



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**

**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR  
FACULTAD DE VETERINARIA**

**CENTRO DE BIOTECNOLOGÍA ANIMAL Y TERAPIA GÉNICA**

**INGENIERÍA GENÉTICA DEL TEJIDO ADIPOSO O  
DEL MÚSCULO ESQUELÉTICO MEDIANTE  
VECTORES AAV-FGF21 PARA EL TRATAMIENTO  
DE LA DIABETES Y LA OBESIDAD**

**VÍCTOR SACRISTÁN FRAILE**

**SERGIO ANTONIO MUÑOZ FORERO**

**FÀTIMA BOSCH I TUBERT**









Este trabajo experimental se ha realizado bajo la dirección de la Dra. Fàtima Bosch i Tubert y el Dr. Sergio Antonio Muñoz Forero en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y en el Centro de Biotecnología y Terapia Génica.

**VÍCTOR SACRISTÁN FRAILE**

**SERGIO ANTONIO MUÑOZ FORERO**

**FÀTIMA BOSCH I TUBERT**

**SEPTIEMBRE 2018**

**BELLATERRA**



A mis padres, mujer e hijo



Esta tesis es el resultado del trabajo de muchas personas y a las que quiero dar mis más sinceros agradecimientos ya que sin ellos esto no podría haber sido posible.

En primer lugar querría agradecer sinceramente a la Dra. Fàtima Bosch la oportunidad de haber podido realizar no solo la tesis sino también el máster en su grupo de investigación, bajo unas condiciones y ambiente excepcionales. Gracias por toda la energía, entusiasmo y conocimiento que me has transmitido durante todos estos años.

Muchísimas gracias a mi co-director Sergio. Muchas gracias por haberme inculcado la manera correcta de trabajar en el laboratorio. También gracias por transmitirme toda tu sabiduría, paciencia y comprensión. Me llevo más que un buen amigo y pese a que nunca podré hacer chistes tan buenos como los tuyos, tu humor me ha ayudado en muchos momentos.

Muchas gracias al Adipose Team. Haber trabajado junto a vosotros durante estos años no tiene precio. No creo que otro grupo de personas lo hubiera podido hacer mejor. Gracias a la capitana Vero por estar siempre ahí. He aprendido muchísimo de ti y seguro que en un futuro seguiré aprendiendo. Muchísimas gracias a mis compañeras de viaje Estefanía y Claudia que me acogisteis desde el primer día como uno más y por ser mi soporte, asesoras y amigas. También agradecer a los dos grandes bioinformáticos Miquel y Jordi, las matanzas no serían lo mismo sin vosotros. A la ya no tan novata Sara que me ha ayudado en todo lo que ha podido y más. Y por supuesto no me olvido de mi compi de ordenador Ignasi (aunque ya ha dejado el nido y ahora vuela por la 4ª planta), que aunque es del equipo Neuro tiene corazón de adiposo. El laboratorio no sería lo mismo sin ti y sin tus clases musicales. No olvidaré ninguno de los momentos vividos tanto en el laboratorio como fuera con todos vosotros.

A mi compadre Víctor Sánchez, que aunque nuestra aventura empezó años atrás en las aulas de la facultad de Biociencias, nos hemos aguantado mutuamente y nos hemos dado soporte ante todas las adversidades. Ha sido un placer compartir todos estos años junto a ti y espero que nuestra amistad nunca desaparezca.

A los zuleros Xavi y Joan y mi isleña Jennifer, gracias por hacer que todos estos años hayan sido mucho más agradables. A pesar de las adversidades de la vida, nunca dejéis de ser tan felices como sois.

A Marisa, que aunque no he tenido la suerte de trabajar codo con codo con ella, es parte de los Adorables C, y su forma de trabajar con los animales hace que el trabajar con éstos sea más llevadero.

A mi compi de pista Carles, ya me gustaría ser tan buena persona, trabajador y jugón como tú. Hemos pasado muy buenos momentos juntos.

Gracias también al resto de equipo MPS, Sara Marcó, Albert Ribera y Gemma Elias. Aunque me hubiera gustado compartir más momentos junto a gente tan trabajadora y profesional como vosotros, he aprendido mucho de vosotros.

Muchas gracias Maria Molas y Xavier León, por esas conversaciones tan profundas en el laboratorio. Nadie sabe ver la vida con tanta gracia como vosotros. Pero sobre todo gracias por los virus y las células que con tanto esfuerzo y cariño preparáis. Sobre la producción de virus también me gustaría agradecer su excelente trabajo a Meritxell y Carles.

Muchas gracias a Ivet, que aunque no pensaba que tuviéramos que trabajar juntos me has dado muy buenos consejos y apoyo, sobre todo al final de la tesis. He aprendido mucho de ti. Agradecer la paciencia y dedicación con los journal club y con todo lo relacionado con el microscopio a Alba. Gracias a Laia, Sylvie y Tura por vuestra amabilidad y por compartir vuestra sabiduría.

Gracias a las chicas de la cocina, Lidia y Jennifer Barrero, porque el grupo no podría salir adelante sin vosotras. También agradecer la paciencia de Marta Moya, ya que las inmunos son siempre cosa de última hora, pero siempre salen adelante.

También me gustaría recordar a los compañeros que se marcharon pero que han sido muy importantes para mí y para el grupo: Cristina, Luca, Tami, Vicky y Sandra.

Al equipo responsable del animalario: Pedro, Marta, Mire, Edurne, Carles y Pere. Vuestro trabajo es indispensable para que los proyectos funcionen. También agradecer vuestra ayuda y asesoramiento con todo lo referente al cuidado de los animales. Gracias por tener tanta paciencia con nosotros. A las chicas de la Unidad de Animales Transgénicos: Anna Pujol, Anna Arbós y Sandra Turón. Porque el CBATEG no sería lo mismo sin vosotras y vuestra alegría.

Muchas gracias Lorena por tu ayuda en el último momento. Al resto de personal de la 4ª planta por su compañerismo y por contribuir en un día a día tan agradable. Agradecer el asesoramiento y simpatía de Montse Bellido y Rosmi. Sin vosotras todo sería mucho más caótico. Tampoco hay que olvidarse de agradecer el trabajo del personal de administración, seguridad, mantenimiento y limpieza por su contribución al buen funcionamiento del CBATEG.

Muchas gracias a mis amigos y compañeros de vida fuera del CBATEG, Dani Jiménez, Silvia Pérez, Iván García, Judit Mir, Albert Balsells, Aleix Grau, Lorena Cajé. Todos habéis contribuido a que todos estos años hayan sido muy divertidos, sobre todo durante nuestras escapadas.

Muchas gracias a la Uni Shore: Blanca Carreño, Víctor Sánchez, Eduard Ulles, Patricia Lamas, Ana Rico y Sara García por vuestras aventuras durante todos estos años. Espero que sigamos viviendo muchas más aventuras juntos.

A mi familia, muchas gracias a mis padres, por haberme apoyado siempre ante las adversidades, por creer en mí y por ser tan buenos asesores. Gracias a mi hermano, porque aunque no nos veamos mucho siempre estás ahí.

Por último, a mi mujer Silvia, por tu empatía y amor. Por apoyarme y ayudarme a sentar mi cabeza loca. Por tu paciencia con Leo en los momentos de mayor estrés. Agradecer tus ánimos en los momentos de crisis de la tesis (que todos sabemos que son muchos). Poca gente tiene tanta suerte como yo de tener una compañera de vida que te quiera tanto y con tanta fuerza y ganas de vivir la vida.

Este trabajo ha sido posible gracias a la beca predoctoral de formación del profesorado universitario (FPU), financiada por el Ministerio de Educación, de la que he sido beneficiaria durante cuatro años (FPU14/05268). Las investigaciones se han realizado gracias a la financiación recibida del Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO) y FEDER, Plan Nacional I+D+I (SAF2014-54866R), de la Generalitat de Catalunya (2014 SGR-1669), de la European Foundation for the Study of Diabetes (EFSD/MSD European Research Programme on Novel Therapies for Type 2 Diabetes, 2013) y de la Comisión Europea (MYOCURE, PHC-15-2015-667751).





<b>°C</b>	Grado Celsius
<b>%</b>	Porcentaje
<b>µm</b>	Micrómetros
<b>µL</b>	Microlitros
<b>3'-UTRs</b>	Región 3' no traducida
<b>4AAP</b>	<i>4-aminoantipirina</i>
<b>5-HT2C</b>	<i>5-hydroxytryptamine receptor 2C</i>
<b>AAV</b>	Virus adenoasociado
<b>AAP</b>	Proteína de activación de ensamblaje
<b>AARE</b>	<i>Amino acid response element</i>
<b>ACC</b>	Acetyl-coA carboxilasa
<b>ADIPOQ</b>	Adiponectina
<b>AMPK</b>	<i>5'-AMPactivated protein kinase</i>
<b>ANOVA</b>	Análisis de la varianza
<b>AP2</b>	Fatty acid binding protein 4, adipocyte
<b>ATF2</b>	<i>Activating transcription factor 2</i>
<b>ATF4</b>	Activador del factor de transcripción 4
<b>ATGL</b>	<i>Adipose triglyceride lipase</i>
<b>A<sup>y</sup></b>	Agouti
<b>BAT</b>	Tejido adiposo marrón
<b>BDNF</b>	<i>Brain-derived neurotrophic factor</i>
<b>BHE</b>	Barrera hematoencefálica
<b>CAG</b>	Promotor de la β-actina de pollo y el enhancer del Citomegalovirus
<b>CBATEG</b>	Centre Centre de biotecnologia animal i teràpia gènica
<b>CD68</b>	<i>Cluster of differentiation 68</i>
<b>CDKAL1</b>	Cyclin-dependent kinase 5 regulatory subunit associated protein 1-like 1
<b>CDKN2A/2B</b>	Cyclin-dependent kinase 4 inhibitor B
<b>cDNA</b>	DNA complementario
<b>CDS</b>	Secuencia codificante
<b>CHE</b>	Colesterol esterasa
<b>CHO</b>	Colesterol oxidasa
<b>Chow diet</b>	Dieta estándar
<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</i>
<b>CRISPR</b>	<i>Clustered regularly interspaced short palindromic repeats</i>
<b>CSF</b>	Fluido cerebrospinal

<b>Ct</b>	<i>Cycle threshold</i>
<b>db/db</b>	Ratón deficiente para el gen del receptor de la leptina
<b>DAB</b>	<i>Diaminobenzidina</i>
<b>DHAP</b>	Deshidoxiacetona fosfato
<b>Dio2</b>	<i>Deiodinase, iodothyronine, type II</i>
<b>DIO mice</b>	Ratón obeso inducido por la dieta
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>dNTP</b>	Desoxirribonucleótidos trifosfato
<b>DPP4</b>	<i>Dipeptidyl peptidase 4</i>
<b>DSBmt</b>	N,N-bis-(4-sulfovutil)-m-toludina disódica
<b>DT1</b>	Diabetes <i>mellitus</i> tipo 1
<b>DT2</b>	Diabetes <i>mellitus</i> tipo 2
<b>E.coli</b>	<i>Escherichia coli</i>
<b>EEM</b>	Error estándar de la media
<b>eGFP</b>	<i>Enhanced Green Fluorescent Protein</i>
<b>EGFR</b>	<i>Epidermal growth factor receptor</i>
<b>ELISA</b>	<i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>
<b>ERK</b>	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
<b>eWAT</b>	Tejido adiposo blanco epididimal
<b>F4/80</b>	<i>EGF-like module-containing mucin-like hormone receptor-like 1</i>
<b>FABP4</b>	Fatty acid binding protein 4, adipocyte
<b>FAP</b>	<i>Fibroblast activation protein</i>
<b>FBS</b>	Suero fetal bovino
<b>FC</b>	<i>Fold change</i>
<b>FDA</b>	<i>Food and Drug Administration</i>
<b>FFA</b>	Ácidos grasos libres
<b>FGF</b>	Factor de crecimiento fibroblástico
<b>FGF21</b>	Factor de crecimiento fibroblástico 21
<b>FGFR</b>	Receptor del factor de crecimiento fibroblástico 21
<b>FID</b>	Federación internacional de diabetes
<b>FRS2</b>	<i>Fibroblast growth factor receptor substrate 2</i>
<b>FTO</b>	<i>Fat mass and obesity-associated protein</i>
<b>FXR</b>	<i>Farsenoid-X receptor</i>
<b>g</b>	Gramos
<b>g</b>	<i>Fuerza g</i>
<b>G</b>	Gauge
<b>G6Pc</b>	Glucosa 6 fosfatasa

---

<b>GABA</b>	<i>γ-aminobutyric acid</i>
<b>Gc</b>	<i>Glucocorticoids</i>
<b>GK</b>	Glucocinasa
<b>GLP1</b>	<i>Glucagon-like peptide 1</i>
<b>GLPR1</b>	<i>Glucagon-like peptide 1 receptor</i>
<b>Glut4</b>	Transportador de glucosa tipo 4
<b>GPO</b>	Glicerol-3-fosfato oxidasa
<b>GRB14</b>	<i>Growth factor receptor-bound protein 14</i>
<b>GTT</b>	Test de tolerancia a la glucosa
<b>GWA</b>	<i>Genome-wide association</i>
<b>h</b>	Horas
<b>HbA1C</b>	Hemoglobina glucosilada
<b>HCC</b>	Carcinoma hepatocelular
<b>HDAC</b>	Histona deacetilasa
<b>HDAC3</b>	<i>Histone deacetylase 3</i>
<b>HDL</b>	Lipoproteína de alta densidad
<b>HEK293</b>	Células embrionarias de riñón humano 293
<b>HFD</b>	Dieta alta en lípidos
<b>HGFR</b>	<i>Hepatocyte growth factor receptor</i>
<b>HK1</b>	Hexoquinasa 1
<b>HK2</b>	Hexoquinasa 2
<b>HSL</b>	Lipasa sensible a hormonas
<b>HSPG</b>	<i>Heparan sulfate proteoglycan</i>
<b>IL-1β</b>	Interleucina 1β
<b>ITRs</b>	Repeticiones terminales invertidas
<b>ITT</b>	Test de tolerancia a la insulina
<b>LamR</b>	<i>Laminin receptor</i>
<b>LB</b>	<i>Lysogeny broth medium</i>
<b>LDL</b>	Lipoproteína de baja densidad
<b>LEP</b>	Leptina
<b>K<sub>ATP</sub></b>	canales de potasio sensibles a ATP
<b>KK</b>	Cepa de ratón japonesa
<b>KK-A<sup>y</sup></b>	Cepa de ratón japonesa combinada con la mutación agouti
<b>IMC</b>	Índice de masa corporal
<b>IRS1</b>	<i>Insulin receptor substrate 1</i>
<b>IRS2</b>	<i>Insulin receptor substrate 2</i>

---

<b>iBAT</b>	Tejido adiposo marrón interescapular
<b>ITT</b>	Test de tolerancia a la insulina
<b>iWAT</b>	Tejido adiposo blanco inguinal
<b>Jak</b>	<i>Janus kinases</i>
<b>Kb</b>	Kilobases
<b>Kcal</b>	Kilocalorías
<b>kDA</b>	Kilodalton
<b>Kg</b>	Kilogramos
<b>KLF14</b>	<i>Krüppel-like factor 14</i>
<b>KO</b>	<i>Knockout</i>
<b>LEPR</b>	Receptor de leptina
<b>LPL</b>	<i>Lipoprotein lipase</i>
<b>m<sup>2</sup></b>	Metros al cuadrado
<b>mM</b>	Milimolar
<b>MAC2</b>	<i>Galectin-3</i>
<b>MAFA</b>	<i>MAF bZIP transcription factor A</i>
<b>MAPK</b>	<i>Mitogen-Activated Protein Kinases</i>
<b>MC4R</b>	<i>Receptor 4 de la melanocortina</i>
<b>mg</b>	Miligramos
<b>MGL</b>	Monoglicerol lipasa
<b>Min</b>	Minuto
<b>MODY</b>	<i>Maturity-onset diabetes of the young</i>
<b>moFGF21</b>	Secuencia optimizada del CDS murino de Fgf21
<b>mRNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>miRNA</b>	<i>microRNA</i>
<b>miRT</b>	Secuencia complementaria a los miRNA
<b>miRT1</b>	Secuencia complementaria al microRNA-1
<b>miRT122a</b>	Secuencia complementaria al microRNA-122a
<b>dmiRT</b>	Secuencia complementaria al microRNA-1 y 122a
<b>mL</b>	Mililitro
<b>mM</b>	Milimolar
<b>MS</b>	Músculo esquelético
<b>MTNR1B</b>	<i>Melatonin receptor 1B</i>
<b>mTOR</b>	<i>mammalian target of rapamycin</i>
<b>mWAT</b>	Tejido adiposo blanco mesentérico
<b>n</b>	Número
<b>nm</b>	Nanometros

<b>NAFLD</b>	Enfermedad del hígado graso no alcohólico
<b>NASH</b>	Esteatohepatitis no alcohólica
<b>NBRE</b>	<i>Nerve growth factor-induced clone B response element</i>
<b>NEGR1</b>	<i>Neural growth regulator 1</i>
<b>NEUROD</b>	<i>Neurogenic differentiation 1</i>
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	<i>nuclear factor <math>\kappa</math>-lightchain-enhancer of activated <math>\beta</math> cells</i>
<b>ng</b>	Nanogramos
<b>NUR77</b>	<i>Nuclear hormone receptor 77</i>
<b>ob/ob</b>	Ratón deficiente para el gene de la leptina
<b>OGTT</b>	Test de tolerancia a la glucosa oral
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>ORF</b>	Marcos de lectura abiertos
<b>pA</b>	Secuencia de poliadenilación
<b>PAP</b>	Cromógeno quinoneimina
<b>pb</b>	Pares de bases
<b>PBS</b>	<i>Phosphate buffered saline</i>
<b>Pck1</b>	Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa
<b>PDGFR</b>	<i>Platelet-derived growth factor receptor</i>
<b>PDX1</b>	<i>Pancreatic duodenal homeobox-1</i>
<b>PEG</b>	Polietilenglicol
<b>PGC1<math>\alpha</math></b>	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor-<math>\gamma</math> co-activator 1<math>\alpha</math></i>
<b>pH</b>	Potencial de hidrógeno
<b>Phospho1</b>	<i>Phosphatase orphan 1</i>
<b>PI3K</b>	<i>Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase</i>
<b>PKB</b>	<i>Protein kinase B</i>
<b>PKC</b>	<i>Protein kinase C</i>
<b>PNH</b>	Primate no humano
<b>POD</b>	Peroxidasa
<b>POMC</b>	<i>Pro-opiomelanocortin</i>
<b>PPAR<math>\alpha</math></b>	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor <math>\alpha</math></i>
<b>PPAR<math>\gamma</math></b>	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor <math>\gamma</math></i>
<b>PPRE</b>	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor response element</i>
<b>REV-ERB<math>\alpha</math></b>	<i>Nuclear receptor subfamily 1, group D, member 1</i>
<b>rAAV</b>	Virus adenoasociado recombinante
<b>RAR</b>	<i>Receptor de ácido retinoico</i>
<b>RARE</b>	<i>Retinoic acid response elements</i>
<b>RB</b>	<i>Roller Botlles</i>

---

<b>RIA</b>	Radioinmunoensayo
<b>RORE</b>	<i>Retinoid-related orphan receptor response element</i>
<b>ROR<math>\alpha</math></b>	<i>Retinoid-related orphan receptor-<math>\alpha</math></i>
<b>RPE65</b>	<i>Retinal pigment epithelium 65</i>
<b>Rplp0</b>	<i>Ribosomal protein lateal stalk subunit P0</i>
<b>RT-PCR</b>	<i>Real-Time PCR</i>
<b>RXR</b>	Receptor X retinoide
<b>RXR<math>\beta</math></b>	Receptor X retinoide $\beta$
<b>rWAT</b>	Tejido adiposo blanco retroperitoneal
<b>s</b>	Segundos
<b>SDS</b>	Dodecilsulfato sódico
<b>SGLT2</b>	<i>Sodium/glucose cotransporter 2</i>
<b>SH2B1</b>	<i>SH2B adaptor protein 1</i>
<b>SIDA</b>	Síndrome de la inmunodeficiencia adquirida
<b>SIRT1</b>	<i>Sirtuin 1</i>
<b>Slc2a1</b>	<i>Solute carrier family 2 member 1</i>
<b>Slc2a4</b>	<i>Solute carrier family 2 member 4</i>
<b>SLC30A8</b>	<i>Solute carrier family 30 member 8</i>
<b>SNc</b>	Sistema nervioso central
<b>ssDNA</b>	<i>DNA de cadena simple</i>
<b>STAT</b>	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription proteins</i>
<b>SV40</b>	Señal de poliadenilación del <i>simian virus 40</i>
<b>TALEN</b>	<i>Transcription activator-like effector nuclease</i>
<b>TCF7L2</b>	<i>Transcriptor factor 7-like 2</i>
<b>TE</b>	Buffer Tris-EDTA
<b>TG</b>	Triglicéridos
<b>THR</b>	Receptor de la hormona tiroidea
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	<i>Factor de necrosis tumoral <math>\alpha</math></i>
<b>TZD</b>	Tiazolidinedionas
<b>U</b>	Unidad de actividad enzimática
<b>UA</b>	Unidades arbitrarias
<b>UAB</b>	Universidad Autónoma de Barcelona
<b>UV</b>	Luz ultravioleta
<b>V</b>	Voltios
<b>Vg</b>	Genomas virales
<b>WAT</b>	Tejido adiposo blanco
<b>ZDF</b>	Zucker Diabetes Fatty

---

<b>I. PRESENTACIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>II. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>5</b>
<b>1. DIABETES MELLITUS</b> .....	<b>7</b>
1.1. Diabetes tipo 2.....	9
1.1.1. <i>Patogenia de la diabetes tipo 2</i> .....	10
1.1.2. <i>Susceptibilidad genética y factores ambientales en la diabetes tipo 2</i> .....	14
<b>2. OBESIDAD</b> .....	<b>16</b>
2.1. Tipos de obesidad en humanos.....	17
2.2. Complicaciones de la obesidad .....	18
2.3. Susceptibilidad genética y factores ambientales en la obesidad .....	19
<b>3. TRATAMIENTOS ACTUALES PARA LA DIABETES TIPO 2 Y LA OBESIDAD</b> .....	<b>20</b>
3.1. Terapias actuales para pacientes diabéticos tipo 2.....	20
3.2. Terapias actuales para pacientes obesos.....	23
<b>4. MODELOS ANIMALES DE DIABETES TIPO 2 Y OBESIDAD</b> .....	<b>25</b>
4.1 Modelos murinos de diabetes tipo 2 y obesidad inducidos por la dieta .....	26
4.2 Modelos murinos monogénicos de diabetes tipo 2 y obesidad .....	27
<b>5. FACTOR DE CRECIMIENTO FIBROBLÁSTICO 21 (FGF21)</b> .....	<b>28</b>
5.1. Familia de los factores de crecimiento fibroblástico .....	28
5.2. Regulación génica y señalización de FGF21 .....	29
5.3. FGF21 como regulador metabólico.....	32
5.4. Perspectiva del uso de FGF21 como fármaco contra la diabetes tipo 2 y la obesidad .....	36
<b>6. TERÁPIA GÈNICA IN VIVO CON VECTORES ADENOASOCIADOS (AAV)</b> ...	<b>37</b>
6.1. Biología de los virus adenoasociados.....	37
6.2. Vectores virales adenoasociados recombinantes .....	40
6.3. Transferencia de genes al músculo esquelético y al tejido adiposo blanco mediante vectores AAV .....	44
<b>III. OBJETIVOS</b> .....	<b>47</b>



