCd68</i>	<b>Forward</b>	TGG CGG TGG AAT ACA ATG TG
	<b>Reverse</b>	TGC TTG CAT TTC CAC AGC AG
<i>Mcp1</i>	<b>Forward</b>	AAC TGC ATC TGC CCT AAG GTC
	<b>Reverse</b>	AAG TGC TTG AGG TGG TTG TG
<i>mmCol1a1</i>	<b>Forward</b>	GGC AAG AAT GGA GAT GAT GG
	<b>Reverse</b>	ACC ATC CAA ACC ACT GAA GC
<i>mmI1b</i>	<b>Forward</b>	TGC ACA CTT TTG ACA GTG ATG
	<b>Reverse</b>	TGA TGT GCT GCT GCA AGA TT
<i>mmTgfb</i>	<b>Forward</b>	TGA CCC CCA AGG CTC AAA TAT
	<b>Reverse</b>	TGA ACC CAG GTC CTC GCT TA
<i>mmI16</i>	<b>Forward</b>	AAG GTC TGA AGT CGT CCT G
	<b>Reverse</b>	CAC GTG GCA TGA AAG AAG CT
<i>mmUcp1</i>	<b>Forward</b>	GGA TTG GCC TCT ACG ACT CAG
	<b>Reverse</b>	TGT AGG CTG CCC AAT GAA CA
<i>mmCidea</i>	<b>Forward</b>	AAA CCA TGA CCG AAG TAG CC
	<b>Reverse</b>	AGG CCA GTT GTG ATG ACT AAG AC
<i>mmPpargc1a</i>	<b>Forward</b>	GCA TGA GTG TGT GCT GTG TG
	<b>Reverse</b>	TAG AGA CGG CTC TTC TGC CT
<i>mmCrh</i>	<b>Forward</b>	TCC GCA TGG GTG AAG AAT AC
	<b>Reverse</b>	ACA CGC GGA AAA AGT TAG CC
<i>mmDusp4</i>	<b>Forward</b>	CTG TCC CAA TCA CTT TGA GG
	<b>Reverse</b>	ACT CGA TGG CTT CCA TGA AC
<i>mmEgr1</i>	<b>Forward</b>	ACC TGA CCA CAG AGT CCT TTT C
	<b>Reverse</b>	ACA CGC GGA AAA AGT TAG CC
<i>mmElovl3</i>	<b>Forward</b>	GGA CTT AAG GCC CTT TTT GG
	<b>Reverse</b>	CCA ACA ACG ATG AGC AAC AG
<i>mmBmp8b</i>	<b>Forward</b>	AGA CAG CCT TTC ATG GTT
	<b>Reverse</b>	AGC TGC TTC TTC TTC AGT GG
<i>mmAfp</i>	<b>Forward</b>	AGA GAA TGG CGT CAA ACC TG
	<b>Reverse</b>	AAG GTT GGG GTG AGT TCT TG
<i>mmKrt19</i>	<b>Forward</b>	TTG AGA CAG AAC ACG CCT TG
	<b>Reverse</b>	TCA GGC TCT CAA TCT GCA TC
<i>mmLy6</i>	<b>Forward</b>	ACT TCT GCA AAA CCG TCA CC
	<b>Reverse</b>	TGT AGT CGG AGG TGC ATG AG
<i>mmFoxo1</i>	<b>Forward</b>	TTC AAG GAT AAG GGC GAC AG
	<b>Reverse</b>	TGC TGT GAA GGG ACA GAT TG

Els resultats obtinguts de la qPCR s'expressen com a *Cycle threshold* o Ct, que es defineix com el cicle fraccional de PCR en la qual es reporta una fluorescència major a la fluorescència basal.

Els resultats es van normalitzar per les Cts del gen de referència (o *housekeeping*) *Ribosomal protein lateal stalk subunit P0 (Rplp0)* realitzant els càlculs segons el mètode delta-delta-CT ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) descrit per Livak (Livak and Schmittgen, 2001). En aquest mètode, àmpliament usat, s'assumeix una duplicació òptima de cada cicle de qPCR amb una taxa d'amplificació del 100 %. Les Cts indiquen el número del cicle en què la quantitat de cDNA del gen diana ha amplificat i tant les mostres d'assaig com les de referència s'ajusten pel gen normalitzador. El valor resultant serveix per determinar la diferència d'expressió respecte al grup control. En el cas que el grup control no presentés amplificació de Cts, les Cts del gen d'interès es normalitzaran directament amb les Cts del *housekeeping* del mateix animal obtenint com a resultat unitats arbitràries del gen d'interès.

## **2.5. Western blot**

### **2.5.1. Obtenció del contingut proteic a partir de teixits**

L'obtenció dels extractes proteics de les diferents mostres de cervell es va realitzar homogeneïtzant en 400  $\mu$ L (Hipocamp) i 150  $\mu$ L (Hipotàlem) de tampó *T-PER<sup>TM</sup>* (*Thermo Fisher Scientific*) utilitzant un sonicador (VC130PB, *Sonics & Materials INC*). En canvi, les mostres de teixits perifèrics (BAT i iWAT) es van homogeneïtzar en 500  $\mu$ L de tampó de lisi (Tris 50 mM pH 7.5, sucrosa 0.27 M, EGTA 1 mM, EDTA 1 mM, NaF 50 mM, Na- $\beta$ -glicolfosfat 10 mM, Ppi 5 mM, Tritó X-100 1%) fent servir un polítró (*Polytron<sup>®</sup>* *MICCRA-KIT D-9*, ART Prozess & Labortechnik GmbH & Co. KG, Mullheim, Alemanya). Els dos tampons usats estaven suplementats amb inhibidors de proteases (*Complete<sup>®</sup>*, 1 pastilla/20 ml) (Roche) i inhibidors de fosfatases (Orthovanadat, 1mM). Una vegada homogeneïtzades, les mostres es van centrifugar a 10000 g durant 10 min a 4 °C per tal d'eliminar tot el *debris* cel·lular. El sobrenedant es va recuperar i es va guardar a -80 °C fins al moment de la seva utilització. Per evitar cicles de congelació/descongelació les mostres van ser al·liquotades.

### **2.5.2. Quantificació del contingut proteic pel mètode del BCA**

Per quantificar el contingut proteic es va utilitzar el mètode de l'àcid bicinonímic (BCA) (*Thermo Fisher Scientific*), basat en la reducció de cations  $Cu^{2+}$  a  $Cu^{+1}$  en presència de proteïnes a causa de la reacció de biuret. Els ions  $Cu^{+1}$  són quelats pel BCA i produeixen un complex amb un màxim d'absorbància a 562 nm.

Es va emprar una placa transparent de 96 pous on es van carregar 25  $\mu$ L d'una dilució apropiada de la mostra a analitzar i 25  $\mu$ L (per duplicat) de cada punt d'una recta

de calibratge (0-20 µg) feta amb albúmina sèrica bovina (BSA, *Bovine serum albumin*). Posteriorment, es van afegir 200 µL del reactiu BCA i es va incubar 30 min a 37°C. L'absorbància es va mesurar 562 nm amb un espectofotòmetre *Synergy HTX* (*BioTek Instruments*). Els valors d'absorbància dels blancs es van restar als valors tant de la recta patró i de les mostres. La concentració proteica es va determinar per extrapolació de la regressió lineal de la recta patró de BSA.

### **2.5.3. Electroforesi en gels d'acrilamida (SDS-PAGE)**

La separació de les diferents proteïnes segons el seu pes molecular es va fer mitjançant electroforesi en gels d'acrilamida de dues fases en presència de SDS. La fase superior del gel, el *stacking gel* (3.2 % p/v acrilamida/bisacrilamida, 0.125 M Tris-HCl, 0.1 % p/v SDS, 2.7 % v/v TEMED, 1.3% p/v Persulfat d'amoni) permet que les proteïnes s'apilin i es compactin en una única banda abans d'entrar en la següent fase del gel. La fase inferior del gel, el *resolving gel* (10 o 15 % w/v acrilamida/bisacrilamida, 0.375 M Tris-HCl, 0.1 % p/v SDS, 0.02 % p/v persulfat d'amoni, 0.01 % v/v TEMED) permet la separació de les proteïnes segons el seu pes molecular. Abans de carregar les mostres proteiques (15 µg de proteïna) es barregen amb 0.2 volums de tampó de càrrega Laemli 5x (20 mM tampó fosfat pH 7, 30% v/v glicerol, 4 % w/v SDS, 2 % v/v β-mercaptoetanol, amb blau de bromofenol) i es desnaturalitzen a 95°C durant 3 min. L'electroforesi es va córrer en tampó d'electroforesi (25 mM Tris, 200 mM glicina, 0.1 % w/v SDS) durant 1,5-2 hores, en un primer moment a 50 V (fins que les mostres estaven ben apilades en el *stacking gel*) i després a fixant l'amperatge a uns 35 mA. Per tal de poder identificar les bandes també es va carregar el marcador de pes molecular pre-tenyit de rang ampli (MultiColor Broad Range, *Thermo Fisher Scientific*).

### **2.5.4. Electrotransferència de les proteïnes a la membrana de PVDF**

L'electrotransferència de les proteïnes des del gel d'acrilamida a les membranes de PVDF *Immobilon-P* (*Millipore*) es va realitzar en el tampó de transferència (25 mM Tris, 150 mM glicina, 20% v/v metanol) durant 1.5 h a 200 mA i 4°C. Abans de fer la transferència les membranes de PVDF es van activar amb un rentat de 1 min amb metanol seguit d'un rentat de 5 min amb H<sub>2</sub>O i es van equilibrar en el tampó de transferència durant mínim 15 minuts. Una vegada acabada la transferència, les membranes es netejaven amb tampó TBS (25 mM Tris-HCl, 137 mM NaCl). Si era necessari guardar-les, s'inactivaven amb un rentat d'1 min amb metanol.

### 2.5.5. Immunodetecció

Les membranes es van bloquejar durant 1 hora a temperatura ambient en agitació amb BSA 5% diluït en TBS-T 0,1% (5% p/v de BSA, 25 mM Tris-HCl, 137 mM NaCl, 0.01% Tween 20) o en *blotto* 5% diluït en TBS-T 0,1% (5% p/v de llet en pols desnatada, 25 mM Tris-HCl, 137 mM NaCl, 0.01% Tween 20) en funció del medi en què s'hagués de diluir l'anticòs primari. A continuació, les membranes es van incubar a 4 °C O/N en agitació amb l'anticòs primari diluït en BSA 5% amb TBS-T 0.1% o en *blotto* 5% diluït en TBS-T 0,1%, segons les especificacions del proveïdor. El dia següent, les membranes es van temperar a temperatura ambient durant 30 min i posteriorment es van fer 3 rentats ràpids i 3 rentats de 5 min (en agitació) amb TBS-T 0,01% (25 mM Tris-HCl, 137 mM NaCl, 0.01% Tween 20) per eliminar l'excés d'anticòs primari. Seguidament, les membranes es van incubar durant una 1 hora a temperatura ambient en agitació amb l'anticòs secundari adequat unit a peroxidasa i diluït en el mateix medi que l'anticòs primari. Posteriorment, es van repetir els mateixos rentats realitzats anteriorment a les membranes per tal d'eliminar l'excés d'anticòs secundari i es van deixar les membranes en TBS. A continuació, es va procedir a la immunodetecció mitjançant el producte comercial *Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore)*, segons les especificacions del fabricant. Finalment, es va exposar un film fotosensible a les membranes per a la visualització del senyal. La quantificació de les bandes es va realitzar per densitometria, utilitzant el programari lliure ImageJ (*NIH*).

### 2.6. Determinació del contingut de triglicèrids i colesterol hepàtics

La determinació de triglicèrids i colesterol total del fetge es va realitzar seguint el mètode d'extracció de lípids de teixit hepàtic descrit per Folch (Folch et al., 1957). Es van afegir uns 100 mg de fetge congelat a 15 mL de cloroform:metanol (2:1) i el teixit es va homogeneïtzar mitjançant el politró (*Polytron® MICCRA-KIT D-9 ART Prozess & Labortechnik GmbH & Co. KG*). Seguidament, es va afegir 3 mL d'àcid sulfúric al 0.05% i les mostres es van incubar a 4 °C O/N perquè es produís la separació de la fase aquosa i lipídica. L'endemà, es va recuperar 1 mL de la fase lipídica inferior. El volum es va transferir en un tub de vidre de 5 mL, s'hi va afegir 1 mL de la solució cloroform/Tritó 100X al 1% i les mostres es van incubar a 90 °C en un bany tèrmic. Per tal de netejar les impureses i concentrar la mostra, es va anar afegint cloroform a les parets del tub de vidre i es van tornar a incubar les mostres a 90 °C per garantir la seva evaporació. Aquesta operació es va repetir 3 vegades. Quan el cloroform va estar totalment evaporat, es van ressuspensar els lípids en 500 µL de H<sub>2</sub>O Mili-Q en un bany tèrmic a 37°C i posteriorment es van homogeneïtzar totalment amb l'ajuda d'agitació i una pipeta.

Una vegada ressuspesos, la determinació es va realitzar mitjançant el kit ABX Pentra Cholesterol CP (*Horiba*)

## 2.7. Determinació dels paràmetres sèrics

La sang es va obtenir de la cua dels animals (vena caudal) en els punts intermedis utilitzant els tubs no heparinitzats Microvette® (CB 300 Z, *Sarstedt*), o bé, a partir de la decapitació dels ratolins a punt final de l'experiment utilitzant els tubs no heparinitzats *BD Microcontainer SST™ Tubes* (365968, *BD*). La sang posteriorment es va centrifugar a 10000 g durant 10 min a 4°C. Finalment, la sang es va congelar a -80°C fins a la seva utilització.

Els nivells de glucèmia es van determinar a partir d'una gota de sang provinent de la cua dels ratolins utilitzant el sistema *Glucometer Elite™* (*Bayer*).

### 2.7.1 Determinació d'hormones

Per mesurar els nivells d'insulina es va utilitzar l'assaig immunoenzimàtic *Rat Insulin ELISA kit* (900010, *Crystal Chem*). La determinació es va fer a partir de 5 µL de sèrum i es van seguir les instruccions del fabricant, realitzant dilucions de la mostra quan va ser requerit.

Per mesurar els nivells d'adiponectina es va utilitzar l'assaig immunoenzimàtic *Mouse Adiponectin ELISA kit* (805669, *Crystal Chem*). La determinació es va fer a partir de 5 µL de sèrum i es van seguir les instruccions del fabricant, realitzant dilucions de la mostra quan va ser requerit.

Per mesurar els nivells de leptina es va utilitzar l'assaig immunoenzimàtic *Mouse Leptin ELISA kit* (90030, *Crystal Chem*). La determinació es va fer a partir de 5 µL de sèrum seguint les instruccions del fabricant, realitzant dilucions de la mostra quan va ser requerit.

Per mesurar els nivells de FGF21 es va utilitzar de l'assaig immunoenzimàtic *Mouse/Rat FGF-21 ELISA kit* (MF2100, *R&Dsystems*). La determinació es va fer a partir de 50 µL de sèrum seguint les instruccions del fabricant, realitzar dilucions de la mostra quan va ser requerit.

La determinació del contingut de FGF21 en les diferents regions de l'encèfal es va dur a terme a partir de 50 µL de l'homogenat de proteïnes obtingut pel Western blot (apartat 2.5.1), fent dilucions 1/10 dels extractes.

Per mesurar els nivells de AST i ALT es va utilitzar l'analitzador Pentra 400 (Horiba) i el kit ABX Pentra AST i ABX Pentra ALT i es van seguir les especificacions del fabricant.

## **2.8. Anàlisi histològica**

Els teixits obtinguts a punt final es van mantenir en formol al 4 % durant 24 h per després ser inclosos en blocs de parafina i ser guardats fins al moment del seu ús. El primer pas per fer una immunohistoquímica era fer talls histològics amb el micròtom *Leica RM2135* (Leica Biosystems) i desparafinar-los amb 2 rentats de xilol. A continuació, el teixit es va rehidratar mitjançant un gradient al 100% i al 96% i PBS.

### **2.8.1. Tincions de les seccions tissulars de parafina**

#### 2.8.1.1 Tinció hematoxilina/eosina

Per realitzar la tinció d'hematoxilina/eosina, una vegada desparafinades, les seccions tissulars es van tenyir amb hematoxilina, es van rentar amb H<sub>2</sub>O destil·lada i es van tenyir amb eosina. Posteriorment, es van deshidratar les mostres i es van muntar sobre un portaobjectes per poder-se analitzar en un microscopi. Les imatges es van obtenir amb el microscopi òptic Eclipse 90i (Nikon Instruments).

#### 2.8.1.2 Tinció PicroSirius Red

Per tal d'identificar les fibres de col·lagen de la matriu extracel·lular del teixit i avaluar la fibrosi hepàtica es va realitzar la tinció *PicroSirius Red*. Una vegada desparafinades i rehidratades les seccions tissulars es van tenyir amb *hematoxilina de Weigert* durant 10 min. A continuació, es van tenyir amb *blau alcian* (pH 2.5) durant 30 min. Finalment, es van tenyir amb *PicroSirius Red* (Sigma-Aldrich) durant 1 h i 15 min. Les imatges es van obtenir amb el microscopi òptic Eclipse 90i (Nikon Instruments).

### **2.8.2. Immunohistoquímiques de les seccions tissulars de parafina**

Per realitzar les immunohistoquímiques de les seccions desparafinades es van seguir diferents protocols segons si es volia fer una immunohistoquímica en camp clar o amb fluorescència. En alguns casos concrets (Mac2 i GFP), abans de seguir el protocol es van tractar les seccions amb tampó citrat amb una olla a pressió per tal de recuperar epítops.

Per les immunohistoquímiques de camp clar, en primer lloc es va inhibir la peroxidasa endògena amb Metanol al 30% en PBS i 1% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30% durant 30 min. En aquest moment es van incubar les mostres amb els anticossos primaris específics (Taula 5) O/N a 4°C a la dilució corresponent (Taula 5). L'endemà, es van rentar amb PBS i es van incubar amb el corresponent anticòs secundari biotinitat durant 1 h a temperatura ambient. El revelat es va dur a terme amb el reactiu *ABC Complex* (Vector Laboratories), el qual utilitza 3,3-diaminobenzidina (DAB) com a cromogen. A continuació, les seccions es van tenyir amb l'*hematoxilina de Mayer*. Posteriorment, es van deshidratar les mostres i es van muntar sobre un portaobjectes per poder-se analitzar en un microscopi òptic Eclipse 90i (Nikon Instruments).

Per les immunohistoquímiques de fluorescència les seccions es van incubar amb els anticossos primaris específics (Taula 5) O/N a 4°C a la dilució corresponent (Taula 5). L'endemà, es van rentar les seccions per posteriorment incubar-les amb el corresponent anticòs secundari unit al fluorocrom corresponent durant 1 h a temperatura ambient. Per tal de marcar els nuclis de les cèl·lules, es va utilitzar la tinció de Hoechst/DAPI (Sigma Aldrich) durant 10 min a temperatura. Per acabar, es van muntar les mostres amb un medi aquós per analitzar-les en un microscopi. Les imatges es van obtenir amb el microscopi òptic Eclipse 90i (Nikon Instruments)

### **2.8.3. Determinació de l'àrea mitjana dels adipòcits**

La determinació de l'àrea mitjana dels adipòcits es va fer mitjançant un estudi de morfometria del teixit adipós epididimal. Aquest estudi es va fer a partir de 6 camps de 2 talls per animal a 100X i es va utilitzar l'analitzador d'imatges *NIS Elements Advanced Research 2.20* (Nikon Instruments). El software va permetre determinar l'àrea en  $\mu\text{m}^2$  de cada adipòcit sencer present al camp. Els resultats es van representar com a l'àrea mitjana dels adipòcits per cada grup experimental i la freqüència de la distribució de les àrees dels diferents adipòcits.

### **2.9. Administració intracisterna magna dels vectors AAV1 en ratolins**

Per tal de realitzar l'administració intra-cisterna dels vectors AAV1, en primer lloc, es van anestesiatar els ratolins mitjançant l'administració intraperitoneal de Ketamina (100 mg/kg) i Xilacina (10 mg/kg). Un cop anestesiats, es va rasurar el pèl de la part posterior del cap dels animals (des de les orelles fins a la zona de les escàpules) i es va practicar una incisió d'uns 2-3 mm entre el final del crani i l'inici de la columna vertebral coincidint amb la línia mitja. Els animals es van mantenir en posició decúbit supí amb el cap inclinat cap avall amb un angle de 60° respecte a l'horitzontal, aproximadament. L'administració

es va realitzar mitjançant una agulla de 34 G unida a una xeringa *Hamilton (Hamilton Company)* carregada amb 5 µL del vector viral desitjat a la dosi escollida diluït amb PBS + 0.001% *Plurònic F68*. L'agulla es va col·locar en el mateix angle d'inclinació de l'animal i es va buscar el *foramen magnum* per tal d'accedir a la cisterna magna. Un cop finalitzada l'administració es va retirar l'agulla i es va tancar la incisió de la pell mitjançant adhesiu tissular *Histoacryl® (B.Braun)*. Independentment del pes corporal, tots els ratolins van ser administrats amb la mateixa quantitat total de genomes virals.

## 2.10. Determinació de la ingesta

Per determinar la ingesta de calories per part dels animals es va calcular la diferència en grams entre el menjar afegit a la gàbia i el restant al cap de 7 dies i es va dividir pel nombre d'animals que hi havia a la gàbia i pel nombre de dies. Per tant, era necessari que tots els animals d'una mateixa gàbia fossin del mateix grup experimental. Per representar el resultat en kcal ingerides per dia i per animal es va multiplicar el valor en grams per l'aportació calòrica de cada dieta, 3,348 Kcal/g pel que fa a la dieta estàndard i 4,5 Kcal/g pel que fa a la dieta alta en lípids. Per obtenir el valor final es va calcular la mitjana de cada gàbia al llarg del temps i aquest valor va servir per calcular la mitjana de cada grup expressada en Kcal/dia/animal.

## 2.11. Test de tolerància a la insulina

El test de tolerància a la insulina es va realitzar per tal de determinar si els ratolins eren capaços de respondre correctament a una sobrecàrrega d'insulina, determinant així la sensibilitat i/o la resistència a aquesta hormona. Per dur a terme el test es va retirar el menjar als animals i immediatament es va mesurar la glucèmia basal dels animals a partir d'una gota de sang obtinguda de la vena de la cua mitjançant el sistema *Glucometer Elite®*. A continuació es va injectar una dosi intraperitoneal de 0,75 UI d'insulina /Kg de pes (*Humulin Regular; Eli Lilly*) per determinar la resistència en animals obesos o una dosi de 0,375 UI d'insulina/Kg de pes per determinar la sensibilitat a l'hormona en animals amb una dieta chow. A partir d'aquest moment, es van realitzar determinacions de la glucèmia cada 15 min durant 1 hora i 30 minuts. Els resultats es van representar com el % de canvi de cada un dels punts analitzats respecte als nivells de glucosa basal previs a l'administració de la insulina.

## 2.12. Test de tolerància a la glucosa

Per determinar la resposta que tenien els ratolins envers a una sobrecàrrega de glucosa es va realitzar un test de tolerància a la glucosa. Els animals van ser dejunats



durant 16 h i no van tenir accés ni a menjar ni a aigua durant el test. Abans d'administrar la glucosa es va mesurar la glucèmia basal en dejuni a partir d'una gota de sang de la vena de la cua mitjançant el sistema *Glucometer Elite®*. A continuació, es va injectar una dosi intraperitoneal d'1 o 2 g de glucosa per kg de ratolí. A partir d'aquest moment, es van dur a terme determinacions de la glucèmia als minuts 15, 30, 60, 90 i 120. Els resultats es van expressar com a glucèmia en mg/dL en els diferents punts del test.

### **2.13. Calorimetria indirecta**

Per determinar el gast energètic dels ratolins es va utilitzar el sistema de calorimetria indirecta (*Phenomaster*, TSE Systems, Thuringia, Alemanya i *Oxilet*, Panlab, Cornellà, Espanya) que permet monitorar el consum d'oxigen (O<sub>2</sub>) i la producció de diòxid de carboni (CO<sub>2</sub>), en mL/h/kg<sup>0.75</sup>, simultàniament en vuit gàbies metabòliques durant 24 hores. Les determinacions de cada gàbia es feien durant 3 minuts a intervals de 15 min a cada gàbia. Per calcular la despesa energètica es va utilitzar el software *Metabolim* (*Oxilet*) i *TSE Phenomaster* (*Phenomaster*)

### **2.14. Proves de comportament**

#### **2.14.1. Open field**

L'*Open field* realitzat en ratolins permet analitzar l'activitat locomotora i els nivells d'ansietat. El test sempre es va realitzar entre les 9:00 i les 13:00 hores. Els ratolins es van situar a la part superior dreta, mirant cap a la paret, d'una arena quadrada amb parets transparents i terra blanc de 41x41x30 cm. La duració de la prova va ser de 10 min/animal i al capdamunt de l'arena s'hi va col·locar una càmera digital (*uEye SE*, *IDS Imaging Development Systems*) que enregistrava el moviment dels ratolins.. Entre animal i animal l'arena es va netejar amb aigua i etanol 70% per tal d'eliminar les possibles pistes olfactivores. Per analitzar els paràmetres d'ansietat, l'arena es va dividir digitalment en tres zones: el centre, la perifèria (que correspon a tot l'espai excepte el centre) i el marge (que correspon a l'àrea més adjacent a les parets). Els diferents paràmetres del test es van analitzar mitjançant el software *SMART v3* (*Panlab*). Els diferents paràmetres analitzats estan expressats com el sumatori dels 10 min.