<b>IV. RESULTADOS .....</b>	<b>51</b>
<b>Parte I. ESTUDIO DEL EFECTO DE LA SOBREEXPRESIÓN DE FGF21 EN EL TEJIDO ADIPOSO.....</b>	<b>53</b>
<b>1. DISEÑO Y GENERACIÓN DE LOS VECTORES AAV PARA MEDIAR EXPRESIÓN DE FGF21 EN EL TEJIDO ADIPOSO BLANCO EPIDIDIMAL .....</b>	<b>55</b>
<b>2. ESTUDIO DE LOS EFECTOS DE LA SOBREEXPRESIÓN LOCAL DE FGF21 EN EL TEJIDO ADIPOSO EN RATONES ALIMENTADOS CON DIETA ALTA EN LÍPIDOS.....</b>	<b>58</b>
2.1. Prevención de la obesidad en ratones alimentados con dieta alta en lípidos mediante AAV9-FGF21 en el tejido adiposo .....	59
2.2. Expresión y secreción de FGF21 en los animales tratados con AAV9- FGF21 .....	62
2.3. Reversión de la hipertrofia y la inflamación del eWAT inducida por la dieta alta en lípidos .....	64
2.4. Análisis del gasto energético y el <i>browning</i> en el tejido adiposo inducido por el tratamiento con AAV9-FGF21 .....	68
2.5. Reversión de la esteatosis, la inflamación y la fibrosis hepática inducida por la dieta alta en lípidos .....	73
2.6. Reversión de la resistencia a la insulina inducida por la dieta alta en lípidos .....	76
<b>3. ESTUDIO DE LOS EFECTOS DE LA SOBREEXPRESIÓN DE FGF21 EN EL TEJIDO ADIPOSO DE RATONES <i>ob/ob</i>.....</b>	<b>81</b>
3.1. Estudio de la disminución del peso corporal en ratones <i>ob/ob</i> mediante la administración de AAV8-FGF21 en el tejido adiposo .....	82
3.2. Expresión y secreción de FGF21 en los animales tratados con AAV8- FGF21 .....	84
3.3. Disminución de la hipertrofia y la inflamación del eWAT en ratones <i>ob/ob</i> tratados con AAV8-FGF21.....	85
3.4. Análisis del gasto energético y el <i>browning</i> en el tejido adiposo inducido por el tratamiento de AAV8-FGF21.....	87
3.5. Disminución de la esteatosis, la inflamación y la fibrosis hepática en ratones <i>ob/ob</i> .....	89
3.6. Reversión de la resistencia a la insulina en ratones <i>ob/ob</i> .....	91

---

<b>Parte II. ESTUDIO DEL EFECTO DE LA SOBREEXPRESIÓN DE FGF21 EN EL MÚSCULO ESQUELÉTICO .....</b>	<b>97</b>
<b>1. DISEÑO Y GENERACIÓN DE LOS VECTORES AAV PARA MEDIAR EXPRESIÓN DE FGF21 EN EL MÚSCULO ESQUELÉTICO.....</b>	<b>99</b>
<b>2. ESTUDIO DE LOS EFECTOS DE LA SOBREEXPRESIÓN LOCAL DE FGF21 EN EL MÚSCULO ESQUELÉTICO EN RATONES SANOS.....</b>	<b>101</b>
2.1. Estudio de la sobreexpresión de FGF21 a largo plazo en ratones alimentados con dieta estándar en el músculo esquelético.....	102
2.2. Expresión y secreción de FGF21 en los animales tratados con AAV1-FGF21 .....	103
2.3. Análisis del depósito de lípidos en el eWAT .....	104
2.4. Análisis del gasto energético y el browning en el tejido adiposo inducido por el tratamiento con AAV1-FGF21 .....	106
2.5. Mejora del contenido lipídico en hígado inducida por el tratamiento con AAV1-FGF21.....	108
2.6. Mejora de la resistencia a la insulina por el tratamiento con AAV1-FGF21 .....	110
<b>3. ESTUDIO DE LOS EFECTOS DE LA SOBREEXPRESIÓN DE FGF21 EN EL MÚSCULO ESQUELÉTICO EN RATONES OBESOS ALIMENTADOS CON DIETA ALTA EN LÍPIDOS .....</b>	<b>112</b>
3.1. Reversión de la obesidad inducida por la dieta en ratones mediante la administración de AAV1-FGF21 en el músculo esquelético.....	113
3.2. Expresión y secreción de FGF21 en los animales tratados con AAV1-FGF21 .....	116
3.3. Reversión de la hipertrofia y la inflamación del eWAT inducida por la dieta alta en lípidos .....	117
3.4. Análisis del gasto energético y el <i>browning</i> en el tejido adiposo inducido por el tratamiento de AAV1-FGF21.....	120
3.5. Reversión de la esteatosis, la inflamación y la fibrosis hepática inducida por la dieta alta en lípidos.....	123
3.6. Reversión de la resistencia a la inducida por la dieta alta en lípidos.....	127

<b>V. DISCUSSION</b> .....	<b>131</b>
<b>VI. CONCLUSIONES</b> .....	<b>139</b>
<b>VII. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>143</b>
<b>1. MATERIALES</b> .....	<b>145</b>
1.1. Animales.....	145
1.2. Cepas bacterianas.....	145
1.3. Anticuerpos .....	146
1.4. Reactivos.....	146
1.5. Plásmidos.....	146
<b>2. MÉTODOS</b> .....	<b>148</b>
2.1. Técnicas básicas de DNA.....	148
2.1.1. Preparación del DNA plasmídico.....	148
2.1.2. Digestión del DNA plasmídico con enzimas de restricción .....	148
2.1.3. Generación de extremos romos de fragmentos de DNA .....	149
2.1.4. Desfosforilación de fragmentos de DNA .....	149
2.1.5. Ligación: construcción de moléculas híbridas .....	150
2.1.6. Transformación en células competentes <i>E.coli</i> XL2-blue .....	151
2.1.7. Separación y visualización del fragmento de DNA.....	151
2.2. Células eucariotas en cultivo .....	152
2.2.1. Células HEK293.....	152
2.2.2. Transfección de las células en cultivo con DNA.....	152
2.3. Producción, purificación y titulación de vectores virales adenoasociados .....	153
2.3.1. Producción y purificación.....	153
2.3.2. Titulación de genomas virales por PicoGreen.....	154
2.3.3. Cuantificación de las partículas virales por Sypro Ruby Protein Gel Staining .	156
2.4. Administración sistémica de los vectores virales .....	156
2.4.1. Administración local de AAV8 y AAV9 en el tejido adiposo blanco epididimal	156
2.4.2. Administración local de AAV1 en el músculo esquelético.....	157
2.5. Determinación del consumo de alimentos .....	157
2.6. Test de tolerancia a la insulina .....	158
2.7. Test de tolerancia a la glucosa .....	158
2.8. Calorimetría indirecta.....	158

---

2.9. Test de actividad locomotora ( <i>Open-field</i> ) .....	159
2.10. Determinación de parámetros séricos.....	159
2.10.1. <i>Determinación de hormonas</i> .....	159
2.10.2. <i>Determinación de metabolitos</i> .....	160
2.11. Determinación del contenido de triglicéridos y colesterol total hepático .....	161
2.12. Análisis de expresión del mRNA por <i>real-time PCR</i> .....	161
2.12.1. <i>Extracción de RNA mensajero</i> .....	161
2.12.2. <i>Retrotranscripción de RNA a DNA complementario</i> .....	162
2.12.3. <i>PCR cuantitativa a tiempo real</i> .....	162
2.13. Análisis histológico .....	164
2.13.1. <i>Tinción con hematoxilina/eosina</i> .....	165
2.13.2. <i>Determinación del área media de los adipocitos</i> .....	165
2.13.3. <i>Inmunohistoquímica contra Mac-2 y UCP1</i> .....	165
2.13.4. <i>Tinción PicroSirius Red</i> .....	166
2.14. Análisis estadístico .....	166
<b>VIII. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>167</b>



# **I. PRESENTACIÓN**



En las últimas décadas, la incidencia de la DT2 y la obesidad han crecido de manera alarmante. Ambas patologías no sólo están estrechamente relacionadas entre sí, sino que también están asociadas con otras patologías que presentan una alta mortalidad. Actualmente, no existen terapias completamente efectivas debido a la amplia heterogeneidad de los pacientes obesos y/o diabéticos tipo 2. Asimismo, los tratamientos farmacológicos actuales frecuentemente presentan importantes efectos secundarios, por lo que es necesario desarrollar nuevas aproximaciones terapéuticas para combatir estas epidemias.

Recientemente, se ha descrito el factor de crecimiento fibroblástico (FGF21) como un prometedor agente terapéutico tanto para la obesidad como la DT2. FGF21 ejerce su función endocrina en múltiples tejidos diana, regulando la homeostasis energética.

Las principales limitaciones que presenta este factor son su baja vida media en circulación, su susceptibilidad a la proteólisis y su facilidad de agregación, siendo necesarias múltiples administraciones de la proteína recombinante para conseguir un efecto terapéutico sostenido. A pesar de que los análogos/miméticos de FGF21 presentan propiedades farmacocinéticas mejoradas, siguen requiriendo administración periódica y las modificaciones de la proteína nativa pueden inducir respuesta inmune.

La terapia génica presenta una gran ventaja respecto a estas estrategias terapéuticas, ya que permitiría alcanzar niveles circulantes elevados y constantes de la proteína nativa tras una única administración, previniendo posibles respuestas inmunológicas. De entre los numerosos vectores virales, los vectores virales adenoasociados (AAVs) presentan un gran interés para la transferencia génica dado que son no patogénicos y presentan baja inmunogenicidad y excelente perfil de seguridad.

En esta tesis doctoral se estudió la eficacia terapéutica de la modificación genética del tejido adiposo o del músculo esquelético mediante vectores AAVs codificantes para FGF21 para el tratamiento de la obesidad y la resistencia a la insulina.

La administración local de vectores AAV de serotipo 9 codificantes para FGF21 (AAV9-FGF21) en el tejido adiposo epididimal incrementó los niveles circulantes de FGF21 y previno la obesidad y la resistencia a la insulina inducidas por una dieta alta



en lípidos en ratones. Asimismo, la administración local de vectores AAV8-FGF21 en el tejido adiposo también fue capaz de revertir la obesidad y la resistencia a la insulina en ratones *ob/ob*. Estos ratones genéticamente obesos y resistentes a la insulina, cuando se trataron con vectores AAV-FGF21 mostraron un incremento del gasto energético y una reducción del depósito de lípidos en el tejido adiposo y en el hígado, así como menor inflamación en los mismos, llevando a una gran disminución de la obesidad y a un incremento de la sensibilidad a la insulina.

Por otro lado, la administración local de vectores AAV1-FGF21 en el músculo esquelético de ratones obesos y resistentes a la insulina medió resultados similares a los obtenidos mediante la administración de los vectores AAV-FGF21 en el tejido adiposo. Además, la sobreexpresión de FGF21 en el músculo esquelético y, el consiguiente aumento de los niveles circulantes de FGF21, previnieron el desarrollo de hepatocarcinomas inducidos por el consumo crónico de una dieta alta en lípidos. La administración de vectores AAV1-FGF21 en el músculo esquelético llevó a un envejecimiento más saludable de ratones controles, lo que se evidenció por el mantenimiento del peso corporal, una menor adiposidad, niveles de triglicéridos en hígado disminuidos y mejora de la resistencia a insulina mediada por la edad.

En conclusión, en esta tesis doctoral se ha demostrado que la ingeniería genética del tejido adiposo y del músculo esquelético mediante vectores AAV codificantes para FGF21 permitió producir niveles terapéuticos de FGF21 circulantes, que llevaron a prevenir y revertir la obesidad y la DT2 en modelos murinos obesos y de resistencia a la insulina. Además, el tratamiento con AAV-FGF21 en animales controles promovió que estos animales envejecieran de manera más saludable. Estos resultados proporcionan las bases para la traslación clínica de estas aproximaciones de terapia génica para el tratamiento de la DT2, la obesidad y sus comorbilidades asociadas en humanos en el futuro.

## **II. INTRODUCCIÓN**



## 1. DIABETES MELLITUS

La diabetes *mellitus* se define como el grupo de enfermedades metabólicas de múltiples etiologías caracterizadas por la alteración del metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas debida a defectos en la secreción de insulina, a la acción de la insulina o a ambas (WHO, 1999). Los pacientes diabéticos se caracterizan por presentar unos niveles elevados de glucosa en sangre (hiperglucemia). La hiperglucemia crónica, es la responsable del desarrollo de las severas complicaciones secundarias de la enfermedad, entre las que se incluyen la retinopatía diabética, la nefropatía y la cardiopatía (Gregg et al., 2016).

Actualmente, la prevalencia de la diabetes ha alcanzado proporciones epidémicas, con una estimación de 425 millones de adultos afectados en el 2017. Además, se estima que dicha prevalencia irá en aumento, pudiendo alcanzar los 628 millones de adultos afectados en el 2045 (FDI, 2017; WHO, 2016). Por otra parte, cabe destacar que la diabetes es una de las principales causas de mortalidad tanto en hombres como en mujeres (WHO, 2016). En 2017 aproximadamente 4 millones de personas murieron a causa de diabetes o de sus complicaciones asociadas, lo que equivaldría a un fallecimiento cada ocho segundos (FDI, 2017).

En 2017 el total del gasto sanitario mundial destinado a pacientes diabéticos de entre 20 y 79 años alcanzó los 727.000 millones de dólares, lo cual representó un aumento del 8% en comparación con los datos de 2015. Si se amplía el rango de edad, de 18 a 99 años, los costes ascendieron a 850.000 millones de dólares (FDI, 2017).

La diabetes *mellitus* se clasifica según su etiología en dos grandes categorías: la diabetes *mellitus* tipo 1 (DT1) y la diabetes *mellitus* tipo 2 (DT2). La DT1, también conocida como diabetes juvenil, se diagnostica principalmente en niños y adultos jóvenes, afectando a entre el 5-10% de los pacientes diabéticos. Está causada por la deficiencia de insulina provocada por una destrucción autoinmune de las células  $\beta$  pancreáticas, productoras de esta hormona. Los síntomas clínicos no se manifiestan hasta la destrucción de más del 80% de la masa de células  $\beta$ , dificultando así su diagnóstico (American Diabetes Association, 2011). Por otro lado, la DT2 es la diabetes mayoritaria, afectando al 90-95% de la población diabética y está causada por la resistencia a la acción de la insulina en los tejidos periféricos y la secreción inadecuada de la hormona (Donath and Halban, 2004; Donath et al., 2010; Hajer et al.,

2008a; Leahy, 2005). A diferencia de la DT1, la DT2 se diagnostica principalmente en personas adultas (alrededor de los 40 años) (FDI, 2017).

Además de la DT1 y DT2, existen otros tipos de diabetes *mellitus* con menor prevalencia, tales como la diabetes gestacional o las formas de diabetes monogénicas. La diabetes gestacional se define como cualquier grado de intolerancia a la glucosa diagnosticado durante el embarazo, independientemente de si la intolerancia a la glucosa puede haber sido anterior al embarazo o persiste después de éste (American Diabetes Association, 2018a). Las diabetes monogénicas están causadas por mutaciones en diferentes genes que causan la disfunción de las células  $\beta$  pancreáticas y, por consiguiente, la aparición de hiperglucemia en pacientes en edades tempranas (generalmente antes de los 25 años). Las diabetes monogénicas tan sólo afectan a un porción muy pequeña de los pacientes diabéticos (< 5%), y entre ellas encontramos la diabetes neonatal y las MODY (*Maturity-onset diabetes of the young*), las cuales se heredan de forma autosómica dominante (American Diabetes Association, 2018a).

Tradicionalmente, el diagnóstico de la diabetes se ha llevado a cabo mediante criterios basados en los niveles de glucemia en plasma, ya fuera mediante el valor de glucemia tras someter al paciente a 8 horas de ayuno o mediante la glucemia 2 horas después de un test oral de tolerancia a la glucosa (OGTT). Actualmente, el diagnóstico también se basa en la determinación de los niveles de hemoglobina glicosilada circulante (HbA1C), los cuales son un reflejo de la glucemia en los últimos 2-3 meses (Tabla 1). Las ventajas del diagnóstico basado en los niveles de hemoglobina glicosilada incluyen: una mayor estabilidad preanalítica, menos perturbaciones frente al estrés y la enfermedad y una mayor comodidad para el paciente, al no ser imprescindible el ayuno para realizar la extracción de sangre. Sin embargo, la determinación de HbA1C presenta una menor sensibilidad, un mayor coste, disponibilidad limitada de la realización de la analítica en ciertas regiones del mundo y, en ciertos individuos, una correlación imperfecta entre los niveles de HbA1C y el promedio de glucemias (American Diabetes Association, 2018a).

Tabla 1. Criterios para el diagnóstico de la diabetes.

Diagnóstico de la diabetes
Glucemia en ayuno $\geq 126$ mg/dL (7.0 mmol/L). El ayuno se define como la no ingestión de calorías durante al menos 8 h.*
O
Glucemia 2-h post OGTT $\geq 200$ mg/dL (11.1 mmol/L). Según la OMS, el test se realiza administrando oralmente una sobrecarga de glucosa que contenga el equivalente a 75 g de glucosa anhidra disuelta en agua.*
O
A1C $\geq 6.5\%$ (48 mmol/mol). La prueba debe realizarse en un laboratorio que esté estandarizado según el análisis <i>Diabetes Control and Complications Trial</i> y debe utilizar el método certificado por <i>The National Glycohemoglobin Standardization Program</i> .*
O
Paciente con síntomas clásicos de hiperglucemia o crisis hiperglucémica, con una glucemia aleatoria $\geq 200$ mg/dL (11.1 mmol/L).
*En ausencia de hiperglucemia inequívoca, el resultado tiene que ser confirmado repitiendo el test.

OGTT; Test de tolerancia a la glucosa oral, OMS; Organización Mundial de la Salud. Adaptado de (American Diabetes Association, 2018a)

### 1.1. Diabetes tipo 2

La DT2 está estrechamente relacionada con el sobrepeso y la obesidad, siendo obesos la mayoría de los pacientes diabéticos de tipo 2 (American Diabetes Association, 2016). Aunque la mayor parte de los pacientes diagnosticados son adultos, cada vez se empiezan a diagnosticar pacientes en edades más tempranas. Esta disminución en la edad de diagnóstico se debe al aumento del sobrepeso y la obesidad infantil, la falta de actividad física y a las deficiencias nutricionales (American Diabetes Association, 2018a; Cheng, 2005).

Con frecuencia, la DT2 no se diagnostica durante los primeros años de la enfermedad, ya que la hiperglucemia se desarrolla gradualmente y, a menudo, los efectos iniciales pasan desapercibidos (American Diabetes Association, 2016). La DT2 es una enfermedad multifactorial en la que intervienen componentes genéticos y ambientales, entre los que destacan la edad avanzada, el origen étnico, el desarrollo económico y el estilo de vida. Todo esto contribuye a la gran heterogeneidad observada en la patofisiología y el fenotipo de la DT2 (Gregg et al., 2016; Smith et al., 2010a).

### **1.1.1. Patogenia de la diabetes de tipo 2**

La DT2 se inicia al producirse una leve resistencia a la insulina por parte de los tejidos periféricos, principalmente hígado, tejido adiposo y músculo esquelético. Sin embargo, durante esta fase inicial, las células beta pancreáticas son capaces de compensar esta resistencia, aumentando la secreción de insulina. La hiperinsulinemia sostenida a lo largo del tiempo, junto con la resistencia a la insulina cada vez más agravada en los tejidos periféricos, promueven el “agotamiento” de las células  $\beta$  pancreáticas, siendo éstas incapaces de responder a la excesiva demanda de insulina. En esta fase se produce una disfunción de las células  $\beta$  pancreáticas, las cuales disminuyen la síntesis, señalización celular y secreción de insulina. Además también se observa una desdiferenciación y disminución de la proliferación de estas células que, junto con un aumento de la apoptosis, inducen la reducción de la masa de célula  $\beta$  pancreática (Ashcroft and Rorsman, 2012; Butler et al., 2003; Cerf, 2015). Cuando se produce una reducción de más del 80% de la masa de célula  $\beta$  pancreática, la hiperglucemia se hace evidente (Butler et al., 2003).

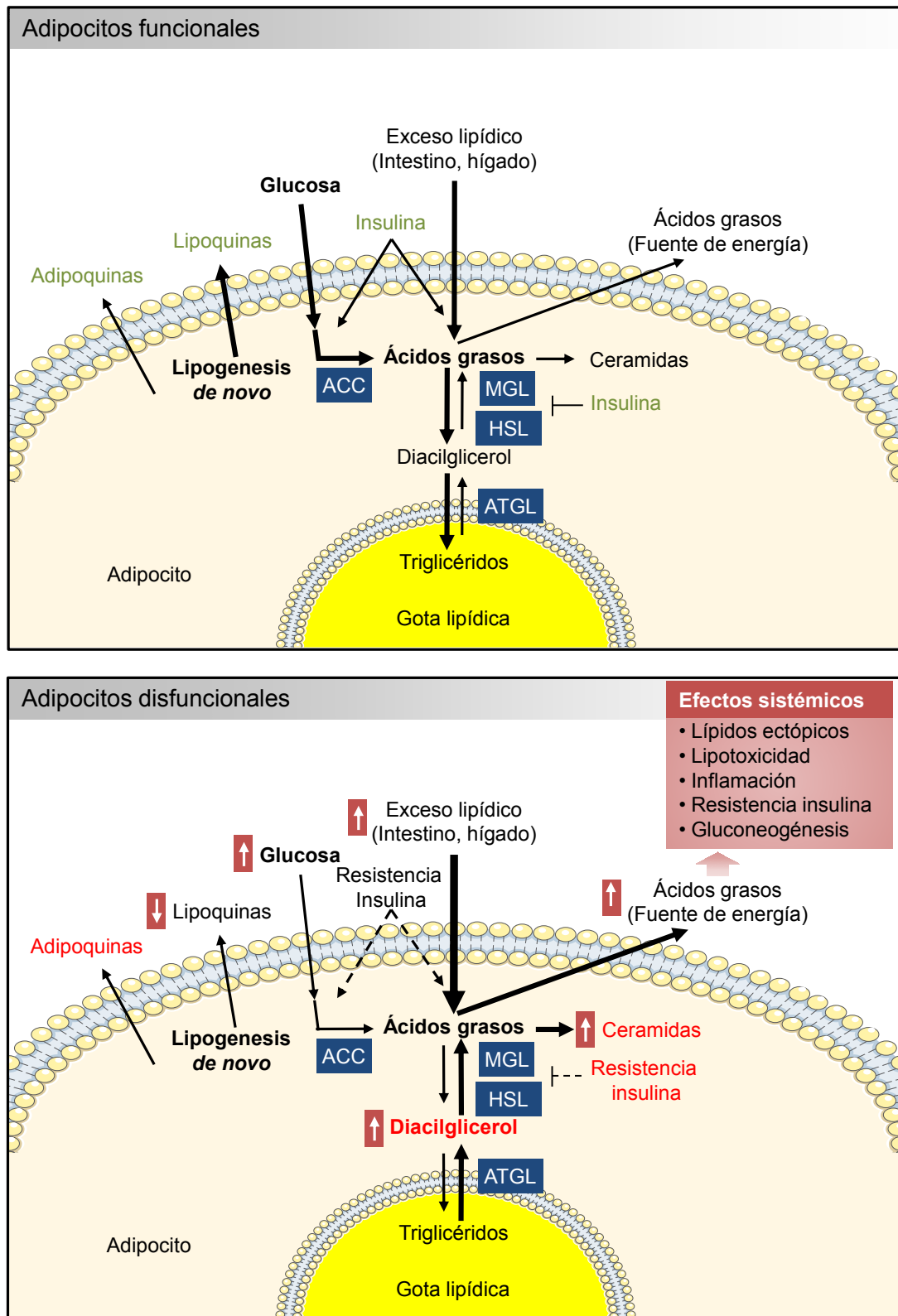
El desarrollo de la DT2 está muy asociado a la obesidad. Una ingesta excesiva de calorías y la falta de actividad física provocan un incremento en los niveles circulantes de ácidos grasos libres (FFA), los cuales se almacenan en los adipocitos en forma de triglicéridos (TG) en gotas lipídicas intracelulares (Figura 1) (Sattar and Gill, 2014). Cuando los adipocitos son funcionales, los FFA almacenados pueden ser movilizados mediante lipólisis de los triglicéridos en situaciones de demanda energética. La insulina promueve tanto la captación y metabolización de la glucosa como la captación y metabolización de los lípidos circulantes, así como la lipogénesis *de novo*. La secreción de adipoquinas y lipoquinas por los adipocitos contribuye a regular el metabolismo sistémico (Figura 1). Sin embargo, el depósito excesivo de grasa en los adipocitos desencadena el aumento de su tamaño o hipertrofia (Lee et al., 2010).