#### **2.14.2. Novel object recognition test**

El *novel object recognition test* permet analitzar la capacitat de memòria de reconeixement a curt i a llarg termini dels ratolins mitjançant l'anàlisi del temps d'exploració de dos objectes, un nou i un altre familiar. El test sempre es va realitzar

entre les 9:00 i les 13:00 hores. En primer lloc, els animals s'havien d'aclimatar al lloc on es realitzaria la prova, per aquest motiu el dia anterior al test, els animals es van deixar durant 10 min a l'arena de l'*open field*. Al capdamunt de l'arena s'hi va col·locar una càmera digital (uEye SE, *IDS Imaging Development Systems*). El dia de la prova es va començar fent una fase de familiarització col·locant dos objectes idèntics (A-A) a la part superior dreta i a la part superior esquerra de l'arena. El ratolí es va situar al mig de l'arena en direcció contrària als objectes i la duració del test va ser de 10 min. En acabar el test, l'animal es tornava a la seva gàbia i se'l deixava reposar durant aproximadament 15 min. Passat aquest temps, es realitzava el test de memòria a curt termini on es substituïa un dels objectes utilitzats en el test de familiarització per un de nou (A-B) i es deixava que l'animal els explorés durant 10 min. L'endemà, passades 24 hores, es realitzava el test de memòria a llarg termini on es substituïa el mateix objecte substituït el dia anterior per un de nou (A-C) i es deixava que l'animal els explorés durant 10 minuts. Entre animal i animal els objectes i l'arena es netejaven amb aigua i etanol 70% per tal d'eliminar les possibles pistes olfactivores. Els objectes utilitzats van ser una piràmide vermella, un tub blau i un pot transparent amb tapa groga. El temps que l'animal explorava cadascun dels objectes es va analitzar manualment mitjançant el software *SMART v3 (Panlab)*. Es va considerar exploració quan l'animal presentava un comportament clar d'investigació de l'objecte de manera que el morro es situava a menys de 2 cm d'aquest. Els resultats es van expressar mitjançant el *Discrimination Index* que es calcula mitjançant la fórmula següent:

$$\text{Discrimination Index} = \frac{(T_{\text{new}} - T_{\text{old}})}{T_{\text{total}}} \times 100$$

$T_{\text{new}}$ : Temps explorant el objecte nou  
 $T_{\text{old}}$ : Temps explorant el objecte familiar  
 $T_{\text{total}}$ : Temps total explorant

#### 2.14.5. Barnes Maze

El *Barnes Maze* (BM) és una prova d'anàlisi cognitiu que permet analitzar la capacitat d'aprenentatge i de memòria espacial dels ratolins. L'estructura del BM (*Panlab*) consta d'una circumferència de 92 cm de diàmetre de color gris que descansa sobre un trípode que eleva l'estructura uns 120 cm. A la perifèria d'aquesta circumferència hi ha distribuïts 20 forats de 5 cm de diàmetre, tots ells tapats per la part de sota per una plataforma negra, excepte un, que està connectat a una *Escape box* de 17,5x7,5x8 cm de color negre i que en el seu interior conté papers absorbents. Per dipositar l'animal a l'interior de l'arena, també es disposava d'un cilindre de color gris de 8x12,5 cm. El BM se separava dels investigadors mitjançant una cortina blanca. Per tal que els ratolins es poguessin orientar al voltant del BM, a una altura que els fos visible,

es van penjar cartolines amb formes simples de diferents colors (quadrat, triangle, creu i rodona) en els 4 punts cardinals i cartolines amb formes més abstractes (llapis, ordinador, arbre, etc.) entremig de les primeres. A la part superior del BM s'hi va col·locar una càmera (uEye SE, *IDS Imaging Development Systems*), unes llums (per il·luminar amb mínim de 1000 lúmens la superfície del BM) i uns altaveus (per reproduir el so d'un metrònom a 80 bpm). El test estava dividit en tres fases: habituació, aprenentatge i test. En primer lloc, es va realitzar la fase d'habitució amb les llums apagades i sense soroll. L'animal es col·locava a l'interior de la *Escape box* durant 1 minut, passat aquest temps l'animal es col·locava al centre del BM i es deixava que explorés l'arena durant 2 minuts. Al finalitzar, l'animal es retornava a la seva gàbia. En aquesta fase, l'exploració de l'animal era lliure i en cap cas s'hi intervenia. En segon lloc, es va dur a terme la fase d'aprenentatge. L'animal es col·locava al centre del BM i es tapava amb el cilindre gris durant 15 segons. Per evitar estressar l'animal, durant aquest temps el soroll estava apagat i el cilindre es tapava amb una cartolina. A continuació, s'obrien els llums, s'activava l'estímul sonor i s'alliberava el ratolí del cilindre de manera que podia explorar el BM durant 2 min. Si passat aquest temps l'animal no havia trobat i entrat a la *Escape box*, se l'hi guiava suaument. Quan l'animal entrava dins de la *Escape box* immediatament es parava el soroll i es deixava que estigués allà durant 1 min abans de retornar-lo a la seva gàbia. S'apuntava el temps que trigava el ratolí tant a trobar com a entrar a la *Escape box* i també el patró de recerca que va utilitzar (directe, seqüencial o aleatori). Finalment, en la fase de test, les condicions eren les mateixes que durant la fase d'aprenentatge però la *Escape box* era substituïda per una plataforma negra que tapava el forat i el test durava 3 minuts. Mitjançant el software *SMART v3 (Panlab)*, en aquesta fase, s'analitzava el temps que l'animal passava a prop del forat on anteriorment hi havia hagut la *Escape box*. La prova de comportament es va realitzar durant cinc dies consecutius. El primer dia es va realitzar un *trial* d'habitució i un *trial* d'aprenentatge, els següents tres dies es van realitzar 2 *trials* d'aprenentatge per dia i per acabar, l'últim dia es va realitzar un *trial* de test. Entre animal i animal, l'arena, el cilindre, i la *Escape box* es netejaven amb aigua i etanol 70 % i també es canviaven els papers absorbents de l'interior de la *Escape box* per tal d'eliminar les possibles pistes olfactòries.

## 2.15. Anàlisi estadística

Les anàlisis estadístiques de les dades obtingudes es van realitzar amb el programa *Prism 8 (GraphPad)*. Els resultats es van expressar com la mitja  $\pm$  SEM. Les comparacions estadístiques es van dur a terme mitjançant l'anàlisi de variància d'un factor (ANOVA) seguides del post-test de Dunnett (en el cas de que es comparessin tots

els grups experimentals amb el grup control) o del post-test de Tukey (en el cas de que es comparessin tots els grups experimentals entre ells). Es va considerar significança estadística quan les diferències eren  $p < 0.05$  (interval de confiança del 95 %).



## **VIII. BIBLIOGRAFIA**



- Abdul-Ghani, M.A., and Defronzo, R.A. (2010). Pathogenesis of insulin resistance in skeletal muscle. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2010.
- Abner, E.L., Nelson, P.T., Kryscio, R.J., Schmitt, F.A., Fardo, D.W., Woltjer, R.L., Cairns, N.J., Yu, L., Dodge, H.H., Xiong, C., et al. (2016). Diabetes is associated with cerebrovascular but not Alzheimer's disease neuropathology. *Alzheimer's & Dementia* 12, 882–889.
- Abu-Odeh, M., Zhang, Y., Reilly, S.M., Ebadat, N., Keinan, O., Valentine, J.M., Hafezi-Bakhtiari, M., Ashayer, H., Mamoun, L., Zhou, X., et al. (2021). FGF21 promotes thermogenic gene expression as an autocrine factor in adipocytes. *Cell Reports* 35, 109331.
- Adab, P., Pallan, M., and Whincup, P.H. (2018). Is BMI the best measure of obesity? *BMJ* 360.
- Adams, A.C., Coskun, T., Rovira, A.R., Schneider, M.A., Raches, D.W., Micanovic, R., Bina, H.A., Dunbar, J.D., and Kharitonov, A. (2012). Fundamentals of FGF19 & FGF21 Action In Vitro and In Vivo. *PLOS ONE* 7, e38438.
- 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. *Molecular Metabolism* 2, 31.
- 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.
- Albright, B.H., Storey, C.M., Murlidharan, G., Castellanos Rivera, R.M., Berry, G.E., Madigan, V.J., and Asokan, A. (2018). Mapping the Structural Determinants Required for AAVrh.10 Transport across the Blood-Brain Barrier. *Molecular Therapy* 26, 510–523.
- 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 (2021a). 2. Classification and diagnosis of diabetes: Standards of medical care in diabetes-2021. *Diabetes Care* 44, S15–S33.
- American Diabetes Association (2021b). 9. Pharmacologic Approaches to Glycemic Treatment: Standards of Medical Care in Diabetes—2021. *Diabetes Care* 44, S111–S124.
- American Diabetes Association (2021c). 5. Facilitating Behavior Change and Well-being to Improve Health Outcomes: Standards of Medical Care in Diabetes—2021. *Diabetes Care* 44, S53–S72.
- American Diabetes Association (2021d). 8. Obesity Management for the Treatment of Type 2 Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes—2021. *Diabetes Care* 44, S100–S110.
- Amiri, M., Braidy, N., and Aminzadeh, M. (2018). Protective Effects of Fibroblast Growth Factor 21 Against Amyloid-Beta1–42-Induced Toxicity in SH-SY5Y Cells. *Neurotoxicity Research* 34, 574–583.
- Andersen, B., Straarup, E.M., Heppner, K.M., Takahashi, D.L., Raffaele, V., Dissen, G.A., Lewandowski, K., Bödvarsdóttir, T.B., Raun, K., Grove, K.L., et al. (2018). FGF21



decreases body weight without reducing food intake or bone mineral density in high-fat fed obese rhesus macaque monkeys. *International Journal of Obesity* 2018 42:6 42, 1151–1160.

Arafat, A.M., Kaczmarek, P., Skrzypski, M., Pruszyńska-Oszmalek, E., Kołodziejcki, P., Szczepankiewicz, D., Sassek, M., Wojciechowicz, T., Wiedenmann, B., Pfeiffer, A.F.H., et al. (2013). Glucagon increases circulating fibroblast growth factor 21 independently of endogenous insulin levels: A novel mechanism of glucagon-stimulated lipolysis? *Diabetologia* 56, 588–597.

Arnold, S.E., Lucki, I., Brookshire, B.R., Carlson, G.C., Browne, C.A., Kazi, H., Bang, S., Choi, B.R., Chen, Y., McMullen, M.F., et al. (2014). High fat diet produces brain insulin resistance, synaptodendritic abnormalities and altered behavior in mice. *Neurobiology of Disease* 67, 79–87.

Aschauer, D.F., Kreuz, S., and Rumpel, S. (2013). Analysis of Transduction Efficiency, Tropism and Axonal Transport of AAV Serotypes 1, 2, 5, 6, 8 and 9 in the Mouse Brain. *PLoS ONE* 8.

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. (2009). High AAV vector purity results in serotype- and tissue-independent enhancement of transduction efficiency. *Gene Therapy* 2010 17:4 17, 503–510.

Ayuso, E., Mingozi, F., and Bosch, F. (2010). Production, Purification and Characterization of Adeno-Associated Vectors. *Current Gene Therapy* 10, 423–436.

Badman, M.K., Pissios, P., Kennedy, A.R., Koukos, G., Flier, J.S., and Maratos-Flier, E. (2007). Hepatic Fibroblast Growth Factor 21 Is Regulated by PPAR $\alpha$  and Is a Key Mediator of Hepatic Lipid Metabolism in Ketotic States. *Cell Metabolism* 5, 426–437.

Baker, L.D., Frank, L.L., Foster-Schubert, K., Green, P.S., Wilkinson, C.W., McTiernan, A., Cholerton, B.A., Plymate, S.R., Fishel, M.A., Watson, G.S., et al. (2010). Aerobic Exercise Improves Cognition for Older Adults with Glucose Intolerance, A Risk Factor for Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis* 22, 569.

Balakrishnan, B., and Jayandharan, G. (2014). Basic Biology of Adeno-Associated Virus (AAV) Vectors Used in Gene Therapy. *Current Gene Therapy* 14, 86–100.

Banks, W.A., Owen, J.B., and Erickson, M.A. (2012). Insulin in the brain: There and back again. *Pharmacology & Therapeutics* 136, 82–93.

Benedict, C., Hallschmid, M., Hatke, A., Schultes, B., Fehm, H.L., Born, J., and Kern, W. (2004). Intranasal insulin improves memory in humans. *Psychoneuroendocrinology* 29, 1326–1334.

Benedict, C., Hallschmid, M., Schmitz, K., Schultes, B., Ratter, F., Fehm, H.L., Born, J., and Kern, W. (2006). Intranasal Insulin Improves Memory in Humans: Superiority of Insulin Aspart. *Neuropsychopharmacology* 2007 32:1 32, 239–243.

Bentham, J., di Cesare, M., Bilano, V., Bixby, H., Zhou, B., Stevens, G.A., Riley, L.M., Taddei, C., Hajifathalian, K., Lu, Y., et al. (2017). Worldwide trends in body-mass index, underweight, overweight, and obesity from 1975 to 2016: a pooled analysis of 2416 population-based measurement studies in 128.9 million children, adolescents, and adults. *The Lancet* 390, 2627–2642.

- van den Berg, E., Reijmer, Y.D., de Bresser, J., Kessels, R.P.C., Kappelle, L.J., and Biessels, G.J. (2010). A 4 year follow-up study of cognitive functioning in patients with type 2 diabetes mellitus. *Diabetologia* 53, 58.
- 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. *International Journal of Molecular Sciences* 2016, Vol. 17, Page 774 17, 774.
- Betz, M.J., and Enerbäck, S. (2017). Targeting thermogenesis in brown fat and muscle to treat obesity and metabolic disease. *Nature Reviews Endocrinology* 2017 14:2 14, 77–87.
- Beydoun, M.A., Beydoun, H.A., and Wang, Y. (2008). Obesity and central obesity as risk factors for incident dementia and its sub-types: A systematic review and meta-analysis. *Obes Rev* 9, 204.
- Biessels, G.J., and Reijmer, Y.D. (2014). Brain Changes Underlying Cognitive Dysfunction in Diabetes: What Can We Learn From MRI? *Diabetes* 63, 2244–2252.
- Biessels, G.J., Strachan, M.W.J., Visseren, F.L.J., Kappelle, L.J., and Whitmer, R.A. (2014). Dementia and cognitive decline in type 2 diabetes and prediabetic stages: towards targeted interventions. *The Lancet Diabetes & Endocrinology* 2, 246–255.
- Bimboim, H.C., and Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research* 7, 1513–1523.
- Birkenfeld, A.L., and Shulman, G.I. (2014). Nonalcoholic fatty liver disease, hepatic insulin resistance, and type 2 Diabetes. *Hepatology* 59, 713–723.
- Black, B.L., Croom, J., Eisen, E.J., Petro, A.E., Edwards, C.L., and Surwit, R.S. (1998). Differential effects of fat and sucrose on body composition in AJ and C57BL/6 mice. *Metabolism* 47, 1354–1359.
- Blüher, M. (2019). Obesity: global epidemiology and pathogenesis. *Nature Reviews Endocrinology* 2019 15:5 15, 288–298.
- Bondurant, L.D., Ameka, M., Naber, M.C., Walsh, S.A., Ornitz, D.M., and Potthoff, M.J. (2017). FGF21 Regulates Metabolism Through Adipose-Dependent and -Independent Mechanisms. *Cell Metabolism* 25, 935–944.
- Bookout, A.L., de Groot, M.H.M., Owen, B.M., Lee, S., Gautron, L., Lawrence, H.L., Ding, X., Elmquist, J.K., Takahashi, J.S., Mangelsdorf, D.J., et al. (2013). FGF21 regulates metabolism and circadian behavior by acting on the nervous system. *Nature Medicine* 19, 1147–1152.
- Boutin, S., Monteilhet, V., Veron, P., Leborgne, C., Benveniste, O., Montus, M.F., and Masurier, C. (2010). Prevalence of serum IgG and neutralizing factors against adeno-associated virus (AAV) types 1, 2, 5, 6, 8, and 9 in the healthy population: Implications for gene therapy using AAV vectors. *Human Gene Therapy* 21, 704–712.
- de Bresser, J., Tiehuis, A.M., van den Berg, E., Reijmer, Y.D., Jongen, C., Kappelle, L.J., Mali, W.P., Viergever, M.A., and Biessels, G.J. (2010). Progression of Cerebral Atrophy

and White Matter Hyperintensities in Patients With Type 2 Diabetes. *Diabetes Care* 33, 1309.

van den Brink, A.C., Brouwer-Brolsma, E.M., Berendsen, A.A.M., and van de Rest, O. (2019). The Mediterranean, Dietary Approaches to Stop Hypertension (DASH), and Mediterranean-DASH Intervention for Neurodegenerative Delay (MIND) Diets Are Associated with Less Cognitive Decline and a Lower Risk of Alzheimer's Disease—A Review. *Advances in Nutrition* 10, 1040–1065.

Büning, H., Ried, M.U., Perabo, L., Gerner, F.M., Huttner, N.A., Enssle, J., and Hallek, M. (2003). Receptor targeting of adeno-associated virus vectors. *Gene Therapy* 2003 10:14 10, 1142–1151.

Büning, H., Perabo, L., Coutelle, O., Quadt-Humme, S., and Hallek, M. (2008). Recent developments in adeno-associated virus vector technology. *J Gene Med* 10, 717–733.

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.

Camacho, R.C., Zafian, P.T., Achanfuo-Yeboah, J., Manibusan, A., and Berger, J.P. (2013). Pegylated Fgf21 rapidly normalizes insulin-stimulated glucose utilization in diet-induced insulin resistant mice. *European Journal of Pharmacology* 715, 41–45.

Candeias, E.M., Sebastião, I.C., Cardoso, S.M., Correia, S.C., Carvalho, C.I., Pimenta, A.I., Santos, M.S., Oliveira, C.R., Moreira, P.I., and Duarte, A.I. (2015). Gut-brain connection: The neuroprotective effects of the anti-diabetic drug liraglutide. *World J Diabetes* 6, 807–827.

Cannon, B., de Jong, J.M.A., Fischer, A.W., Nedergaard, J., and Petrovic, N. (2020). Human brown adipose tissue: Classical brown rather than brite/beige? *Experimental Physiology* 105, 1191–1200.

Carter, B.J. (2004). Adeno-associated virus and the development of adeno-associated virus vectors: a historical perspective. *Molecular Therapy* 10, 981–989.

Caspar, H., Jabbour, S., Hammar, N., Fenici, P., Sheehan, J.J., and Kosiborod, M. (2018). Recent trends in the prevalence of type 2 diabetes and the association with abdominal obesity lead to growing health disparities in the USA: An analysis of the NHANES surveys from 1999 to 2014. *Diabetes, Obesity and Metabolism* 20, 667–671.

Castle, M.J., Turunen, H.T., Vandenberghe, L.H., and Wolfe, J.H. (2016). Controlling AAV tropism in the nervous system with natural and engineered capsids. In *Methods in Molecular Biology*, (Humana Press Inc.), pp. 133–149.

Centers for Disease Control and Prevention (2021). Obesity, Race/Ethnicity, and COVID-19 | Overweight & Obesity | CDC.

Cerf, M.E. (2013). Beta cell dysfunction and insulin resistance. *Frontiers in Endocrinology* 4, 37.

Cerf, M.E. (2015). High fat programming of beta cell compensation, exhaustion, death and dysfunction. *Pediatric 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. (2016). Fibroblast growth

- factor-21 restores insulin sensitivity but induces aberrant bone microstructure in obese insulin-resistant rats. *Journal of Bone and Mineral Metabolism* 2016 35:2 35, 142–149.
- Chen, J., Hu, J., Liu, H., Xiong, Y., Zou, Y., Huang, W., Shao, M., Wu, J., Yu, L., Wang, X., et al. (2018). FGF21 protects the blood-brain barrier by upregulating PPAR $\gamma$  via FGFR1/ $\beta$ -klotho after traumatic brain injury. *Journal of Neurotrauma* 35, 2091–2103.
- Chen, S., Chen, S.T., Sun, Y., Xu, Z., Wang, Y., Yao, S.Y., Yao, W.B., and Gao, X.D. (2019). Fibroblast growth factor 21 ameliorates neurodegeneration in rat and cellular models of Alzheimer's disease. *Redox Biology* 22.
- Chen, W., Hu, Y., and Ju, D. (2020). Gene therapy for neurodegenerative disorders: advances, insights and prospects. *Acta Pharmaceutica Sinica B* 10, 1347–1359.
- Cheng, D. (2005). Prevalence, predisposition and prevention of type II diabetes. *Nutrition and Metabolism* 2, 1–12.
- Chira, S., Jackson, C.S., Oprea, I., Ozturk, F., Pepper, M.S., Diaconu, I., Braicu, C., Raduly, L.-Z., Calin, G.A., Berindan-Neagoe, I., et al. (2015). Progresses towards safe and efficient gene therapy vectors. *Oncotarget* 6, 30675–30703.
- 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. *Frontiers in Endocrinology* 7, 30.
- Christoffersen, B., Straarup, E.M., Lykkegaard, K., Fels, J.J., Sass-Ørum, K., Zhang, X., Raun, K., and Andersen, B. (2019). FGF21 decreases food intake and body weight in obese Göttingen minipigs. *Diabetes, Obesity and Metabolism* 21, 592–600.
- Claxton, A., Baker, L.D., Wilkinson, C.W., Trittschuh, E.H., Chapman, D., Watson, G.S., Cholerton, B., Plymate, S.R., Arbuckle, M., and Craft, S. (2013). Sex and ApoE Genotype Differences in Treatment Response to Two Doses of Intranasal Insulin in Adults with Mild Cognitive Impairment or Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis* 35, 789.
- Claxton, A., Baker, L.D., Hanson, A., Trittschuh, E.H., Cholerton, B., Morgan, A., Callaghan, M., Arbuckle, M., Behl, C., and Craft, S. (2015). Long-Acting Intranasal Insulin Detemir Improves Cognition for Adults with Mild Cognitive Impairment or Early-Stage Alzheimer's Disease Dementia. *Journal of Alzheimer's Disease* 44, 897–906.
- Clegg, D.J., Gotoh, K., Kemp, C., Wortman, M.D., Benoit, S.C., Brown, L.M., D'Alessio, D., Tso, P., Seeley, R.J., and Woods, S.C. (2011). Consumption of a high-fat diet induces central insulin resistance independent of adiposity. *Physiology & Behavior* 103, 10–16.
- Cornelis, M.C., Zaitlen, N., Hu, F.B., Kraft, P., and Price, A.L. (2015). Genetic and environmental components of family history in type 2 diabetes. *Human Genetics* 134, 259–267.
- 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.
- Craft, S., Raman, R., Chow, T.W., Rafii, M.S., Sun, C.K., Rissman, R.A., Donohue, M.C., Brewer, J.B., Jenkins, C., Harless, K., et al. (2020). Safety, Efficacy, and Feasibility of Intranasal Insulin for the Treatment of Mild Cognitive Impairment and Alzheimer Disease Dementia: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Neurology* 77, 1099–1109.

- Cuadrado, A., Orive, A., García-Suárez, C., Domínguez, A., Fernández-Escatante, J.C., Crespo, J., and Pons-Romero, F. (2005). Non-alcoholic Steatohepatitis (NASH) and Hepatocellular Carcinoma. *Obesity Surgery* 2005 15:3 15, 442–446.
- Desai, B.N., Singhal, G., Watanabe, M., Stevanovic, D., Lundasen, T., Fisher, ffolliott M., Mather, M.L., Vardeh, H.G., Douris, N., Adams, A.C., et al. (2017). Fibroblast growth factor 21 (FGF21) is robustly induced by ethanol and has a protective role in ethanol associated liver injury. *Molecular Metabolism* 6, 1395–1406.
- Deverman, B.E., Ravina, B.M., Bankiewicz, K.S., Paul, S.M., and Sah, D.W.Y. (2018). Gene therapy for neurological disorders: progress and prospects. *Nature Reviews Drug Discovery* 2018 17:9 17, 641–659.
- Diabetes Prevention Program Research Group (2002). Reduction in the Incidence of Type 2 Diabetes with Lifestyle Intervention or Metformin. *The New England Journal of Medicine* 346, 393–403.
- 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.
- Douris, N., Stevanovic, D.M., Fisher, F.M., Cisu, T.I., Chee, M.J., Nguyen, N.L., Zarebidaki, E., Adams, A.C., Kharitononkov, 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.
- Duarte, A.I., Candeias, E., Correia, S.C., Santos, R.X., Carvalho, C., Cardoso, S., Plácido, A., Santos, M.S., Oliveira, C.R., and Moreira, P.I. (2013). Crosstalk between diabetes and brain: Glucagon-like peptide-1 mimetics as a promising therapy against neurodegeneration. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1832, 527–541.
- Dushay, J., Chui, P.C., Gopalakrishnan, G.S., Varela-Rey, M., Crawley, M., Fisher, F.M., Badman, M.K., Martinez-Chantar, M.L., and Maratos-Flier, E. (2010). Increased Fibroblast Growth Factor 21 in Obesity and Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology* 139, 456–463.
- 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 $\gamma$  Activity and the Antidiabetic Actions of Thiazolidinediones. *Cell* 148, 556–567.
- Dye, L., Boyle, N.B., Champ, C., and Lawton, C. (2017). The relationship between obesity and cognitive health and decline. *Proceedings of the Nutrition Society* 76, 443–454.
- Dyson, P.A. (2010). The therapeutics of lifestyle management on obesity. *Diabetes, Obesity and Metabolism* 12, 941–946.
- Eberling, J.L., Jagust, W.J., Christine, C.W., Starr, P., Larson, P., Bankiewicz, K.S., and Aminoff, M.J. (2008). Results from a phase I safety trial of hAADC gene therapy for Parkinson disease. *Neurology* 70, 1980–1983.
- Egawa, M., Yoshimatsu, H., and Bray, G.A. (1990). Preoptic area injection of corticotropin-releasing hormone stimulates sympathetic activity. *Am J Physiol* 259, 82–86.

- Eijkelenboom, A., and Burgering, B.M.T. (2013). FOXOs: signalling integrators for homeostasis maintenance. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2013 14:2 14, 83–97.
- Ekerot, M., Stavridis, M.P., Delavaine, L., Mitchell, M.P., Staples, C., Owens, D.M., Keenan, I.D., Dickinson, R.J., Storey, K.G., and Keyse, S.M. (2008). Negative-feedback regulation of FGF signalling by DUSP6/MKP-3 is driven by ERK1/2 and mediated by Ets factor binding to a conserved site within the DUSP6/MKP-3 gene promoter. *Biochemical Journal* 412, 287–298.
- Eknoyan, G. (2007). Adolphe Quetelet (1796–1874)—the average man and indices of obesity. *Nephrology Dialysis Transplantation* 23, 47–51.
- Emanuelli, B., Vienberg, S.G., Smyth, G., Cheng, C., Stanford, K.I., Arumugam, M., Michael, M.D., Adams, A.C., Kharitononkov, A., and Kahn, C.R. (2014). Interplay between FGF21 and insulin action in the liver regulates metabolism. *The Journal of Clinical Investigation* 124, 515.
- Espeland, M.A., Bryan, R.N., Goveas, J.S., Robinson, J.G., Siddiqui, M.S., Liu, S., Hogan, P.E., Casanova, R., Coker, L.H., Yaffe, K., et al. (2013). Influence of Type 2 Diabetes on Brain Volumes and Changes in Brain Volumes. *Diabetes Care* 36, 90–97.
- Falvey, C.M., Rosano, C., Simonsick, E.M., Harris, T., Strotmeyer, E.S., Satterfield, S., and Yaffe, K. (2013). Macro- and Microstructural Magnetic Resonance Imaging Indices Associated With Diabetes Among Community-Dwelling Older Adults. *Diabetes Care* 36, 677–682.
- Fang, X., Ma, J., Mu, D., Li, B., Lian, B., and Sun, C. (2020). FGF21 Protects Dopaminergic Neurons in Parkinson's Disease Models Via Repression of Neuroinflammation. *Neurotoxicity Research* 37, 616–627.
- Farrell, G., Schattenberg, J.M., Leclercq, I., Yeh, M.M., Goldin, R., Teoh, N., and Schuppan, D. (2019). Mouse Models of Nonalcoholic Steatohepatitis: Toward Optimization of Their Relevance to Human Nonalcoholic Steatohepatitis. *Hepatology* 69, 2241–2257.
- Fisher, F.M., and Maratos-Flier, E. (2016). Understanding the Physiology of FGF21. *Annual Review of Physiology* 78, 223–241.
- Fisher, F.M., Chui, P.C., Nasser, I.A., Popov, Y., Cunniff, J.C., Lundasen, T., Kharitononkov, A., Schuppan, D., Flier, J.S., and Maratos-Flier, E. (2014). Fibroblast Growth Factor 21 Limits Lipotoxicity by Promoting Hepatic Fatty Acid Activation in Mice on Methionine and Choline-Deficient Diets. *Gastroenterology* 147, 1073-1083.e6.
- Fisher, M., Kleiner, S., Douris, N., Fox, E.C., Mepani, R.J., Verdeguer, F., Wu, J., Kharitononkov, A., Flier, J.S., Maratos-flier, E., et al. (2012). Adaptive thermogenesis FGF21 regulates PGC-1 $\alpha$  and browning of white adipose tissues in adaptive thermogenesis. *Genes and Development* 26, 271–281.
- Flippo, K.H., and Potthoff, M.J. (2021). Metabolic Messengers: FGF21. *Nature Metabolism* 2021 3:3 3, 309–317.
- Flippo, K.H., Trammell, S.A.J., Gillum, M.P., Aklan, I., Perez, M.B., Yavuz, Y., Smith, N.K., Jensen-Cody, S.O., Zhou, B., Clafflin, K.E., et al. (2022). FGF21 suppresses alcohol consumption through an amygdalo-striatal circuit. *Cell Metabolism* 34, 317-328.e6.

- Folch, J., Lees, M., and Sloane, G.H. (1957). A simple Method for the Isolation and Purification of Total Lipides from Animal Tissues. *JBC*.
- 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  $\beta$ Klotho/FGFR1c receptor complex. *Science Translational Medicine* 4.
- Forrester, J. v., McMenamin, P.G., and Dando, S.J. (2018). CNS infection and immune privilege. *Nature Reviews Neuroscience* 2018 19:11 19, 655–671.
- Furdui, C.M., Lew, E.D., Schlessinger, J., and Anderson, K.S. (2006). Autophosphorylation of FGFR1 kinase is mediated by a sequential and precisely ordered reaction. *Molecular Cell* 21, 711–717.
- 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 Metabolism* 18, 333–340.
- Gälman, C., Lundåsen, T., Kharitonov, A., Bina, H.A., Eriksson, M., Hafström, I., Dahlin, M., Åmark, P., Angelin, B., and Rudling, M. (2008). The Circulating Metabolic Regulator FGF21 Is Induced by Prolonged Fasting and PPAR $\alpha$  Activation in Man. *Cell Metabolism* 8, 169–174.
- Gaspar, J.M., Baptista, F.I., MacEdo, M.P., and Ambrósio, A.F. (2015). Inside the Diabetic Brain: Role of Different Players Involved in Cognitive Decline. *ACS Chemical Neuroscience* 7, 131–142.
- Gaulton, K.J., Ferreira, T., Lee, Y., Raimondo, A., Mägi, R., Reschen, M.E., Mahajan, A., Locke, A., Rayner, N.W., Robertson, N., et al. (2015). Genetic fine mapping and genomic annotation defines causal mechanisms at type 2 diabetes susceptibility loci. *Nature Genetics* 47, 1415–1425.
- Gauthier, S., Rosa-Neto, P., Morais, J.A., and Webster, C. (2021). World Alzheimer Report 2021: Journey through the diagnosis of dementia.
- Ge, X., Chen, C., Hui, X., Wang, Y., Lam, K.S.L., and Xu, A. (2011). Fibroblast growth factor 21 induces glucose transporter-1 expression through activation of the serum response factor/Ets-like protein-1 in adipocytes. *Journal of Biological Chemistry* 286, 34533–34541.
- Geng, L., Lam, K.S.L., and Xu, A. (2020). The therapeutic potential of FGF21 in metabolic diseases: from bench to clinic. *Nature Reviews Endocrinology* 2020 16:11 16, 654–667.
- 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. *Molecular and Cellular Biology* 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. *The Lancet* 376, 595–605.

Gregg, E.W., Sattar, N., and Ali, M.K. (2016). The changing face of diabetes complications. *The Lancet Diabetes and Endocrinology* 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. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 9, 367–377.

Guillemot-Legris, O., and Muccioli, G.G. (2017). Obesity-Induced Neuroinflammation: Beyond the Hypothalamus. *Trends in Neurosciences* 40, 237–253.

Gustafson, B., Hedjazifar, S., Gogg, S., Hammarstedt, A., and Smith, U. (2015). Insulin resistance and impaired adipogenesis. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 26, 193–200.

Guy, G.R., Jackson, R.A., Yusoff, P., and Chow, S.Y. (2009). Sprouty proteins: modified modulators, matchmakers or missing links? *Journal of Endocrinology* 191–202.

Hadaczek, P., Stanek, L., Ciesielska, A., Sudhakar, V., Samaranch, L., Pivrotto, P., Bringas, J., O’Riordan, C., Mastis, B., San Sebastian, W., et al. (2016). Widespread AAV1- and AAV2-mediated transgene expression in the nonhuman primate brain: implications for Huntington’s disease. *Molecular Therapy. Methods & Clinical Development* 3, 16037.

Hameed, I., Masoodi, S.R., Mir, S.A., Nabi, M., Ghazanfar, K., and Ganai, B.A. (2015). Type 2 diabetes mellitus: From a metabolic disorder to an inflammatory condition. *World Journal of Diabetes* 6, 598.

Harding, J.L., Pavkov, M.E., Magliano, D.J., Shaw, J.E., and Gregg, E.W. (2019). Global trends in diabetes complications: a review of current evidence. *Diabetologia* 62, 3–16.

Haurigot, V., and Bosch, F. (2013). Toward a gene therapy for neurological and somatic MPSIIIA. *Rare Diseases* 1, e27209.

Haurigot, V., Marcó, S., Ribera, A., Garcia, M., Ruzo, A., Villacampa, P., Ayuso, E., Añor, S., Andaluz, A., Pineda, M., et al. (2013). Whole body correction of mucopolysaccharidosis IIIA by intracerebrospinal fluid gene therapy. *The Journal of Clinical Investigation* 123, 3254–3271.

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, J.M., Lesniak, M.A., Pert, C.B., and Roth, J. (1986). Autoradiographic localization of insulin receptors in rat brain: Prominence in olfactory and limbic areas. *Neuroscience* 17, 1127–1138.

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. *Human Molecular Genetics* 18, 2975–2988.

Himanshu, D., Ali, W., and Wamique, M. (2020). Type 2 diabetes mellitus: pathogenesis and genetic diagnosis. *Journal of Diabetes and Metabolic Disorders* 19, 1959–1966.



- Hirata, R.K., and Russell, D.W. (2000). Design and Packaging of Adeno-Associated Virus Gene Targeting Vectors. *Journal of Virology* 74, 4612–4620.
- Hironaka, K., Yamazaki, Y., Hirai, Y., Yamamoto, M., Miyake, N., Miyake, K., Okada, T., Morita, A., and Shimada, T. (2015). Enzyme replacement in the CSF to treat metachromatic leukodystrophy in mouse model using single intracerebroventricular injection of self-complementary AAV1 vector. *Scientific Reports* 2015 5:1 5, 1–12.
- Hocquemiller, M., Giersch, L., Audrain, M., Parker, S., and Cartier, N. (2016). Adeno-Associated Virus-Based Gene Therapy for CNS Diseases. *Human Gene Therapy* 27, 478–496.
- Hodge, C., Liao, J., Stofega, M., Guan, K., Carter-Su, C., and Schwartz, J. (1998). Growth Hormone Stimulates Phosphorylation and Activation of Elk-1 and Expression of c-fos, egr-1, and junB through Activation of Extracellular Signal-regulated Kinases 1 and 2 \*. *Journal of Biological Chemistry* 273, 31327–31336.
- Holland, W.L., Adams, A.C., Brozinick, J.T., Bui, H.H., Miyauchi, Y., Kusminski, C.M., Bauer, S.M., Wade, M., Singhal, E., Cheng, C.C., et al. (2013). An FGF21-Adiponectin-Ceramide Axis Controls Energy Expenditure and Insulin Action in Mice. *Cell Metabolism* 17, 790–797.
- von Holstein-Rathlou, S., Bondurant, L.D., Peltekian, L., Naber, M.C., Yin, T.C., Claflin, K.E., Urizar, A.I., Madsen, A.N., Ratner, C., Holst, B., et al. (2016). FGF21 mediates endocrine control of simple sugar intake and sweet taste preference by the liver. *Cell Metabolism* 23, 335–343.
- 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. *Journal of Biological Chemistry* 286, 12983–12990.
- Hsuchou, H., Pan, W., and Kastin, A.J. (2007). The fasting polypeptide FGF21 can enter brain from blood. *Peptides (N.Y.)* 28, 2382.
- Hua, S., Liu, Q., Li, J., Fan, M., Yan, K., and Ye, D. (2021). Beta-klotho in type 2 diabetes mellitus: From pathophysiology to therapeutic strategies. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders* 2021 1–19.
- 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. *Molecular Carcinogenesis* 45, 934–942.
- Hughes, T.F., Borenstein, A.R., Schofield, E., Wu, Y., and Larson, E.B. (2009). Association between late-life body mass index and dementia. *Neurology* 72, 1741–1746.
- Hugo, J., and Ganguli, M. (2014). Dementia and Cognitive Impairment Epidemiology, Diagnosis, and Treatment. *Clinics in Geriatric Medicine*.
- Hultman, K., Scarlett, J.M., Baquero, A.F., Cornea, A., Zhang, Y., Salinas, C.B.G., Brown, J., Morton, G.J., Whalen, E.J., Grove, K.L., et al. (2019). The central fibroblast growth factor receptor/beta klotho system: Comprehensive mapping in *Mus musculus* and comparisons to nonhuman primate and human samples using an automated in situ hybridization platform. *Journal of Comparative Neurology* 527, 2069–2085.

- Hussain, M.F., Roesler, A., and Kazak, L. (2020). Regulation of adipocyte thermogenesis: mechanisms controlling obesity. *The FEBS Journal* 287, 3370–3385.
- Hwu, W.L., Muramatsu, S.I., Tseng, S.H., Tzen, K.Y., Lee, N.C., Chien, Y.H., Snyder, R.O., Byrne, B.J., Tai, C.H., and Wu, R.M. (2012). Gene therapy for aromatic L-amino acid decarboxylase deficiency. *Science Translational Medicine* 4.
- IDF (2021). *IDF Diabetes Atlas 10th edition*.
- Imamura, M., and Maeda, S. (2011). Genetics of type 2 diabetes: the GWAS era and future perspectives. *Endocrine Journal* 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 PPAR $\alpha$ -Mediated Induction of Fibroblast Growth Factor 21. *Cell Metabolism* 5, 415–425.
- 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, 1364–1379.
- Ito, S., Kinoshita, S., Shiraishi, N., Nakagawa, S., Sekine, S., Fujimori, T., and Nabeshima, Y.I. (2000). Molecular cloning and expression analyses of mouse  $\beta$ klotho, which encodes a novel Klotho family protein. *Mechanisms of Development* 98, 115–119.
- Itoh, N., and Ornitz, D.M. (2004). Evolution of the Fgf and Fgfr gene families. *Trends in Genetics* 20, 563–569.
- Jackness, C., Karmally, W., Febres, G., Conwell, I.M., Ahmed, L., Bessler, M., McMahon, D.J., and Korner, J. (2013). Very Low-Calorie Diet Mimics the Early Beneficial Effect of Roux-en-Y Gastric Bypass on Insulin Sensitivity and  $\beta$ -Cell Function in Type 2 Diabetic Patients. *Diabetes* 62, 3027–3032.
- Jan Biessels, G., and Despa, F. (2018). Cognitive decline and dementia in diabetes mellitus: mechanisms and clinical implications. *Nature Reviews Endocrinology* 14, 591–604.
- Jan Biessels, G., and Reagan, L.P. (2015). Hippocampal insulin resistance and cognitive dysfunction.
- Jensen-Cody, S.O., Flippo, K.H., Clafflin, K.E., Yavuz, Y., Sapouckey, S.A., Walters, G.C., Usachev, Y.M., Atasoy, D., Gillum, M.P., and Potthoff, M.J. (2020). FGF21 Signals to Glutamatergic Neurons in the Ventromedial Hypothalamus to Suppress Carbohydrate Intake. *Cell Metabolism* 32, 273-286.e6.
- Jiang, Y., Lin, L., Liu, N., Wang, Q., Yuan, J., Li, Y., Chung, K.K., Guo, S., Yu, Z., and Wang, X. (2020). FGF21 protects against aggravated blood-brain barrier disruption after ischemic focal stroke in diabetic db/db male mice via cerebrovascular PPAR $\gamma$  activation. *International Journal of Molecular Sciences* 21.
- Jimenez, V., Muñoz, S., Casana, E., Mallol, C., Elias, I., Jambrina, C., Ribera, A., Ferre, T., Franckhauser, S., and Bosch, F. (2013). In Vivo Adeno-Associated Viral Vector-Mediated Genetic Engineering of White and Brown Adipose Tissue in Adult Mice. *Diabetes* 62, 4012–4022.

- Jimenez, V., Jambrina, C., Casana, E., Sacristan, V., Muñoz, S., Darriba, S., Rodó, J., Mallol, C., Garcia, M., León, X., et al. (2018). FGF21 gene therapy as treatment for obesity and insulin resistance. *EMBO Molecular Medicine* 10, e8791.
- Johnson, C.L., Weston, J.Y., Chadi, S.A., Fazio, E.N., Huff, M.W., Kharitonov, A., Köester, A., and Pin, C.L. (2009). Fibroblast Growth Factor 21 Reduces the Severity of Cerulein-Induced Pancreatitis in Mice. *Gastroenterology* 137, 1795–1804.
- Jørgensen, J.A., Zadavec, D., and Jacobsson, A. (2007). Norepinephrine and rosiglitazone synergistically induce Elovl3 expression in brown adipocytes. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism* 293.
- Kahkoska, A.R., and Dabelea, D. (2021). Diabetes in Youth: A Global Perspective. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America* 50, 491–512.
- 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.
- Kang, K., Xu, P., Wang, M., Chunyu, J., Sun, X., Ren, G., Xiao, W., and Li, D. (2020a). FGF21 attenuates neurodegeneration through modulating neuroinflammation and oxidant-stress. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 129, 110439.
- Kang, K., Xu, P., Wang, M., Chunyu, J., Sun, X., Ren, G., Xiao, W., and Li, D. (2020b). FGF21 attenuates neurodegeneration through modulating neuroinflammation and oxidant-stress. *Biomedicine and Pharmacotherapy* 129.
- Katz, M.L., Tecedor, L., Chen, Y., Williamson, B.G., Lysenko, E., Winger, F.A., Young, W.M., Johnson, G.C., Whiting, R.E.H., Coates, J.R., et al. (2015). AAV gene transfer delays disease onset in a TPP1-deficient canine model of the late infantile form of Batten disease. *Science Translational Medicine* 7.
- Kaufman, A., Abuqayyas, L., Denney, W.S., Tillman, E.J., and Rolph, T. (2020). AKR-001, an Fc-FGF21 Analog, Showed Sustained Pharmacodynamic Effects on Insulin Sensitivity and Lipid Metabolism in Type 2 Diabetes Patients. *Cell Reports Medicine* 1, 100057.
- Keesey, R.E., and Powley, T.L. (2008). Body energy homeostasis. *Appetite* 51, 442–445.
- Kellar, D., and Craft, S. (2020). Brain insulin resistance in Alzheimer's disease and related disorders: mechanisms and therapeutic approaches. *The Lancet Neurology* 19, 758–766.
- Kelleher, F.C., O'Sullivan, H., Smyth, E., McDermott, R., and Viterbo, A. (2013). Fibroblast growth factor receptors, developmental corruption and malignant disease. *Carcinogenesis* 34, 2198–2205.
- Kells, A.P., Hadaczek, P., Yin, D., Bringas, J., Varenika, V., Forsayeth, J., and Bankiewicz, K.S. (2009). Efficient gene therapy-based method for the delivery of therapeutics to primate cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 2407–2411.
- Kern, W., Peters, A., Fruehwald-Schultes, B., Deininger, E., Born, J., and Fehm, H.L. (2001). Improving Influence of Insulin on Cognitive Functions in Humans. *Neuroendocrinology* 74, 270–280.

- Keuper, M., Häring, H.U., and Staiger, H. (2020). Circulating FGF21 Levels in Human Health and Metabolic Disease. *Experimental and Clinical Endocrinology and Diabetes* 128, 752–770.
- Kharitononkov, 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. (2005). FGF-21 as a novel metabolic regulator. *The Journal of Clinical Investigation* 115, 1627–1635.
- Kharitononkov, 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.
- Kharitononkov, A., Dunbar, J.D., Bina, H.A., Bright, S., Moyers, J.S., Zhang, C., Ding, L., Micanovic, R., Mehrbod, S.F., Knierman, M.D., et al. (2008). FGF-21/FGF-21 receptor interaction and activation is determined by  $\beta$ Klotho. *Journal of Cellular Physiology* 215, 1–7.
- Kharitononkov, A., Beals, J.M., Micanovic, R., Striffler, B.A., Rathnachalam, R., Wroblewski, V.J., Li, S., Koester, A., Ford, A.M., Coskun, T., et al. (2013). Rational Design of a Fibroblast Growth Factor 21-Based Clinical Candidate, LY2405319. *PLOS ONE* 8, e58575.
- 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, Obesity and Metabolism* 19, 1762–1772.
- Kim, K.H., Kim, S.H., Min, Y.K., Yang, H.M., Lee, J.B., and Lee, M.S. (2013). Acute Exercise Induces FGF21 Expression in Mice and in Healthy Humans. *PLOS ONE* 8, e63517.
- Kim, S., Kim, Y., and Park, S.M. (2016). Body Mass Index and Decline of Cognitive Function. *PLoS ONE* 11.
- Kimura, S., and Harashima, H. (2020). Current status and challenges associated with CNS-targeted gene delivery across the BBB. *Pharmaceutics* 12, 1–33.
- Kinlen, D., Cody, D., and O’Shea, D. (2018). Complications of obesity. *QJM: An International Journal of Medicine* 111, 437–443.
- Kleinert, M., Clemmensen, C., Hofmann, S.M., Moore, M.C., Renner, S., Woods, S.C., Huypens, P., Beckers, J., de Angelis, M.H., Schürmann, A., et al. (2018). Animal models of obesity and diabetes mellitus. *Nature Reviews Endocrinology* 2018 14:3 14, 140–162.
- Kolb, H., and Martin, S. (2017). Environmental/lifestyle factors in the pathogenesis and prevention of type 2 diabetes. *BMC Medicine* 15.
- Kotterman, M.A., and Schaffer, D. v. (2014). Engineering adeno-associated viruses for clinical gene therapy. *Nature Reviews Genetics* 2014 15:7 15, 445–451.
- Kouhara, H., Hadari, Y.R., Spivak-Kroizman, T., Schilling, J., Bar-Sagi, D., Lax, I., and Schlessinger, J. (1997). A Lipid-Anchored Grb2-Binding Protein That Links FGF-Receptor Activation to the Ras/MAPK Signaling Pathway. *Cell* 89, 693–702.

- Kowiański, P., Lietzau, G., Czuba, E., Waśkow, M., Steliga, A., and Moryś, J. (2017). BDNF: A Key Factor with Multipotent Impact on Brain Signaling and Synaptic Plasticity. *Cellular and Molecular Neurobiology* 2017 38:3 38, 579–593.
- Kullmann, S., Heni, M., Hallschmid, M., Fritsche, A., Preissl, H., and Häring, H.-U. (2016). Brain Insulin Resistance at the Crossroads of Metabolic and Cognitive Disorders in Humans. *Physiol Rev* 96, 1169–1209.
- Kullmann, S., Kleinridders, A., Small, D.M., Fritsche, A., Häring, H.-U., Preissl, H., and Heni, M. (2020). Central nervous pathways of insulin action in the control of metabolism and food intake. *The Lancet Diabetes Endocrinology* 8, 524–234.
- Kuro-o, M. (2018). The Klotho proteins in health and disease. *Nature Reviews Nephrology* 2018 15:1 15, 27–44.
- Kurosu, H., Choi, M., Ogawa, Y., Dickson, A.S., Goetz, R., Eliseenkova, A. v., Mohammadi, M., Rosenblatt, K.P., Kliewer, S.A., and Kuro-O, M. (2007). Tissue-specific expression of  $\beta$ klotho and Fibroblast Growth Factor (FGF) receptor isoforms determines metabolic activity of FGF19 and FGF21. *Journal of Biological Chemistry* 282, 26687–26695.
- Kushner, R.F., Calanna, S., Davies, M., Dicker, D., Garvey, W.T., Goldman, B., Lingvay, I., Thomsen, M., Wadden, T.A., Wharton, S., et al. (2020). Semaglutide 2.4 mg for the Treatment of Obesity: Key Elements of the STEP Trials 1 to 5. *Obesity* 28, 1050–1061.
- Laeger, T., Henagan, T.M., Albarado, D.C., Redman, L.M., Bray, G.A., Noland, R.C., Münzberg, H., Hutson, S.M., Gettys, T.W., Schwartz, M.W., et al. (2014). FGF21 is an endocrine signal of protein restriction. *The Journal of Clinical Investigation* 124, 3913–3922.
- Lamothe, B., Yamada, M., Schaeper, U., Birchmeier, W., Lax, I., and Schlessinger, J. (2004). The Docking Protein Gab1 Is an Essential Component of an Indirect Mechanism for Fibroblast Growth Factor Stimulation of the Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt Antiapoptotic Pathway. *Molecular and Cellular Biology* 24, 5657–5666.
- Lan, T., Morgan, D.A., Rahmouni, K., Sonoda, J., Fu, X., Burgess, S.C., Holland, W.L., Kliewer, S.A., and Mangelsdorf, D.J. (2017). FGF19, FGF21, and an FGFR1/ $\beta$ -Klotho-Activating Antibody Act on the Nervous System to Regulate Body Weight and Glycemia. *Cell Metabolism* 26, 709-718.e3.
- Langenberg, C., and Lotta, L.A. (2018). Genomic insights into the causes of type 2 diabetes. *The Lancet* 391, 2463–2474.
- Launer, L.J., Miller, M.E., Williamson, J.D., Lazar, R.M., Gerstein, H.C., Murray, A.M., Sullivan, M., Horowitz, K.R., Ding, J., Marcovina, S., et al. (2011). Effects of intensive glucose lowering on brain structure and function in people with type 2 diabetes (ACCORD MIND): a randomised open-label substudy. *The Lancet Neurology* 10, 969–977.
- Lee, J.H., Kang, Y.E., Chang, J.Y., Park, K.C., Kim, H.W., Kim, J.T., Kim, H.J., Yi, H.S., Shong, M., Chung, H.K., et al. (2016). An engineered FGF21 variant, LY2405319, can prevent non-alcoholic steatohepatitis by enhancing hepatic mitochondrial function. *American Journal of Translational Research* 8, 4750.
- Lee, P., Linderman, J.D., Smith, S., Brychta, R.J., Wang, J., Idelson, C., Perron, R.M., Werner, C.D., Phan, G.Q., Kammula, U.S., et al. (2014). Irisin and FGF21 are cold-

induced endocrine activators of brown fat function in humans. *Cell Metabolism* 19, 302–309.