Cuando los adipocitos sobrepasan su capacidad de almacenaje se produce un incremento de la lipólisis de los triglicéridos, liberándose a la circulación los FFAs, además de inducirse una reducción en la captación de glucosa y lipogénesis *de novo* (Figura 1) (Guilherme et al., 2008). El incremento de diacilglicerol y ceramidas también contribuyen al efecto lipotóxico de los ácidos grasos (Vegiopoulos et al., 2017). Dado el aumento de los niveles circulantes de FFA y el colapso de la capacidad de almacenaje de los adipocitos, los FFA son acumulados de manera ectópica en tejidos

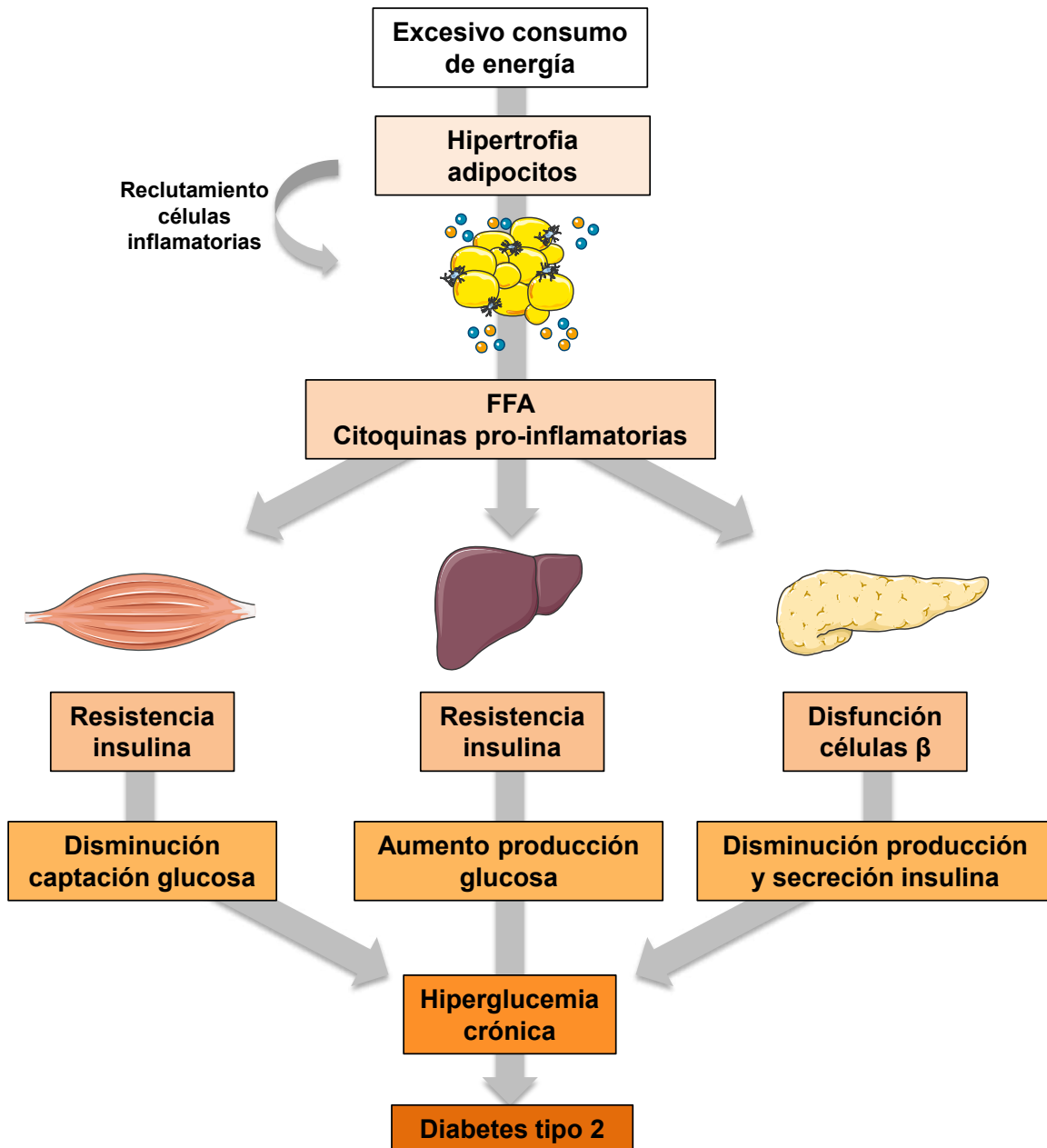
no adiposos tales como el hígado y músculo esquelético (Guilherme et al., 2008; Loher et al., 2016; Sattar and Gill, 2014). Además, junto con el incremento en la liberación de FFA por parte de los adipocitos, se induce la liberación de citoquinas proinflamatorias, como son el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) o la interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), por parte tanto de los adipocitos como de los macrófagos residentes en el tejido adiposo. Otros tipos celulares inmunitarios presentes en el tejido adiposo, como son los linfocitos B y las células T, también pueden secretar agentes inmunomoduladores que contribuyen a la inflamación local y sistémica. Este estado proinflamatorio contribuye a aumentar la lipólisis en el tejido adiposo e inhibe la expresión de genes necesarios para la diferenciación de los adipocitos y la señalización de la insulina, proporcionando las bases moleculares de la resistencia a la insulina en el tejido adiposo (Ruan et al., 2002; Strissel et al., 2014).

La acumulación de lípidos en el hígado y en el músculo esquelético junto con el entorno proinflamatorio inducido por el tejido adiposo, favorecen la reducción de la sensibilidad sistémica a la insulina (Amouzou et al., 2016; DeFronzo and Tripathy, 2009). En este contexto de resistencia a la insulina, el músculo esquelético disminuye la captación de glucosa. A su vez, la resistencia hepática a la insulina impide la supresión de la gluconeogénesis, aumentando la producción de glucosa y contribuyendo así al empeoramiento de la hiperglucemia (Figura 2). La hiperglucemia, los altos niveles de FFA y de citoquinas proinflamatorias, entre las que destaca TNF- $\alpha$  (Kahn et al., 2006), inducen una alteración en la respuesta a la estimulación de la secreción de insulina inducida por la glucosa (Donath and Halban, 2004; Leahy, 2005). Además, también disminuyen la biosíntesis de insulina, promueven la apoptosis de las células  $\beta$  y median la inflamación en los islotes pancreáticos que acaba impactando negativamente la función y la masa de células  $\beta$  (Figura 2) (Donath et al., 2010; Hajer et al., 2008b; Halban, 2008). En conjunto, los altos niveles de FFA y de citoquinas proinflamatorias circulantes, junto con la aparición de resistencia a la insulina en los tejidos periféricos y una disfunción de la célula  $\beta$  pancreática, desencadenan la alteración de la homeostasis energética del organismo (Nolan et al., 2011) (Figura 2).





**Figura 1. Metabolismo y almacenamiento de lípidos en adipocitos sanos y en adipocitos disfuncionales.** En el panel superior de la figura se muestra como los adipocitos sanos metabolizan y almacenan el exceso de lípidos y glucosa circulantes en forma de triglicéridos en gotas lipídicas intracelulares. Por otro lado, en el panel inferior, se muestra la incapacidad de los adipocitos disfuncionales en almacenar correctamente los triglicéridos y la lipotoxicidad asociada. Los efectos adaptativos y patogénicos se muestran en verde y rojo respectivamente. MGL, monoglicerol lipasa; HSL, lipasa sensible a hormonas; ATGL, *Adipose triglyceride lipase*; ACC, *acetyl-CoA carboxilasa*. Figura adaptada de (Vegiopoulos et al., 2017))



**Figura 2. Alteraciones claves que vinculan la obesidad y el desarrollo de la diabetes de tipo 2.** El excesivo acúmulo de lípidos en los adipocitos induce la falta de respuesta a la inhibición de la lipólisis por la insulina y el reclutamiento de células inflamatorias que secretan citoquinas proinflamatorias. El aumento de FFA y citoquinas circulantes favorecen el depósito ectópico de lípidos en el músculo y en el hígado e inducen la resistencia a la insulina en estos tejidos. La resistencia a la insulina en el hígado conlleva un aumento de la gluconeogénesis y la glucogenólisis que, junto con la disminución de la captación de glucosa por el músculo y el tejido adiposo, contribuyen a la hiperglucemia. Ante el incremento de los niveles de glucosa en sangre se produce una hiperplasia de las células  $\beta$  del páncreas para compensar la demanda de insulina. Con el tiempo se ocasiona el agotamiento de las células  $\beta$ , disminuyendo su capacidad para producir y secretar insulina. Todo ello desencadena la hiperglucemia crónica característica de la DT2.

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

Existen evidencias de que factores genéticos contribuyen en gran manera al desarrollo de la DT2 (Stumvoll et al., 2005). Se ha observado que personas con antecedentes familiares de DT2 presentan un riesgo tres veces mayor de desarrollar dicha enfermedad (Schäfer et al., 2011). Sin embargo, considerando la heterogeneidad de la patogenia de la DT2, en la mayoría de casos el factor genético muestra una contribución más modesta frente a los factores ambientales (Imamura and Maeda, 2011; Murea et al., 2012).

En la actualidad los estudios *Genome-Wide Association* (GWA) han permitido asociar más de 60 locis con el desarrollo de diabetes (Billings and Florez, 2010; Dupuis et al., 2010; Morris et al., 2012; Voight et al., 2010). Cada uno de estos loci contiene variaciones en la secuencia de DNA, que son causantes de un mayor riesgo de sufrir DT2. A pesar de que en algunas de estas variantes genéticas aún no se ha establecido el mecanismo molecular subyacente al desarrollo de DT2, su influencia en la sensibilidad a la insulina o en la secreción de ésta ha sido demostrada en diversos casos. Un claro ejemplo son las variantes de los genes *Peroxisome proliferator-activated receptor*  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ), *Fat mass and obesity-associated protein* (FTO), *Insulin receptor substrate 1* (IRS1) o *Krüppel-like factor 14* (KLF14) que están relacionadas con altos niveles de insulina circulante en ayuno (Voight et al., 2010). También se han descrito genes involucrados en el desarrollo de DT2 que están asociados con la disfunción de las células  $\beta$  del páncreas como *Glucokinase* (GK) o *Melatonin receptor 1B* (MTNR1B) (Tam et al., 2010). En el mismo sentido, existen variantes génicas asociadas a defectos en la secreción de insulina, como las de los genes *Transcriptor factor 7-like 2* (TCF7L2), *Solute carrier family 30 member 8* (SLC30A8), *Cyclin-dependent kinase 5 regulatory subunit associated protein 1-like 1* (CDKAL1) y *Cyclin-dependent kinase 4 inhibitor B* (CDKN2A/2B), aunque no producen efectos marcados sobre la glucemia (Dimas et al., 2014). Gran parte de estos loci también están involucrados en la susceptibilidad a la obesidad, como es el caso del gen FTO, evidenciando la estrecha relación existente entre la obesidad y la DT2 (Hu et al., 2001; Karaderi et al., 2015). Asimismo, también se han identificado locis que aumentan el riesgo de padecer sobrepeso y obesidad en diabéticos tipo 2 como los genes *Adiponectin* (ADIPOQ), *Leptin receptor* (LEPR), *Insulin receptor substrate 2* (IRS2) o *Growth factor receptor-bound protein 14* (GRB14) (Kasim et al., 2016).

Aunque el componente genético se considera un factor a tener en cuenta, solo representa un riesgo que contribuye a aumentar la susceptibilidad a padecer DT2, siendo el estilo de vida el principal responsable del aumento de la incidencia de DT2 en la últimas décadas (Imamura and Maeda, 2011). En particular, un estilo de vida cada vez más sedentario junto con el consumo de dietas con un alto contenido calórico propias de Occidente (*Western diet*), son dos de los factores que más contribuyen en el desarrollo de la DT2 al aumentar la incidencia de obesidad y sobrepeso. Concretamente, el incremento de la cantidad de grasa visceral y el depósito de grasa de manera ectópica en tejidos periféricos, como el hígado, contribuyen en gran medida al desarrollo de la DT2. De hecho, las personas obesas que presentan una menor obesidad visceral o menor acumulación de grasa en el hígado, no muestran una desregulación metabólica. Por el contrario, aquellos pacientes con un mayor acúmulo de grasa visceral o ectópico, presentan una mayor probabilidad de desarrollar DT2, independientemente de que el paciente sea obeso (Kolb and Martin, 2017).

Además del consumo de dietas hipercalóricas ricas en grasas, la ingesta de dietas pobres en fibra (fruta, verdura y cereales) triplican el riesgo de desarrollar DT2. De manera similar, el consumo regular de bebidas azucaradas eleva el riesgo de desarrollar DT2 un 20%. Además, estudios recientes demuestran que la exposición a partículas pequeñas, principalmente procedentes de la polución del tráfico, también aumentan la susceptibilidad a padecer DT2 (Bowe et al., 2018). El tabaquismo por sí solo incrementa las probabilidades de desarrollar DT2 desde un 30 a un 90%, dependiendo del grado de adicción. Se ha descrito que el estrés y la depresión también son factores que influyen sobre el riesgo de padecer esta enfermedad, incluso el insomnio provoca un aumento del riesgo en un 10% (Kolb and Martin, 2017). Otro factor independiente de la obesidad a tener en cuenta es el origen étnico (Basu et al., 2013). Presentar antecedentes de diabetes gestacional incrementa en 10 veces la probabilidad de que una mujer desarrolle diabetes en comparación con un mujer que no haya tenido diabetes durante el embarazo (Herath et al., 2017). La edad es otro factor importante con una alta correlación con la prevalencia de DT2 (Basu et al., 2013; Yakaryilmaz and Öztürk, 2017). Finalmente, también se ha descrito relación entre el desarrollo de la DT2 y ciertas infecciones víricas. El virus de la hepatitis C puede inducir la aparición de esteatosis hepática y, por consiguiente, el desarrollo de la resistencia a la insulina y DT2 (Negro, 2014). También, se ha observado que la infección por *Chlamydia pneumoniae* puede causar la disfunción de la célula  $\beta$

pancreática en un contexto de inflamación sistémica (Rodríguez et al., 2015). Por último, tanto las personas que sufren el síndrome de la inmunodeficiencia adquirida (SIDA), así como los pacientes sometidos a tratamientos con fármacos antiretrovirales, muestran un agravamiento de la inflamación sistémica, lo que puede promover resistencia a la insulina (Dooko et al., 2015).

## **2. OBESIDAD**

La obesidad está causada por el desequilibrio energético entre el aporte energético y la energía consumida, llevando a la acumulación excesiva o anormal de grasa que puede ser perjudicial para la salud. En las últimas décadas, tanto la incidencia de sobrepeso como de obesidad han aumentado de manera alarmante y paralela a la incidencia de la DT2. En 2016 más de 1900 millones de adultos tenían sobrepeso, de los cuales, más de 650 millones eran obesos (WHO, 2017). Actualmente el 13% de la población mundial adulta es obesa y no se aprecian diferencias entre sexos. Al comparar la prevalencia actual de obesidad con la de 1975, se evidencia que la población obesa mundial se ha triplicado (WHO, 2017). Además, en 2016 aproximadamente 41 millones de niños menores de cinco años presentaban sobrepeso o eran obesos (WHO, 2017).

Aunque la obesidad y el sobrepeso se han considerado un problema propio de países desarrollados, actualmente la incidencia de ambos trastornos ha aumentado también en países pobres y en vías de desarrollo. Así, desde el año 2000, el número de menores de 5 años con sobrepeso ha crecido un 50% en África. Si se amplía el rango de edad entre los 5 y 19 años, 340 millones de niños y adolescentes presentaron sobrepeso u obesidad según los últimos datos de la Organización Mundial de la Salud (WHO, 2017).

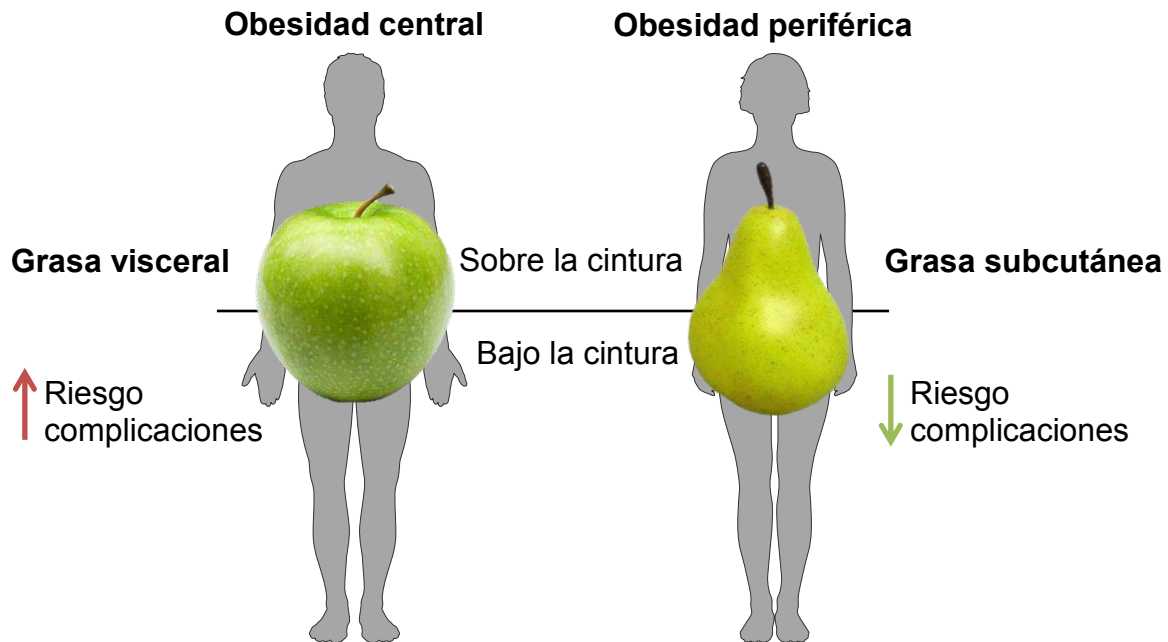
La obesidad se caracteriza por un acumuló excesivo de grasa en el tejido adiposo y otros órganos (Frühbeck et al., 2009; Rodgers et al., 2012). El índice de masa corporal (IMC) es el parámetro más aceptado para el diagnóstico de la obesidad. El IMC se define como el cociente del peso del individuo entre su altura al cuadrado ( $\text{Kg/m}^2$ ). Se considera que una persona padece sobrepeso cuando su valor de IMC se sitúa entre los 25 y 29,9  $\text{Kg/m}^2$ , mientras que pacientes con un IMC igual o superior a 30  $\text{Kg/m}^2$  se definen como obesos (American Diabetes Association, 2011). Por razones biológicas las mujeres suelen tener un IMC y tasas de obesidad

superiores a los hombres (Haslam and James, 2005). A pesar de que el IMC es la medida más utilizada para valorar la obesidad en estudios poblacionales, no es el parámetro más correcto para predecir el riesgo individual, ya que no permite discernir entre la contribución del músculo y la grasa al peso del individuo. Otros métodos más específicos para determinar la distribución de la grasa y clasificar el grado de obesidad de un individuo incluyen la circunferencia de la cintura o el ratio entre el perímetro de la cintura y la cadera (Taylor, 2008). Por último, también existen medidas directas de la composición corporal de un individuo tales como los obtenidos mediante la tomografía computarizada o la resonancia magnética (Marzola et al., 2016).

### 2.1. Tipos de obesidad en humanos

La cantidad así como la distribución de la grasa corporal determinan en gran medida el riesgo de padecer algunas de las enfermedades asociadas con la obesidad. En función del depósito donde mayormente se acumula la grasa, se pueden distinguir dos tipos de obesidad (Gesta et al., 2007) (Figura 3):

- **Obesidad central, en forma de manzana o androide:** esta obesidad se caracteriza por un preferente acúmulo intraabdominal o visceral de la grasa, aumentando su almacenamiento alrededor de las vísceras en los depósitos adiposos omental, mesentérico y retroperitoneal. Este tipo de obesidad es la más común en hombres. Los individuos que la padecen presentan menor sensibilidad a la insulina y tolerancia a la glucosa, junto a un incremento en el riesgo de sufrir complicaciones metabólicas como la DT2 (Tchernof and Després, 2013).
- **Obesidad periférica, en forma de pera o ginoidea:** este tipo de obesidad se caracteriza por un preferente depósito de grasa en el tejido adiposo subcutáneo, especialmente en muslos y caderas. Esta forma es predominante en mujeres. A diferencia de la obesidad central, la obesidad periférica presenta un menor riesgo metabólico y de complicaciones, incluso los pacientes muestran una tolerancia normal a la glucosa (Tchernof and Després, 2013).



**Figura 3. Clasificación de la obesidad en función de la distribución de la grasa corporal. Obesidad central o periférica.**

## 2.2. Complicaciones de la obesidad

Las personas obesas presentan una disminución en su esperanza de vida de unos 7 años (Kitahara et al., 2014; Peeters et al., 2003). Si el individuo padece obesidad extrema ( $BMI \geq 40 \text{ kg/m}^2$ ) la reducción de la esperanza de vida alcanza los 14 años (Kitahara et al., 2014; Peeters et al., 2003). Este aumento en el riesgo de mortalidad vinculado a la obesidad se debe a que la obesidad predispone a padecer múltiples patologías con elevada mortalidad y morbilidad, como son la hipertensión, dislipidemia, enfermedades coronarias, enfermedades biliares y ciertos tipos de tumores (Van Gaal et al., 2006; Haslam and James, 2005; Pi-Sunyer, 2002). La obesidad también está estrechamente ligada a la enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD), grave complicación debida tanto a su alta prevalencia a nivel mundial como por sus efectos metabólicos. El NAFLD se inicia con un acúmulo de grasa (esteatosis) en el hígado, el cual, si no se trata, progresa y se agrava hasta desarrollar una grave inflamación o esteatohepatitis no alcohólica (NASH). La esteatohepatitis con el tiempo puede inducir fibrosis en el propio hígado, desarrollando finalmente una cirrosis hepática (Bertot and Adams, 2016).