Lew, E.D., Furdui, C.M., Anderson, K.S., and Schlessinger, J. (2009). The precise sequence of FGF receptor autophosphorylation is kinetically driven and is disrupted by oncogenic mutations. *Science Signaling* 2.

Li, C., and Samulski, R.J. (2020). Engineering adeno-associated virus vectors for gene therapy. *Nature Reviews Genetics* 2020 21:4 21, 255–272.

Li, Z.C., Xiao, J., Wang, G., Li, M.Q., Hu, K.Z., Ma, T., Wang, W.L., Liu, Z. de, and Zhang, J.D. (2015). Fibroblast growth factor-21 concentration in serum and synovial fluid is associated with radiographic bone loss of knee osteoarthritis. *Scand J Clin Lab Invest* 75, 121–125.

Liang, J., Matheson, B.E., Kaye, W.H., and Boutelle, K.N. (2014a). Neurocognitive correlates of obesity and obesity-related behaviors in children and adolescents. *International Journal of Obesity* 38, 494–506.

Liang, Q., Zhong, L., Zhang, J., Wang, Y., Bornstein, S.R., Triggle, C.R., Ding, H., Lam, K.S.L., and Xu, A. (2014b). FGF21 maintains glucose homeostasis by mediating the cross talk between liver and brain during prolonged fasting. *Diabetes* 63, 4064–4075.

Lin, X., and Li, H. (2021). Obesity: Epidemiology, Pathophysiology, and Therapeutics. *Frontiers in Endocrinology* 12.

Lin, Z., Tian, H., Lam, K.S.L., Lin, S., Hoo, R.C.L., Konishi, M., Itoh, N., Wang, Y., Bornstein, S.R., Xu, A., et al. (2013). Adiponectin Mediates the Metabolic Effects of FGF21 on Glucose Homeostasis and Insulin Sensitivity in Mice. *Cell Metabolism* 17, 779–789.

Lisowski, L., Tay, S.S., and Alexander, I.E. (2015). Adeno-associated virus serotypes for gene therapeutics. *Current Opinion in Pharmacology* 24, 59–67.

Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods* 25, 402–408.

Livhits, M., Mercado, C., Yermilov, I., Parikh, J.A., Dutson, E., Mehran, A., Ko, C.Y., and Gibbons, M.M. (2011). Patient behaviors associated with weight regain after laparoscopic gastric bypass. *Obesity Research & Clinical Practice* 5, e258–e265.

Loher, H., Kreis, R., Boesch, C., and Christ, E. (2016). The flexibility of ectopic lipids. *International Journal of Molecular Sciences* 17.

Lu, J., Wu, D. mei, Zheng, Y. lin, Hu, B., Cheng, W., Zhang, Z. feng, and Shan, Q. (2011). Ursolic acid improves high fat diet-induced cognitive impairments by blocking endoplasmic reticulum stress and I $\kappa$ B kinase  $\beta$ /nuclear factor- $\kappa$ B-mediated inflammatory pathways in mice. *Brain, Behavior, and Immunity* 25, 1658–1667.

Luchsinger, J.A., Perez, T., Chang, H., Mehta, P., Steffener, J., Pradabhan, G., Ichise, M., Manly, J., Devanand, D.P., and Bagiella, E. (2016). Metformin in Amnesic Mild Cognitive Impairment: Results of a Pilot Randomized Placebo Controlled Clinical Trial. *Journal of Alzheimer's Disease* 51, 501–514.

Lundsgaard, A.M., Fritzen, A.M., Sjøberg, K.A., Myrmel, L.S., Madsen, L., Wojtaszewski, J.F.P., Richter, E.A., and Kiens, B. (2017). Circulating FGF21 in humans is potently induced by short term overfeeding of carbohydrates. *Molecular Metabolism* 6, 22–29.

- Ly, H., Verma, N., Wu, F., Liu, M., Saatman, K.E., Nelson, P.T., Slevin, J.T., Goldstein, L.B., Biessels, G.J., and Despa, F. (2017). Brain microvascular injury and white matter disease provoked by diabetes-associated hyperamylinemia. *Annals of Neurology* 82, 208–222.
- Maida, A., Zota, A., Sjöberg, K.A., Schumacher, J., Sijmonsma, T.P., Pfenninger, A., Christensen, M.M., Gantert, T., Fuhrmeister, J., Rothermel, U., et al. (2016). A liver stress-endocrine nexus promotes metabolic integrity during dietary protein dilution. *The Journal of Clinical Investigation* 126, 3263–3278.
- Mäkelä, J., Tselykh, T. v., Maiorana, F., Eriksson, O., Do, H.T., Mudò, G., Korhonen, L.T., Belluardo, N., and Lindholm, D. (2014). Fibroblast growth factor-21 enhances mitochondrial functions and increases the activity of PGC-1 $\alpha$  in human dopaminergic neurons via Sirtuin-1. *Springerplus* 3.
- Marcela Santos, L., Marcela, L., Nakayama Ohe, M., Giovanna Pallone, S., Sizue Kunii, I., Elen Costa Silva, R., Gabriel Pereira, B., Ohki Nacaguma, I., Gilberto Vieira, J., and Lazaretti-Castro, M. (2020). SAT-606 Distribution of Beta Klotho Gene Expression in the Mouse Brain. *J Endocr Soc* 4.
- Marcó, S., Haurigot, V., and Bosch, F. (2019). In Vivo Gene Therapy for Mucopolysaccharidosis Type III (Sanfilippo Syndrome): A New Treatment Horizon. *Human Gene Therapy* 30, 1211–1221.
- Marks, J.L., Porte, D., Stahl, W.L., and Basking, D.G. (1990). Localization of insulin receptor mRNA in rat brain by in situ hybridization. *Endocrinology* 127, 3234–3236.
- Matsui, S., Sasaki, T., Kohno, D., Yaku, K., Inutsuka, A., Yokota-Hashimoto, H., Kikuchi, O., Suga, T., Kobayashi, M., Yamanaka, A., et al. (2018). Neuronal SIRT1 regulates macronutrient-based diet selection through FGF21 and oxytocin signalling in mice. *Nature Communications* 2018 9:1 9, 1–17.
- 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.
- McNelis, J.C., and Olefsky, J.M. (2014). Macrophages, Immunity, and Metabolic Disease. *Immunity* 41, 36–48.
- Mendell, J.R., Al-Zaidy, S., Shell, R., Arnold, W.D., Rodino-Klapac, L.R., Prior, T.W., Lowes, L., Alfano, L., Berry, K., Church, K., et al. (2017). Single-Dose Gene-Replacement Therapy for Spinal Muscular Atrophy. *New England Journal of Medicine* 377, 1713–1722.
- Miehle, K., Ebert, T., Kralisch, S., Hoffmann, A., Kratzsch, J., Schlögl, H., Stumvoll, M., and Fasshauer, M. (2016). Serum concentrations of fibroblast growth factor 21 are elevated in patients with congenital or acquired lipodystrophy. *Cytokine* 83, 239–244.
- Ming, A.Y.K., Yoo, E., Vorontsov, E.N., Altamentova, S.M., Kilkenny, D.M., and Rocheleau, J. v. (2012). Dynamics and distribution of Klotho $\beta$  (KLB) and Fibroblast Growth Factor Receptor-1 (FGFR1) in living cells reveal the Fibroblast Growth Factor-21 (FGF21)-induced receptor complex. *Journal of Biological Chemistry* 287, 19997–20006.
- Mingozzi, F., and High, K.A. (2011). Therapeutic in vivo gene transfer for genetic disease using AAV: progress and challenges. *Nature Reviews Genetics* 2011 12:5 12, 341–355.

- Mittermeyer, G., Christine, C.W., Rosenbluth, K.H., Baker, S.L., Starr, P., Larson, P., Kaplan, P.L., Forsayeth, J., Aminoff, M.J., and Bankiewicz, K.S. (2011). Long-term evaluation of a phase 1 study of AADC gene therapy for parkinson's disease. *Human Gene Therapy* 23, 377–381.
- Morais, M., Faria, G., Preto, J., and Costa-Maia, J. (2016). Gallstones and Bariatric Surgery: To Treat or Not to Treat? *World Journal of Surgery* 40, 2904–2910.
- Moran, C., Beare, R., Phan, T., Starkstein, S., Bruce, D., Romina, M., and Srikanth, V. (2017). Neuroimaging and its Relevance to Understanding Pathways Linking Diabetes and Cognitive Dysfunction. *Journal of Alzheimer's Disease* 59, 405–419.
- Morigny, P., Houssier, M., Mouisel, E., and Langin, D. (2016). Adipocyte lipolysis and insulin resistance. *Biochimie* 125, 259–266.
- Morrison, C.D., Pistell, P.J., Ingram, D.K., Johnson, W.D., Liu, Y., Fernandez-Kim, S.O., White, C.L., Purpera, M.N., Uranga, R.M., Bruce-Keller, A.J., et al. (2010). High fat diet increases hippocampal oxidative stress and cognitive impairment in aged mice: implications for decreased Nrf2 signaling. *Journal of Neurochemistry* 114, 1581–1589.
- Motas, S., Haurigot, V., Garcia, M., Marcó, S., Ribera, A., Roca, C., Sánchez, X., Sánchez, V., Molas, M., Bertolin, J., et al. (2016). CNS-directed gene therapy for the treatment of neurologic and somatic mucopolysaccharidosis type II (Hunter syndrome). *JCI Insight* 1, 86696.
- Mulligan, R.C. (1993). The Basic Science of Gene Therapy. *Science* (1979) 260, 926–932.
- Munshi, M.N. (2017). Cognitive Dysfunction in Older Adults With Diabetes: What a Clinician Needs to Know. *Diabetes Care* 40, 461–467.
- Muriach, M., Flores-Bellver, M., Romero, F.J., and Barcia, J.M. (2014). Diabetes and the Brain: Oxidative Stress, Inflammation, and Autophagy. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2014.
- Murray, A.M., Hsu, F.C., Williamson, J.D., Bryan, R.N., Gerstein, H.C., Sullivan, M.D., Miller, M.E., Leng, I., Lovato, L.L., and Launer, L.J. (2017). ACCORDION MIND: results of the observational extension of the ACCORD MIND randomised trial. *Diabetologia* 60, 69–80.
- Naldini, L. (2015). Gene therapy returns to centre stage. *Nature* 2015 526:7573 526, 351–360.
- Naso, M.F., Tomkowicz, B., Perry, W.L., and Strohl, W.R. (2017). Adeno-Associated Virus (AAV) as a Vector for Gene Therapy. *BioDrugs* 2017 31, 317–334.
- 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. *Journal of Virology* 86, 13038–13048.
- Nichols, E., Szoëke, C.E.I., Vollset, S.E., Abbasi, N., Abd-Allah, F., Abdela, J., Aichour, M.T.E., Akinyemi, R.O., Alahdab, F., Asgedom, S.W., et al. (2019). Global, regional, and national burden of Alzheimer's disease and other dementias, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *The Lancet Neurology* 18, 88–106.



- Nilsson, C., Raun, K., Yan, F.F., Larsen, M.O., and Tang-Christensen, M. (2012). Laboratory animals as surrogate models of human obesity. *Acta Pharmacologica Sinica* 2012 33:2 33, 173–181.
- Nishimura, T., Nakatake, Y., Konishi, M., and Itoh, N. (2000). Identification of a novel FGF, FGF-21, preferentially expressed in the liver. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression* 1492, 203–206.
- Odom, J., Zalesin, K.C., Washington, T.L., Miller, W.W., Hakmeh, B., Zaremba, D.L., Altattan, M., Balasubramaniam, M., Gibbs, D.S., Krause, K.R., et al. (2010). Behavioral predictors of weight regain after bariatric surgery. *Obesity Surgery* 20, 349–356.
- Ogawa, K., Kato, N., and Kawakami, S. (2020). Recent Strategies for Targeted Brain Drug Delivery. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 68, 567–582.
- Oishi, K., Uchida, D., and Ishida, N. (2008). Circadian expression of FGF21 is induced by PPAR $\alpha$  activation in the mouse liver. *FEBS Letters* 582, 3639–3642.
- 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. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 412, 396–400.
- Ong, S.H., Guy, G.R., Hadari, Y.R., Laks, S., Gotoh, N., Schlessinger, J., and Lax, I. (2000). FRS2 Proteins Recruit Intracellular Signaling Pathways by Binding to Diverse Targets on Fibroblast Growth Factor and Nerve Growth Factor Receptors. *Molecular and Cellular Biology* 20, 979–989.
- Ornitz, D.M., and Itoh, N. (2015). The fibroblast growth factor signaling pathway. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology* 4, 215–266.
- 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. *Nature Medicine* 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 Metabolism* 20, 670–677.
- Park, C.R., Seeley, R.J., Craft, S., and Woods, S.C. (2000). Intracerebroventricular insulin enhances memory in a passive-avoidance task. *Physiology & Behavior* 68, 509–514.
- Pastors, J.G., Warshaw, H., Daly, A., Franz, M., and Kulkarni, K. (2002). The Evidence for the Effectiveness of Medical Nutrition Therapy in Diabetes Management. *Diabetes Care* 25, 608–613.
- Piguet, F., Alves, S., and Cartier, N. (2017). Clinical Gene Therapy for Neurodegenerative Diseases: Past, Present, and Future. *Hum Gene Ther* 28, 988–1003.
- 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. *New England Journal of Medicine* 373, 11–22.
- Planavila, A., Redondo-Angulo, I., and Villarroya, F. (2015). FGF21 and Cardiac Physiopathology. *Frontiers in Endocrinology* 6.

- Popkin, B.M., Du, S., Green, W.D., Beck, M.A., Algaith, T., Herbst, C.H., Alsukait, R.F., Alluhidan, M., Alazemi, N., and Shekar, M. (2020). Individuals with obesity and COVID-19: A global perspective on the epidemiology and biological relationships. *Obesity Reviews* 21.
- Powell, S.K., Rivera-Soto, R., and Gray, S.J. (2015). Viral Expression Cassette Elements to Enhance Transgene Target Specificity and Expression in Gene Therapy. *Discov Med* 19, 49.
- Prasad, R.B., and Groop, L. (2015). Genetics of type 2 diabetes—pitfalls and possibilities. *Genes (Basel)* 6, 87–123.
- Prince, M., Bryce, R., Albanese, E., Wimo, A., Ribeiro, W., and Ferri, C.P. (2013). The global prevalence of dementia: A systematic review and metaanalysis. *Alzheimer's & Dementia* 9, 63-75.e2.
- Raji, C.A., Ho, A.J., Parikshak, N.N., Becker, J.T., Lopez, O.L., Kuller, L.H., Hua, X., Leow, A.D., Toga, A.W., and Thompson, P.M. (2010). Brain structure and obesity. *Hum Brain Mapp* 31, 353–364.
- Ren, B., Wang, L., Shi, L., Jin, X., Liu, Y., Liu, R.H., Yin, F., Cadenas, E., Dai, X., Liu, Z., et al. (2021). Methionine restriction alleviates age-associated cognitive decline via fibroblast growth factor 21. *Redox Biology* 41.
- Ribera, A., Haurigot, V., Garcia, M., Marcó, S., Motas, S., Villacampa, P., Maggioni, L., León, X., Molas, M., Sánchez, V., et al. (2015). Biochemical, histological and functional correction of mucopolysaccharidosis Type IIIB by intra-cerebrospinal fluid gene therapy. *Human Molecular Genetics* 24, 2078–2095.
- Ritchie, M., Hanouneh, I.A., Noureddin, M., Rolph, T., and Alkhouri, N. (2020). Fibroblast growth factor (FGF)-21 based therapies: A magic bullet for nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD)? *Expert Opinion on Investigational Drugs* 29, 197–204.
- Roca, C., Motas, S., Marco, S., Ribera, A., Sanchez, V., Sanchez, X., Bertolin, J., Leon, X., Perez, J., Garcia, M., et al. (2017). Disease correction by AAV-mediated gene therapy in a new mouse model of mucopolysaccharidosis type IIID. *Human Molecular Genetics* 26, 1535–1551.
- Roger, C., Lasbleiz, A., Guye, M., Dutour, A., Gaborit, B., and Ranjeva, J.P. (2022). The Role of the Human Hypothalamus in Food Intake Networks: An MRI Perspective. *Frontiers in Nutrition* 8, 1191.
- Ronzitti, G., Gross, D.A., and Mingozzi, F. (2020). Human Immune Responses to Adeno-Associated Virus (AAV) Vectors. *Frontiers in Immunology* 11, 670.
- Rose Mayeda, E., Postdoctoral Fellow, M., Whitmer, R.A., and Yaffe, K. (2015). Diabetes and Cognition HHS Public Access. *Clin Geriatr Med* 31, 101.
- Rühlmann, C., Wölk, T., Blümel, T., Stahn, L., Vollmar, B., and Kuhla, A. (2016). Long-term caloric restriction in ApoE-deficient mice results in neuroprotection via Fgf21-induced AMPK/mTOR pathway. *Aging* 8, 2777–2789.
- Rühlmann, C., Dannehl, D., Brodtrück, M., Adams, A.C., Stenzel, J., Lindner, T., Krause, B.J., Vollmar, B., and Kuhla, A. (2021). Neuroprotective Effects of the FGF21 Analogue LY2405319. *J Alzheimers Dis* 80, 357–369.

- Ruzo, A., Marcó, S., García, M., Villacampa, P., Ribera, A., Ayuso, E., Maggioni, L., Mingozzi, F., Haurigot, V., and Bosch, F. (2012). Correction of Pathological Accumulation of Glycosaminoglycans in Central Nervous System and Peripheral Tissues of MPSIIIA Mice Through Systemic AAV9 Gene Transfer. *Human Gene Therapy* 23, 1237–1246.
- Saczynski, J.S., Siggurdsson, S., Jonsson, P. v., Eiriksdottir, G., Olafsdottir, E., Kjartansson, O., Harris, T.B., van Buchem, M.A., Gudnason, V., and Launer, L.J. (2009). Glycemic Status and Brain Injury in Older Individuals. *Diabetes Care* 32, 1608–1613.
- Sam, S. (2018). Differential effect of subcutaneous abdominal and visceral adipose tissue on cardiometabolic risk. *Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation* 33.
- Samulski, R.J., and Muzyczka, N. (2014). AAV-Mediated Gene Therapy for Research and Therapeutic Purposes. *Annu Rev Virol* 1, 427–451.
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 79, 2077–2081.
- Sa-nguanmoo, P., Chattipakorn, N., and Chattipakorn, S.C. (2016a). Potential roles of fibroblast growth factor 21 in the brain. *Metabolic Brain Disease* 31, 239–248.
- Sa-nguanmoo, P., Tanajak, P., Kerdphoo, S., Satjaritanun, P., Wang, X., Liang, G., Li, X., Jiang, C., Pratchayasakul, W., Chattipakorn, N., et al. (2016b). FGF21 improves cognition by restored synaptic plasticity, dendritic spine density, brain mitochondrial function and cell apoptosis in obese-insulin resistant male rats. *Hormones and Behavior* 85, 86–95.
- Sa-nguanmoo, P., Tanajak, P., Kerdphoo, S., Jaiwongkam, T., Wang, X., Liang, G., Li, X., Jiang, C., Pratchayasakul, W., Chattipakorn, N., et al. (2018). FGF21 and DPP-4 inhibitor equally prevents cognitive decline in obese rats. *Biomedicine and Pharmacotherapy* 97, 1663–1672.
- Santoleri, D., and Titchenell, P.M. (2019). Resolving the Paradox of Hepatic Insulin Resistance. *CMGH* 7, 447–456.
- dos Santos Matioli, M.N.P., Suemoto, C.K., Rodriguez, R.D., Farias, D.S., da Silva, M.M., Leite, R.E.P., Ferretti-Rebustini, R.E.L., Farfel, J.M., Pasqualucci, C.A., Jacob Filho, W., et al. (2017). Diabetes is Not Associated with Alzheimer's Disease Neuropathology. *Journal of Alzheimer's Disease* 60, 1035–1043.
- Sanyal, A., Charles, E.D., Neuschwander-Tetri, B.A., Loomba, R., Harrison, S.A., Abdelmalek, M.F., Lawitz, E.J., Halegoua-DeMarzio, D., Kundu, S., Noviello, S., et al. (2018). Pegbelfermin (BMS-986036), a PEGylated fibroblast growth factor 21 analogue, in patients with non-alcoholic steatohepatitis: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2a trial. *The Lancet* 392, 2705–2717.
- 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 Increases Energy Expenditure and Insulin Sensitivity in Obese Rats. *Diabetes* 59, 1817.
- Sattar, N., and Gill, J.M. (2014). Type 2 diabetes as a disease of ectopic fat? *BMC Medicine* 12.

- Schäfer, S.A., Machicao, F., Fritsche, A., Häring, H.U., and Kantartzis, K. (2011). New type 2 diabetes risk genes provide new insights in insulin secretion mechanisms. *Diabetes Research and Clinical Practice* 93, S9.
- Shahror, R.A., Linares, G.R., Wang, Y., Hsueh, S.C., Wu, C.C., Chuang, D.M., Chiang, Y.H., and Chen, K.Y. (2020). Transplantation of mesenchymal stem cells overexpressing fibroblast growth factor 21 facilitates cognitive recovery and enhances neurogenesis in a mouse model of traumatic brain injury. *Journal of Neurotrauma* 37, 14–26.
- Sharretts, J., Galescu, O., Gomatam, S., Andraca-Carrera, E., Hampp, C., and Yanoff, L. (2020). Cancer Risk Associated with Lorcaserin — The FDA’s Review of the CAMELLIA-TIMI 61 Trial. *New England Journal of Medicine* 383, 1000–1002.
- Shenoy, V.K., Beaver, K.M., Fisher, F.M., Singhal, G., Dushay, J.R., Maratos-Flier, E., and Flier, S.N. (2016). Elevated Serum Fibroblast Growth Factor 21 in Humans with Acute Pancreatitis. *PLoS ONE* 11.
- Singhal, G., Douris, N., Fish, A.J., Zhang, X., Adams, A.C., Flier, J.S., Pissios, P., and Maratos-Flier, E. (2016). Fibroblast growth factor 21 has no direct role in regulating fertility in female mice. *Molecular Metabolism* 5, 690–698.
- Skyler, J.S., Bakris, G.L., Bonifacio, E., Darsow, T., Eckel, R.H., Groop, L., Groop, P.H., Handelsman, Y., Insel, R.A., Mathieu, C., et al. (2017). Differentiation of diabetes by pathophysiology, natural history, and prognosis. *Diabetes* 66, 241–255.
- Smith, R.E., and Hock, R.J. (1963). Brown Fat: Thermogenic Effector of Arousal in Hibernators. *Science* (1979) 140, 199–200.
- 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. (2010). Individualizing therapies in type 2 diabetes mellitus based on patient characteristics: What we know and what we need to know. In *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, pp. 1566–1574.
- Snyder, R.O., Audit, M., and Francis, J.D. (2012). rAAV Vector Product Characterization and Stability Studies. *Methods in Molecular Biology* 807, 405–428.
- Song, P., Zechner, C., Hernandez, G., Cánovas, J., Xie, Y., Sondhi, V., Wagner, M., Stadlbauer, V., Horvath, A., Leber, B., et al. (2018). The Hormone FGF21 Stimulates Water Drinking in Response to Ketogenic Diet and Alcohol. *Cell Metabolism* 27, 1338–1347.e4.
- Srikanth, V., Sinclair, A.J., Hill-Briggs, F., Moran, C., and Biessels, G.J. (2020). Type 2 diabetes and cognitive dysfunction—towards effective management of both comorbidities. *The Lancet Diabetes & Endocrinology* 8, 535–545.
- Srivastava, A., Lusby, E.W., and Berns, K.I. (1983). Nucleotide sequence and organization of the adeno-associated virus 2 genome. *Journal of Virology* 45, 555–564.
- Staiger, H., Keuper, M., Berti, L., de Angelis, M.H., and Häring, H.U. (2017). Fibroblast Growth Factor 21—Metabolic Role in Mice and Men. *Endocrine Reviews* 38, 468–488.
- Stanislaus, S., Hecht, R., Yie, J., Hager, T., Hall, M., Spahr, C., Wang, W., Weiszmann, J., Li, Y., Deng, L., et al. (2017a). A Novel Fc-FGF21 With Improved Resistance to

Proteolysis, Increased Affinity Toward  $\beta$ -Klotho, and Enhanced Efficacy in Mice and Cynomolgus Monkeys. *Endocrinology* 158, 1314–1327.

Stanislaus, S., Hecht, R., Yie, J., Hager, T., Hall, M., Spahr, C., Wang, W., Weiszmann, J., Li, Y., Deng, L., et al. (2017b). A Novel Fc-FGF21 With Improved Resistance to Proteolysis, Increased Affinity Toward  $\beta$ -Klotho, and Enhanced Efficacy in Mice and Cynomolgus Monkeys. *Endocrinology* 158, 1314–1327.

Stefan, N. (2020). Causes, consequences, and treatment of metabolically unhealthy fat distribution. *The Lancet Diabetes & Endocrinology* 8, 616–627.

St-Onge, M.P., and Gallagher, D. (2010). Body composition changes with aging: The cause or the result of alterations in metabolic rate and macronutrient oxidation? *Nutrition* 26, 152–155.

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.

Sumithran, P., and Proietto, J. (2014). Benefit-risk assessment of orlistat in the treatment of obesity. *Drug Safety* 37, 597–608.

Sun, Y., Wang, Y., Chen, S.T., Chen, Y.J., Shen, J., Yao, W.B., Gao, X.D., and Chen, S. (2020). Modulation of the astrocyte-neuron lactate shuttle system contributes to neuroprotective action of fibroblast growth factor 21. *Theranostics* 10, 8430–8445.

Suomalainen, A., Elo, J.M., Pietiläinen, K.H., Hakonen, A.H., Sevastianova, K., Korpela, M., Isohanni, P., Marjavaara, S.K., Tyni, T., Kiuru-Enari, S., et al. (2011). FGF-21 as a biomarker for muscle-manifesting mitochondrial respiratory chain deficiencies: a diagnostic study. *The Lancet Neurology* 10, 806–818.

Surwit, R.S., Wang, S., Petro, A.E., Sanchis, D., Raimbault, S., Ricquier, D., and Collins, S. (1998). Diet-induced changes in uncoupling proteins in obesity-prone and obesity-resistant strains of mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 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).  $\beta$ Klotho Is Required for Fibroblast Growth Factor (FGF) 21 Signaling through FGF Receptor (FGFR) 1c and FGFR3c. *Molecular Endocrinology* 22, 1006–1014.

Talukdar, S., and Kharitonov, A. (2021). FGF19 and FGF21: In NASH we trust. *Molecular Metabolism* 46, 101152.

Talukdar, S., Owen, B.M., Song, P., Hernandez, G., Zhang, Y., Zhou, Y., Scott, W.T., Paratala, B., Turner, T., Smith, A., et al. (2016a). FGF21 regulates sweet and alcohol preference. *Cell Metabolism* 23, 344–349.

Talukdar, S., Zhou, Y., Li, D., Rossulek, M., Dong, J., Somayaji, V., Weng, Y., Clark, R., Lanba, A., Owen, B.M., et al. (2016b). A long-acting FGF21 molecule, PF-05231023, decreases body weight and improves lipid profile in non-human primates and type 2 diabetic subjects. *Cell Metabolism* 23, 427–440.

Tamboli, R.A., Breitman, I., Marks-Shulman, P.A., Jabbour, K., Melvin, W., Williams, B., Clements, R.H., Feurer, I.D., and Abumrad, N.N. (2014). Early weight regain after gastric

bypass does not affect insulin sensitivity but is associated with elevated ghrelin. *Obesity* 22, 1617–1622.

Tan, B.K., Hallschmid, M., Adya, R., Kern, W., Lehnert, H., and Randeve, H.S. (2011). Fibroblast Growth Factor 21 (FGF21) in Human Cerebrospinal Fluid. *Diabetes* 60, 2758–2762.

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.

Thisse, B., and Thisse, C. (2005). Functions and regulations of fibroblast growth factor signaling during embryonic development. *Developmental Biology* 287, 390–402.

Torgerson, J.S., Hauptman, J., Boldrin, M.N., and Sjöström, L. (2004). XENical in the Prevention of Diabetes in Obese Subjects (XENDOS) Study. *Diabetes Care* 27, 155–161.

Tucsek, Z., Toth, P., Sosnowska, D., Gautam, T., Mitschelen, M., Koller, A., Szalai, G., Sonntag, W.E., Ungvari, Z., and Csiszar, A. (2014). Obesity in Aging Exacerbates Blood–Brain Barrier Disruption, Neuroinflammation, and Oxidative Stress in the Mouse Hippocampus: Effects on Expression of Genes Involved in Beta-Amyloid Generation and Alzheimer’s Disease. *The Journals of Gerontology: Series A* 69, 1212–1226.

Turner, R.C., Cull, C.A., Frighi, V., Holman, R.R., and for the UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group, for the U.P.D.S. (UKPDS) G. (1999). Glycemic Control With Diet, Sulfonylurea, Metformin, or Insulin in Patients With Type 2 Diabetes Mellitus: Progressive Requirement for Multiple Therapies (UKPDS 49). *JAMA* 281, 2005–2012.

Ueta, C.B., Fernandes, G.W., Capelo, L.P., Fonseca, T.L., Maculan, F.D.A., Gouveia, C.H.A., Brum, P.C., Christoffolete, M.A., Aoki, M.S., Lancellotti, C.L., et al. (2012).  $\beta$ 1 Adrenergic receptor is key to cold- and diet-induced thermogenesis in mice. *J Endocrinol* 214, 359.

UKPDS Group (1990). UK prospective diabetes study 7: Response of fasting plasma glucose to diet therapy in newly presenting type II diabetic patients. *Metabolism* 39, 905–912.

Usui, N., Yoshida, M., Takayanagi, Y., Nasanbuyan, N., Inutsuka, A., Kurosu, H., Mizukami, H., Mori, Y., Kuro-o, M., and Onaka, T. (2021). Roles of fibroblast growth factor 21 in the control of depression-like behaviours after social defeat stress in male rodents. *Journal of Neuroendocrinology* 33.

Verrotti, A., Scaparrotta, A., Agostinelli, S., di Pillo, S., Chiarelli, F., and Grosso, S. (2011). Topiramate-induced weight loss: A review. *Epilepsy Research* 95, 189–199.

Vinkers, C.H., de Jong, N.M., Kalkman, C.J., Westphal, K.G.C., van Oorschoot, R., Olivier, B., Korte, S.M., and Groenink, L. (2009). Stress-induced hyperthermia is reduced by rapid-acting anxiolytic drugs independent of injection stress in rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 93, 413–418.

Wang, D., Tai, P.W.L., and Gao, G. (2019). Adeno-associated virus vector as a platform for gene therapy delivery. *Nature Reviews Drug Discovery* 2019 18:5 18, 358–378.

Wang, D., Liu, F., Zhu, L., Lin, P., Han, F., Wang, X., Tan, X., Lin, L., and Xiong, Y. (2020a). FGF21 alleviates neuroinflammation following ischemic stroke by modulating

the temporal and spatial dynamics of microglia/macrophages. *Journal of Neuroinflammation* 17.

Wang, L., Louboutin, J.P., Bell, P., Greig, J.A., Li, Y., Wu, D., and Wilson, J.M. (2011). Muscle-directed Gene Therapy for Hemophilia B with More Efficient and Less Immunogenic AAV Vectors. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 9, 2009.

Wang, Q., Yuan, J., Yu, Z., Lin, L., Jiang, Y., Cao, Z., Zhuang, P., Whalen, M.J., Song, B., Wang, X.J., et al. (2018). FGF21 Attenuates High-Fat Diet-Induced Cognitive Impairment via Metabolic Regulation and Anti-inflammation of Obese Mice. *Molecular Neurobiology* 55, 4702–4717.

Wang, X., Zhu, L., Hu, J., Guo, R., Ye, S., Liu, F., Wang, D., Zhao, Y., Hu, A., Wang, X., et al. (2020b). FGF21 Attenuated LPS-Induced Depressive-Like Behavior via Inhibiting the Inflammatory Pathway. *Frontiers in Pharmacology* 11.

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.

Watakabe, A., Ohtsuka, M., Kinoshita, M., Takaji, M., Isa, K., Mizukami, H., Ozawa, K., Isa, T., and Yamamori, T. (2015). Comparative analyses of adeno-associated viral vector serotypes 1, 2, 5, 8 and 9 in marmoset, mouse and macaque cerebral cortex. *Neuroscience Research* 93, 144–157.

Webb, V.L., and Wadden, T.A. (2017). Intensive Lifestyle Intervention for Obesity: Principles, Practices, and Results. *Gastroenterology* 152, 1752–1764.

Weber, C., and Chand, B. (2018). Weight Regain Following Bariatric Surgery and Revisional Surgery. *Complications in Bariatric Surgery* 147–165.

Weinstein, G., Davis-Plourde, K.L., Conner, S., Himali, J.J., Beiser, A.S., Lee, A., Rawlings, A.M., Sedaghat, S., Ding, J., Moshier, E., et al. (2019). Association of metformin, sulfonylurea and insulin use with brain structure and function and risk of dementia and Alzheimer's disease: Pooled analysis from 5 cohorts. *PLOS ONE* 14, e0212293.

Weng, Y., Chabot, J.R., Bernardo, B., Yan, Q., Zhu, Y., Brenner, M.B., Vage, C., Logan, A., Calle, R., and Talukdar, S. (2015). Pharmacokinetics (PK), Pharmacodynamics (PD) and Integrated PK/PD Modeling of a Novel Long Acting FGF21 Clinical Candidate PF-05231023 in Diet-Induced Obese and Leptin-Deficient Obese Mice. *PLOS ONE* 10, e0119104.

Wente, W., Efanov, A.M., Brenner, M., Kharitonov, A., Köster, A., Sandusky, G.E., Sewing, S., Treinies, I., Zitzer, H., and Gromada, J. (2006). Fibroblast Growth Factor-21 Improves Pancreatic  $\beta$ -Cell Function and Survival by Activation of Extracellular Signal-Regulated Kinase 1/2 and Akt Signaling Pathways. *Diabetes* 55, 2470–2478.

Whitmer, R.A., Gunderson, E.P., Barrett-Connor, E., Quesenberry, C.P., and Yaffe, K. (2005). Obesity in middle age and future risk of dementia: a 27 year longitudinal population based study. *BMJ: British Medical Journal* 330, 1360.

Whittle, A.J., Carobbio, S., Martins, L., Slawik, M., Hondares, E., Vázquez, M.J., Morgan, D., Csikasz, R.I., Gallego, R., Rodriguez-Cuenca, S., et al. (2012). BMP8B Increases

- Brown Adipose Tissue Thermogenesis through Both Central and Peripheral Actions. *Cell* 149, 871–885.
- WHO Consultation on Obesity (1999: Geneva, S.& W., and Obesity, H.Organization. (2000). OBESITY: Preventing and managing the global epidemic.
- World Health Organization (2016). GLOBAL REPORT ON DIABETES.
- World Health Organization (2021). Obesity and overweight.
- World Obesity Federation (2020). Obesity: missing the 2025 global targets.
- World Obesity Federation (2021). COVID-19 and Obesity: The 2021 Atlas.
- Wu, J., Boström, P., Sparks, L.M., Ye, L., Choi, J.H., Giang, A.H., Khandekar, M., Virtanen, K.A., Nuutila, P., Schaart, G., et al. (2012). Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. *Cell* 150, 366–376.
- Xie, Q., Bu, W., Bhatia, S., Hare, J., Somasundaram, T., Azzi, A., and Chapman, M.S. (2002). The atomic structure of adeno-associated virus (AAV-2), a vector for human gene therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99, 10405–10410.
- 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. (2009a). Fibroblast Growth Factor 21 Reverses Hepatic Steatosis, Increases Energy Expenditure, and Improves Insulin Sensitivity in Diet-Induced Obese Mice. *Diabetes* 58, 250–259.
- Xu, J., Stanislaus, S., Chinookoswong, N., Lau, Y.Y., Hager, T., Patel, J., Ge, H., Weiszmann, J., Lu, S.C., Graham, M., et al. (2009b). Acute glucose-lowering and insulin-sensitizing action of FGF21 in insulin-resistant mouse models - Association with liver and adipose tissue effects. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism* 297, 1105–1114.
- Xue, M., Xu, W., Ou, Y.N., Cao, X.P., Tan, M.S., Tan, L., and Yu, J.T. (2019). Diabetes mellitus and risks of cognitive impairment and dementia: A systematic review and meta-analysis of 144 prospective studies. *Ageing Research Reviews* 55, 100944.
- Yaffe, K., Falvey, C., Hamilton, N., Schwartz, A. v., Simonsick, E.M., Satterfield, S., Cauley, J.A., Rosano, C., Launer, L.J., Strotmeyer, E.S., et al. (2012). Diabetes, Glucose Control, and 9-Year Cognitive Decline Among Older Adults Without Dementia. *Archives of Neurology* 69, 1170–1175.
- Yan, H., Xia, M., Chang, X., Xu, Q., Bian, H., Zeng, M., Rao, S., Yao, X., Tu, Y., Jia, W., et al. (2011). Circulating Fibroblast Growth Factor 21 Levels Are Closely Associated with Hepatic Fat Content: A Cross-Sectional Study. *PLOS ONE* 6, e24895.
- Yan, J., Nie, Y., Cao, J., Luo, M., Yan, M., Chen, Z., and He, B. (2021). The Roles and Pharmacological Effects of FGF21 in Preventing Aging-Associated Metabolic Diseases. *Frontiers in Cardiovascular Medicine* 0, 221.
- Yau, P.L., Castro, M.G., Tagani, A., Tsui, W.H., and Convit, A. (2012). Obesity and Metabolic Syndrome and Functional and Structural Brain Impairments in Adolescence. *Pediatrics* 130, e856.
- Yoneda, S., Uno, S., Iwahashi, H., Fujita, Y., Yoshikawa, A., Kozawa, J., Okita, K., Takiuchi, D., Eguchi, H., Nagano, H., et al. (2013). Predominance of  $\beta$ -cell neogenesis



rather than replication in humans with an impaired glucose tolerance and newly diagnosed diabetes. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 98, 2053–2061.

Yu, H., Xia, F., Lam, K.S.L., Wang, Y., Bao, Y., Zhang, J., Gu, Y., Zhou, P., Lu, J., Jia, W., et al. (2011). Circadian Rhythm of Circulating Fibroblast Growth Factor 21 Is Related to Diurnal Changes in Fatty Acids in Humans. *Clinical Chemistry* 57, 691–700.

Yu, Y., Bai, F., Wang, W., Liu, Y., Yuan, Q., Qu, S., Zhang, T., Tian, G., Li, S., Li, D., et al. (2015). Fibroblast growth factor 21 protects mouse brain against D-galactose induced aging via suppression of oxidative stress response and advanced glycation end products formation. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 133, 122–131.

Zhao, L., Niu, J., Lin, H., Zhao, J., Liu, Y., Song, Z., Xiang, C., Wang, X., Yang, Y., Li, X., et al. (2019). Paracrine-endocrine FGF chimeras as potent therapeutics for metabolic diseases. *EBioMedicine* 48, 462–477.

Zhen, E.Y., Jin, Z., Ackermann, B.L., Thomas, M.K., and Gutierrez, J.A. (2016). Circulating FGF21 proteolytic processing mediated by fibroblast activation protein. *Biochemical Journal* 473, 605–614.

Zheng, Y., Ley, S.H., and Hu, F.B. (2018). Global aetiology and epidemiology of type 2 diabetes mellitus and its complications. *Nature Reviews Endocrinology* 14, 88–98.

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. *Molecular Therapy* 16, 1073–1080.

Zu, H., and Gao, D. (2021). Non-viral Vectors in Gene Therapy: Recent Development, Challenges, and Prospects. *The AAPS Journal* 23.

Abdul-Ghani, M.A., and DeFronzo, R.A. (2010). Pathogenesis of insulin resistance in skeletal muscle. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2010.

Abner, E.L., Nelson, P.T., Kryscio, R.J., Schmitt, F.A., Fardo, D.W., Woltjer, R.L., Cairns, N.J., Yu, L., Dodge, H.H., Xiong, C., et al. (2016). Diabetes is associated with cerebrovascular but not Alzheimer's disease neuropathology. *Alzheimer's & Dementia* 12, 882–889.

Abu-Odeh, M., Zhang, Y., Reilly, S.M., Ebadat, N., Keinan, O., Valentine, J.M., Hafezi-Bakhtiari, M., Ashayer, H., Mamoun, L., Zhou, X., et al. (2021). FGF21 promotes thermogenic gene expression as an autocrine factor in adipocytes. *Cell Reports* 35, 109331.

Adab, P., Pallan, M., and Whincup, P.H. (2018). Is BMI the best measure of obesity? *BMJ* 360.

Adams, A.C., Coskun, T., Rovira, A.R., Schneider, M.A., Raches, D.W., Micanovic, R., Bina, H.A., Dunbar, J.D., and Kharitonov, A. (2012). Fundamentals of FGF19 & FGF21 Action In Vitro and In Vivo. *PLOS ONE* 7, e38438.

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. *Molecular Metabolism* 2, 31.

- 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 Kharitononkov, A. (2013b). LY2405319, an Engineered FGF21 Variant, Improves the Metabolic Status of Diabetic Monkeys. *PLOS ONE* 8, e65763.
- Albright, B.H., Storey, C.M., Murlidharan, G., Castellanos Rivera, R.M., Berry, G.E., Madigan, V.J., and Asokan, A. (2018). Mapping the Structural Determinants Required for AAVrh.10 Transport across the Blood-Brain Barrier. *Molecular Therapy* 26, 510–523.
- 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 (2021a). 2. Classification and diagnosis of diabetes: Standards of medical care in diabetes-2021. *Diabetes Care* 44, S15–S33.
- American Diabetes Association (2021b). 9. Pharmacologic Approaches to Glycemic Treatment: Standards of Medical Care in Diabetes—2021. *Diabetes Care* 44, S111–S124.
- American Diabetes Association (2021c). 5. Facilitating Behavior Change and Well-being to Improve Health Outcomes: Standards of Medical Care in Diabetes—2021. *Diabetes Care* 44, S53–S72.
- American Diabetes Association (2021d). 8. Obesity Management for the Treatment of Type 2 Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes—2021. *Diabetes Care* 44, S100–S110.
- Amiri, M., Braidy, N., and Aminzadeh, M. (2018). Protective Effects of Fibroblast Growth Factor 21 Against Amyloid-Beta1–42-Induced Toxicity in SH-SY5Y Cells. *Neurotoxicity Research* 34, 574–583.
- Andersen, B., Straarup, E.M., Heppner, K.M., Takahashi, D.L., Raffaele, V., Dissen, G.A., Lewandowski, K., Bødvarsdottir, T.B., Raun, K., Grove, K.L., et al. (2018). FGF21 decreases body weight without reducing food intake or bone mineral density in high-fat fed obese rhesus macaque monkeys. *International Journal of Obesity* 2018 42:6 42, 1151–1160.
- Arafat, A.M., Kaczmarek, P., Skrzypski, M., Pruszyńska-Oszmerek, E., Kołodziejki, P., Szczepankiewicz, D., Sassek, M., Wojciechowicz, T., Wiedenmann, B., Pfeiffer, A.F.H., et al. (2013). Glucagon increases circulating fibroblast growth factor 21 independently of endogenous insulin levels: A novel mechanism of glucagon-stimulated lipolysis? *Diabetologia* 56, 588–597.
- Arnold, S.E., Lucki, I., Brookshire, B.R., Carlson, G.C., Browne, C.A., Kazi, H., Bang, S., Choi, B.R., Chen, Y., McMullen, M.F., et al. (2014). High fat diet produces brain insulin resistance, synaptodendritic abnormalities and altered behavior in mice. *Neurobiology of Disease* 67, 79–87.
- Aschauer, D.F., Kreuz, S., and Rumpel, S. (2013). Analysis of Transduction Efficiency, Tropism and Axonal Transport of AAV Serotypes 1, 2, 5, 6, 8 and 9 in the Mouse Brain. *PLoS ONE* 8.
- 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. (2009). High AAV vector purity results in

- serotype- and tissue-independent enhancement of transduction efficiency. *Gene Therapy* 2010 17:4 17, 503–510.
- Ayuso, E., Mingozi, F., and Bosch, F. (2010). Production, Purification and Characterization of Adeno-Associated Vectors. *Current Gene Therapy* 10, 423–436.
- Badman, M.K., Pissios, P., Kennedy, A.R., Koukos, G., Flier, J.S., and Maratos-Flier, E. (2007). Hepatic Fibroblast Growth Factor 21 Is Regulated by PPAR $\alpha$  and Is a Key Mediator of Hepatic Lipid Metabolism in Ketotic States. *Cell Metabolism* 5, 426–437.
- Baker, L.D., Frank, L.L., Foster-Schubert, K., Green, P.S., Wilkinson, C.W., McTiernan, A., Cholerton, B.A., Plymate, S.R., Fishel, M.A., Watson, G.S., et al. (2010). Aerobic Exercise Improves Cognition for Older Adults with Glucose Intolerance, A Risk Factor for Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis* 22, 569.
- Balakrishnan, B., and Jayandharan, G. (2014). Basic Biology of Adeno-Associated Virus (AAV) Vectors Used in Gene Therapy. *Current Gene Therapy* 14, 86–100.
- Banks, W.A., Owen, J.B., and Erickson, M.A. (2012). Insulin in the brain: There and back again. *Pharmacology & Therapeutics* 136, 82–93.
- Benedict, C., Hallschmid, M., Hatke, A., Schultes, B., Fehm, H.L., Born, J., and Kern, W. (2004). Intranasal insulin improves memory in humans. *Psychoneuroendocrinology* 29, 1326–1334.
- Benedict, C., Hallschmid, M., Schmitz, K., Schultes, B., Ratter, F., Fehm, H.L., Born, J., and Kern, W. (2006). Intranasal Insulin Improves Memory in Humans: Superiority of Insulin Aspart. *Neuropsychopharmacology* 2007 32:1 32, 239–243.
- Bentham, J., di Cesare, M., Bilano, V., Bixby, H., Zhou, B., Stevens, G.A., Riley, L.M., Taddei, C., Hajifathalian, K., Lu, Y., et al. (2017). Worldwide trends in body-mass index, underweight, overweight, and obesity from 1975 to 2016: a pooled analysis of 2416 population-based measurement studies in 128.9 million children, adolescents, and adults. *The Lancet* 390, 2627–2642.
- van den Berg, E., Reijmer, Y.D., de Bresser, J., Kessels, R.P.C., Kappelle, L.J., and Biessels, G.J. (2010). A 4 year follow-up study of cognitive functioning in patients with type 2 diabetes mellitus. *Diabetologia* 53, 58.
- 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. *International Journal of Molecular Sciences* 2016, Vol. 17, Page 774 17, 774.
- Betz, M.J., and Enerbäck, S. (2017). Targeting thermogenesis in brown fat and muscle to treat obesity and metabolic disease. *Nature Reviews Endocrinology* 2017 14:2 14, 77–87.
- Beydoun, M.A., Beydoun, H.A., and Wang, Y. (2008). Obesity and central obesity as risk factors for incident dementia and its sub-types: A systematic review and meta-analysis. *Obes Rev* 9, 204.
- Biessels, G.J., and Reijmer, Y.D. (2014). Brain Changes Underlying Cognitive Dysfunction in Diabetes: What Can We Learn From MRI? *Diabetes* 63, 2244–2252.