### 2.3. Susceptibilidad genética y factores ambientales en la obesidad

De manera similar a la DT2, tanto factores genéticos como ambientales están implicados en el desarrollo de obesidad (González-Muniesa et al., 2017). La variabilidad del IMC dentro de una población está en gran parte determinada genéticamente, con estimaciones de heredabilidad que varían entre el 40% y 70% (Ramachandrapa and Farooqi, 2011). Asimismo, en un estudio realizado en niños adoptados, se observó una mayor correlación entre el peso de los niños con sus padres biológicos que con sus padres adoptivos (Sørensen et al., 1989).

De manera similar a la DT1, estudios de *Genome-Wide Association* (GWA) han permitido identificar múltiples genes relacionados con la obesidad en humanos (McCarthy, 2010). La leptina es una hormona secretada principalmente por el tejido adiposo y está implicada en la señalización de la saciedad y el aumento del gasto energético (Coppari and Bjorbaedk, 2012). Se han identificado diferentes mutaciones en el gen humano de la leptina que afectan el marco de lectura como mutaciones *nonsense* y *missense* que cuando aparecen en homocigosis provocan que el individuo no pueda producir leptina, por lo que los pacientes son severamente obesos desde edades tempranas (Montague et al., 1997; Strobel et al., 1998). Asimismo, también se ha descrito que hasta el 3% de los pacientes con obesidad severa presentan mutaciones con pérdida de función en el gen que codifica el receptor de leptina (Ozata et al., 1999; Ramachandrapa and Farooqi, 2011). La leptina modula el balance energético mediante la combinación tanto de vías dependientes como independientes de la melanocortina. De hecho, mutaciones en el receptor 4 de la melanocortina (MC4R) pueden explicar entre un 5 y 6% de los casos de obesidad severa (Farooqi et al., 2003). De igual forma, mutaciones en los genes *pro-opiomelanocortin* (POMC) y la *prohormone convertase 1* (PCSK1, enzima implicada en el procesamiento de POMC) provocan hiperfagia y obesidad de aparición temprana (Ramachandrapa and Farooqi, 2011). Además, la obesidad en pacientes humanos también ha sido asociada a variantes de los genes *FTO*, *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF), *SH2B adaptor protein 1* (SH2B1) y *neural growth regulator 1* (NEGR1) (McCarthy, 2010).

El incremento actual de la incidencia de la obesidad, al igual que en el caso de la DT2, se debe principalmente a los cambios de hábitos y estilo de vida durante las últimas décadas. Los factores ambientales que más contribuyen a este crecimiento son el incremento del consumo de dietas grasas y bebidas azucaradas junto con el consumo frecuente de comidas rápidas hipercalóricas. Esto se evidencia sobre todo



en países desarrollados donde las dietas equilibradas ricas en vegetales, frutas y pescado han sido reemplazadas por dietas con alto contenido calórico. El estrés crónico se considera también un componente muy importante en la predisposición a padecer sobrepeso y obesidad (Ahima, 2011; Scott, 2012). Un estilo de vida cada vez más sedentario también contribuye. En este sentido, existe una estrecha relación entre los bajos niveles de actividad física y el aumento de peso en ambos sexos (Hu, 2003).

### **3. TRATAMIENTOS ACTUALES PARA LA DIABETES DE TIPO 2 Y LA OBESIDAD**

El control de la obesidad presenta un claro efecto beneficioso en el tratamiento de la DT2, retrasando su progresión (Goldstein, 1992; Jackness et al., 2013; Knowler et al., 2002; Lim et al., 2011; Pastor et al., 2002; Rothber et al., 2014; Tuomilehto, 2013; UKPDS Group, 1990). Así, una pérdida de peso modesta y mantenida mejora el control glucémico y reduce la necesidad de medicamentos hipoglucemiantes en pacientes diabéticos con sobrepeso u obesidad (Goldstein, 1992; Pastor et al., 2002; UKPDS Group, 1990).

#### **3.1 Terapias actuales para pacientes diabéticos tipo 2**

El objetivo de los tratamientos es el de disminuir los niveles circulantes de glucosa en los pacientes diabéticos de tipo 2. La efectividad de los tratamientos depende del momento de la progresión de la DT2 en el que se diagnostica, de una ingesta adecuada de nutrientes, del nivel de actividad física del paciente y del tipo de fármacos utilizados. Una vez diagnosticada la DT2, se recomienda a los pacientes una terapia basada en cambios alimentarios, ejercicio y el cese del tabaquismo, lo que claramente reduce el riesgo de progresión de la intolerancia a la glucosa y la resistencia a la insulina (American Diabetes Association, 2018b). Si esto no fuera suficiente para reducir los niveles circulantes de glucosa, se administra a los pacientes tratamientos farmacológicos. Si no existen contraindicaciones, el tratamiento más utilizado es con Metformina, aunque existen otros entre los que se incluyen fármacos como las sulfonilureas, tiazolidinedionas (TZD), agonistas del *glucagon-like peptide 1 receptor* (GLP1R), inhibidores de la dipeptidyl peptidase 4 (DPP4), inhibidores del *sodium/glucose cotransporter 2* (SGLT2) o insulina basal (American Diabetes Association, 2018c). Si el tratamiento con Metformina no normaliza los niveles de HbA1C en 3 meses, se combina el tratamiento con un segundo fármaco. Si persisten los niveles elevados de HbA1C, se recomienda combinar ambos fármacos junto con la

administración diaria de múltiples dosis de insulina basal (American Diabetes Association, 2016; Inzucchi et al., 2012).

La Metformina pertenece al grupo de las biguanidinas y es un fármaco ampliamente utilizado en el tratamiento de la DT2 al ser considerado efectivo, seguro y barato, que además puede reducir el riesgo de sufrir eventos cardiovasculares e incluso la muerte (Holman et al., 2008; Inzucchi et al., 2012). Su mecanismo de acción se basa en la supresión de la gluconeogénesis hepática mediante la sensibilización del hígado a la insulina, reduciendo la producción endógena de glucosa. Además la Metformina es capaz de mejorar la sensibilidad a la insulina del músculo esquelético, aumentar la saciedad y los niveles de *glucagon-like peptide 1* (GLP-1) (Holman et al., 2008; Pryor and Cabreiro, 2015; Tahrani et al., 2011). A diferencia de otros fármacos utilizados en el tratamiento de la diabetes, la Metformina no aumenta el riesgo de sufrir hipoglucemias (Holman et al., 2008; Inzucchi et al., 2012). Sin embargo, la Metformina está asociada a una deficiencia de vitamina B12, con lo que es recomendable realizar un seguimiento periódico de los pacientes para controlar los niveles de esta vitamina, especialmente en pacientes que padecen anemia o neuropatía periférica (Aroda et al., 2016).

Las sulfonilureas fueron los primeros fármacos orales utilizados para el tratamiento de la DT2, ya que mejoran la secreción de insulina. Las sulfonilureas se unen a los canales de potasio sensibles a ATP ( $K_{ATP}$ ) de las células  $\beta$  pancreáticas, mejorando la secreción de insulina (Inzucchi et al., 2012; Turner et al., 1999). Además, las sulfonilureas también son capaces de suprimir la gluconeogénesis hepática, lo que contribuye a reducir la hiperglucemia (Turner et al., 1999). Aunque son eficaces controlando los niveles de glucosa, su uso está asociado a un incremento en la ganancia de peso y al riesgo de sufrir hipoglucemias (Inzucchi et al., 2012).

Las tiazolidinedionas (TZDs) activan la heterodimerización de PPAR $\gamma$  con el *receptor X retinoide* (RXR) y bloquean la fosforilación de *Cyclin-dependent kinase 5* (CDK-5) por PPAR $\gamma$  (Yki-Järvinen, 2004), incrementando la sensibilidad a la insulina en el músculo esquelético y reduciendo la producción hepática de glucosa (Inzucchi et al., 2012; Yki-Järvinen, 2004). Las TZDs no incrementan el riesgo de sufrir episodios hipoglucemiantes y sus efectos son más duraderos que los de las sulfonilureas y la Metformina. Sin embargo, entre sus efectos adversos se incluyen la ganancia de peso y la retención de líquidos (Inzucchi et al., 2012).

GLP-1 es una hormona incretina, la cual es inmediatamente inactivada por DPP-4 una vez se encuentra en el torrente sanguíneo. Las incretinas pueden estimular la secreción pancreática de insulina, retrasar el vaciado gástrico, suprimir la secreción de glucagón y disminuir el apetito. Recientemente se han obtenido miméticos de GLP-1 que son resistentes a la inactivación por DPP-4, por lo que presentan una vida media más larga en comparación con GLP-1 nativo (Inzucchi et al., 2012; Mulvihill and Drucker, 2014). Por otro lado, también se han generado inhibidores de la DPP4 capaces de potenciar la vida media de GLP-1 aumentando sus niveles endógenos, sin afectar el peso corporal (Mulvihill and Drucker, 2014). Al igual que la Metformina, los fármacos basados en el sistema de incretinas no inducen hipoglucemias (Inzucchi et al., 2012).

Los inhibidores de SGLT2 disminuyen la hiperglucemia al bloquear la reabsorción de glucosa en el riñón, incrementando así su excreción en orina. Sin embargo, estos fármacos pueden favorecer las infecciones del tracto urinario al aumentar la concentración de glucosa en la orina (Zinman et al., 2015). Además, algunos autores han descrito que este tratamiento puede favorecer la resorción ósea, incrementando el riesgo de fracturas (Brunton, 2015), aunque existe controversia respecto este tema.

Debido a la progresiva disminución de la masa de células  $\beta$  durante el desarrollo de la DT2, a menudo se requiere de una terapia de remplazo con insulina en el tratamiento de la diabetes. La administración de insulina exógena mejora la capacidad de secreción de insulina endógena y estabiliza la glucemia. En pacientes diabéticos tipo 2, la terapia con insulina puede ser combinada con uno o varios de los fármacos anteriormente mencionados. Dependiendo de cada paciente y de sus necesidades en el mantenimiento de la normoglucemia, existen diferentes tipos de insulina, desde la insulina basal, bolo de insulina, insulina premezclada, productos concentrados de insulina e incluso insulina inhalada (American Diabetes Association, 2018c). A pesar de las múltiples ventajas de la administración de insulina exógena, su mayor defecto y miedo entre los pacientes es que puede inducir estados de hipoglucemia e incremento de peso (Turner et al., 1999).

Además de la normalización de la glucemia, es fundamental tratar las complicaciones secundarias, como la hipertensión arterial, las complicaciones renales, la retinopatía diabética y las úlceras del pie, las cuales pueden aparecer durante el desarrollo y progresión de la DT2. Es importante indicar que con cambios del estilo de

vida y alimentación, junto con un buen control farmacológico de la glucemia si fuera necesario, las personas diabéticas de tipo 2 pueden tener una vida larga y saludable (American Diabetes Association, 2018b).

### **3.2. Terapias actuales para pacientes obesos**

La primera intervención en el tratamiento del sobrepeso y la obesidad es una disminución de la ingesta calórica junto con un aumento del gasto energético. Sin embargo, la mayor parte de los pacientes solamente reducen entre 3-4% de su peso corporal tras 4 años de cambios saludables en su estilo de vida y un aumento de la actividad física (Torgerson et al., 2004). Por este motivo, las intervenciones sobre el estilo de vida suelen estar acompañadas de terapias farmacológicas e incluso cirugía bariátrica (Dyson, 2010). La farmacoterapia contra la obesidad se recomienda en individuos con un IMC de al menos 27 Kg/m<sup>2</sup> con alguna comorbilidad persistente o en aquellos sujetos con un IMC de 30 Kg/m<sup>2</sup> o superior. La farmacoterapia se considera un complemento a los cambios en el estilo de vida ya que puede mejorar sustancialmente la pérdida de peso, pero por sí sola no induce una pérdida involuntaria y sustancial de peso. La eficacia de un tratamiento farmacológico contra la obesidad se determina por su capacidad de reducir un 3-5% el peso corporal tras 3 meses de administración (American Diabetes Association, 2016).

Actualmente existen seis tratamientos contra la obesidad aprobados por la FDA, lo cual permite adaptarse a las necesidades individuales de cada paciente (American Diabetes Association, 2016, 2018d). La mayoría de los fármacos aprobados actúan a largo plazo, mientras que tan solo existe un tratamiento a corto plazo, el inhibidor del apetito Fentermina (American Diabetes Association, 2018d). Los otros tratamientos aprobados son: Liraglutide® (Astrup et al., 2011; Pi-Sunyer et al., 2015), Orlistat® (Sumithran and Proietto, 2014), Lorcaserin® (Smith et al., 2010b) y las combinaciones duales Fentermina-Topiramato (Verrotti et al., 2011) y Naltrexone-bupropion (Greenway et al., 2010).

La Fentermina pertenece a la familia de las anfetaminas y su mecanismo de acción se basa en la supresión del apetito mediante la activación de las neuronas catecolaminérgicas. Este tratamiento solo se puede administrar durante un corto periodo de tiempo y en dosis muy controladas, ya que su mayor inconveniente es que crea adicción (American Diabetes Association, 2018d).

Liraglutide® es un agonista de GLP-1 y se basa en el mecanismo de acción de las incretinas, las cuales promueven la secreción pancreática de insulina retrasando el vaciado gástrico y suprimiendo la secreción de glucagón. Además, también poseen un efecto anorexigénico a nivel del sistema nervioso central, reduciendo el apetito y la ingesta de alimentos. Es más, se ha descrito que los agonistas del GLP-1 pueden restablecer la sensibilidad a la leptina en animales obesos (Astrup et al., 2011; Ladenheim, 2015; Pi-Sunyer et al., 2015).

Orlistat® es una molécula capaz de inhibir las lipasas gástricas y pancreáticas, reduciendo la digestión de grasa a nivel intestinal. El tratamiento con Orlistat® permite reducir un 30% la absorción de grasa por el intestino, mejorando la glucemia y el peso de los pacientes (Sumithran and Proietto, 2014).

Lorcaserin® es un agonista del *5-hydroxytryptamine receptor 2C* (5-HT<sub>2C</sub>) capaz de activar las neuronas hipotalámicas productoras de pro-opiomelanocortina (POMC), favoreciendo la saciedad. Por otro lado, también reduce los niveles de hemoglobina glicosilada y los factores de riesgo de enfermedades cardiovasculares (Smith et al., 2010b).

La combinación de agonistas de la noradrenalina junto con inhibidores de la anhidrasa carbónica, Fentermina-topiramato, reduce la ingesta de alimento a través de antagonistas del *α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid* (AMPA) y de receptores de cainita. Además, mejoran la actividad de los receptores del *γ-aminobutyric acid* (GABA) y de la noradrenalina, incrementando el gasto energético (Verrotti et al., 2011).

La combinación de antagonistas opioides con antidepresivos aminocetona, Naltrexone-bupropion, activa las neuronas POMC a través de la unión al receptor de la melanocortina MC4R, antagonizando los efectos del sistema opioide. De esta forma se incrementa el consumo de energía y se reduce la ingesta de alimentos (Greenway et al., 2010). Sin embargo, se ha observado que puede afectar al estado de ánimo y aumentar la probabilidad de suicidio (Billes et al., 2014).

Por último, la cirugía bariátrica se ha convertido en la alternativa al tratamiento farmacológico más utilizada debido a su rápida eficacia. Este tipo de cirugía se aconseja en pacientes con un IMC superior a 40 Kg/m<sup>2</sup> o con comorbilidades severas. Actualmente, los fallecimientos debidos a la cirugía están por debajo del 1% y se

consiguen pérdidas de peso del 25-30% con una rápida normalización de la glucemia y la presión sanguínea. Sin embargo, la cirugía bariátrica presenta inconvenientes para los pacientes como la necesaria monitorización postquirúrgica a largo plazo y la ingesta de una dieta muy restrictiva, nutricionalmente pobre y exenta de fruta y vegetales. Además, existe un riesgo añadido a los pacientes que pierde peso muy rápidamente, observándose que el 38% de estos presentan cálculos biliares (Haslam and James, 2005).

A pesar de que los tratamientos anteriormente descritos pueden disminuir el grado de obesidad de los pacientes, presentan importantes efectos secundarios y en algunos casos los efectos beneficiosos son tan solo temporales. Así, es necesario el desarrollo de nuevos tratamientos para la DT2 y la obesidad que presenten una eficacia mejorada y un efecto terapéutico sostenido.

#### **4. MODELOS ANIMALES DE DIABETES DE TIPO 2 Y OBESIDAD**

Para desarrollar nuevos tratamientos para la DT2 y la obesidad es necesario utilizar modelos animales para describir, validar y optimizar nuevos fármacos y terapias para su uso seguro en humanos. Con el fin de mejorar la traslación clínica de los mismos, no solo es imprescindible seleccionar cuidadosamente los modelos animales más apropiados, sino también extraer correctas conclusiones.

Actualmente, existe una amplia gama de modelos animales, cada uno de los cuales presentan claras ventajas y desventajas (Figura 4). Los modelos animales no mamíferos presentan un bajo coste de mantenimiento, un ciclo de vida corto y la disponibilidad de múltiples herramientas de edición genética tales como *Clustered regularly interspaced short palindromic repeats* (CRISPR), *Transcription activator-like effector nuclease* (TALEN), terapia génica, entre otras. Sin embargo, su menor similitud anatómica y fisiológica con los humanos limita su utilización. Por el contrario, los modelos de animales grandes, incluyendo los primates no humanos, muestran una gran similitud con la fisiología humana, sin embargo presentan altos costes de mantenimiento y ciclos de vida más largos. Entre ambos extremos se encuentran los pequeños roedores, especialmente el ratón (*Mus musculus*), cuya fisiología es más cercana a la de los humanos comparada con los modelos no mamíferos, y su pequeño tamaño, alta fecundidad y ciclo de vida corto, junto con la relativa facilidad de edición de su genoma, explican su popularidad. El buen compromiso que presentan los

ratones entre rendimiento y capacidad traslacional a estudios humanos han hecho que alrededor del 61% de todos los estudios preclínicos se realicen en este modelo animal en la últimas décadas (Commission, 2013).

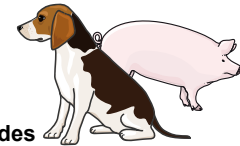
#### Modelo de primates no humanos

- Fisiología metabólica y anatomía similar a humanos
- Identidad genética cercana a los humanos (≈99% de similitud)
- Relevancia traslacional
- Posibilidad de realizar extracción de sangre, endoscopia y biopsias laparoscópicas en serie



- Mantenimiento costoso, instalaciones aprobadas limitadas y cuestiones éticas
- Ciclo de vida prolongado y parto único

#### Modelos animales grandes



- Tamaño y forma similares a humanos con fisiología humana relevante
- Herramientas genéticas disponibles similares a aquellas disponible para roedores (cerdo) y partos múltiples
- Posibilidad de canulación crónica
- El estrés puede reducirse con entrenamiento
- Farmacocinética similar a los humanos
- Páncreas y arquitectura de islotes similar a humanos

- Se requieren instalaciones costosas y especializadas
- Largo ciclo de vida



#### Modelos no mamíferos



- Ciclo de vida corto (excepto el pez cebra)
- Biblioteca de RNAi de genoma completo disponible
- Modelos similares a la obesidad y similares a DT2
- Bajo coste de mantenimiento
- Bioquímica conservada



- Distinta fisiología y anatomía

#### Modelos murinos



- Numerosos modelos de obesidad y DT2
- Herramientas disponibles para la manipulación genética
- Tecnología de fenotipado metabólico disponible
- Rentable y partos múltiples

- Arquitectura de los islotes pancreática distinta a la humana
- Los modelos monogénicos no son representativos de la mayoría de las enfermedades humanas

**Figura 4. Principales ventajas y desventajas de los diferentes modelos animales utilizados en el estudio de la DT2 y la obesidad.** En azul se muestran las principales ventajas de cada modelo animal y en rojo sus desventajas.

### 4.1. Modelos murinos de diabetes tipo 2 y obesidad inducidos por la dieta

Los modelos murinos de obesidad inducida por la dieta son muy utilizados para el estudio de la fisiopatología de la obesidad y la DT2, así como para el desarrollo de nuevos tratamientos ya que presentan una considerable similitud con la obesidad humana (Nilsson et al., 2012). En estos modelos experimentales a los ratones se les da acceso libre a alimentos con un alto contenido calórico, enriquecidos especialmente en grasas, siendo una de las más utilizadas la dieta alta en lípidos (*high fat diet*, HFD).

Los ratones alimentados con una dieta HFD presentan un lento y progresivo aumento de peso, junto con el desarrollo secundario de resistencia a la insulina de forma paulatina, de forma similar a la aparición de obesidad y DT2 en humanos. En contraposición, este tipo de dietas son costosas, y factores como la cepa del ratón, sexo, casa comercial y la edad del animal al inicio de la dieta pueden influenciar los resultados y la interpretación de los mismos (Ingvorsen et al., 2017; Mitchell et al., 2016; Nishikawa et al., 2007).

#### **4.2. Modelos murinos monogénicos de diabetes de tipo 2 y obesidad**

Entre la variedad de modelos genéticos murinos de DT2 y obesidad, cabe destacar el modelo de ratón *ob/ob*. Los ratones *ob/ob* fueron descritos por primera vez en 1949, en una población de ratones no consanguíneos y rápidamente se trasladó al fondo genético C57Bl/6, uno de los más utilizados. La mutación que presentaban estos ratones era recesiva y se encontraba localizada en el gen de la leptina (*lep*), situado en el cromosoma 6 del ratón, e inducía la deficiencia en la producción de leptina. Esta hormona está involucrada en el control de la saciedad y del apetito, por lo que la deficiencia de la hormona promueve un incremento en la ingesta. Al nacer, los ratones *ob/ob* son fenotípicamente indistinguibles de sus hermanos de camada no afectados. Sin embargo, a partir de las 4-5 semanas de edad muestran un rápido aumento de peso, que se mantendrá durante toda su vida, llegando a triplicar el peso de sus hermanos no afectados. Además, el modelo *ob/ob* desarrolla hiperinsulinemia y muestra un reducido gasto energético debido principalmente a una disminución de la termogénesis no asociada al temblor en el tejido adiposo marrón (BAT). Los animales *ob/ob* también muestran alteraciones reproductivas, presentando las hembras homocigotas esterilidad (Friedman and Halaas, 1998; Himms-hagen and Desautels, 1978; Ingalls et al., 1996; Trayhurn et al., 1977; Zhang et al., 1994). Este modelo es uno de los más utilizados en los estudios preclínicos dada la rapidez con la que los animales aumentan su peso corporal y el desarrollo de una ligera hiperglucemia.