- Biessels, G.J., Strachan, M.W.J., Visseren, F.L.J., Kappelle, L.J., and Whitmer, R.A. (2014). Dementia and cognitive decline in type 2 diabetes and prediabetic stages: towards targeted interventions. *The Lancet Diabetes & Endocrinology* 2, 246–255.
- Bimboim, H.C., and Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research* 7, 1513–1523.
- Birkenfeld, A.L., and Shulman, G.I. (2014). Nonalcoholic fatty liver disease, hepatic insulin resistance, and type 2 Diabetes. *Hepatology* 59, 713–723.
- Black, B.L., Croom, J., Eisen, E.J., Petro, A.E., Edwards, C.L., and Surwit, R.S. (1998). Differential effects of fat and sucrose on body composition in AJ and C57BL/6 mice. *Metabolism* 47, 1354–1359.
- Blüher, M. (2019). Obesity: global epidemiology and pathogenesis. *Nature Reviews Endocrinology* 2019 15:5 15, 288–298.
- Bondurant, L.D., Ameka, M., Naber, M.C., Walsh, S.A., Ornitz, D.M., and Potthoff, M.J. (2017). FGF21 Regulates Metabolism Through Adipose-Dependent and -Independent Mechanisms. *Cell Metabolism* 25, 935–944.
- Bookout, A.L., de Groot, M.H.M., Owen, B.M., Lee, S., Gautron, L., Lawrence, H.L., Ding, X., Elmquist, J.K., Takahashi, J.S., Mangelsdorf, D.J., et al. (2013). FGF21 regulates metabolism and circadian behavior by acting on the nervous system. *Nature Medicine* 19, 1147–1152.
- Boutin, S., Monteilhet, V., Veron, P., Leborgne, C., Benveniste, O., Montus, M.F., and Masurier, C. (2010). Prevalence of serum IgG and neutralizing factors against adeno-associated virus (AAV) types 1, 2, 5, 6, 8, and 9 in the healthy population: Implications for gene therapy using AAV vectors. *Human Gene Therapy* 21, 704–712.
- de Bresser, J., Tiehuis, A.M., van den Berg, E., Reijmer, Y.D., Jongen, C., Kappelle, L.J., Mali, W.P., Viergever, M.A., and Biessels, G.J. (2010). Progression of Cerebral Atrophy and White Matter Hyperintensities in Patients With Type 2 Diabetes. *Diabetes Care* 33, 1309.
- van den Brink, A.C., Brouwer-Brolsma, E.M., Berendsen, A.A.M., and van de Rest, O. (2019). The Mediterranean, Dietary Approaches to Stop Hypertension (DASH), and Mediterranean-DASH Intervention for Neurodegenerative Delay (MIND) Diets Are Associated with Less Cognitive Decline and a Lower Risk of Alzheimer's Disease—A Review. *Advances in Nutrition* 10, 1040–1065.
- Büning, H., Ried, M.U., Perabo, L., Gerner, F.M., Huttner, N.A., Enssle, J., and Hallek, M. (2003). Receptor targeting of adeno-associated virus vectors. *Gene Therapy* 2003 10:14 10, 1142–1151.
- Büning, H., Perabo, L., Coutelle, O., Quadt-Humme, S., and Hallek, M. (2008). Recent developments in adeno-associated virus vector technology. *J Gene Med* 10, 717–733.
- 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.
- Camacho, R.C., Zafian, P.T., Achanfuo-Yeboah, J., Manibusan, A., and Berger, J.P. (2013). Pegylated Fgf21 rapidly normalizes insulin-stimulated glucose utilization in diet-induced insulin resistant mice. *European Journal of Pharmacology* 715, 41–45.

- Candeias, E.M., Sebastião, I.C., Cardoso, S.M., Correia, S.C., Carvalho, C.I., PI&acutecido, A.I., Santos, M.S., Oliveira, C.R., Moreira, P.I., and Duarte, A.I. (2015). Gut-brain connection: The neuroprotective effects of the anti-diabetic drug liraglutide. *Http://Www.Wjgnet.Com/ 6*, 807–827.
- Cannon, B., de Jong, J.M.A., Fischer, A.W., Nedergaard, J., and Petrovic, N. (2020). Human brown adipose tissue: Classical brown rather than brite/beige? *Experimental Physiology 105*, 1191–1200.
- Carter, B.J. (2004). Adeno-associated virus and the development of adeno-associated virus vectors: a historical perspective. *Molecular Therapy 10*, 981–989.
- Caspard, H., Jabbour, S., Hammar, N., Fenici, P., Sheehan, J.J., and Kosiborod, M. (2018). Recent trends in the prevalence of type 2 diabetes and the association with abdominal obesity lead to growing health disparities in the USA: An analysis of the NHANES surveys from 1999 to 2014. *Diabetes, Obesity and Metabolism 20*, 667–671.
- Castle, M.J., Turunen, H.T., Vandenberghe, L.H., and Wolfe, J.H. (2016). Controlling AAV tropism in the nervous system with natural and engineered capsids. In *Methods in Molecular Biology*, (Humana Press Inc.), pp. 133–149.
- Centers for Disease Control and Prevention (2021). Obesity, Race/Ethnicity, and COVID-19 | Overweight & Obesity | CDC.
- Cerf, M.E. (2013). Beta cell dysfunction and insulin resistance. *Frontiers in Endocrinology 4*, 37.
- Cerf, M.E. (2015). High fat programming of beta cell compensation, exhaustion, death and dysfunction. *Pediatric 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. (2016). Fibroblast growth factor-21 restores insulin sensitivity but induces aberrant bone microstructure in obese insulin-resistant rats. *Journal of Bone and Mineral Metabolism 2016 35:2 35*, 142–149.
- Chen, J., Hu, J., Liu, H., Xiong, Y., Zou, Y., Huang, W., Shao, M., Wu, J., Yu, L., Wang, X., et al. (2018). FGF21 protects the blood-brain barrier by upregulating PPAR $\gamma$  via FGFR1/ $\beta$ -klotho after traumatic brain injury. *Journal of Neurotrauma 35*, 2091–2103.
- Chen, S., Chen, S.T., Sun, Y., Xu, Z., Wang, Y., Yao, S.Y., Yao, W.B., and Gao, X.D. (2019). Fibroblast growth factor 21 ameliorates neurodegeneration in rat and cellular models of Alzheimer's disease. *Redox Biology 22*.
- Chen, W., Hu, Y., and Ju, D. (2020). Gene therapy for neurodegenerative disorders: advances, insights and prospects. *Acta Pharmaceutica Sinica B 10*, 1347–1359.
- Cheng, D. (2005). Prevalence, predisposition and prevention of type II diabetes. *Nutrition and Metabolism 2*, 1–12.
- Chira, S., Jackson, C.S., Oprea, I., Ozturk, F., Pepper, M.S., Diaconu, I., Braicu, C., Raduly, L.-Z., Calin, G.A., Berindan-Neagoe, I., et al. (2015). Progresses towards safe and efficient gene therapy vectors. *Oncotarget 6*, 30675–30703.
- 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. *Frontiers in Endocrinology 7*, 30.

Christoffersen, B., Straarup, E.M., Lykkegaard, K., Fels, J.J., Sass-Ørum, K., Zhang, X., Raun, K., and Andersen, B. (2019). FGF21 decreases food intake and body weight in obese Göttingen minipigs. *Diabetes, Obesity and Metabolism* 21, 592–600.

Claxton, A., Baker, L.D., Wilkinson, C.W., Trittschuh, E.H., Chapman, D., Watson, G.S., Cholerton, B., Plymate, S.R., Arbuckle, M., and Craft, S. (2013). Sex and ApoE Genotype Differences in Treatment Response to Two Doses of Intranasal Insulin in Adults with Mild Cognitive Impairment or Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis* 35, 789.

Claxton, A., Baker, L.D., Hanson, A., Trittschuh, E.H., Cholerton, B., Morgan, A., Callaghan, M., Arbuckle, M., Behl, C., and Craft, S. (2015). Long-Acting Intranasal Insulin Detemir Improves Cognition for Adults with Mild Cognitive Impairment or Early-Stage Alzheimer's Disease Dementia. *Journal of Alzheimer's Disease* 44, 897–906.

Clegg, D.J., Gotoh, K., Kemp, C., Wortman, M.D., Benoit, S.C., Brown, L.M., D'Alessio, D., Tso, P., Seeley, R.J., and Woods, S.C. (2011). Consumption of a high-fat diet induces central insulin resistance independent of adiposity. *Physiology & Behavior* 103, 10–16.

Cornelis, M.C., Zaitlen, N., Hu, F.B., Kraft, P., and Price, A.L. (2015). Genetic and environmental components of family history in type 2 diabetes. *Human Genetics* 134, 259–267.

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.

Craft, S., Raman, R., Chow, T.W., Rafii, M.S., Sun, C.K., Rissman, R.A., Donohue, M.C., Brewer, J.B., Jenkins, C., Harless, K., et al. (2020). Safety, Efficacy, and Feasibility of Intranasal Insulin for the Treatment of Mild Cognitive Impairment and Alzheimer Disease Dementia: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Neurology* 77, 1099–1109.

Cuadrado, A., Orive, A., García-Suárez, C., Domínguez, A., Fernández-Escatante, J.C., Crespo, J., and Pons-Romero, F. (2005). Non-alcoholic Steatohepatitis (NASH) and Hepatocellular Carcinoma. *Obesity Surgery* 2005 15:3 15, 442–446.

Desai, B.N., Singhal, G., Watanabe, M., Stevanovic, D., Lundasen, T., Fisher, ffolliott M., Mather, M.L., Vardeh, H.G., Douris, N., Adams, A.C., et al. (2017). Fibroblast growth factor 21 (FGF21) is robustly induced by ethanol and has a protective role in ethanol associated liver injury. *Molecular Metabolism* 6, 1395–1406.

Deverman, B.E., Ravina, B.M., Bankiewicz, K.S., Paul, S.M., and Sah, D.W.Y. (2018). Gene therapy for neurological disorders: progress and prospects. *Nature Reviews Drug Discovery* 2018 17:9 17, 641–659.

Diabetes Prevention Program Research Group (2002). Reduction in the Incidence of Type 2 Diabetes with Lifestyle Intervention or Metformin. *The New England Journal of Medicine* 346, 393–403.

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.

- Douris, N., Stevanovic, D.M., Fisher, F.M., Cisu, T.I., Chee, M.J., Nguyen, N.L., Zarebidaki, E., Adams, A.C., Kharitononkov, 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.
- Duarte, A.I., Candeias, E., Correia, S.C., Santos, R.X., Carvalho, C., Cardoso, S., Plácido, A., Santos, M.S., Oliveira, C.R., and Moreira, P.I. (2013). Crosstalk between diabetes and brain: Glucagon-like peptide-1 mimetics as a promising therapy against neurodegeneration. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1832, 527–541.
- Dushay, J., Chui, P.C., Gopalakrishnan, G.S., Varela-Rey, M., Crawley, M., Fisher, F.M., Badman, M.K., Martinez-Chantar, M.L., and Maratos-Flier, E. (2010). Increased Fibroblast Growth Factor 21 in Obesity and Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology* 139, 456–463.
- 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 $\gamma$  Activity and the Antidiabetic Actions of Thiazolidinediones. *Cell* 148, 556–567.
- Dye, L., Boyle, N.B., Champ, C., and Lawton, C. (2017). The relationship between obesity and cognitive health and decline. *Proceedings of the Nutrition Society* 76, 443–454.
- Dyson, P.A. (2010). The therapeutics of lifestyle management on obesity. *Diabetes, Obesity and Metabolism* 12, 941–946.
- Eberling, J.L., Jagust, W.J., Christine, C.W., Starr, P., Larson, P., Bankiewicz, K.S., and Aminoff, M.J. (2008). Results from a phase I safety trial of hAADC gene therapy for Parkinson disease. *Neurology* 70, 1980–1983.
- Egawa, M., Yoshimatsu, H., and Bray, G.A. (1990). Preoptic area injection of corticotropin-releasing hormone stimulates sympathetic activity. <https://doi.org/10.1152/Ajpregu.1990.259.4.R799> 259.
- Eijkelenboom, A., and Burgering, B.M.T. (2013). FOXOs: signalling integrators for homeostasis maintenance. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2013 14:2 14, 83–97.
- Ekerot, M., Stavridis, M.P., Delavaine, L., Mitchell, M.P., Staples, C., Owens, D.M., Keenan, I.D., Dickinson, R.J., Storey, K.G., and Keyse, S.M. (2008). Negative-feedback regulation of FGF signalling by DUSP6/MKP-3 is driven by ERK1/2 and mediated by Ets factor binding to a conserved site within the DUSP6/MKP-3 gene promoter. *Biochemical Journal* 412, 287–298.
- Eknoyan, G. (2007). Adolphe Quetelet (1796–1874)—the average man and indices of obesity. *Nephrology Dialysis Transplantation* 23, 47–51.
- Emanuelli, B., Vienberg, S.G., Smyth, G., Cheng, C., Stanford, K.I., Arumugam, M., Michael, M.D., Adams, A.C., Kharitononkov, A., and Kahn, C.R. (2014). Interplay between FGF21 and insulin action in the liver regulates metabolism. *The Journal of Clinical Investigation* 124, 515.
- Espeland, M.A., Bryan, R.N., Goveas, J.S., Robinson, J.G., Siddiqui, M.S., Liu, S., Hogan, P.E., Casanova, R., Coker, L.H., Yaffe, K., et al. (2013). Influence of Type 2 Diabetes on Brain Volumes and Changes in Brain Volumes. *Diabetes Care* 36, 90–97.

Falvey, C.M., Rosano, C., Simonsick, E.M., Harris, T., Strotmeyer, E.S., Satterfield, S., and Yaffe, K. (2013). Macro- and Microstructural Magnetic Resonance Imaging Indices Associated With Diabetes Among Community-Dwelling Older Adults. *Diabetes Care* 36, 677–682.

Fang, X., Ma, J., Mu, D., Li, B., Lian, B., and Sun, C. (2020). FGF21 Protects Dopaminergic Neurons in Parkinson's Disease Models Via Repression of Neuroinflammation. *Neurotoxicity Research* 37, 616–627.

Farrell, G., Schattenberg, J.M., Leclercq, I., Yeh, M.M., Goldin, R., Teoh, N., and Schuppan, D. (2019). Mouse Models of Nonalcoholic Steatohepatitis: Toward Optimization of Their Relevance to Human Nonalcoholic Steatohepatitis. *Hepatology* 69, 2241–2257.

Fisher, F.M., and Maratos-Flier, E. (2016). Understanding the Physiology of FGF21. *Annual Review of Physiology* 78, 223–241.

Fisher, F.M., Chui, P.C., Nasser, I.A., Popov, Y., Cunniff, J.C., Lundasen, T., Kharitonov, A., Schuppan, D., Flier, J.S., and Maratos-Flier, E. (2014). Fibroblast Growth Factor 21 Limits Lipotoxicity by Promoting Hepatic Fatty Acid Activation in Mice on Methionine and Choline-Deficient Diets. *Gastroenterology* 147, 1073-1083.e6.

Fisher, 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). Adaptive thermogenesis FGF21 regulates PGC-1 $\alpha$  and browning of white adipose tissues in adaptive thermogenesis. *Genes and Development* 26, 271–281.

Flippo, K.H., and Potthoff, M.J. (2021). Metabolic Messengers: FGF21. *Nature Metabolism* 2021 3:3 3, 309–317.

Flippo, K.H., Trammell, S.A.J., Gillum, M.P., Aklan, I., Perez, M.B., Yavuz, Y., Smith, N.K., Jensen-Cody, S.O., Zhou, B., Claflin, K.E., et al. (2022). FGF21 suppresses alcohol consumption through an amygdalo-striatal circuit. *Cell Metabolism* 34, 317-328.e6.

Folch, J., Lees, M., and Sloane, G.H. (1957). A simple Method for the Isolation and Purification of Total Lipides from Animal Tissues. *JBC*.

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  $\beta$ Klotho/FGFR1c receptor complex. *Science Translational Medicine* 4.

Forrester, J. v., McMenamin, P.G., and Dando, S.J. (2018). CNS infection and immune privilege. *Nature Reviews Neuroscience* 2018 19:11 19, 655–671.

Furdui, C.M., Lew, E.D., Schlessinger, J., and Anderson, K.S. (2006). Autophosphorylation of FGFR1 kinase is mediated by a sequential and precisely ordered reaction. *Molecular Cell* 21, 711–717.

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 Metabolism* 18, 333–340.



- Gälman, C., Lundåsen, T., Kharitononkov, A., Bina, H.A., Eriksson, M., Hafström, I., Dahlin, M., Åmark, P., Angelin, B., and Rudling, M. (2008). The Circulating Metabolic Regulator FGF21 Is Induced by Prolonged Fasting and PPAR $\alpha$  Activation in Man. *Cell Metabolism* 8, 169–174.
- Gaspar, J.M., Baptista, F.I., MacEdo, M.P., and Ambrósio, A.F. (2015). Inside the Diabetic Brain: Role of Different Players Involved in Cognitive Decline. *ACS Chemical Neuroscience* 7, 131–142.
- Gaulton, K.J., Ferreira, T., Lee, Y., Raimondo, A., Mägi, R., Reschen, M.E., Mahajan, A., Locke, A., Rayner, N.W., Robertson, N., et al. (2015). Genetic fine mapping and genomic annotation defines causal mechanisms at type 2 diabetes susceptibility loci. *Nature Genetics* 47, 1415–1425.
- Gauthier, S., Rosa-Neto, P., Morais, J.A., and Webster, C. (2021). World Alzheimer Report 2021: Journey through the diagnosis of dementia.
- Ge, X., Chen, C., Hui, X., Wang, Y., Lam, K.S.L., and Xu, A. (2011). Fibroblast growth factor 21 induces glucose transporter-1 expression through activation of the serum response factor/Ets-like protein-1 in adipocytes. *Journal of Biological Chemistry* 286, 34533–34541.
- Geng, L., Lam, K.S.L., and Xu, A. (2020). The therapeutic potential of FGF21 in metabolic diseases: from bench to clinic. *Nature Reviews Endocrinology* 2020 16:11 16, 654–667.
- 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. *Molecular and Cellular Biology* 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. *The Lancet* 376, 595–605.
- Gregg, E.W., Sattar, N., and Ali, M.K. (2016). The changing face of diabetes complications. *The Lancet Diabetes and Endocrinology* 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. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 9, 367–377.
- Guillemot-Legris, O., and Muccioli, G.G. (2017). Obesity-Induced Neuroinflammation: Beyond the Hypothalamus. *Trends in Neurosciences* 40, 237–253.
- Gustafson, B., Hedjazifar, S., Gogg, S., Hammarstedt, A., and Smith, U. (2015). Insulin resistance and impaired adipogenesis. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 26, 193–200.
- Guy, G.R., Jackson, R.A., Yusoff, P., and Chow, S.Y. (2009). Sprouty proteins: modified modulators, matchmakers or missing links? *Journal of Endocrinology* 191–202.

- Hadaczek, P., Stanek, L., Ciesielska, A., Sudhakar, V., Samaranch, L., Pivrotto, P., Bringas, J., O'Riordan, C., Mastis, B., San Sebastian, W., et al. (2016). Widespread AAV1- and AAV2-mediated transgene expression in the nonhuman primate brain: implications for Huntington's disease. *Molecular Therapy. Methods & Clinical Development* 3, 16037.
- Hameed, I., Masoodi, S.R., Mir, S.A., Nabi, M., Ghazanfar, K., and Ganai, B.A. (2015). Type 2 diabetes mellitus: From a metabolic disorder to an inflammatory condition. *World Journal of Diabetes* 6, 598.
- Harding, J.L., Pavkov, M.E., Magliano, D.J., Shaw, J.E., and Gregg, E.W. (2019). Global trends in diabetes complications: a review of current evidence. *Diabetologia* 62, 3–16.
- Haurigot, V., and Bosch, F. (2013). Toward a gene therapy for neurological and somatic MPSIIIA. *Rare Diseases* 1, e27209.
- Haurigot, V., Marcó, S., Ribera, A., Garcia, M., Ruzo, A., Villacampa, P., Ayuso, E., Añor, S., Andaluz, A., Pineda, M., et al. (2013). Whole body correction of mucopolysaccharidosis IIIA by intracerebrospinal fluid gene therapy. *The Journal of Clinical Investigation* 123, 3254–3271.
- 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, J.M., Lesniak, M.A., Pert, C.B., and Roth, J. (1986). Autoradiographic localization of insulin receptors in rat brain: Prominence in olfactory and limbic areas. *Neuroscience* 17, 1127–1138.
- 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. *Human Molecular Genetics* 18, 2975–2988.
- Himanshu, D., Ali, W., and Wamique, M. (2020). Type 2 diabetes mellitus: pathogenesis and genetic diagnosis. *Journal of Diabetes and Metabolic Disorders* 19, 1959–1966.
- Hirata, R.K., and Russell, D.W. (2000). Design and Packaging of Adeno-Associated Virus Gene Targeting Vectors. *Journal of Virology* 74, 4612–4620.
- Hironaka, K., Yamazaki, Y., Hirai, Y., Yamamoto, M., Miyake, N., Miyake, K., Okada, T., Morita, A., and Shimada, T. (2015). Enzyme replacement in the CSF to treat metachromatic leukodystrophy in mouse model using single intracerebroventricular injection of self-complementary AAV1 vector. *Scientific Reports* 2015 5:1 5, 1–12.
- Hocquemiller, M., Giersch, L., Audrain, M., Parker, S., and Cartier, N. (2016). Adeno-Associated Virus-Based Gene Therapy for CNS Diseases. *Human Gene Therapy* 27, 478–496.
- Hodge, C., Liao, J., Stofega, M., Guan, K., Carter-Su, C., and Schwartz, J. (1998). Growth Hormone Stimulates Phosphorylation and Activation of Elk-1 and Expression of c-fos, egr-1, and junB through Activation of Extracellular Signal-regulated Kinases 1 and 2 \*. *Journal of Biological Chemistry* 273, 31327–31336.

- Holland, W.L., Adams, A.C., Brozinick, J.T., Bui, H.H., Miyauchi, Y., Kusminski, C.M., Bauer, S.M., Wade, M., Singhal, E., Cheng, C.C., et al. (2013). An FGF21-Adiponectin-Ceramide Axis Controls Energy Expenditure and Insulin Action in Mice. *Cell Metabolism* 17, 790–797.
- von Holstein-Rathlou, S., Bondurant, L.D., Peltekian, L., Naber, M.C., Yin, T.C., Claflin, K.E., Urizar, A.I., Madsen, A.N., Ratner, C., Holst, B., et al. (2016). FGF21 mediates endocrine control of simple sugar intake and sweet taste preference by the liver. *Cell Metabolism* 23, 335–343.
- 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 \*. *Journal of Biological Chemistry* 286, 12983–12990.
- Hsuchou, H., Pan, W., and Kastin, A.J. (2007). The fasting polypeptide FGF21 can enter brain from blood. *Peptides (N.Y.)* 28, 2382.
- Hua, S., Liu, Q., Li, J., Fan, M., Yan, K., and Ye, D. (2021). Beta-klotho in type 2 diabetes mellitus: From pathophysiology to therapeutic strategies. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders* 2021 1–19.
- 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. *Molecular Carcinogenesis* 45, 934–942.
- Hughes, T.F., Borenstein, A.R., Schofield, E., Wu, Y., and Larson, E.B. (2009). Association between late-life body mass index and dementia. *Neurology* 72, 1741–1746.
- Hugo, J., and Ganguli, M. (2014). Dementia and Cognitive Impairment Epidemiology, Diagnosis, and Treatment. *Clinics in Geriatric Medicine*.
- Hultman, K., Scarlett, J.M., Baquero, A.F., Cornea, A., Zhang, Y., Salinas, C.B.G., Brown, J., Morton, G.J., Whalen, E.J., Grove, K.L., et al. (2019). The central fibroblast growth factor receptor/beta klotho system: Comprehensive mapping in *Mus musculus* and comparisons to nonhuman primate and human samples using an automated in situ hybridization platform. *Journal of Comparative Neurology* 527, 2069–2085.
- Hussain, M.F., Roesler, A., and Kazak, L. (2020). Regulation of adipocyte thermogenesis: mechanisms controlling obesity. *The FEBS Journal* 287, 3370–3385.
- Hwu, W.L., Muramatsu, S.I., Tseng, S.H., Tzen, K.Y., Lee, N.C., Chien, Y.H., Snyder, R.O., Byrne, B.J., Tai, C.H., and Wu, R.M. (2012). Gene therapy for aromatic L-amino acid decarboxylase deficiency. *Science Translational Medicine* 4.
- IDF (2021). *IDF Diabetes Atlas 10th edition*.
- Imamura, M., and Maeda, S. (2011). Genetics of type 2 diabetes: the GWAS era and future perspectives [Review]. *Endocrine Journal* 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 PPAR $\alpha$ -Mediated Induction of Fibroblast Growth Factor 21. *Cell Metabolism* 5, 415–425.

- 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, 1364–1379.
- Itoh, N., and Ornitz, D.M. (2004). Evolution of the Fgf and Fgfr gene families. *Trends in Genetics* 20, 563–569.
- Jackness, C., Karmally, W., Febres, G., Conwell, I.M., Ahmed, L., Bessler, M., McMahon, D.J., and Korner, J. (2013). Very Low-Calorie Diet Mimics the Early Beneficial Effect of Roux-en-Y Gastric Bypass on Insulin Sensitivity and  $\beta$ -Cell Function in Type 2 Diabetic Patients. *Diabetes* 62, 3027–3032.
- Jan Biessels, G., and Despa, F. (2018). Cognitive decline and dementia in diabetes mellitus: mechanisms and clinical implications. *Nature Reviews Endocrinology* 14, 591–604.
- Jan Biessels, G., and Reagan, L.P. (2015). Hippocampal insulin resistance and cognitive dysfunction.
- Jensen-Cody, S.O., Flippo, K.H., Claffin, K.E., Yavuz, Y., Sapouckey, S.A., Walters, G.C., Usachev, Y.M., Atasoy, D., Gillum, M.P., and Potthoff, M.J. (2020). FGF21 Signals to Glutamatergic Neurons in the Ventromedial Hypothalamus to Suppress Carbohydrate Intake. *Cell Metabolism* 32, 273-286.e6.
- Jiang, Y., Lin, L., Liu, N., Wang, Q., Yuan, J., Li, Y., Chung, K.K., Guo, S., Yu, Z., and Wang, X. (2020). FGF21 protects against aggravated blood-brain barrier disruption after ischemic focal stroke in diabetic db/db male mice via cerebrovascular PPAR $\gamma$  activation. *International Journal of Molecular Sciences* 21.
- Jimenez, V., Muñoz, S., Casana, E., Mallol, C., Elias, I., Jambrina, C., Ribera, A., Ferre, T., Franckhauser, S., and Bosch, F. (2013). In Vivo Adeno-Associated Viral Vector-Mediated Genetic Engineering of White and Brown Adipose Tissue in Adult Mice. *Diabetes* 62, 4012–4022.
- Jimenez, V., Jambrina, C., Casana, E., Sacristan, V., Muñoz, S., Darriba, S., Rodó, J., Mallol, C., Garcia, M., León, X., et al. (2018). FGF21 gene therapy as treatment for obesity and insulin resistance. *EMBO Molecular Medicine* 10, e8791.
- Johnson, C.L., Weston, J.Y., Chadi, S.A., Fazio, E.N., Huff, M.W., Kharitonov, A., Köester, A., and Pin, C.L. (2009). Fibroblast Growth Factor 21 Reduces the Severity of Cerulein-Induced Pancreatitis in Mice. *Gastroenterology* 137, 1795–1804.
- Jørgensen, J.A., Zdravec, D., and Jacobsson, A. (2007). Norepinephrine and rosiglitazone synergistically induce Elovl3 expression in brown adipocytes. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism* 293.
- Kahkoska, A.R., and Dabelea, D. (2021). Diabetes in Youth: A Global Perspective. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America* 50, 491–512.
- 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.
- Kang, K., Xu, P., Wang, M., Chunyu, J., Sun, X., Ren, G., Xiao, W., and Li, D. (2020a). FGF21 attenuates neurodegeneration through modulating neuroinflammation and oxidant-stress. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 129, 110439.

Kang, K., Xu, P., Wang, M., Chunyu, J., Sun, X., Ren, G., Xiao, W., and Li, D. (2020b). FGF21 attenuates neurodegeneration through modulating neuroinflammation and oxidant-stress. *Biomedicine and Pharmacotherapy* 129.

Katz, M.L., Tecedor, L., Chen, Y., Williamson, B.G., Lysenko, E., Wininger, F.A., Young, W.M., Johnson, G.C., Whiting, R.E.H., Coates, J.R., et al. (2015). AAV gene transfer delays disease onset in a TPP1-deficient canine model of the late infantile form of Batten disease. *Science Translational Medicine* 7.

Kaufman, A., Abuqayyas, L., Denney, W.S., Tillman, E.J., and Rolph, T. (2020). AKR-001, an Fc-FGF21 Analog, Showed Sustained Pharmacodynamic Effects on Insulin Sensitivity and Lipid Metabolism in Type 2 Diabetes Patients. *Cell Reports Medicine* 1, 100057.

Keeseey, R.E., and Powley, T.L. (2008). Body energy homeostasis. *Appetite* 51, 442–445.

Kellar, D., and Craft, S. (2020). Brain insulin resistance in Alzheimer's disease and related disorders: mechanisms and therapeutic approaches. *The Lancet Neurology* 19, 758–766.

Kelleher, F.C., O'Sullivan, H., Smyth, E., McDermott, R., and Viterbo, A. (2013). Fibroblast growth factor receptors, developmental corruption and malignant disease. *Carcinogenesis* 34, 2198–2205.

Kells, A.P., Hadaczek, P., Yin, D., Bringas, J., Varenika, V., Forsayeth, J., and Bankiewicz, K.S. (2009). Efficient gene therapy-based method for the delivery of therapeutics to primate cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 2407–2411.

Kern, W., Peters, A., Fruehwald-Schultes, B., Deininger, E., Born, J., and Fehm, H.L. (2001). Improving Influence of Insulin on Cognitive Functions in Humans. *Neuroendocrinology* 74, 270–280.

Keuper, M., Häring, H.U., and Staiger, H. (2020). Circulating FGF21 Levels in Human Health and Metabolic Disease. *Experimental and Clinical Endocrinology and Diabetes* 128, 752–770.

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. (2005). FGF-21 as a novel metabolic regulator. *The Journal of Clinical Investigation* 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.

Kharitonkov, A., Dunbar, J.D., Bina, H.A., Bright, S., Moyers, J.S., Zhang, C., Ding, L., Micanovic, R., Mehrbod, S.F., Knierman, M.D., et al. (2008). FGF-21/FGF-21 receptor interaction and activation is determined by  $\beta$ Klotho. *Journal of Cellular Physiology* 215, 1–7.

Kharitonkov, A., Beals, J.M., Micanovic, R., Strifler, B.A., Rathnachalam, R., Wroblewski, V.J., Li, S., Koester, A., Ford, A.M., Coskun, T., et al. (2013). Rational Design of a Fibroblast Growth Factor 21-Based Clinical Candidate, LY2405319. *PLOS ONE* 8, e58575.

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, Obesity and Metabolism* 19, 1762–1772.

Kim, K.H., Kim, S.H., Min, Y.K., Yang, H.M., Lee, J.B., and Lee, M.S. (2013). Acute Exercise Induces FGF21 Expression in Mice and in Healthy Humans. *PLOS ONE* 8, e63517.

Kim, S., Kim, Y., and Park, S.M. (2016). Body Mass Index and Decline of Cognitive Function. *PLoS ONE* 11.

Kimura, S., and Harashima, H. (2020). Current status and challenges associated with CNS-targeted gene delivery across the BBB. *Pharmaceutics* 12, 1–33.

Kinlen, D., Cody, D., and O'Shea, D. (2018). Complications of obesity. *QJM: An International Journal of Medicine* 111, 437–443.

Kleinert, M., Clemmensen, C., Hofmann, S.M., Moore, M.C., Renner, S., Woods, S.C., Huypens, P., Beckers, J., de Angelis, M.H., Schürmann, A., et al. (2018). Animal models of obesity and diabetes mellitus. *Nature Reviews Endocrinology* 2018 14:3 14, 140–162.

Kolb, H., and Martin, S. (2017). Environmental/lifestyle factors in the pathogenesis and prevention of type 2 diabetes. *BMC Medicine* 15.

Kotterman, M.A., and Schaffer, D. v. (2014). Engineering adeno-associated viruses for clinical gene therapy. *Nature Reviews Genetics* 2014 15:7 15, 445–451.

Kouhara, H., Hadari, Y.R., Spivak-Kroizman, T., Schilling, J., Bar-Sagi, D., Lax, I., and Schlessinger, J. (1997). A Lipid-Anchored Grb2-Binding Protein That Links FGF-Receptor Activation to the Ras/MAPK Signaling Pathway. *Cell* 89, 693–702.

Kowiański, P., Lietzau, G., Czuba, E., Waśkow, M., Steliga, A., and Moryś, J. (2017). BDNF: A Key Factor with Multipotent Impact on Brain Signaling and Synaptic Plasticity. *Cellular and Molecular Neurobiology* 2017 38:3 38, 579–593.

Kullmann, S., Heni, M., Hallschmid, M., Fritsche, A., Preissl, H., and Häring, H.-U. (2016). Brain Insulin Resistance at the Crossroads of Metabolic and Cognitive Disorders in Humans. *Physiol Rev* 96, 1169–1209.

Kullmann, S., Kleinridders, A., Small, D.M., Fritsche, A., Häring, H.-U., Preissl, H., and Heni, M. (2020). Series Diabetes and brain health 1 Central nervous pathways of insulin action in the control of metabolism and food intake.

Kuro-o, M. (2018). The Klotho proteins in health and disease. *Nature Reviews Nephrology* 2018 15:1 15, 27–44.

Kurosu, H., Choi, M., Ogawa, Y., Dickson, A.S., Goetz, R., Eliseenkova, A. v., Mohammadi, M., Rosenblatt, K.P., Klierer, S.A., and Kuro-O, M. (2007). Tissue-specific expression of  $\beta$ klotho and Fibroblast Growth Factor (FGF) receptor isoforms determines metabolic activity of FGF19 and FGF21. *Journal of Biological Chemistry* 282, 26687–26695.

Kushner, R.F., Calanna, S., Davies, M., Dicker, D., Garvey, W.T., Goldman, B., Lingvay, I., Thomsen, M., Wadden, T.A., Wharton, S., et al. (2020). Semaglutide 2.4

mg for the Treatment of Obesity: Key Elements of the STEP Trials 1 to 5. *Obesity* 28, 1050–1061.

Laeger, T., Henagan, T.M., Albarado, D.C., Redman, L.M., Bray, G.A., Noland, R.C., Münzberg, H., Hutson, S.M., Gettys, T.W., Schwartz, M.W., et al. (2014). FGF21 is an endocrine signal of protein restriction. *The Journal of Clinical Investigation* 124, 3913–3922.

Lamothe, B., Yamada, M., Schaeper, U., Birchmeier, W., Lax, I., and Schlessinger, J. (2004). The Docking Protein Gab1 Is an Essential Component of an Indirect Mechanism for Fibroblast Growth Factor Stimulation of the Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt Antiapoptotic Pathway. *Molecular and Cellular Biology* 24, 5657–5666.

Lan, T., Morgan, D.A., Rahmouni, K., Sonoda, J., Fu, X., Burgess, S.C., Holland, W.L., Kliewer, S.A., and Mangelsdorf, D.J. (2017). FGF19, FGF21, and an FGFR1/β-Klotho-Activating Antibody Act on the Nervous System to Regulate Body Weight and Glycemia. *Cell Metabolism* 26, 709-718.e3.

Langenberg, C., and Lotta, L.A. (2018). Genomic insights into the causes of type 2 diabetes. *The Lancet* 391, 2463–2474.

Launer, L.J., Miller, M.E., Williamson, J.D., Lazar, R.M., Gerstein, H.C., Murray, A.M., Sullivan, M., Horowitz, K.R., Ding, J., Marcovina, S., et al. (2011). Effects of intensive glucose lowering on brain structure and function in people with type 2 diabetes (ACCORD MIND): a randomised open-label substudy. *The Lancet Neurology* 10, 969–977.

Lee, J.H., Kang, Y.E., Chang, J.Y., Park, K.C., Kim, H.W., Kim, J.T., Kim, H.J., Yi, H.S., Shong, M., Chung, H.K., et al. (2016). An engineered FGF21 variant, LY2405319, can prevent non-alcoholic steatohepatitis by enhancing hepatic mitochondrial function. *American Journal of Translational Research* 8, 4750.

Lee, P., Linderman, J.D., Smith, S., Brychta, R.J., Wang, J., Idelson, C., Perron, R.M., Werner, C.D., Phan, G.Q., Kammula, U.S., et al. (2014). Irisin and FGF21 are cold-induced endocrine activators of brown fat function in humans. *Cell Metabolism* 19, 302–309.

Lew, E.D., Furdui, C.M., Anderson, K.S., and Schlessinger, J. (2009). The precise sequence of FGF receptor autophosphorylation is kinetically driven and is disrupted by oncogenic mutations. *Science Signaling* 2.

Li, C., and Samulski, R.J. (2020). Engineering adeno-associated virus vectors for gene therapy. *Nature Reviews Genetics* 2020 21:4 21, 255–272.

Li, Z.C., Xiao, J., Wang, G., Li, M.Q., Hu, K.Z., Ma, T., Wang, W.L., Liu, Z. de, and Zhang, J.D. (2015). Fibroblast growth factor-21 concentration in serum and synovial fluid is associated with radiographic bone loss of knee osteoarthritis. <https://doi.org/10.3109/00365513.2014.992942> 75, 121–125.

Liang, J., Matheson, B.E., Kaye, W.H., and Boutelle, K.N. (2014a). Neurocognitive correlates of obesity and obesity-related behaviors in children and adolescents. *International Journal of Obesity* 38, 494–506.

Liang, Q., Zhong, L., Zhang, J., Wang, Y., Bornstein, S.R., Triggle, C.R., Ding, H., Lam, K.S.L., and Xu, A. (2014b). FGF21 maintains glucose homeostasis by mediating the cross talk between liver and brain during prolonged fasting. *Diabetes* 63, 4064–4075.

- Lin, X., and Li, H. (2021). Obesity: Epidemiology, Pathophysiology, and Therapeutics. *Frontiers in Endocrinology* 12.
- Lin, Z., Tian, H., Lam, K.S.L., Lin, S., Hoo, R.C.L., Konishi, M., Itoh, N., Wang, Y., Bornstein, S.R., Xu, A., et al. (2013). Adiponectin Mediates the Metabolic Effects of FGF21 on Glucose Homeostasis and Insulin Sensitivity in Mice. *Cell Metabolism* 17, 779–789.
- Lisowski, L., Tay, S.S., and Alexander, I.E. (2015). Adeno-associated virus serotypes for gene therapeutics. *Current Opinion in Pharmacology* 24, 59–67.
- Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Method. *Methods* 25, 402–408.
- Livhits, M., Mercado, C., Yermilov, I., Parikh, J.A., Dutson, E., Mehran, A., Ko, C.Y., and Gibbons, M.M. (2011). Patient behaviors associated with weight regain after laparoscopic gastric bypass. *Obesity Research & Clinical Practice* 5, e258–e265.
- Loher, H., Kreis, R., Boesch, C., and Christ, E. (2016). The flexibility of ectopic lipids. *International Journal of Molecular Sciences* 17.
- Lu, J., Wu, D. mei, Zheng, Y. lin, Hu, B., Cheng, W., Zhang, Z. feng, and Shan, Q. (2011). Ursolic acid improves high fat diet-induced cognitive impairments by blocking endoplasmic reticulum stress and I $\kappa$ B kinase  $\beta$ /nuclear factor- $\kappa$ B-mediated inflammatory pathways in mice. *Brain, Behavior, and Immunity* 25, 1658–1667.
- Luchsinger, J.A., Perez, T., Chang, H., Mehta, P., Steffener, J., Pradabhan, G., Ichise, M., Manly, J., Devanand, D.P., and Bagiella, E. (2016). Metformin in Amnesic Mild Cognitive Impairment: Results of a Pilot Randomized Placebo Controlled Clinical Trial. *Journal of Alzheimer's Disease* 51, 501–514.
- Lundsgaard, A.M., Fritzen, A.M., Sjøberg, K.A., Myrmed, L.S., Madsen, L., Wojtaszewski, J.F.P., Richter, E.A., and Kiens, B. (2017). Circulating FGF21 in humans is potently induced by short term overfeeding of carbohydrates. *Molecular Metabolism* 6, 22–29.
- Ly, H., Verma, N., Wu, F., Liu, M., Saatman, K.E., Nelson, P.T., Slevin, J.T., Goldstein, L.B., Biessels, G.J., and Despa, F. (2017). Brain microvascular injury and white matter disease provoked by diabetes-associated hyperamylinemia. *Annals of Neurology* 82, 208–222.
- Maida, A., Zota, A., Sjøberg, K.A., Schumacher, J., Sijmonsma, T.P., Pfenninger, A., Christensen, M.M., Gantert, T., Fuhrmeister, J., Rothermel, U., et al. (2016). A liver stress-endocrine nexus promotes metabolic integrity during dietary protein dilution. *The Journal of Clinical Investigation* 126, 3263–3278.
- Mäkelä, J., Tselykh, T. v., Maiorana, F., Eriksson, O., Do, H.T., Mudò, G., Korhonen, L.T., Belluardo, N., and Lindholm, D. (2014). Fibroblast growth factor-21 enhances mitochondrial functions and increases the activity of PGC-1 $\alpha$  in human dopaminergic neurons via Sirtuin-1. *Springerplus* 3.
- Marcela Santos, L., Marcela, L., Nakayama Ohe, M., Giovanna Pallone, S., Sizue Kunii, I., Elen Costa Silva, R., Gabriel Pereira, B., Ohki Nacaguma, I., Gilberto Vieira, J., and Lazaretti-Castro, M. (2020). SAT-606 Distribution of Beta Klotho Gene Expression in the Mouse Brain. *J Endocr Soc* 4.



- Marcó, S., Haurigot, V., and Bosch, F. (2019). In Vivo Gene Therapy for Mucopolysaccharidosis Type III (Sanfilippo Syndrome): A New Treatment Horizon. *Human Gene Therapy* 30, 1211–1221.
- Marks, J.L., Porte, D., Stahl, W.L., and Basking, D.G. (1990). Localization of insulin receptor mRNA in rat brain by in situ hybridization. *Endocrinology* 127, 3234–3236.
- Matsui, S., Sasaki, T., Kohno, D., Yaku, K., Inutsuka, A., Yokota-Hashimoto, H., Kikuchi, O., Suga, T., Kobayashi, M., Yamanaka, A., et al. (2018). Neuronal SIRT1 regulates macronutrient-based diet selection through FGF21 and oxytocin signalling in mice. *Nature Communications* 2018 9:1 9, 1–17.
- McCarty, D.M., Young, S.M., and Samulski, R.J. (2004). Integration of Adeno-Associated Virus (AAV) and Recombinant AAV Vectors. [Http://Dx.Doi.Org/10.1146/Annurev.Genet.37.110801.143717](http://dx.doi.org/10.1146/annurev.genet.37.110801.143717) 38, 819–845.
- McNelis, J.C., and Olefsky, J.M. (2014). Macrophages, Immunity, and Metabolic Disease. *Immunity* 41, 36–48.
- Mendell, J.R., Al-Zaidy, S., Shell, R., Arnold, W.D., Rodino-Klapac, L.R., Prior, T.W., Lowes, L., Alfano, L., Berry, K., Church, K., et al. (2017). Single-Dose Gene-Replacement Therapy for Spinal Muscular Atrophy. *New England Journal of Medicine* 377, 1713–1722.
- Miehle, K., Ebert, T., Kralisch, S., Hoffmann, A., Kratzsch, J., Schlögl, H., Stumvoll, M., and Fasshauer, M. (2016). Serum concentrations of fibroblast growth factor 21 are elevated in patients with congenital or acquired lipodystrophy. *Cytokine* 83, 239–244.
- Ming, A.Y.K., Yoo, E., Vorontsov, E.N., Altamentova, S.M., Kilkenny, D.M., and Rocheleau, J. v. (2012). Dynamics and distribution of Klotho (KLB) and Fibroblast Growth Factor Receptor-1 (FGFR1) in living cells reveal the Fibroblast Growth Factor-21 (FGF21)-induced receptor complex. *Journal of Biological Chemistry* 287, 19997–20006.
- Mingozzi, F., and High, K.A. (2011). Therapeutic in vivo gene transfer for genetic disease using AAV: progress and challenges. *Nature Reviews Genetics* 2011 12:5 12, 341–355.
- Mittermeyer, G., Christine, C.W., Rosenbluth, K.H., Baker, S.L., Starr, P., Larson, P., Kaplan, P.L., Forsayeth, J., Aminoff, M.J., and Bankiewicz, K.S. (2011). Long-term evaluation of a phase 1 study of AADC gene therapy for parkinson's disease. *Human Gene Therapy* 23, 377–381.
- Morais, M., Faria, G., Preto, J., and Costa-Maia, J. (2016). Gallstones and Bariatric Surgery: To Treat or Not to Treat? *World Journal of Surgery* 40, 2904–2910.
- Moran, C., Beare, R., Phan, T., Starkstein, S., Bruce, D., Romina, M., and Srikanth, V. (2017). Neuroimaging and its Relevance to Understanding Pathways Linking Diabetes and Cognitive Dysfunction. *Journal of Alzheimer's Disease* 59, 405–419.
- Morigny, P., Houssier, M., Mouisel, E., and Langin, D. (2016). Adipocyte lipolysis and insulin resistance. *Biochimie* 125, 259–266.
- Morrison, C.D., Pistell, P.J., Ingram, D.K., Johnson, W.D., Liu, Y., Fernandez-Kim, S.O., White, C.L., Purpera, M.N., Uranga, R.M., Bruce-Keller, A.J., et al. (2010). High

fat diet increases hippocampal oxidative stress and cognitive impairment in aged mice: implications for decreased Nrf2 signaling. *Journal of Neurochemistry* 114, 1581–1589.

Motas, S., Haurigot, V., Garcia, M., Marcó, S., Ribera, A., Roca, C., Sánchez, X., Sánchez, V., Molas, M., Bertolin, J., et al. (2016). CNS-directed gene therapy for the treatment of neurologic and somatic mucopolysaccharidosis type II (Hunter syndrome). *JCI Insight* 1, 86696.

Mulligan, R.C. (1993). The Basic Science of Gene Therapy. *Science* (1979) 260, 926–932.

Munshi, M.N. (2017). Cognitive Dysfunction in Older Adults With Diabetes: What a Clinician Needs to Know. *Diabetes Care* 40, 461–467.

Muriach, M., Flores-Bellver, M., Romero, F.J., and Barcia, J.M. (2014). Diabetes and the Brain: Oxidative Stress, Inflammation, and Autophagy. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2014.

Murray, A.M., Hsu, F.C., Williamson, J.D., Bryan, R.N., Gerstein, H.C., Sullivan, M.D., Miller, M.E., Leng, I., Lovato, L.L., and Launer, L.J. (2017). ACCORDION MIND: results of the observational extension of the ACCORD MIND randomised trial. *Diabetologia* 60, 69–80.

Naldini, L. (2015). Gene therapy returns to centre stage. *Nature* 2015 526:7573 526, 351–360.

Naso, M.F., Tomkowicz, B., Perry, W.L., and Strohl, W.R. (2017). Adeno-Associated Virus (AAV) as a Vector for Gene Therapy. *BioDrugs* 2017 31:4 31, 317–334.

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. *Journal of Virology* 86, 13038–13048.

Nichols, E., Szoek, C.E.I., Vollset, S.E., Abbasi, N., Abd-Allah, F., Abdela, J., Aichour, M.T.E., Akinyemi, R.O., Alahdab, F., Asgedom, S.W., et al. (2019). Global, regional, and national burden of Alzheimer's disease and other dementias, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *The Lancet Neurology* 18, 88–106.

Nilsson, C., Raun, K., Yan, F.F., Larsen, M.O., and Tang-Christensen, M. (2012). Laboratory animals as surrogate models of human obesity. *Acta Pharmacologica Sinica* 2012 33:2 33, 173–181.

Nishimura, T., Nakatake, Y., Konishi, M., and Itoh, N. (2000). Identification of a novel FGF, FGF-21, preferentially expressed in the liver. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression* 1492, 203–206.

Odom, J., Zalesin, K.C., Washington, T.L., Miller, W.W., Hakmeh, B., Zaremba, D.L., Altattan, M., Balasubramaniam, M., Gibbs, D.S., Krause, K.R., et al. (2010). Behavioral predictors of weight regain after bariatric surgery. *Obesity Surgery* 20, 349–356.

Ogawa, K., Kato, N., and Kawakami, S. (2020). Recent Strategies for Targeted Brain Drug Delivery. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 68, 567–582.

Oishi, K., Uchida, D., and Ishida, N. (2008). Circadian expression of FGF21 is induced by PPAR $\alpha$  activation in the mouse liver. *FEBS Letters* 582, 3639–3642.

- 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. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 412, 396–400.
- Ornitz, D.M., and Itoh, N. (2015). The fibroblast growth factor signaling pathway. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology* 4, 215–266.
- 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. *Nature Medicine* 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 Metabolism* 20, 670–677.
- Park, C.R., Seeley, R.J., Craft, S., and Woods, S.C. (2000). Intracerebroventricular insulin enhances memory in a passive-avoidance task. *Physiology & Behavior* 68, 509–514.
- Pastors, J.G., Warshaw, H., Daly, A., Franz, M., and Kulkarni, K. (2002). The Evidence for the Effectiveness of Medical Nutrition Therapy in Diabetes Management. *Diabetes Care* 25, 608–613.
- Piguet, F., Alves, S., and Cartier, N. (2017). Clinical Gene Therapy for Neurodegenerative Diseases: Past, Present, and Future. <https://Home.Liebertpub.Com/Hum> 28, 988–1003.
- 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. *New England Journal of Medicine* 373, 11–22.
- Planavila, A., Redondo-Angulo, I., and Villarroya, F. (2015). FGF21 and Cardiac Physiopathology. *Frontiers in Endocrinology* 6.
- Popkin, B.M., Du, S., Green, W.D., Beck, M.A., Algaith, T., Herbst, C.H., Alsukait, R.F., Alluhidan, M., Alazemi, N., and Shekar, M. (2020). Individuals with obesity and COVID-19: A global perspective on the epidemiology and biological relationships. *Obesity Reviews* 21.
- Powell, S.K., Rivera-Soto, R., and Gray, S.J. (2015). Viral Expression Cassette Elements to Enhance Transgene Target Specificity and Expression in Gene Therapy. *Discov Med* 19, 49.
- Prasad, R.B., and Groop, L. (2015). Genetics of type 2 diabetes—pitfalls and possibilities. *Genes (Basel)* 6, 87–123.
- Prince, M., Bryce, R., Albanese, E., Wimo, A., Ribeiro, W., and Ferri, C.P. (2013). The global prevalence of dementia: A systematic review and metaanalysis. *Alzheimer's & Dementia* 9, 63-75.e2.
- Raji, C.A., Ho, A.J., Parikshak, N.N., Becker, J.T., Lopez, O.L., Kuller, L.H., Hua, X., Leow, A.D., Toga, A.W., and Thompson, P.M. (2010). Brain structure and obesity. *Hum Brain Mapp* 31, 353–364.