## 5. FACTOR DE CRECIMIENTO FIBROBLÁSTICO 21 (FGF21)

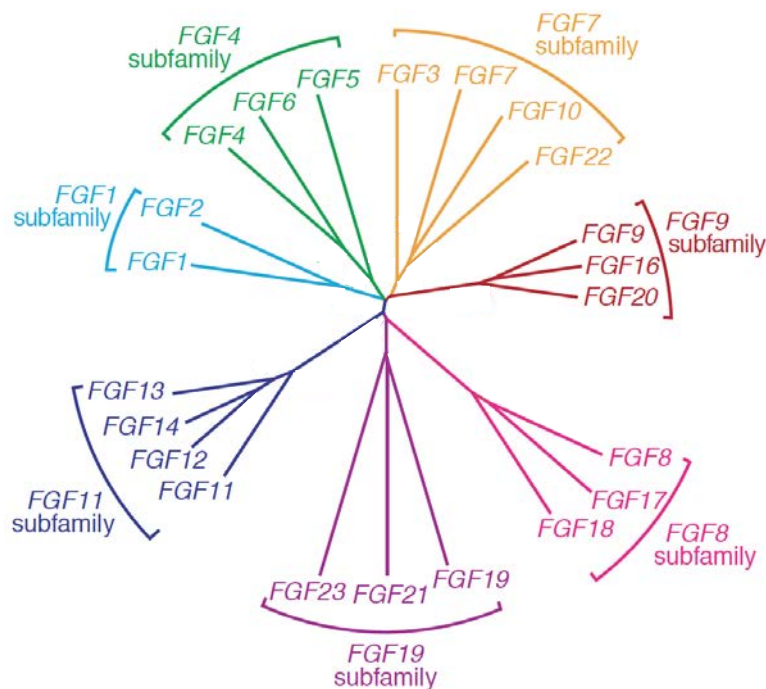
El factor de crecimiento fibroblástico 21 (*Fibroblast Growth Factor 21*, FGF21) es una proteína que pertenece a la familia de los factores de crecimiento fibroblástico. FGF21 es una hormona peptídica con un papel regulador del metabolismo, capaz de aumentar el gasto energético favoreciendo el metabolismo de glúcidos y lípidos, lo que a su vez resulta en una reducción del peso corporal y una mejora de la glucemia. Por ello, durante la última década se ha postulado como candidato terapéutico para el tratamiento de la obesidad, la DT2 y el NAFLD (Arner et al., 2008; Badman et al., 2007; Coskun et al., 2008; Inagaki et al., 2007; Kharitonov et al., 2005a; Lundâsen et al., 2007; Wente et al., 2006; Xu et al., 2009; Zhu et al., 2016).

### 5.1. Familia de los factores de crecimiento fibroblástico

La familia de los factores de crecimiento fibroblástico (FGFs) está formada por un conjunto de proteínas con la capacidad de regular una gran cantidad de procesos entre los que destacan el crecimiento celular, la diferenciación celular y el desarrollo embrionario (Oulion et al., 2012). La mayoría de los FGFs son pequeños, con un peso molecular de entre 17 y 34 kDa. Los FGFs ejercen su función a través de la unión a diferentes receptores de FGFs (FGFRs), los cuales presentan actividad tirosina quinasa y se expresan en la membrana plasmática de las células dianas (Beenken and Mohammadi, 2009).

Se han descrito hasta 22 miembros de la familia FGFs en mamíferos, nombrados del FGF1 al FGF23. En función de su homología y su filogenia los miembros de la familia se agrupan en 7 subfamilias (Figura 5) (Itoh and Ornitz, 2004). Estudios estructurales determinaron que todos los FGFs conservan la región central de unos 120-130 aminoácidos, siendo los extremos N- y C-terminales los que confieren la diversidad biológica de cada FGF (Mohammadi et al., 2005). La mayor parte de los FGFs actúan de forma paracrina sobre la modelación y organización tisular durante el desarrollo embrionario. Sin embargo, tres FGFs muestran una activa función hormonal a nivel metabólico: FGF19 (el ortólogo murino de FGF15 humano), FGF21 y FGF23. Todos los FGFs requieren del proteoglicano heparan sulfato para su interacción con el receptor, a excepción de los tres FGFs con efectos hormonales. Estos 3 FGFs necesitan de un co-receptor para poder señalar, en particular del co-receptor  $\beta$ -Klotho en el caso de FGF19 y FGF21 y Klotho para FGF23 (Fisher and Maratos-Flier, 2016). Las funciones principales de estos 3 miembros son la regulación

de la homeostasis de la glucosa, de los ácidos biliares, del colesterol, de la vitamina D y del fosfato (Fu et al., 2004; Goetz et al., 2007; Kharitononkov et al., 2005a).



**Figura 5. Árbol filogenético de la familia de los factores de crecimiento fibroblástico (FGFs) en humanos.** Se han identificado 22 genes codificantes para FGFs que pueden organizarse en 7 subfamilias. Las longitudes de las ramas son proporcionales a la distancia evolutiva entre cada gen.

## 5.2. Regulación génica y señalización celular de FGF21

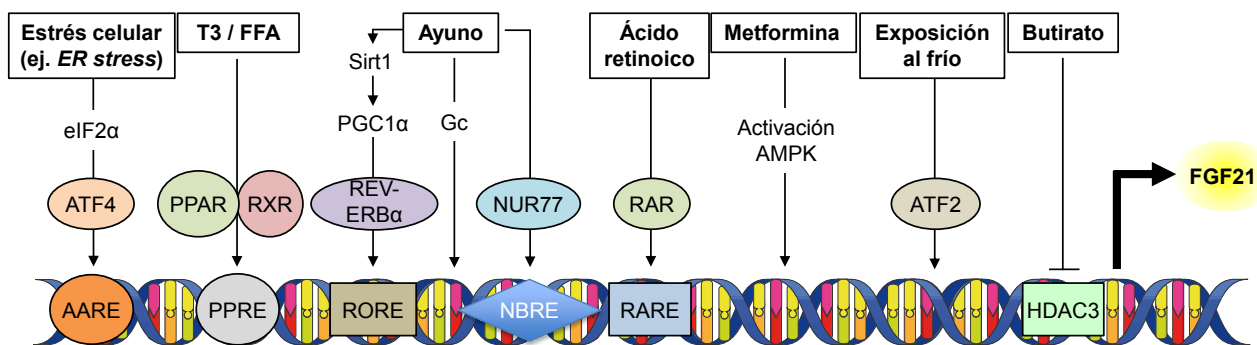
El gen FGF21 conserva una gran homología entre los mamíferos. De hecho, la secuencia del gen FGF21 tan sólo se diferencia en uno o dos aminoácidos entre humanos, gorilas y chimpancés (Fisher and Maratos-Flier, 2016). Respecto a los roedores, existe un 80% de homología con el gen humano. En humanos, el gen FGF21 se encuentra localizado en el cromosoma 19, y contiene tres exones que codifican los 208 aminoácidos que forman la proteína. En ratones, el gen *Fgf21* está localizado en el cromosoma 7 y está formado por 210 aminoácidos (Fisher and Maratos-Flier, 2016).

El hígado es el principal responsable de los niveles circulantes de esta hormona (Nishimura et al., 2000). La función de FGF21 se centra principalmente en la regulación sistémica del metabolismo energético, especialmente del metabolismo lipídico y de glúcidos (Salminen et al., 2017). Estudios recientes han revelado que tanto factores de estrés nutricional, tales como el ayuno, así como factores de estrés

celular, por ejemplo, el estrés de retículo, incrementan notablemente la expresión de FGF21, por lo que se considera que FGF21 es un factor de respuesta a estrés (Inagaki et al., 2008; Luo and McKeehan, 2013; Salminen et al., 2017).

El principal factor de transcripción que regula la expresión de FGF21 a nivel hepático es el *peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha$*  (PPAR $\alpha$ ) (Figura 6) (Badman et al., 2007; Goetz et al., 2007; Lundåsen et al., 2007). Tanto de forma dependiente como independiente a la regulación por PPAR $\alpha$ , existen otros factores de transcripción capaces de regular el gen FGF21. Entre los factores de transcripción que regulan FGF21 de forma dependiente a PPAR $\alpha$  se encuentra el receptor de glucocorticoides, el cual coopera con PPAR $\alpha$  para aumentar la expresión de FGF21 en respuesta al ayuno (Patel et al., 2015). Por otro lado, entre los factores de transcripción que también regulan la expresión de FGF21, pero de manera independiente a PPAR $\alpha$ , destacan el *retinoid X receptor- $\beta$*  (RXR $\beta$ ), *farsenoid-X receptor* (FXR), receptor de la hormona tiroidea (THR), *retinoid-related orphan receptor- $\alpha$*  (ROR $\alpha$ ), *nuclear hormone receptor 77* (NUR77) y PPAR $\gamma$  (Figura 6) (Adams et al., 2010; Cyphert et al., 2012; Li et al., 2013; Oishi and Tomita, 2011). Factores externos presentes en la dieta como el butirato sódico, un inhibidor de la histona deacetilasa (HDAC), o compuestos farmacológicos como la Metformina, también promueven la expresión de FGF21 en hígado (Li et al., 2012; Nygaard et al., 2012). Se ha observado que las dietas altas en grasa y bajas en carbohidratos (dietas cetogénicas) así como un ayuno prolongado inducen un aumento de la expresión de FGF21 no sólo en hígado, sino también en el tejido adiposo (Badman et al., 2007; Nygaard et al., 2014). A diferencia del hígado, la expresión de FGF21 aumenta en el tejido adiposo en respuesta a la re-alimentación tras un periodo de ayuno, pudiendo actuar tanto de manera autocrina como paracrina en este tejido (Oishi et al., 2011). De igual manera, la estimulación  $\beta$  adrenérgica inducida por el frío también induce la expresión de FGF21, sobretudo en los tejidos adiposos con capacidad termogénica, tales como el tejido adiposo blanco inguinal (iWAT) o el BAT (Fisher et al., 2012; Hondares et al., 2011).

En cuanto a las situaciones de estrés celular, como el estrés de retículo endoplasmático, se induce la expresión del gen FGF21 a través del Activador del Factor de Transcripción 4 (ATF4). La disfunción mitocondrial, la deficiencia en la autofagia así como el envejecimiento también son capaces de regular la expresión de FGF21 (Luo and McKeehan, 2013; Salminen et al., 2017).



**Figura 6. Regulación transcripcional de FGF21.** La transcripción del gen FGF21 está regulada por el estado nutricional, principalmente el ayuno; por componentes derivados de alimentos como los ácidos grasos libres (FFA) o el butirato; por fármacos como la Metformina; por factores ambientales como el frío o el ejercicio y por factores de estrés celular. ATF4: *activating transcription factor 4*; AARE: *amino acid response element*; PPAR: *peroxisome proliferator-activated receptors*; RXR: *retinoid X receptor*; PPRE: *peroxisome proliferator-activated receptor response element*; SIRT1: *sirtuin 1*; PGC1α: *peroxisome proliferator-activated receptor-γ co-activator 1α*; REV-ERBα: *nuclear receptor subfamily 1, group D, member 1*; RORE: *retinoid-related orphan receptor response element*; Gc, *glucocorticoids*; NUR77, *nuclear hormone receptor 77*; NBRE: *nerve growth factor-induced clone B response element*; RAR, *Retinoic acid receptor*; RARE, *retinoic acid response elements*; AMPK: *5'-AMP activated protein kinase*; ATF2: *activating transcription factor 2*; HDAC3: *histone deacetylase 3*. Adaptado de (Degirolamo et al., 2016)

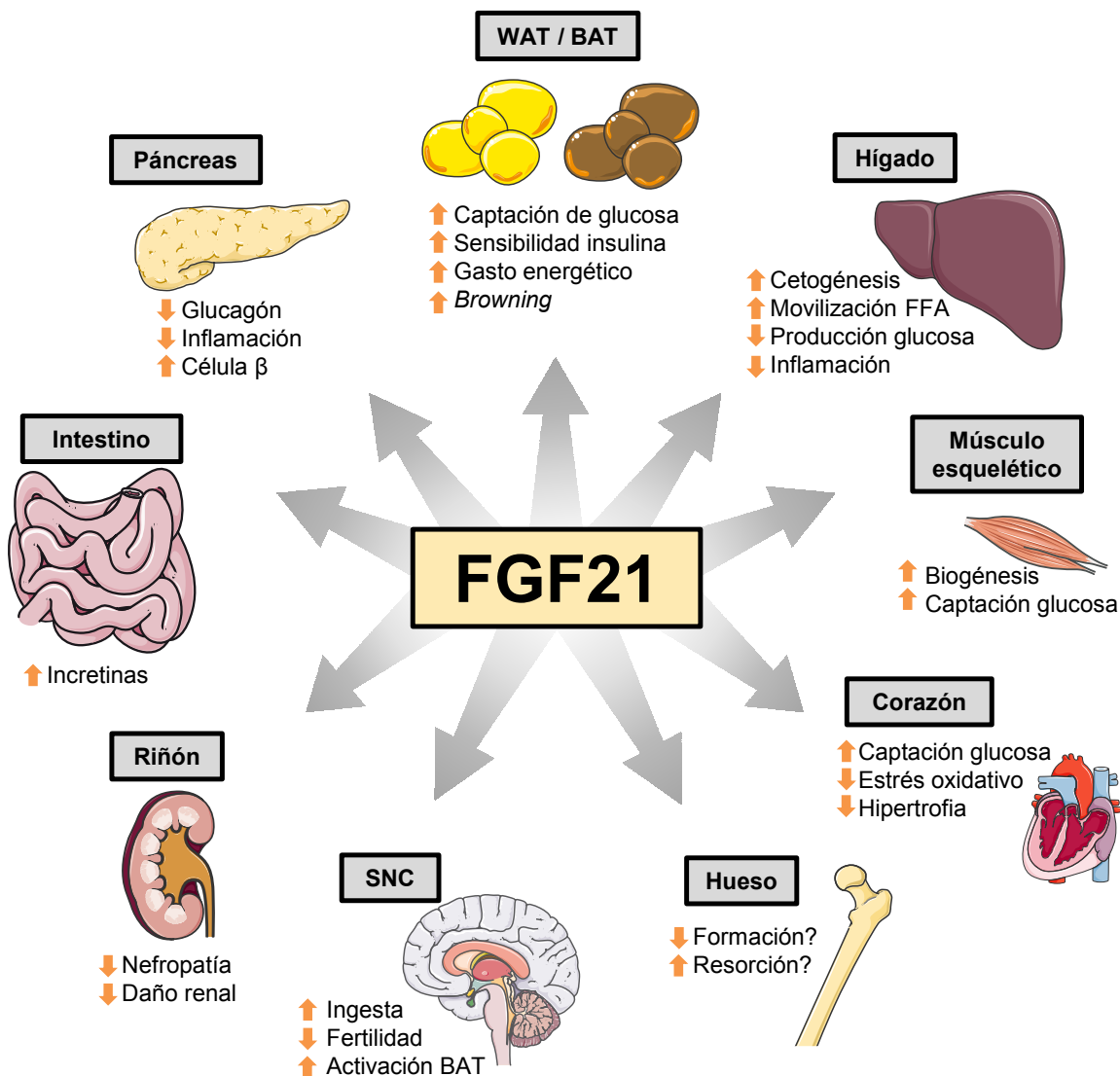
Aunque el FGF21 actúa a través de los receptores FGFRs (principalmente FGFR1c, FGFR2c y FGFR3c), el co-receptor  $\beta$ -klotho juega un papel crucial en la activación de la vía de señalización (Kharitonov et al., 2007; Ogawa et al., 2007; Suzuki et al., 2008). Mientras que los FGFRs se expresan ubicuamente, los tejidos metabólicamente activos, tales como el hígado, el WAT y el BAT, son los que expresan niveles más elevados de  $\beta$ -klotho, siendo en estos tejidos donde FGF21 media principalmente sus efectos (Fon Tacer et al., 2010; Ito et al., 2000). Los receptores FGFRs median su efecto a través de la activación de su dominio tirosina quinasa intracelular (Beenken and Mohammadi, 2009). La activación de los receptores FGFRs mediada por FGF21 promueve diferentes cascadas de señalización intracelular entre las que se incluyen la interacción directa con la proteína de acoplamiento *Fibroblast growth factor receptor substrate 2* (FRS2), así como la posterior activación de las vías *Mitogen-Activated Protein Kinases* (MAPK), *Protein kinase C* (PKC), *Janus kinases/Signal Transducer and Activator of Transcription proteins* (Jak/STAT) y *Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase/ mammalian target of rapamycin* (PI3K/mTOR) (Kilkenny and Rocheleau, 2016). Además, la unión de FGF21 a su receptor hipotalámico promueve la gluconeogénesis hepática a través de la activación de *Extracellular signal-regulated kinase 1/2* (ERK 1/2) (Liang et al., 2014). , FGF21 también mejora la función y supervivencia pancreática a través de la activación de la vía de ERK 1/2 y *Protein kinase B* (PKB) (Wente et al., 2006).

### 5.3. FGF21 como regulador metabólico

FGF21 posee efectos metabólicos pleiotrópicos, los cuales dependen del tejido donde ejerce su acción. El hígado no solo es el principal tejido responsable de los niveles circulantes de FGF21 sino que también es el que mayor efecto metabólico presenta frente a la exposición a la hormona. El hígado sobre-expresa FGF21 a través de la activación de PPAR $\alpha$ , en respuesta al aumento de los ácidos grasos circulantes durante el ayuno y el consumo de dietas cetogénicas (Badman et al., 2007; Inagaki et al., 2007; Lundâsen et al., 2007). PPAR $\alpha$  también regula la transcripción de enzimas involucradas en la oxidación de ácidos grasos y la cetogénesis (Figura 7) (Badman et al., 2007). Así, los animales deficientes en FGF21 muestran una respuesta atípica a la dieta cetogénica, ganando más peso debido a la disminución del gasto energético, y desarrollando hígado graso, probablemente debido a la incapacidad hepática de oxidar ácidos grasos (Badman et al., 2009). Además, los ratones *knock out* para FGF21 son incapaces de revertir la hipoglucemia producida por el ayuno, sugiriendo un papel clave en la glucogénesis hepática (Potthoff et al., 2009). Sin embargo, la sobreexpresión de FGF21 en ratones transgénicos en hígado, también disminuye la glucemia (Zhang et al., 2012). De hecho, la reducción de la glucemia inducida por la administración de la proteína FGF21 es proporcional a la dosis inyectada, sin observar ningún efecto al administrar dosis bajas (Xu et al., 2009). Ensayos *in vivo* demuestran que FGF21 es capaz de suprimir la producción hepática de glucosa de forma similar a la insulina, contradiciendo su papel promoviendo la gluconeogénesis hepática (Xu et al., 2009). Por tanto, estos estudios sugieren que niveles circulantes de FGF21 supra fisiológicos, inhiben la producción hepática de glucosa (Figura 7). Asimismo, la administración de FGF21 recombinante incrementa la movilización de ácidos grasos libres (FFA) (Inagaki et al., 2007) y la cetogénesis en el hígado (Potthoff et al., 2009), protegiéndolo de la hepatoesteatosis (Xu et al., 2009; Zhu et al., 2016) (Figura 7).

El tejido adiposo también es capaz de producir y secretar FGF21 a la circulación. A diferencia del hígado, el principal factor de transcripción que regula FGF21 en el tejido adiposo es PPAR $\gamma$  (Muisse et al., 2008). El FGF21 secretado por el tejido adiposo blanco y el marrón puede actuar como una adipoquina de manera paracrina sobre el propio tejido adiposo. Tanto en WAT como BAT, FGF21 actúa como agente sensibilizador de la insulina, mejorando la homeostasis de la glucosa (Figura 7) (BonDurant et al., 2017; Ding et al., 2012; Li et al., 2018; Véniant et al., 2012). Además, FGF21 induce la lipólisis en el tejido adiposo en condiciones de ayuno (Inagaki et al., 2007; Potthoff et al., 2009). Así, FGF21 se ha postulado como un factor

regulador que garantiza la disponibilidad y la conservación de energía durante la inanición. Entre otros efectos de FGF21 sobre el tejido adiposo también se han descrito un incremento en los niveles circulantes de adiponectina y un aumento del gasto energético, debido a la sobreexpresión de genes relacionados con la termogénesis y el *browning* (proceso en el que el tejido adiposo blanco subcutáneo adquiere un fenotipo similar al del tejido adiposo marrón) (Figura 7) (Adams et al., 2012a; Laeger et al., 2017). Además, también se ha observado un incremento de la captación de glucosa tanto por el WAT como por el BAT tras la administración de FGF21 (Figura 7) (Owen et al., 2014).



**Figura 7. Principales efectos metabólicos de FGF21 sobre sus diferentes órganos y tejidos diana.** A pesar de que los efectos principales de FGF21 se deben principalmente a su acción sobre el tejido adiposo y el hígado, FGF21 también puede actuar sobre otros órganos o tejidos tales como el páncreas, el riñón, el músculo esquelético y cardíaco y el intestino, mejorando su función metabólica ante ciertas disfunciones. Además, dado que cruza la barrera hematoencefálica, actúa a nivel central donde induce múltiples señales bioquímicas y respuestas funcionales. Además, FGF21 podría actuar sobre la homeóstasis ósea. Adaptado de (Kharitonov and DiMarchi, 2017).

Aunque en el páncreas también podemos detectar elevados niveles de FGF21, tanto de mRNA como de proteína, la función de la hormona en este tejido es relativamente desconocida. Se ha descrito que FGF21 se produce principalmente por el páncreas acinar y que actúa de manera paracrina (Singhal et al., 2016a). Se postula que la principal función de FGF21 en el páncreas es la de inmunomodulador de la inflamación, protegiendo las células  $\beta$  pancreáticas (Singhal et al., 2016a; Wente et al., 2006) (Figura 7). Además, FGF21 también reduce la secreción de glucagón por parte de las células  $\alpha$  pancreáticas (Kharitonov et al., 2005a) y es capaz de estimular la secreción *ex vivo* de insulina en islotes aislados de ratones diabéticos (Wente et al., 2006) (Figura 7).

El músculo esquelético también expresa y produce FGF21 como mioquina, teniendo un efecto tanto paracrino en el propio músculo como endocrino sobre el tejido adiposo (Keipert et al., 2014). La función primordial de FGF21 en el músculo esquelético es la protección de los miocitos frente a la resistencia a la insulina, inhibiendo la *stress kinase* y el *nuclear factor  $\kappa$ -lightchain-enhancer of activated  $\beta$  cells* (NF- $\kappa$ ), ambas proteínas integradas en la señalización intracelular de las señales de estrés e inflamación (Lee et al., 2012). Además, también favorece la captación de glucosa y la incorporación de ésta a glucógeno (Mashili et al., 2011) (Figura 7).

El corazón es otro de los tejidos que expresan la hormona y responden a la acción de FGF21, tanto a los niveles sistémicos como locales, ya que los cardiomiocitos expresan FGF1R y  $\beta$ -Klotho (Planavila et al., 2015). Se ha descrito que la expresión de FGF21 en el corazón se induce en respuesta a problemas cardiacos como la hipertrofia cardiaca y el infarto de miocardio. En ese sentido, ratones FGF21<sup>-/-</sup> muestran una mayor hipertrofia cardiaca e inflamación al ser sometidos a estímulos como el isoproterenol, un agonista  $\beta$ -adrenérgico. Además, estos animales muestran una menor oxidación de ácidos grasos en el corazón (Planavila et al., 2013). Por otra parte, FGF21 también previene la hipertensión y la disfunción vascular, regulando el sistema renina-angiotensina-aldosterona, el sistema hormonal responsable de la regulación de la presión sanguínea (Pan et al., 2018). Así, FGF21 contribuiría a la protección del miocardio, evitando su hipertrofia y una excesiva oxidación de ácidos grasos, además de prevenir la apoptosis producida por la diabetes y la obesidad (Liu et al., 2013; Planavila et al., 2013; Yang et al., 2018; Zhang et al., 2015).