- Ren, B., Wang, L., Shi, L., Jin, X., Liu, Y., Liu, R.H., Yin, F., Cadenas, E., Dai, X., Liu, Z., et al. (2021). Methionine restriction alleviates age-associated cognitive decline via fibroblast growth factor 21. *Redox Biology* 41.
- Ribera, A., Haurigot, V., Garcia, M., Marcó, S., Motas, S., Villacampa, P., Maggioni, L., León, X., Molas, M., Sánchez, V., et al. (2015). Biochemical, histological and functional correction of mucopolysaccharidosis Type IIIB by intra-cerebrospinal fluid gene therapy. *Human Molecular Genetics* 24, 2078–2095.
- Ritchie, M., Hanouneh, I.A., Nouredin, M., Rolph, T., and Alkhouri, N. (2020). Fibroblast growth factor (FGF)-21 based therapies: A magic bullet for nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD)? *Expert Opinion on Investigational Drugs* 29, 197–204.
- Roca, C., Motas, S., Marco, S., Ribera, A., Sanchez, V., Sanchez, X., Bertolin, J., Leon, X., Perez, J., Garcia, M., et al. (2017). Disease correction by AAV-mediated gene therapy in a new mouse model of mucopolysaccharidosis type IIID. *Human Molecular Genetics* 26, 1535–1551.
- Roger, C., Lasbleiz, A., Guye, M., Dutour, A., Gaborit, B., and Ranjeva, J.P. (2022). The Role of the Human Hypothalamus in Food Intake Networks: An MRI Perspective. *Frontiers in Nutrition* 8, 1191.
- Ronzitti, G., Gross, D.A., and Mingozi, F. (2020). Human Immune Responses to Adeno-Associated Virus (AAV) Vectors. *Frontiers in Immunology* 11, 670.
- Rose Mayeda, E., Postdoctoral Fellow, M., Whitmer, R.A., and Yaffe, K. (2015). Diabetes and Cognition HHS Public Access. *Clin Geriatr Med* 31, 101.
- Rühlmann, C., Wölk, T., Blümel, T., Stahn, L., Vollmar, B., and Kuhla, A. (2016). Long-term caloric restriction in ApoE-deficient mice results in neuroprotection via Fgf21-induced AMPK/mTOR pathway. *Aging* 8, 2777–2789.
- Rühlmann, C., Dannehl, D., Brodtrück, M., Adams, A.C., Stenzel, J., Lindner, T., Krause, B.J., Vollmar, B., and Kuhla, A. (2021). Neuroprotective Effects of the FGF21 Analogue LY2405319. *J Alzheimers Dis* 80, 357–369.
- Ruzo, A., Marcó, S., García, M., Villacampa, P., Ribera, A., Ayuso, E., Maggioni, L., Mingozi, F., Haurigot, V., and Bosch, F. (2012). Correction of Pathological Accumulation of Glycosaminoglycans in Central Nervous System and Peripheral Tissues of MPSIIIA Mice Through Systemic AAV9 Gene Transfer. *Human Gene Therapy* 23, 1237–1246.
- Saczynski, J.S., Siggurdsson, S., Jonsson, P. v., Eiriksdottir, G., Olafsdottir, E., Kjartansson, O., Harris, T.B., van Buchem, M.A., Gudnason, V., and Launer, L.J. (2009). Glycemic Status and Brain Injury in Older Individuals. *Diabetes Care* 32, 1608–1613.
- Sam, S. (2018). Differential effect of subcutaneous abdominal and visceral adipose tissue on cardiometabolic risk. *Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation* 33.
- Samulski, R.J., and Muzyczka, N. (2014). AAV-Mediated Gene Therapy for Research and Therapeutic Purposes. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-virology-031413-085355> 1, 427–451.

- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 79, 2077–2081.
- Sa-nguanmoo, P., Chattipakorn, N., and Chattipakorn, S.C. (2016a). Potential roles of fibroblast growth factor 21 in the brain. *Metabolic Brain Disease* 31, 239–248.
- Sa-nguanmoo, P., Tanajak, P., Kerdphoo, S., Satjaritanun, P., Wang, X., Liang, G., Li, X., Jiang, C., Pratchayasakul, W., Chattipakorn, N., et al. (2016b). FGF21 improves cognition by restored synaptic plasticity, dendritic spine density, brain mitochondrial function and cell apoptosis in obese-insulin resistant male rats. *Hormones and Behavior* 85, 86–95.
- Sa-nguanmoo, P., Tanajak, P., Kerdphoo, S., Jaiwongkam, T., Wang, X., Liang, G., Li, X., Jiang, C., Pratchayasakul, W., Chattipakorn, N., et al. (2018). FGF21 and DPP-4 inhibitor equally prevents cognitive decline in obese rats. *Biomedicine and Pharmacotherapy* 97, 1663–1672.
- Santoleri, D., and Titchenell, P.M. (2019). Resolving the Paradox of Hepatic Insulin Resistance. *CMGH* 7, 447–456.
- dos Santos Matioli, M.N.P., Suemoto, C.K., Rodriguez, R.D., Farias, D.S., da Silva, M.M., Leite, R.E.P., Ferretti-Rebustini, R.E.L., Farfel, J.M., Pasqualucci, C.A., Jacob Filho, W., et al. (2017). Diabetes is Not Associated with Alzheimer’s Disease Neuropathology. *Journal of Alzheimer’s Disease* 60, 1035–1043.
- Sanyal, A., Charles, E.D., Neuschwander-Tetri, B.A., Loomba, R., Harrison, S.A., Abdelmalek, M.F., Lawitz, E.J., Halegoua-DeMarzio, D., Kundu, S., Noviello, S., et al. (2018). Pegbelfermin (BMS-986036), a PEGylated fibroblast growth factor 21 analogue, in patients with non-alcoholic steatohepatitis: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2a trial. *The Lancet* 392, 2705–2717.
- 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 Increases Energy Expenditure and Insulin Sensitivity in Obese Rats. *Diabetes* 59, 1817.
- Sattar, N., and Gill, J.M. (2014). Type 2 diabetes as a disease of ectopic fat? *BMC Medicine* 12.
- Schäfer, S.A., Machicao, F., Fritsche, A., Häring, H.U., and Kantartzis, K. (2011). New type 2 diabetes risk genes provide new insights in insulin secretion mechanisms. *Diabetes Research and Clinical Practice* 93, S9.
- Shahror, R.A., Linares, G.R., Wang, Y., Hsueh, S.C., Wu, C.C., Chuang, D.M., Chiang, Y.H., and Chen, K.Y. (2020). Transplantation of mesenchymal stem cells overexpressing fibroblast growth factor 21 facilitates cognitive recovery and enhances neurogenesis in a mouse model of traumatic brain injury. *Journal of Neurotrauma* 37, 14–26.
- Sharretts, J., Galescu, O., Gomatam, S., Andraca-Carrera, E., Hampf, C., and Yanoff, L. (2020). Cancer Risk Associated with Lorcaserin — The FDA’s Review of the CAMELLIA-TIMI 61 Trial. *New England Journal of Medicine* 383, 1000–1002.
- Shenoy, V.K., Beaver, K.M., Fisher, F.M., Singhal, G., Dushay, J.R., Maratos-Flier, E., and Flier, S.N. (2016). Elevated Serum Fibroblast Growth Factor 21 in Humans with Acute Pancreatitis. *PLoS ONE* 11.

- Singhal, G., Douris, N., Fish, A.J., Zhang, X., Adams, A.C., Flier, J.S., Pissios, P., and Maratos-Flier, E. (2016). Fibroblast growth factor 21 has no direct role in regulating fertility in female mice. *Molecular Metabolism* 5, 690–698.
- Skyler, J.S., Bakris, G.L., Bonifacio, E., Darsow, T., Eckel, R.H., Groop, L., Groop, P.H., Handelsman, Y., Insel, R.A., Mathieu, C., et al. (2017). Differentiation of diabetes by pathophysiology, natural history, and prognosis. *Diabetes* 66, 241–255.
- Smith, R.E., and Hock, R.J. (1963). Brown Fat: Thermogenic Effector of Arousal in Hibernators. *Science* (1979) 140, 199–200.
- 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. (2010). Individualizing therapies in type 2 diabetes mellitus based on patient characteristics: What we know and what we need to know. In *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, pp. 1566–1574.
- Snyder, R.O., Audit, M., and Francis, J.D. (2012). rAAV Vector Product Characterization and Stability Studies. *Methods in Molecular Biology* 807, 405–428.
- Song, P., Zechner, C., Hernandez, G., Cánovas, J., Xie, Y., Sondhi, V., Wagner, M., Stadlbauer, V., Horvath, A., Leber, B., et al. (2018). The Hormone FGF21 Stimulates Water Drinking in Response to Ketogenic Diet and Alcohol. *Cell Metabolism* 27, 1338–1347.e4.
- Srikanth, V., Sinclair, A.J., Hill-Briggs, F., Moran, C., and Biessels, G.J. (2020). Type 2 diabetes and cognitive dysfunction—towards effective management of both comorbidities. *The Lancet Diabetes & Endocrinology* 8, 535–545.
- Srivastava, A., Lusby, E.W., and Berns, K.I. (1983). Nucleotide sequence and organization of the adeno-associated virus 2 genome. *Journal of Virology* 45, 555–564.
- Staiger, H., Keuper, M., Berti, L., de Angelis, M.H., and Häring, H.U. (2017). Fibroblast Growth Factor 21—Metabolic Role in Mice and Men. *Endocrine Reviews* 38, 468–488.
- Stanislaus, S., Hecht, R., Yie, J., Hager, T., Hall, M., Spahr, C., Wang, W., Weiszmann, J., Li, Y., Deng, L., et al. (2017a). A Novel Fc-FGF21 With Improved Resistance to Proteolysis, Increased Affinity Toward  $\beta$ -Klotho, and Enhanced Efficacy in Mice and Cynomolgus Monkeys. *Endocrinology* 158, 1314–1327.
- Stanislaus, S., Hecht, R., Yie, J., Hager, T., Hall, M., Spahr, C., Wang, W., Weiszmann, J., Li, Y., Deng, L., et al. (2017b). A Novel Fc-FGF21 With Improved Resistance to Proteolysis, Increased Affinity Toward  $\beta$ -Klotho, and Enhanced Efficacy in Mice and Cynomolgus Monkeys. *Endocrinology* 158, 1314–1327.
- Stefan, N. (2020). Causes, consequences, and treatment of metabolically unhealthy fat distribution. *The Lancet Diabetes & Endocrinology* 8, 616–627.
- St-Onge, M.P., and Gallagher, D. (2010). Body composition changes with aging: The cause or the result of alterations in metabolic rate and macronutrient oxidation? *Nutrition* 26, 152–155.

- 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.
- Sumithran, P., and Proietto, J. (2014). Benefit-risk assessment of orlistat in the treatment of obesity. *Drug Safety* 37, 597–608.
- Sun, Y., Wang, Y., Chen, S.T., Chen, Y.J., Shen, J., Yao, W.B., Gao, X.D., and Chen, S. (2020). Modulation of the astrocyte-neuron lactate shuttle system contributes to neuroprotective action of fibroblast growth factor 21. *Theranostics* 10, 8430–8445.
- Suomalainen, A., Elo, J.M., Pietiläinen, K.H., Hakonen, A.H., Sevastianova, K., Korpela, M., Isohanni, P., Marjavaara, S.K., Tyni, T., Kiuru-Enari, S., et al. (2011). FGF-21 as a biomarker for muscle-manifesting mitochondrial respiratory chain deficiencies: a diagnostic study. *The Lancet Neurology* 10, 806–818.
- Surwit, R.S., Wang, S., Petro, A.E., Sanchis, D., Raimbault, S., Ricquier, D., and Collins, S. (1998). Diet-induced changes in uncoupling proteins in obesity-prone and obesity-resistant strains of mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95, 4061–4065.
- Talukdar, S., and Kharitonov, A. (2021). FGF19 and FGF21: In NASH we trust. *Molecular Metabolism* 46, 101152.
- Talukdar, S., Owen, B.M., Song, P., Hernandez, G., Zhang, Y., Zhou, Y., Scott, W.T., Paratala, B., Turner, T., Smith, A., et al. (2016a). FGF21 regulates sweet and alcohol preference. *Cell Metabolism* 23, 344–349.
- Talukdar, S., Zhou, Y., Li, D., Rossulek, M., Dong, J., Somayaji, V., Weng, Y., Clark, R., Lanba, A., Owen, B.M., et al. (2016b). A long-acting FGF21 molecule, PF-05231023, decreases body weight and improves lipid profile in non-human primates and type 2 diabetic subjects. *Cell Metabolism* 23, 427–440.
- Tamboli, R.A., Breitman, I., Marks-Shulman, P.A., Jabbour, K., Melvin, W., Williams, B., Clements, R.H., Feurer, I.D., and Abumrad, N.N. (2014). Early weight regain after gastric bypass does not affect insulin sensitivity but is associated with elevated ghrelin. *Obesity* 22, 1617–1622.
- Tan, B.K., Hallschmid, M., Adya, R., Kern, W., Lehnert, H., and Rande, H.S. (2011). Fibroblast Growth Factor 21 (FGF21) in Human Cerebrospinal Fluid. *Diabetes* 60, 2758–2762.
- 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.
- Thisse, B., and Thisse, C. (2005). Functions and regulations of fibroblast growth factor signaling during embryonic development. *Developmental Biology* 287, 390–402.
- Torgerson, J.S., Hauptman, J., Boldrin, M.N., and Sjöström, L. (2004). XENical in the Prevention of Diabetes in Obese Subjects (XENDOS) Study. *Diabetes Care* 27, 155–161.
- Tucsek, Z., Toth, P., Sosnowska, D., Gautam, T., Mitschelen, M., Koller, A., Szalai, G., Sonntag, W.E., Ungvari, Z., and Csiszar, A. (2014). Obesity in Aging Exacerbates Blood–Brain Barrier Disruption, Neuroinflammation, and Oxidative Stress in the Mouse

- Hippocampus: Effects on Expression of Genes Involved in Beta-Amyloid Generation and Alzheimer's Disease. *The Journals of Gerontology: Series A* 69, 1212–1226.
- Turner, R.C., Cull, C.A., Frighi, V., Holman, R.R., and for the UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group, for the U.P.D.S. (UKPDS) G. (1999). Glycemic Control With Diet, Sulfonylurea, Metformin, or Insulin in Patients With Type 2 Diabetes Mellitus: Progressive Requirement for Multiple Therapies (UKPDS 49). *JAMA* 281, 2005–2012.
- Ueta, C.B., Fernandes, G.W., Capelo, L.P., Fonseca, T.L., Maculan, F.D.A., Gouveia, C.H.A., Brum, P.C., Christoffolete, M.A., Aoki, M.S., Lancellotti, C.L., et al. (2012).  $\beta$ 1 Adrenergic receptor is key to cold- and diet-induced thermogenesis in mice. *J Endocrinol* 214, 359.
- UKPDS Group (1990). UK prospective diabetes study 7: Response of fasting plasma glucose to diet therapy in newly presenting type II diabetic patients. *Metabolism* 39, 905–912.
- Usui, N., Yoshida, M., Takayanagi, Y., Nasanbuyan, N., Inutsuka, A., Kurosu, H., Mizukami, H., Mori, Y., Kuro-o, M., and Onaka, T. (2021). Roles of fibroblast growth factor 21 in the control of depression-like behaviours after social defeat stress in male rodents. *Journal of Neuroendocrinology* 33.
- Verrotti, A., Scaparrotta, A., Agostinelli, S., di Pillo, S., Chiarelli, F., and Grosso, S. (2011). Topiramate-induced weight loss: A review. *Epilepsy Research* 95, 189–199.
- Vinkers, C.H., de Jong, N.M., Kalkman, C.J., Westphal, K.G.C., van Oorschot, R., Olivier, B., Korte, S.M., and Groenink, L. (2009). Stress-induced hyperthermia is reduced by rapid-acting anxiolytic drugs independent of injection stress in rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 93, 413–418.
- Wang, D., Tai, P.W.L., and Gao, G. (2019). Adeno-associated virus vector as a platform for gene therapy delivery. *Nature Reviews Drug Discovery* 2019 18:5 18, 358–378.
- Wang, D., Liu, F., Zhu, L., Lin, P., Han, F., Wang, X., Tan, X., Lin, L., and Xiong, Y. (2020a). FGF21 alleviates neuroinflammation following ischemic stroke by modulating the temporal and spatial dynamics of microglia/macrophages. *Journal of Neuroinflammation* 17.
- Wang, L., Louboutin, J.P., Bell, P., Greig, J.A., Li, Y., Wu, D., and Wilson, J.M. (2011). Muscle-directed Gene Therapy for Hemophilia B with More Efficient and Less Immunogenic AAV Vectors. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 9, 2009.
- Wang, Q., Yuan, J., Yu, Z., Lin, L., Jiang, Y., Cao, Z., Zhuang, P., Whalen, M.J., Song, B., Wang, X.J., et al. (2018). FGF21 Attenuates High-Fat Diet-Induced Cognitive Impairment via Metabolic Regulation and Anti-inflammation of Obese Mice. *Molecular Neurobiology* 55, 4702–4717.
- Wang, X., Zhu, L., Hu, J., Guo, R., Ye, S., Liu, F., Wang, D., Zhao, Y., Hu, A., Wang, X., et al. (2020b). FGF21 Attenuated LPS-Induced Depressive-Like Behavior via Inhibiting the Inflammatory Pathway. *Frontiers in Pharmacology* 11.
- 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.



- Watakabe, A., Ohtsuka, M., Kinoshita, M., Takaji, M., Isa, K., Mizukami, H., Ozawa, K., Isa, T., and Yamamori, T. (2015). Comparative analyses of adeno-associated viral vector serotypes 1, 2, 5, 8 and 9 in marmoset, mouse and macaque cerebral cortex. *Neuroscience Research* 93, 144–157.
- Webb, V.L., and Wadden, T.A. (2017). Intensive Lifestyle Intervention for Obesity: Principles, Practices, and Results. *Gastroenterology* 152, 1752–1764.
- Weber, C., and Chand, B. (2018). Weight Regain Following Bariatric Surgery and Revisional Surgery. *Complications in Bariatric Surgery* 147–165.
- Weinstein, G., Davis-Plourde, K.L., Conner, S., Himali, J.J., Beiser, A.S., Lee, A., Rawlings, A.M., Sedaghat, S., Ding, J., Moshier, E., et al. (2019). Association of metformin, sulfonylurea and insulin use with brain structure and function and risk of dementia and Alzheimer's disease: Pooled analysis from 5 cohorts. *PLOS ONE* 14, e0212293.
- Weng, Y., Chabot, J.R., Bernardo, B., Yan, Q., Zhu, Y., Brenner, M.B., Vage, C., Logan, A., Calle, R., and Talukdar, S. (2015). Pharmacokinetics (PK), Pharmacodynamics (PD) and Integrated PK/PD Modeling of a Novel Long Acting FGF21 Clinical Candidate PF-05231023 in Diet-Induced Obese and Leptin-Deficient Obese Mice. *PLOS ONE* 10, e0119104.
- Whitmer, R.A., Gunderson, E.P., Barrett-Connor, E., Quesenberry, C.P., and Yaffe, K. (2005). Obesity in middle age and future risk of dementia: a 27 year longitudinal population based study. *BMJ : British Medical Journal* 330, 1360.
- Whittle, A.J., Carobbio, S., Martins, L., Slawik, M., Hondares, E., Vázquez, M.J., Morgan, D., Csikasz, R.I., Gallego, R., Rodriguez-Cuenca, S., et al. (2012). BMP8B Increases Brown Adipose Tissue Thermogenesis through Both Central and Peripheral Actions. *Cell* 149, 871–885.
- WHO Consultation on Obesity (1999: Geneva, S.& W., and Obesity, H.Organization. (2000). OBESITY: Preventing and managing the global epidemic.
- World Health Organization (2016). GLOBAL REPORT ON DIABETES.
- World Health Organization (2021). Obesity and overweight.
- World Obesity Federation (2020). Obesity: missing the 2025 global targets.
- World Obesity Federation (2021). COVID-19 and Obesity: The 2021 Atlas.
- Wu, J., Boström, P., Sparks, L.M., Ye, L., Choi, J.H., Giang, A.H., Khandekar, M., Virtanen, K.A., Nuutila, P., Schaart, G., et al. (2012). Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. *Cell* 150, 366–376.
- Xie, Q., Bu, W., Bhatia, S., Hare, J., Somasundaram, T., Azzi, A., and Chapman, M.S. (2002). The atomic structure of adeno-associated virus (AAV-2), a vector for human gene therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99, 10405–10410.
- 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. (2009a). Fibroblast Growth Factor 21 Reverses Hepatic Steatosis, Increases Energy Expenditure, and Improves Insulin Sensitivity in Diet-Induced Obese Mice. *Diabetes* 58, 250–259.

Xu, J., Stanislaus, S., Chinookoswong, N., Lau, Y.Y., Hager, T., Patel, J., Ge, H., Weiszmann, J., Lu, S.C., Graham, M., et al. (2009b). Acute glucose-lowering and insulin-sensitizing action of FGF21 in insulin-resistant mouse models - Association with liver and adipose tissue effects. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism* 297, 1105–1114.

Xue, M., Xu, W., Ou, Y.N., Cao, X.P., Tan, M.S., Tan, L., and Yu, J.T. (2019). Diabetes mellitus and risks of cognitive impairment and dementia: A systematic review and meta-analysis of 144 prospective studies. *Ageing Research Reviews* 55, 100944.

Yaffe, K., Falvey, C., Hamilton, N., Schwartz, A. v., Simonsick, E.M., Satterfield, S., Cauley, J.A., Rosano, C., Launer, L.J., Strotmeyer, E.S., et al. (2012). Diabetes, Glucose Control, and 9-Year Cognitive Decline Among Older Adults Without Dementia. *Archives of Neurology* 69, 1170–1175.

Yan, H., Xia, M., Chang, X., Xu, Q., Bian, H., Zeng, M., Rao, S., Yao, X., Tu, Y., Jia, W., et al. (2011). Circulating Fibroblast Growth Factor 21 Levels Are Closely Associated with Hepatic Fat Content: A Cross-Sectional Study. *PLOS ONE* 6, e24895.

Yan, J., Nie, Y., Cao, J., Luo, M., Yan, M., Chen, Z., and He, B. (2021). The Roles and Pharmacological Effects of FGF21 in Preventing Aging-Associated Metabolic Diseases. *Frontiers in Cardiovascular Medicine* 0, 221.

Yau, P.L., Castro, M.G., Tagani, A., Tsui, W.H., and Convit, A. (2012). Obesity and Metabolic Syndrome and Functional and Structural Brain Impairments in Adolescence. *Pediatrics* 130, e856.

Yoneda, S., Uno, S., Iwahashi, H., Fujita, Y., Yoshikawa, A., Kozawa, J., Okita, K., Takiuchi, D., Eguchi, H., Nagano, H., et al. (2013). Predominance of  $\beta$ -cell neogenesis rather than replication in humans with an impaired glucose tolerance and newly diagnosed diabetes. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 98, 2053–2061.

Yu, H., Xia, F., Lam, K.S.L., Wang, Y., Bao, Y., Zhang, J., Gu, Y., Zhou, P., Lu, J., Jia, W., et al. (2011). Circadian Rhythm of Circulating Fibroblast Growth Factor 21 Is Related to Diurnal Changes in Fatty Acids in Humans. *Clinical Chemistry* 57, 691–700.

Yu, Y., Bai, F., Wang, W., Liu, Y., Yuan, Q., Qu, S., Zhang, T., Tian, G., Li, S., Li, D., et al. (2015). Fibroblast growth factor 21 protects mouse brain against D-galactose induced aging via suppression of oxidative stress response and advanced glycation end products formation. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 133, 122–131.

Zhao, L., Niu, J., Lin, H., Zhao, J., Liu, Y., Song, Z., Xiang, C., Wang, X., Yang, Y., Li, X., et al. (2019). Paracrine-endocrine FGF chimeras as potent therapeutics for metabolic diseases. *EBioMedicine* 48, 462–477.

Zhen, E.Y., Jin, Z., Ackermann, B.L., Thomas, M.K., and Gutierrez, J.A. (2016). Circulating FGF21 proteolytic processing mediated by fibroblast activation protein. *Biochemical Journal* 473, 605–614.

Zheng, Y., Ley, S.H., and Hu, F.B. (2018). Global aetiology and epidemiology of type 2 diabetes mellitus and its complications. *Nature Reviews Endocrinology* 14, 88–98.

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. *Molecular Therapy* 16, 1073–1080.

Zu, H., and Gao, D. (2021). Non-viral Vectors in Gene Therapy: Recent Development, Challenges, and Prospects. *The AAPS Journal* 23.