El daño renal es una complicación secundaria comúnmente observada en pacientes con DT2. En el riñón, FGF21 tiene un efecto protector mediante la reversión de las alteraciones metabólicas sistémicas, junto con la mejora de las nefropatías derivadas de la DT2 (Kim et al., 2013; Shao et al., 2015) (Figura 7). En ese sentido, recientemente se ha demostrado que la administración conjunta de FGF21 y prostaglandinas (Alprostadil) era capaz de proteger frente a la nefropatía diabética a través de la estimulación de la autofagia dependiente de FGF21 en el riñón (Wei et al., 2018).

FGF21 se encuentra presente en la leche materna, y se ha descrito que induce la expresión de factores hormonales y enzimas digestivas en el intestino, mejorando la absorción de lactosa en neonatos, asegurando así una correcta digestión y función endocrina del intestino en desarrollo (Gavaldà-Navarro et al., 2015). Además, incrementa la producción de incretinas por el intestino (Kharitonov and DiMarchi, 2017) (Figura 7).

En ratones, la administración sistémica de FGF21 aumenta sus niveles circulantes, siendo capaz de atravesar la barrera hematoencefálica y llegar al sistema nervioso central (CNS) (Hsueh et al., 2007). En humanos, no sólo se ha detectado FGF21 en el fluido cerebroespinal (CSF) sino que existe una relación directa entre los niveles séricos de FGF21 y los de CSF (Tan et al., 2011). FGFR1, FGFR2 y FGFR3, así como  $\beta$ -Klotho, se expresan en el cerebro aunque a bajos niveles. Estos datos sugieren que FGF21 podría tener un efecto potencial en cerebro. En este sentido, la administración periférica de FGF21 en ratas obesas provocaba un aumento del gasto energético, a pesar de no observar una disminución del peso debido al aumento de la ingesta (Sarruf et al., 2010) (Figura 7). Por otro lado, la continua administración intracerebroventricular de FGF21 previene el desarrollo de la obesidad en ratones alimentados con una dieta HFD, a través de la activación del BAT (Owen et al., 2014) (Figura 7). A nivel central, FGF21 es capaz de mejorar la sensibilidad sistémica a la insulina y favorecer la supresión de la gluconeogénesis (Owen et al., 2014; Sarruf et al., 2010). La administración de FGF21 a nivel del sistema nervioso central también estimula la termogénesis y el *browning*, a través de la activación del sistema nervioso simpático (Douris et al., 2015) (Figura 7). También se ha descrito que FGF21 afecta la periodicidad de los ritmos circadianos y la fertilidad a través de sus efectos sobre el CNS (Bookout et al., 2013) (Figura 7). Así, FGF21 actúa sobre la vía de señalización de la vasopresina-kisspeptina, suprimiendo el pico de la hormona luteinizante necesaria para la reproducción en las hembras de ratones (Owen et al., 2013). Sin



embargo, dicha infertilidad es fácilmente revertida alimentando a los animales con una dieta hipercalórica (Singhal et al., 2016b).

Por último, los efectos de FGF21 sobre el metabolismo del calcio en los huesos han sido ampliamente estudiados y discutidos. Se ha sugerido que FGF21 inhibe la formación ósea a la vez que estimula la reabsorción en el hueso (Wei et al., 2012) (Figura 7). Sin embargo, estudios recientes cuestionan el efecto directo de FGF21 sobre el hueso y atribuyen los defectos óseos observados a diferencias en el balance energético (Guo et al., 2016; Li et al., 2017; Thompson et al., 2014). En ese sentido, en nuestro laboratorio recientemente se ha demostrado que altos niveles circulantes de FGF21, obtenidos mediante la administración de vectores virales en el hígado, no son perjudiciales para la homeostasis del calcio en el hueso (Jimenez et al., 2018).

#### **5.4. Perspectiva del uso de FGF21 como fármaco contra la diabetes tipo 2 y la obesidad**

Tanto en modelos murinos como en primates no humanos se ha demostrado la eficacia del tratamiento con FGF21. La administración de FGF21 recombinante en modelos murinos de obesidad como ratones *ob/ob* o *db/db* y ratas Zucker Diabetes Fatty (ZDF) promueve una robusta disminución de la adiposidad, la glucemia y los triglicéridos circulantes así como una mejora en la sensibilidad a la insulina (Adams et al., 2012b; Coskun et al., 2008; Kharitonov et al., 2005b; Xu et al., 2009). Asimismo, la sobreexpresión de FGF21 en el hígado de ratones transgénicos protege frente a la resistencia a la insulina y la obesidad inducidas por la dieta (Inagaki et al., 2007; Kharitonov et al., 2005b). Además, la administración de FGF21 a monos *Rhesus* obesos y diabéticos reduce marcadamente la glucemia en ayuno, los triglicéridos circulantes y los niveles de insulina a la vez que induce una discreta pérdida de peso (Kharitonov et al., 2007). Así, FGF21 es considerado un candidato atractivo para el tratamiento de la DT2 y la obesidad (Kharitonov and DiMarchi, 2015; Zhang and Li, 2015).

Uno de los principales inconvenientes del tratamiento con proteína recombinante es que la proteína FGF21 tiene una vida media muy corta (30 min en ratón y 2 h en primates), debido a su rápida proteólisis por las enzimas DPP4 y *Fibroblast activation protein* (FAP) (Kharitonov et al., 2013; Zhen et al., 2016) y a su elevada filtración por el riñón debido a su tamaño reducido (Zhen et al., 2016). Con la finalidad de aumentar la estabilidad y eficacia de FGF21, se han generado variantes

y análogos de la hormona (Reitman, 2013; So and Leung, 2016; Zhang and Li, 2015). Entre las estrategias utilizadas destacan el desarrollo de análogos, la conjugación de polietilenglicol (PEG) o de inmunoglobulinas, fusión de proteínas, anticuerpos miméticos de FGF21 y moléculas quiméricas de FGF, entre otros (So and Leung, 2016; Zhang and Li, 2015). Los miméticos de FGF21 presentan una gran eficacia terapéutica, tanto en modelos animales de DT2 y obesidad, como en humanos, al ser similares a la proteína nativa (Adams et al., 2013; Foltz et al., 2012; Hecht et al., 2012; Smith et al., 2013; Talukdar et al., 2016). De hecho los péptidos análogos de FGF21 denominados LY2405319 y PF-05231023 ya se han testado en ensayos clínicos mostrando una mejoras de la dislipidemia, una leve mejora del peso corporal y una reducción de la insulinemia en ayuno en pacientes DT2 y obesos (Gaich et al., 2013; Talukdar et al., 2016).

Pero a pesar de las mejoras de la farmacocinética, los miméticos/análogos de FGF21 requieren de una administración periódica para mediar sus efectos terapéuticos. Además, al tratarse de proteínas modificadas, se puede desencadenar una respuesta inmunológica contra ellas (Gaich et al., 2013; Talukdar et al., 2016). Así, las recurrentes administraciones de FGF21 pueden resultar no solo incómodas para el paciente, sino que aumentan las probabilidades de desarrollar una respuesta inmunitaria al tratamiento. Por este motivo, es necesario el desarrollo de nuevas aproximaciones terapéuticas basadas en FGF21, como por ejemplo la terapia génica, la cual permitiría expresar la propia proteína endógena de manera sostenida a lo largo del tiempo tras una única administración del producto terapéutico.

## 6. TERÁPIA GÈNICA *IN VIVO* CON VECTORES ADENOASOCIADOS (AAV)

La terapia génica es la estrategia clínica basada en la modificación del material genético de la célula mediante la introducción de material genético exógeno con la finalidad de prevenir, corregir o aliviar los síntomas de una enfermedad (Mulligan, 1993). Para ello, se pueden introducir nuevos genes o incrementar la expresión génica, silenciar o disminuir los niveles de expresión de ciertos genes o incluso corregir la secuencia nucleotídica de genes mutados (edición génica) (Naldini, 2015).

La terapia génica puede dividirse en dos subtipos: la **terapia génica *ex vivo***, en la cual las células del tejido diana se obtienen mediante una biopsia, se cultivan y se modifican *in vitro* y se trasplantan finalmente de nuevo en el paciente; y la **terapia génica *in vivo***, en la cual las células/tejido de interés se modifican *in situ* en el individuo (Anderson, 1998).

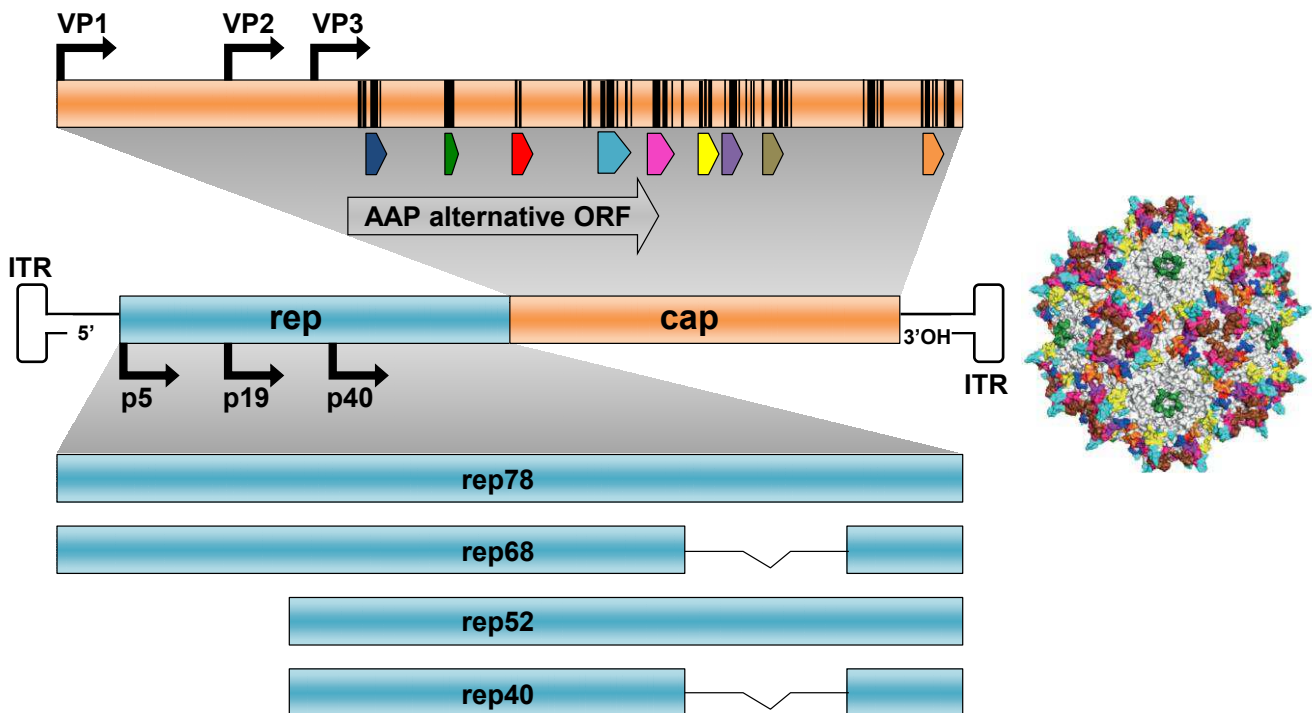
Uno de los factores clave para el éxito de la terapia génica es el desarrollo de vectores de transferencia génica eficientes, seguros e inocuos. Existe una gran variedad de vectores de terapia génica y éstos pueden clasificarse en dos grandes categorías: vectores virales y no virales. Los sistemas de transferencia basados en **vectores no virales** emplean métodos físico-químicos para transferir el material genético a la célula e incluyen la administración directa de DNA, la electrotransferencia o la conjugación del DNA con liposomas o polímeros catiónicos. Los **vectores virales** explotan la capacidad infecciosa de los virus para entrar en las células y transferir su material genético al núcleo. Actualmente, los vectores virales adenoasociados son los más utilizados en la mayoría de estrategias de terapia génica *in vivo* debido a su excelente perfil de seguridad, su baja inmunogenicidad, su no patogenicidad y su habilidad para mediar expresión del transgén de interés durante años en una amplia variedad de tejidos (Mingozzi and High, 2011).

### 6.1. Biología de los virus adenoasociados

Los virus adenoasociados (AAV) pertenecen a la familia *Parvoviridae* y al género *Dependoparvovirus*. Esta clasificación se basa en el hecho de que los virus AAV dependen de la co-infección de un virus auxiliar o *helper* (adenovirus, virus herpes, citomegalovirus humano o virus del papiloma) para producir una infección productiva (Balakrishnan and Jayandharan, 2014; Carter, 2004). Sin la presencia del virus *helper*, el genoma de los AAVs se mantiene en forma episomal en el núcleo

formando grandes concatámeros circulares o, en frecuencia mucho más baja, integrado dentro de una región específica del cromosoma 19 humano (19q13.3-qter) (McCarty et al., 2004).

Los diferentes serotipos de AAV contienen un genoma de DNA de cadena simple (ssDNA) de unas 4.7 Kb que se empaqueta dentro de una cápside proteica icosaédrica y sin envoltura lipídica de unos 18-25 nm de diámetro. El genoma del AAV está formado por las repeticiones terminales invertidas (ITRs) y por tres marcos de lectura abiertos (ORFs) que codifican 4 proteínas reguladoras, 3 proteínas que conforman la cápside y la recientemente descubierta proteína de activación de ensamblaje (AAP) (Figura 9). Las ITRs son secuencias palindrómicas de 145 pb con estructura de horquilla que flanquean el genoma AAV en sus extremos 5' y 3' y actúan como origen de replicación y señal de empaquetamiento e integración (Figura 8) (Kotterman and Schaffer, 2014; Lisowski et al., 2015). El ORF Rep codifica cuatro proteínas no estructurales (REP78, REP68, REP52 y REP40) expresadas mediante promotores alternativos y variantes de *splicing*, las cuales son cruciales para la replicación, transcripción, integración y encapsidación del genoma (Figura 9) (Kotterman and Schaffer, 2014). El ORF Cap codifica tres proteínas estructurales de ensamblaje (VP1, VP2 y VP3) que forman la cápside icosaédrica de 60 subunidades con la ayuda de la proteína de activación de ensamblaje (AAP), expresada a partir del ORF2 del gen Cap (Figura 8) (Kotterman and Schaffer, 2014; Naumer et al., 2012; Xie et al., 2002).



**Figura 8. Representación esquemática del genoma del virus AAV de serotipo 2.** El genoma del AAV contiene tres marcos de lectura abiertos (ORF) flanqueados por repeticiones terminales invertidas (ITR). Por *splicing* alternativo, el ORF de Rep, codifica cuatro proteínas no estructurales (Rep40, Rep52, Rep68 y Rep 78), las cuales son esenciales para la replicación, regulación transcripcional, integración del genoma y ensamblaje de los viriones. El ORF Cap codifica tres proteínas estructurales (VP1, VP2 y VP3) y la proteína de activación de ensamblaje (AAP). Rep78 y Rep68 se transcriben a partir del promotor interno p5, Rep52 y Rep40 a partir del promotor p19 y las proteínas Cap a partir del promotor p40. Las regiones hipervariables están indicadas mediante flechas de colores. Las regiones que codifican los aminoácidos expuestos a la superficie están indicadas mediante líneas negras (ORF de Cap). En la estructura cristalina de la cápside del AAV mostrada en la parte derecha del esquema, se pueden observar coloreadas las regiones hipervariables de VP3 que coinciden con las regiones genéticas del genoma de los AAVs (Adaptado de Kotterman and Schaffer, 2014).

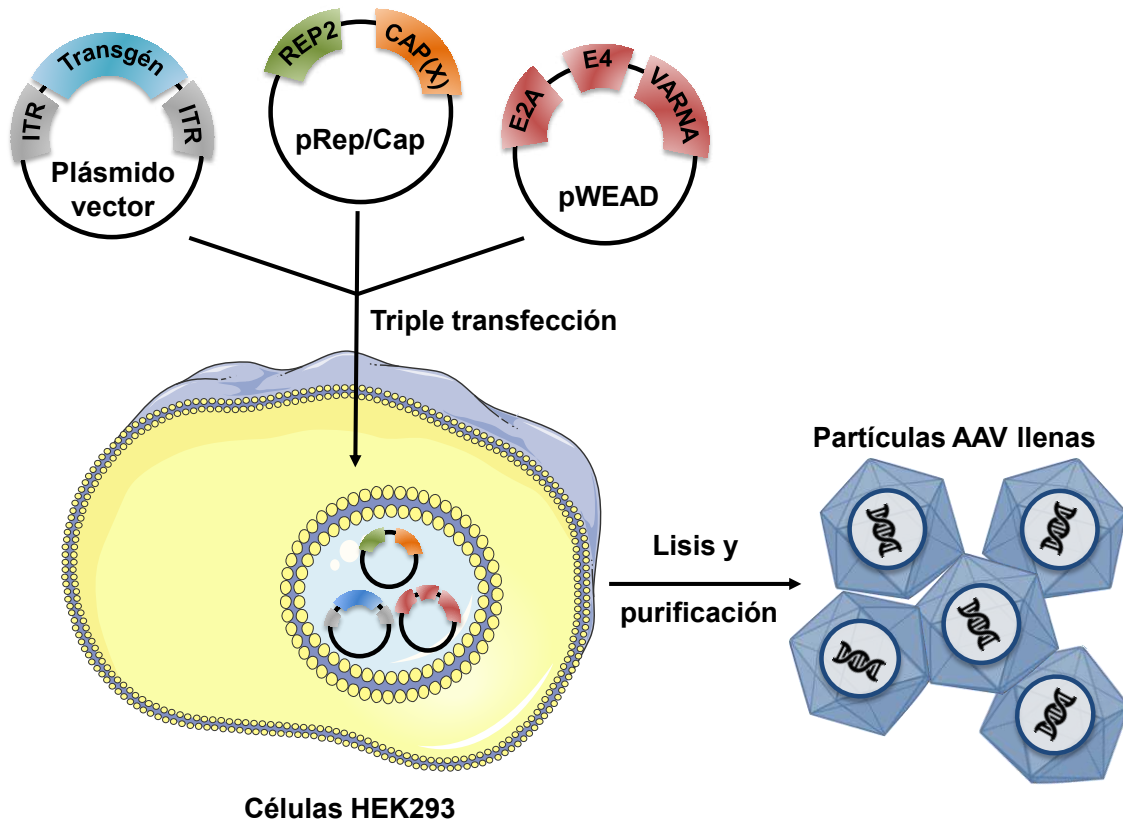
## 6.2. Vectores virales adenoasociados recombinantes

Los vectores AAV para terapia génica están basados principalmente en el serotipo 2 (AAV2) dado que este serotipo es el mejor caracterizado (Samulski et al., 1982; Srivastava et al., 1983). Los vectores AAV recombinantes se generan mediante la sustitución de los ORFs del genoma viral nativo por el casete de expresión de interés, flanqueado por ambas ITRs. Por tanto, el genoma recombinante resultante puede empaquetarse dentro de la cápside pero el vector viral AAV no posee capacidad de integrarse ni de replicarse (Balakrishnan and Jayandharan, 2014; Hirata and Russell, 2000; Snyder et al., 2011). Asimismo, las células transducidas por los vectores AAVs no expresan ningún gen viral, lo que contribuye a su baja inmunogenicidad.

Los vectores AAV se mantienen predominantemente episomales formando concatámeros circulares en el núcleo de la célula huésped. Aunque con muy baja frecuencia (0.01% - 0.05%), los vectores AAV pueden integrarse en el genoma, habitualmente en zonas de transcripción génica activa o en zonas donde se produce la ruptura del DNA endógeno de doble cadena de la célula transducida (Deyle and Russell, 2009; Lisowski et al., 2015; McCarty et al., 2004). Una vez dentro del núcleo, el genoma de ssDNA de los vectores AAV debe convertirse en DNA de doble cadena (dsDNA) para permitir la expresión del transgén. Dado que la síntesis de la cadena complementaria de DNA del genoma AAV supone un paso limitante (Ferrari et al., 1996), se han generado mediante modificación genética adicional, vectores AAV que contienen un genoma de doble cadena (dsAAV) (McCarty et al., 2001). Sin embargo, la capacidad de clonaje de estos vectores se ve reducida a la mitad y su producción es mucho menos eficiente. Por otro lado, la inmunogenicidad de los vectores dsAAV es mayor que la de los vectores AAV de cadena simple de DNA (Martino et al., 2011).

Los vectores AAV pueden producirse y purificarse en el laboratorio a títulos elevados. El sistema de triple transfección en células embrionarias de riñón humano (HEK293) es el más utilizado para producir los vectores AAV (Ayuso et al., 2010a) (Figura 9). En este sistema, un plásmido contiene el casete de expresión terapéutico flanqueado por las ITRs del AAV2 (plásmido vector). Los ORFs Rep y Cap requeridos en *trans* están codificados en el plásmido helper, que no contiene ITRs. Estos dos plásmidos se co-transfectan en células HEK293 junto con el tercer plásmido, que aporta las funciones adenovirales necesarias para la replicación de los AAV. Tras la expresión y traducción de las proteínas REP y VP, el constructo terapéutico flanqueado por las ITRs se replica y las moléculas resultantes de DNA monocatenario se encapsidan en las cápsidas AAV preformadas (Figura 9). Las partículas virales se purifican del lisado celular mediante centrifugación en gradiente de densidad (CsCl o iodixanol) y/o cromatografía en columna (Ayuso et al., 2010b). La preparación purificada del vector puede contener cápsidas vacías, la cantidad de las cuales es inversamente proporcional a la eficiencia de empaquetamiento del vector y al método de purificación (Ayuso et al., 2010b). El método de purificación que separa más eficientemente las cápsidas vacías de las que contienen genoma (cápsidas llenas) es la purificación por gradiente de CsCl (Ayuso et al., 2010b; Pacak et al., 2006; Scallan et al., 2006). En particular, la precipitación con polietilenglicol (PEG) y la purificación mediante CsCl descritas por nuestro laboratorio reducen significativamente las cápsidas vacías y las impurezas de DNA y proteína, lo que aumenta la pureza de la

preparación viral y, por consiguiente, la eficiencia de transducción *in vivo* (Ayuso et al., 2010b).



**Figura 9. Producción de los AAVs recombinantes (rAAV) mediante el método de triple transfección.** Para producir los vectores rAAV, se transfectan células HEK293 con tres plásmidos: el plásmido vector, en el que se reemplazan los ORFs Rep y Cap por el transgén de interés flanqueado por las ITRs; el plásmido pRep/Cap aporta en *trans* las proteínas Rep y Cap y, por último, el plásmido pWEAD proporciona las funciones auxiliares adenovirales necesarias para la producción de los AAVs. Posteriormente, las partículas de vector se purifican a partir del lisado celular y purificadas por gradiente de densidad y/o cromatografía para obtener las cápsides llenas. La representación esquemática no es a escala (Adaptado de Ayuso et al., 2010b).

La Tabla 2 describe las características de los principales serotipos de vectores AAV usados en terapia génica. Las diferencias en las proteínas de la cápside (VP1, VP2 y VP3) de los diversos serotipos de AAV determinan la afinidad de unión con los distintos receptores y co-receptores celulares, confiriendo a cada serotipo un tropismo celular preferencial (Balakrishnan and Jayandharan, 2014).

**Tabla 2. Características de los serotipos AAV del 1 al 12.** Resumen del origen de cada serotipo de AAV, sus receptores y su tropismo tisular.

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

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

Abreviaciones: PNH, primate no humano; HSPG, *heparan sulfate proteoglycan*; LamR, 37/67 kDa *laminin receptor*; FGFR1, *fibroblast growth factor receptor 1*; HGFR, *hepatocyte growth factor receptor*, PDGFR, *platelet-derived growth factor receptor*; EGFR, *epidermal growth factor receptor*; MS, músculo esquelético; SNC, sistema nervioso central; HCC, carcinoma hepatocelular (Adaptado de (Balakrishnan and Jayandharan, 2014; Jimenez et al., 2013; Lisowski et al., 2015)).



### 6.3. Transferencia de genes al músculo esquelético y al tejido adiposo blanco mediante vectores AAV

Además de almacenar energía en forma de lípidos, los adipocitos blancos se caracterizan por su gran capacidad secretora, ya que son capaces de secretar una gran variedad de moléculas tales como FFA, glicerol, lactato, adipoquinas, péptidos, hormonas, vitaminas, prostaglandinas, endocarabinoides y glucocorticoides (Adamczak and Wiecek, 2013).

Nuestro laboratorio ha demostrado que los serotipos AAV8 y AAV9 son los que presentan una mayor eficiencia de transducción del tejido adiposo (Jimenez et al., 2018). Asimismo, otros autores también han observado que los vectores AAV8 y AAV9 median una robusta expresión del transgén de interés en adipocitos en ratones adultos (Liu et al., 2014; O'Neill et al., 2014). Estos serotipos son capaces de transducir los depósitos adiposos tanto en ratones sanos como obesos (Jimenez et al., 2013). Además, nuestro grupo también ha demostrado que es posible secretar a la circulación de manera eficiente, persistente y duradera (1 año) proteínas de interés mediante la administración local intra-tejido adiposo de vectores AAV (Jimenez et al., 2013).

El músculo esquelético, al igual que el tejido adiposo, también posee la capacidad de secretar eficientemente proteínas al torrente circulatorio, en particular proteínas de pequeño tamaño. Además, diversos serotipos tales como AAV1, AAV6, AAV7 o AAV8 han demostrado modificar genéticamente eficientemente este tejido (Braun et al., 2014; Callejas et al., 2013; Childers et al., 2014; Cohn et al., 2007; Flotte et al., 2011; Jaén et al., 2017; Louboutin et al., 2005; Mas et al., 2006; Mendell et al., 2009). En particular, nuestro laboratorio ha demostrado, tanto en ratones como en animales grandes, que la administración intramuscular de vectores AAV1 media una robusta transducción del músculo esquelético, lo que a su vez resulta en una eficiente secreción de la proteína terapéutica a largo plazo (Callejas et al., 2013; Jaén et al., 2017; Mas et al., 2006).

Cabe destacar que el primer producto de terapia génica que fue aprobado con éxito para su comercialización por la Agencia Europea del Medicamento (EMA) fue Glibera® en 2012. Esta terapia se basa en la administración intramuscular de vectores AAV1 que codifican el gen de *lipoprotein lipase* (LPL) para el tratamiento de la deficiencia de la lipoproteína lipasa hereditaria (Scott, 2015). Además de ésta,

actualmente hay muchas otras enfermedades tales como la miopatía miotubular ligada al cromosoma X (Childers et al., 2014), la deficiencia de la  $\alpha$ -antitripsina (Flotte et al., 2011), la distrofia muscular Limber-Girdler tipo 2 (Mendell et al., 2009), la distrofia muscular de Duchenne (Braun et al., 2014; Wang et al., 2007) y hemofilia B (Cohn et al., 2007), que utilizan el músculo como órgano diana. Tanto en modelos animales murinos como caninos y en pacientes humanos se ha demostrado la eficacia de la modificación genética del músculo esquelético mediante vectores AAV a largo plazo (Arruda et al., 2008; Bennett et al., 2016; Buchlis et al., 2012; Jaén et al., 2017; Manno et al., 2003; Mingozzi and High, 2011; Naldini, 2015).

En resumen, el tejido adiposo blanco y el músculo esquelético son dianas muy atractivas para aquellas estrategias de terapia génica en las que se requiera aumentar los niveles circulantes de la proteína terapéutica, tales como serían las estrategias basadas en la sobre-expresión de FGF21 para el tratamiento de la DT2 y la obesidad mediante vectores AAV.



### **III. OBJETIVOS**



El crecimiento alarmante de la incidencia de diabetes tipo 2 (DT2) y obesidad hace necesario el desarrollo de nuevos tratamientos para estas patologías. Estudios recientes han demostrado el potencial terapéutico del factor de crecimiento fibroblástico 21 (FGF21) frente a la DT2 y la obesidad, regulando el metabolismo energético y mejorando la sensibilidad a la insulina. Aunque se han desarrollado miméticos/análogos de FGF21 con propiedades farmacocinéticas mejoradas frente a la proteína nativa, estas moléculas presentan ciertas desventajas como el desarrollo de respuesta inmunitaria debido a sus modificaciones estructurales así como el requerimiento de múltiples administraciones de manera crónica para mantener los efectos terapéuticos. La terapia génica en cambio, permitiría mantener niveles circulantes elevados de la proteína FGF21 nativa tras una única administración de los vectores terapéuticos. A este respecto, nuestro laboratorio ha demostrado que la manipulación genética del hígado mediante vectores AAV codificantes para FGF21 podría ser una excelente alternativa terapéutica frente a los fármacos análogos/miméticos de FGF21. No obstante, algunos pacientes obesos y diabéticos tipo 2 podrían presentar patologías hepáticas como la cirrosis, lo cual podría desaconsejar la estrategia de terapia génica con AAV dirigida al hígado. Dado que el músculo esquelético y el tejido adiposo poseen la capacidad intrínseca de secretar proteínas al torrente circulatorio, ambos tejidos podrían ser candidatos alternativos al hígado.

Por todo ello, el objetivo principal de esta tesis doctoral fue **desarrollar estrategias de terapia génica basadas en la ingeniería genética del tejido adiposo o del músculo esquelético, para incrementar los niveles circulantes de FGF21 para el tratamiento de la obesidad y la diabetes tipo 2**. Este objetivo general se subdividió en los siguientes objetivos específicos:

1. Estudiar la eficacia terapéutica y la seguridad de la modificación genética del tejido adiposo mediada por los vectores AAV codificantes para FGF21 en dos modelos murinos de obesidad y resistencia a la insulina, tanto un modelo inducido por la dieta alta en lípidos como un modelo murino genético *ob/ob*.
2. Estudiar la eficacia terapéutica y la seguridad de la modificación genética del músculo esquelético mediada por los vectores AAV codificantes para FGF21 tanto en animales control sanos como en un modelo murino de obesidad y resistencia a la insulina, inducido por una dieta alta en lípidos.



## **IV. RESULTADOS**





**Parte I. ESTUDIO DE LOS EFECTO DE LA SOBREENPRESIÓN  
DE FGF21 EN EL TEJIDO ADIPOSO**



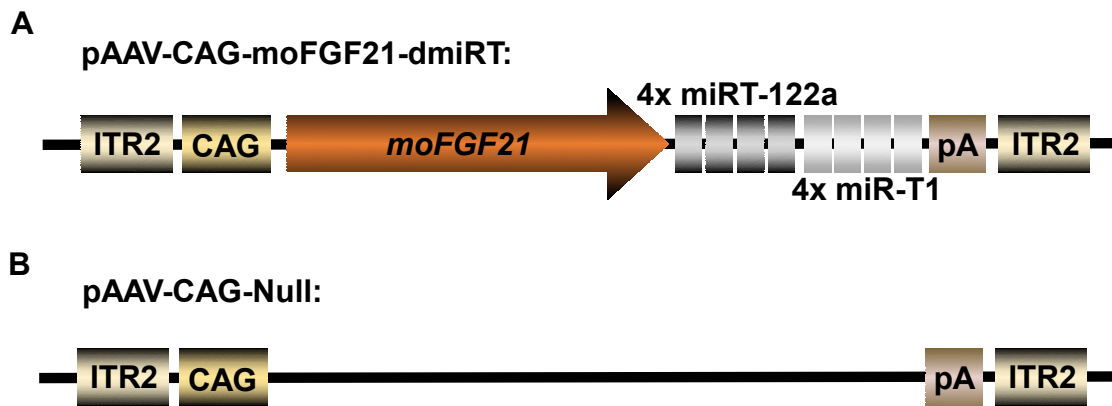
## 1. DISEÑO Y GENERACIÓN DE LOS VECTORES AAV PARA MEDIAR EXPRESIÓN DE FGF21 EN EL TEJIDO ADIPOSO BLANCO EPIDIDIMAL

En la primera parte de este estudio, se pretendió manipular genéticamente el tejido adiposo blanco epididimal para sobreexpresar FGF21. Por ello, para inducir la sobreexpresión de FGF21 específicamente en el tejido adiposo mediante la administración de vectores AAV, es importante tener en cuenta el promotor y la vía de administración más adecuados para limitar la expresión del transgén en otros tejidos no deseados. En nuestro laboratorio, se ha descrito que tras la administración sistémica o local de vectores AAV8 y AAV9 se transduce de manera muy eficiente el eWAT. No obstante, el hígado y el corazón también resultan muy transducidos (Jimenez et al., 2013). La utilización de promotores específicos de tejido adiposo, como el promotor de la *fatty acid binding protein 4, adipocyte* (FABP4 o aP2) podría evitar la expresión del transgén en tejidos no adiposos. Sin embargo, el mayor inconveniente es que la mayoría de los promotores específicos de tejido, como el del aP2, es que inducen una expresión del gen de interés más baja en comparación con los promotores ubícuos mucho más potentes, como el promotor híbrido basado en el *enhancer* del citomegalovirus fusionado con el promotor de la  $\beta$ -actina de pollo (CAG) (Jimenez et al., 2013).

Para minimizar la expresión del transgén en tejidos no deseados, una alternativa a los promotores específicos de tejido es la utilización de un promotor ubicuo junto con secuencias reguladoras que reduzcan la expresión ectopía en dichos tejidos. En este sentido, se pueden utilizar los mecanismos de regulación de la expresión génica a nivel post-transcripcional de los microRNAs (miRNAs). Los miRNAs son pequeños RNAs no codificantes de unos 22 nucleótidos que se unen a sus secuencias específicas ubicadas en la regiones 3' no traducidas (3'-UTRs) de sus mRNAs diana. Esta unión, que puede ser parcial o total, induce la destrucción del mRNA o lo secuestra, evitando así su traducción (Kelly and Russell, 2009). Para conseguir inhibir la expresión de un transgén en un tejido no deseado, se incorporan secuencias complementarias a miRNAs específicos de ese tejido (llamados *miRNA target sequences*, miRT) en la región 3'-UTR, tras el transgén del constructo que contiene el AAV. Así, una vez se expresa el mRNA del transgén en el tejido no deseado, los miRNAs propios del tejido se unen a la secuencia complementaria miRT del transgén, permitiendo su rápida degradación (Jimenez et al., 2013).

Estudios sobre el perfil de expresión de miRNAs en los diferentes tejidos han demostrado que los miRNAs miR-122a y miR-1 son los miRNAs expresados mayoritariamente en hígado y corazón, respectivamente (Chang J, Nicolas E, Marks D, Sander C, Lerro A, Buendia MA, Xu C, Mason WS, Moloshok T, Bort R, Zaret KS, 2004; Lagos-Quintana et al., 2002; Shingara et al., 2005; Sweetman et al., 2008). Resultados en nuestro laboratorio confirmaron que un promotor ubicuo, junto con las secuencias miRT-122a y miRT-1 incorporadas tras el gen de la proteína marcadora verde fluorescente (GFP), es la mejor alternativa para expresar un transgén específicamente en el tejido adiposo frente a los promotores más débiles específicos de este tejido (Jimenez et al., 2013).

Por tanto, para mediar la sobreexpresión de FGF21 en el tejido adiposo blanco epididimal para el tratamiento de la DT2 y la obesidad, se diseñó un vector AAV codificante para el gen murino optimizado de la proteína FGF21 junto con 4 copias de las secuencias reguladoras miRT-122a y 4 copias de miRT-1, bajo el promotor potente y ubicuo CAG. Este constructo estaba flanqueado a ambos lados por las *inverted terminal repeats* (ITRs), secuencias necesarias para que el constructo pudiera encapsidarse en el interior del vector AAV. Se utilizó la secuencia del gen *Fgf21* murino (Gene ID: 56636) optimizada porque se ha descrito que puede aumentar la eficiencia en la producción de la proteína, tanto a nivel transcripcional como traduccional (Disbrow et al., 2003; Ward et al., 2011). El plásmido resultante se denominó pAAV-CAG-moFGF21-dmiRT, en el que “mo” indica la optimización del gen *Fgf21* de ratón, y dmiRT la secuencia doble de las 4 copias de miRT-122a y las 4 copias de miRT-1. Como control se generó el vector AAV-CAG-Null a partir del plásmido pAAV-CAG-Null, el cual presenta el mismo promotor CAG, polyA e ITRs que el vector con el gen de interés, pero en este caso no codifica para ninguna proteína (Figura 10).



**Figura 10. Representación esquemática de los plásmidos utilizados en la producción de los vectores virales.** El plásmido pAAV-CAG-moFGF21-dmiRT se generó para expresar la proteína murina FGF21 específicamente en el tejido adiposo (**A**), mientras que el plásmido control pAAV-CAG-Null se utilizó para generar los vectores virales nulo (**B**). ITR2, *Inverted Terminal Repeats* del vector viral AAV2; CAG, promotor híbrido basado en el *enhancer* del citomegalovirus fusionado con el promotor de la  $\beta$ -actina de pollo; moFGF21, secuencia optimizada del CDS murino de *Fgf21*; 4 x miRT-122a, secuencia diana para el microRNA de hígado 122a (4 copias); 4 x miR-T1, secuencia diana para el microRNA de corazón 1 (4 copias); pA, secuencia de poliadenilación de la  $\beta$ -globina de conejo. Los constructos no están representados a escala.

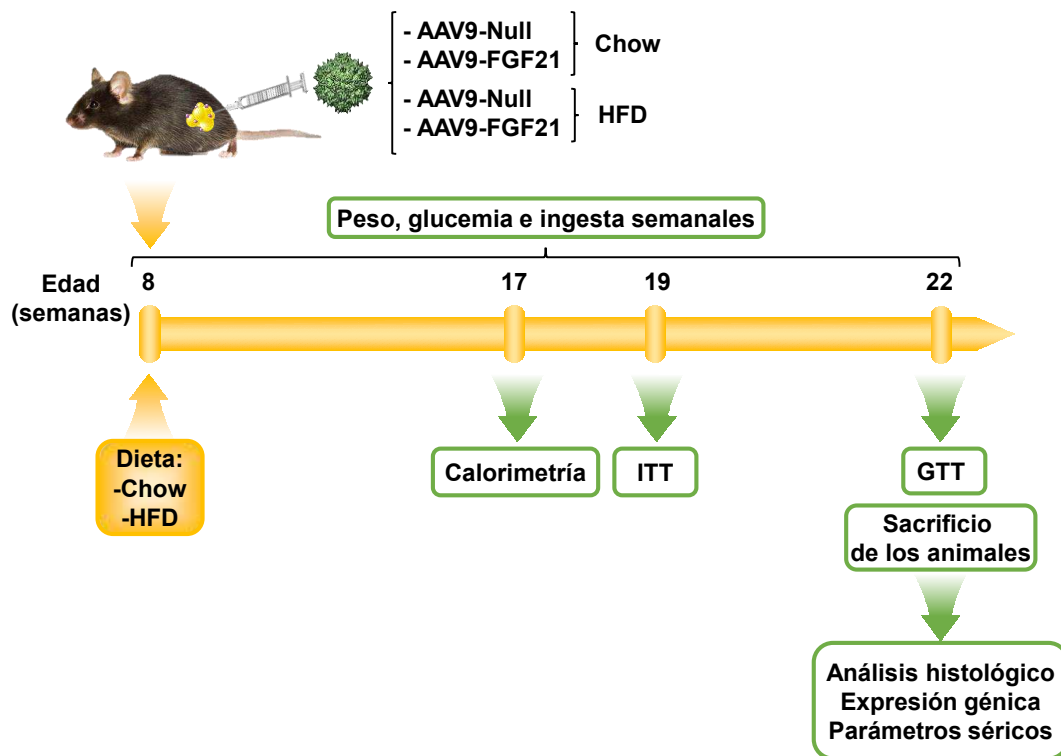
A partir de estos plásmidos se generaron los AAV de serotipo 8 (AAV8) y 9 (AAV9) mediante el sistema de triple transfección en células embrionarias de riñón humano 293 (HEK293) (Ayuso et al., 2010) (apartado 2.3 de Materiales y Métodos). Los AAV resultantes se denominaron AAV8-FGF21, AAV8-Null, AAV9-FGF21 y AAV9-Null. Los diferentes vectores AAV-FGF21 se utilizaron para transducir el tejido adiposo en los estudios llevados a cabo en esta parte I de la tesis.

## **2. ESTUDIO DE LOS EFECTOS DE LA SOBREEXPRESIÓN LOCAL DE FGF21 EN EL TEJIDO ADIPOSO EN RATONES ALIMENTADOS CON DIETA ALTA EN LÍPIDOS**

Uno de los modelos murinos de obesidad y DT2 más utilizado es el modelo de obesidad inducida por la dieta, en la que dicha obesidad se induce mediante una alimentación alta en grasas (HFD) (Black et al., 1998). Así, se ha descrito que la cepa de ratón C57BL/6J alimentada con HFD desarrolla obesidad, resistencia a la insulina, ligera hiperglucemia, dislipidemia e intolerancia a la glucosa. El aumento del peso empieza a evidenciarse tan sólo una semana tras el inicio de la dieta HFD (Almind and Kahn, 2004; Winzell and Ahrén, 2004).

Para estudiar el efecto terapéutico de la sobreexpresión local de FGF21 en el tejido adiposo en la prevención del desarrollo de la obesidad y DT2, se administró intra-eWAT una dosis de  $1 \times 10^{12}$  genomas virales (vg) por animal de AAV9-FGF21 en ratones machos C57BL/6 de 8 semanas de edad (Figura 11). Esta dosis de vectores AAV permiten la transducción de la mayor parte de tejido inyectado (Jimenez et al., 2013). Dos días tras la administración de los vectores AAV, a la mitad del grupo de animales tratados con el vector AAV codificante para FGF21 se les cambió la dieta estándar (Chow) por una HFD, la cual se mantuvo hasta el final del experimento. Como control experimental, también se administró intra-eWAT la misma dosis de vectores AAV9-Null a ratones machos C57BL/6, la mitad de los cuales también se les cambió la dieta Chow por HFD (Figura 11).

Tras la administración de los vectores AAV y la dieta HFD, se realizó un seguimiento semanal de peso, glucemia e ingesta de los animales, durante 14 semanas. Durante ese periodo se realizaron pruebas metabólicas como la calorimetría indirecta, test de tolerancia a la insulina (ITT) y test de tolerancia a la glucosa (GTT). Los animales se sacrificaron a las 22 semanas de edad y se analizaron los tejidos a nivel histológico, se determinó la expresión de genes claves y se evaluaron diferentes parámetros séricos (Figura 11).

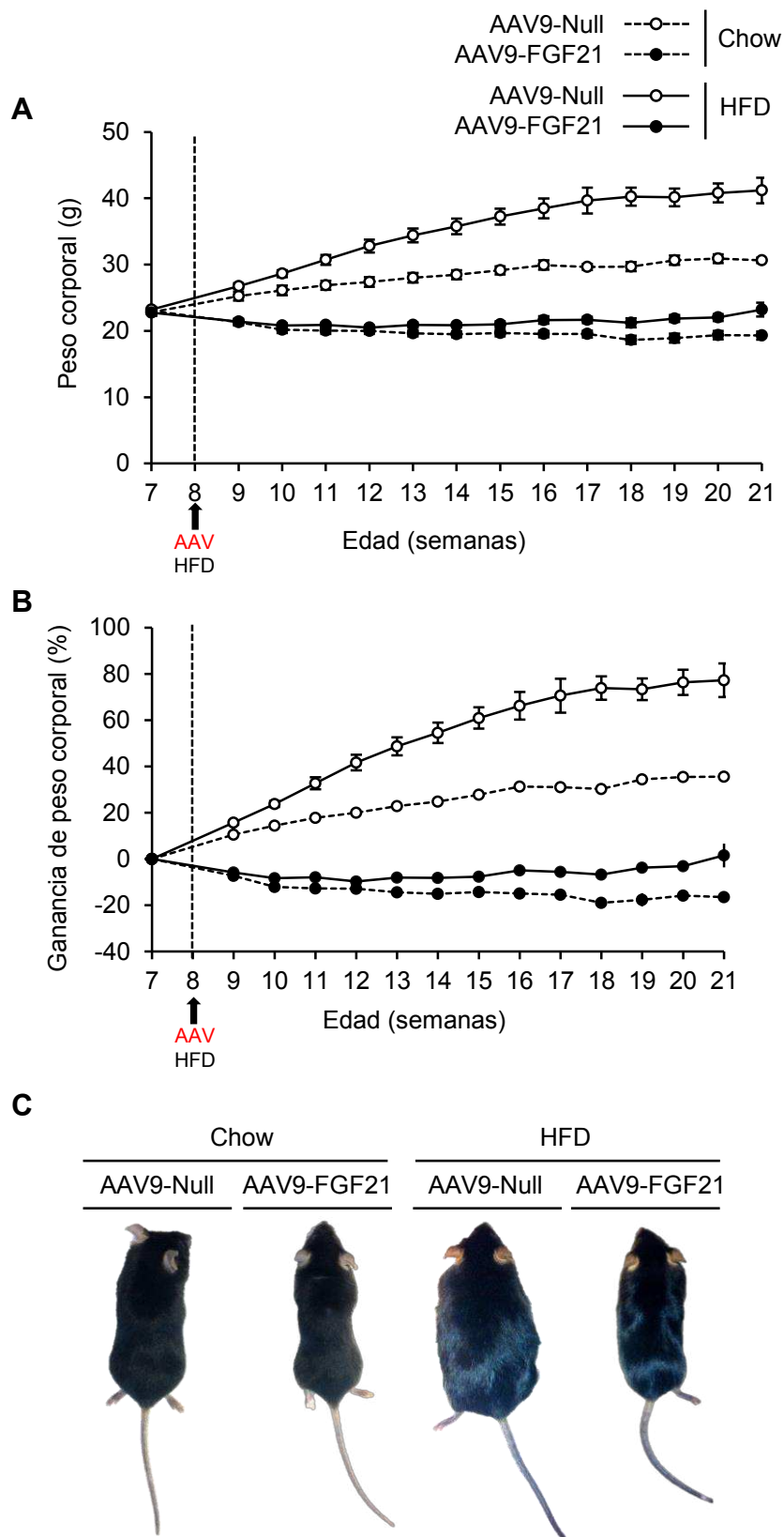


**Figura 11. Diseño experimental de la administración en el tejido adiposo epididimal de vectores AAV9-FGF21.** Los vectores AAV9-FGF21 y AAV9-Null fse administraron localmente en el eWAT a una dosis de  $1 \times 10^{12}$  vg en ratones C57BL/6 de 8 semanas de edad. La mitad de los animales se alimentaron con HFD dos días tras la administración de los AAVs hasta la finalización del experimento. El resto de los animales se alimentaron con una dieta Chow. Se realizó un seguimiento semanal de los animales y se realizaron pruebas metabólicas hasta el sacrificio a las 22 semanas de edad. ITT, test de tolerancia a la insulina; GTT, test de tolerancia a la glucosa; HFD, dieta alta en lípidos; Chow, dieta estándar.  $n=8-11$  por grupo experimental.

## 2.1. Prevención de la obesidad en ratones alimentados con dieta alta en lípidos mediante AAV9-FGF21 en el tejido adiposo.

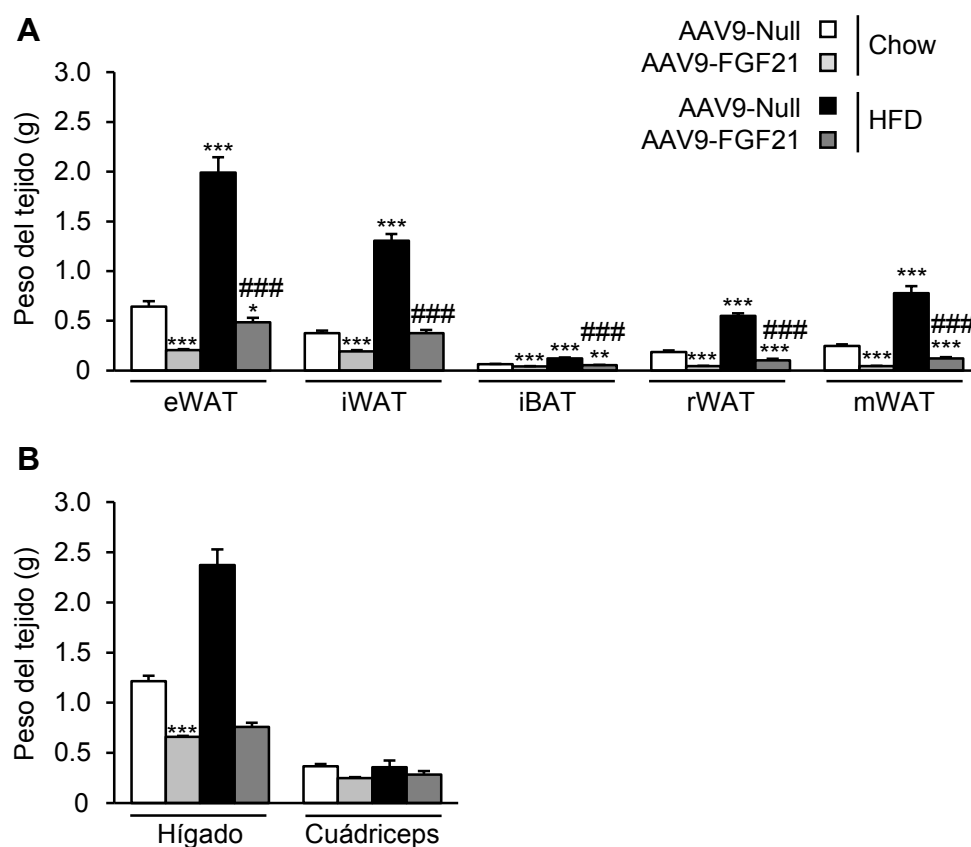
Al evaluar el peso de los animales alimentados con dieta Chow, los ratones administrados intra-eWAT con AAV9-FGF21 presentaron un menor peso corporal durante todo el estudio, mostrando una reducción del 50% de la ganancia de peso respecto al grupo tratado con AAV9-Null al final del estudio (Figura 12A-C). Paralelamente, se observó que la dieta HFD tenía un claro efecto sobre el peso de los animales, aumentando su peso corporal un 40% respecto a los animales control en dieta Chow (Figura 12A-C). Sin embargo, el tratamiento con AAV9-FGF21 fue capaz de prevenir el desarrollo de la obesidad en el grupo de animales alimentados con HFD. Estos animales mostraron una diferencia en la ganancia de peso del 70% respecto al grupo AAV9-Null alimentado con HFD y un peso corporal y una ganancia de peso inferior incluso al de los animales control en dieta Chow (Figura 12A-C).



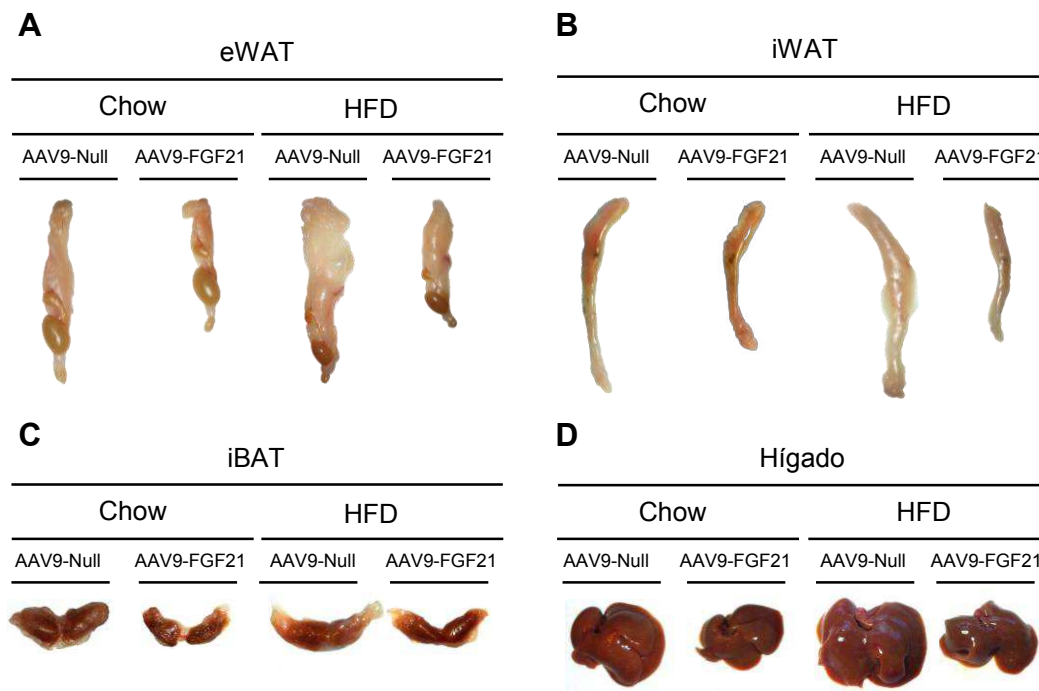


**Figura 12. Evaluación del peso y la ganancia del peso corporal de los animales tratados con AAV9-FGF21.** Ratones machos C57Bl/6 se trataron intra-eWAT con vectores AAV9-FGF21 o AAV9-Null a las 8 semanas de edad y se alimentaron con dieta Chow o HFD. **(A)** Evolución del peso corporal absoluto en gramos (g). **(B)** Evolución de la ganancia del peso corporal en % respecto al peso corporal inicial. **(C)** Imágenes representativas de los animales pertenecientes a cada grupo experimental al final del estudio. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  EEM.  $n=8-11$  por grupo experimental.

Al finalizar del estudio, tras 14 semanas de seguimiento, se obtuvieron y pesaron los principales tejidos adiposos (tejido adiposo blanco epididimal (eWAT), tejido adiposo blanco inguinal (iWAT), tejido adiposo blanco mesentérico (mWAT), tejido blanco retroperitoneal (rWAT) y tejido adiposo marrón interescapular (iBAT)), el hígado y el cuádriceps. De forma similar al peso corporal, se observó un claro efecto de la dieta HFD en el peso de los tejidos de los animales tratados con AAV9-Null, ya que estos animales mostraron un gran aumento del peso de todos los tejidos adiposos y el hígado respecto a los animales en dieta Chow (Figura 13A y 14). El tratamiento con AAV9-FGF21 fue capaz de prevenir la acumulación de grasa en estos tejidos. Además, no se observaron diferencias en el cuádriceps, por lo que la reducción del peso corporal observado en los animales tratados con AAV9-FGF21 respecto los animales control, tanto en dieta Chow como en dieta HFD, fue debida principalmente a la disminución del peso de todos los depósitos adiposos y del hígado (Figura 13 y 14).



**Figura 13. Peso de los tejidos.** Ratones machos C57Bl/6 se trataron intra-eWAT con vectores AAV9-FGF21 o AAV9-Null a las 8 semanas de edad y se alimentaron con dieta Chow o HFD. A las 22 semanas de edad, se determinó el peso de los principales depósitos adiposos (**A**) y los tejidos metabólicos más representativos, hígado y cuádriceps (**B**). Los resultados se expresan como la media  $\pm$  EEM.  $n=8-11$  por grupo experimental. \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$  y \*\*\* $P<0.001$  versus el grupo alimentado con dieta Chow inyectado con vectores nulo. # $P<0.05$ , ## $P<0.01$  y ### $P<0.001$  versus el grupo alimentado con dieta HFD inyectado con vectores nulo.

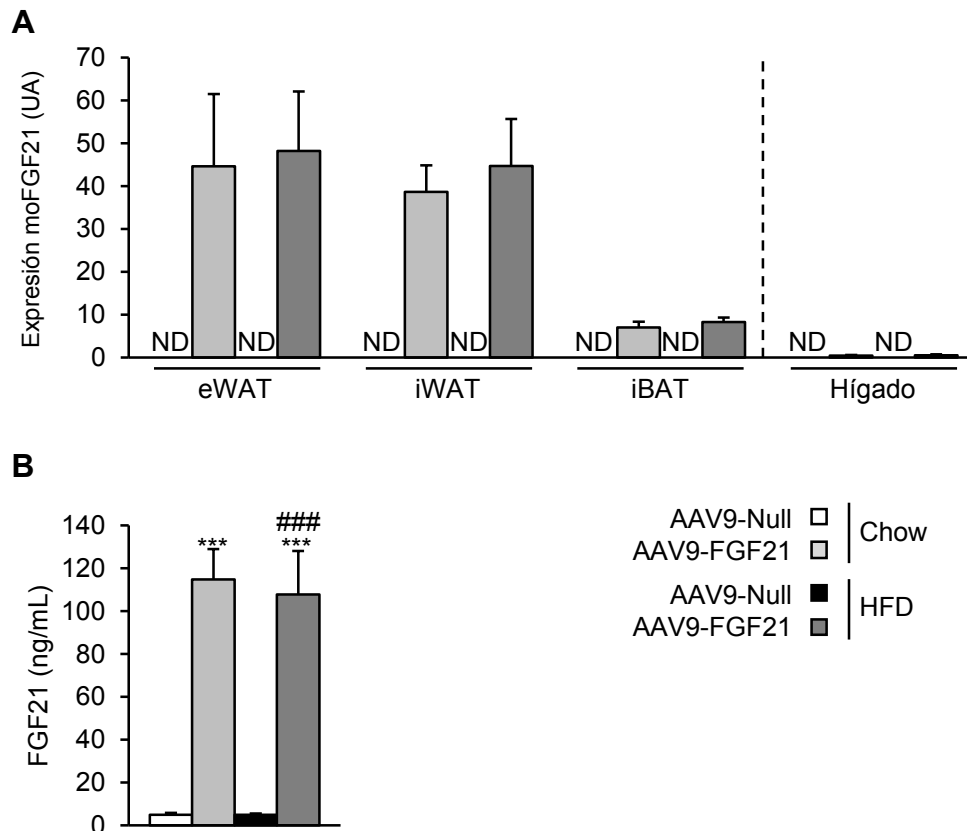


**Figura 14. Evaluación macroscópica de los tres depósitos adiposos principales y del hígado.** Ratones machos C57Bl/6 se trataron con AAV9-FGF21 o AAV9-Null a las 8 semanas de edad y se alimentaron con dieta Chow o HFD. A las 22 semanas de edad, se obtuvieron los eWAT, iWAT, iBAT e hígados. Imágenes representativas de los eWAT (A), iWAT (B), iBAT (C) e hígados (D) de los animales pertenecientes a todos los grupos experimentales del estudio.

## 2.2. Expresión y secreción de FGF21 en los animales tratados con AAV9-FGF21

Cuando los animales se sacrificaron, se comprobó la expresión de moFGF21 tanto en el depósito adiposo inyectado (eWAT) como en otros depósitos adiposos importantes a nivel metabólico, como el iWAT e iBAT. Además, se analizó la expresión hepática de moFGF21 para evaluar la eficiencia del dmiRT en la reducción de la expresión del transgén en el hígado. No se determinó la expresión cardíaca de moFGF21 ya que estudios anteriores demostraron que el nivel de transducción en el corazón tras la administración local de vectores AAV en el eWAT era muy bajo, dado que era completamente contrarrestado por el miRT1 (Jimenez et al., 2013). El eWAT, tejido donde se realizó la administración de los vectores AAV, mostró niveles elevados de expresión de moFGF21 tanto en animales Chow como en HFD (Figura 15A). Mientras que el iWAT presentó niveles de expresión de moFGF21 equiparables al eWAT, la expresión en el iBAT era inferior a ambos depósitos de grasa (Figura 15A). Por último, se detectaron niveles bajísimos del transgén moFGF21 en el hígado, siendo marginales respecto a su expresión en los tejidos adiposos (Figura 15A). Estos resultados confirmaron que la presencia del miRT122 en el transgén fue capaz de bloquear su expresión en hígado.

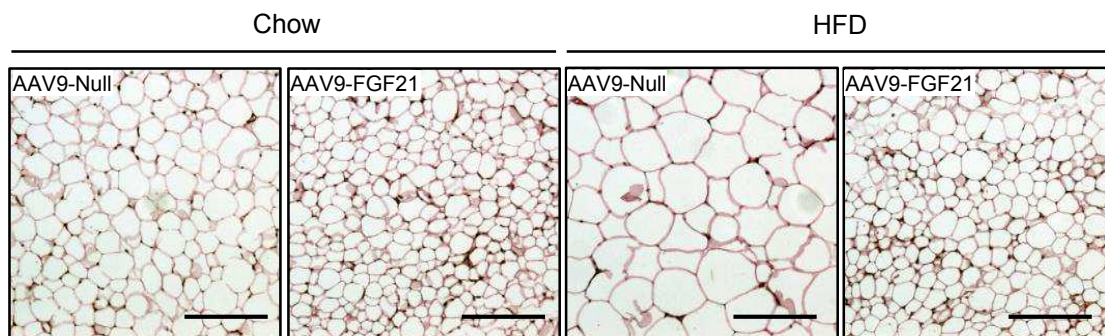
Dado que FGF21 es un factor secretable y el tejido adiposo posee una elevada capacidad secretora, se evaluaron los niveles circulantes de este factor mediante análisis por ELISA. Tras 14 semanas de la administración de los vectores se observaron unos niveles muy elevados de FGF21, similares entre ambos grupos de animales tratados con AAV9-FGF21, en comparación con los grupos control tratados con AAV9-Null (Figura 15B).



**Figura 15. Niveles de expresión de moFGF21 en los principales tejidos adiposos e hígado, y niveles circulantes de FGF21.** Ratones machos C57Bl/6 se trataron intra-eWAT con vectores AAV9-FGF21 o AAV9-Null a las 8 semanas de edad y se alimentaron con dieta Chow o HFD. **(A)** Niveles de expresión de FGF21 murino optimizado (moFGF21) en eWAT, iWAT, iBAT e hígado 14 semanas post-AAV. **(B)** Niveles séricos de FGF21 14 semanas post-AAV. ND, no detectado; moFGF21; secuencia optimizada del CDS murino de *Fgf21*; UA, unidades arbitrarias. Los resultados se expresaron como la media  $\pm$  EEM. n=8-11 por grupo experimental. \*P<0.05, \*\*P<0.01 y \*\*\*P<0.001 versus el grupo alimentado con dieta Chow inyectado con vectores nulo. #P<0.05, ##P<0.01 y ###P<0.001 versus el grupo alimentado con dieta HFD inyectado con vectores nulo.

### 2.3. Reversión de la hipertrofia y la inflamación del eWAT inducida por la dieta alta en lípidos

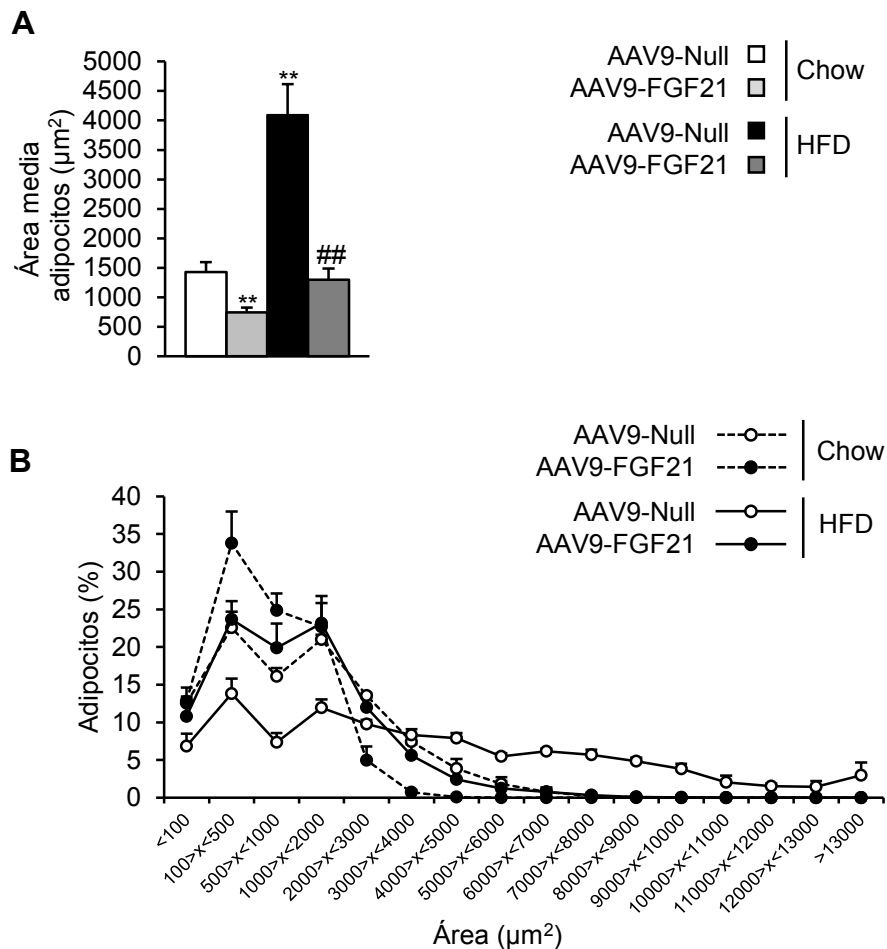
Uno de los efectos de la dieta HFD es el aumento del tamaño de los adipocitos (hipertrofia) y como consecuencia la inflamación del tejido adiposo (Choe et al., 2016). Mientras que los adipocitos de los animales tratados con AAV-Null alimentados con una dieta alta en lípidos mostraban una gran hipertrofia del eWAT, se observó una clara disminución del tamaño de los adipocitos de este tejido, tanto en los animales alimentados con una dieta Chow como una dieta HFD, tras la administración de AAV9-FGF21 (Figura 16). Así, a pesar de consumir una dieta HFD, los adipocitos de los animales tratados con FGF21 mostraron un tamaño indistinguible a los adipocitos de los animales tratados con el mismo vector alimentados con dieta Chow. Además, el tamaño de los adipocitos de los animales administrados con AAV9-FGF21 era incluso menor al de los animales control en dieta Chow (Figura 16).



**Figura 16. Análisis histológico del tejido adiposo blanco epididimal.** Imágenes representativas de la tinción de hematoxilina/eosina del eWAT en los ratones machos C57BL/6 alimentados con dieta Chow o HFD tratados con AAV9-FGF21 o AAV9-Null a las 8 semanas de edad. Escala: 100 $\mu$ m.

De acuerdo con los resultados observados en los cortes histológicos, la morfometría de los adipocitos del eWAT de los animales control en dieta HFD mostró que el área media de las células adiposas era más del doble del tamaño de los adipocitos de los animales control en dieta Chow (Figura 17A). Sin embargo, el tamaño medio de los adipocitos de los animales tratados con AAV9-FGF21, tanto en dieta Chow como en HFD, era significativamente menor respecto a sus grupos control (Figura 17A). De hecho, el área media de los adipocitos de los animales tratados con AAV9-FGF21 alimentados con dieta HFD era similar al de los animales AA9-Null en dieta Chow (Figura 17A). Al evaluar la distribución de los adipocitos según su tamaño, se observó que la dieta HFD en los animales control inducía un aumento en la frecuencia de adipocitos más grandes respecto los animales control en dieta Chow (Figura 17B). Contrariamente, los animales administrados con el vector AAV9-FGF21

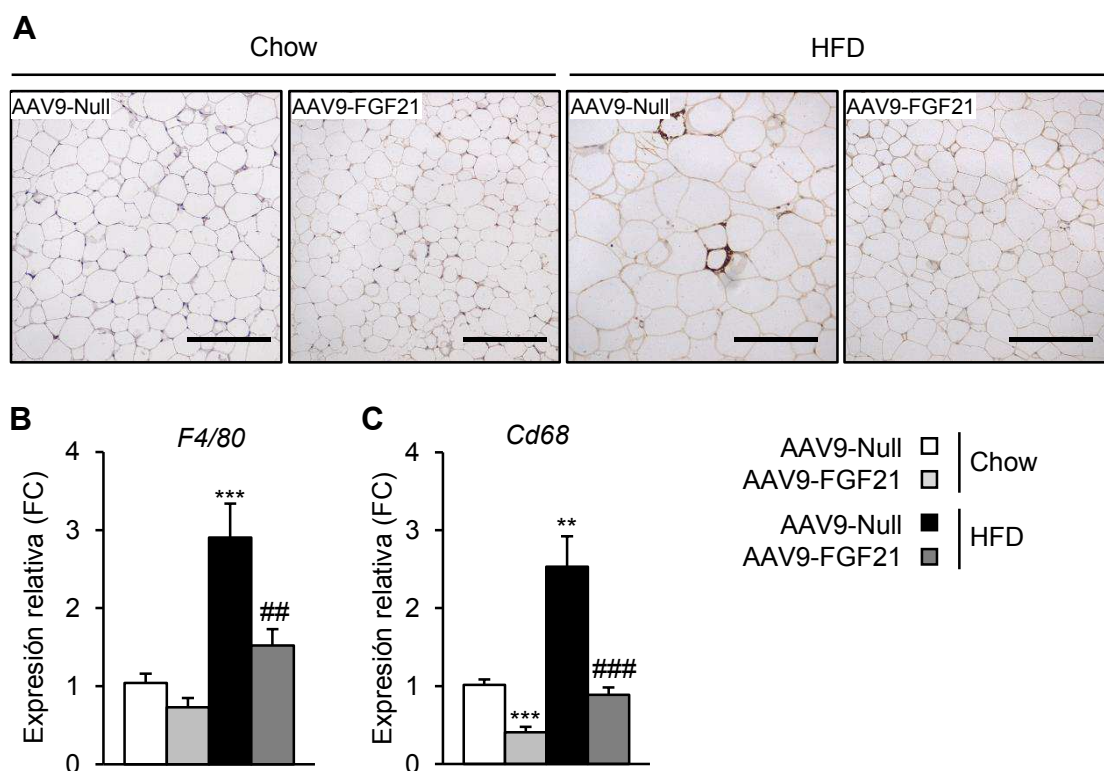
mostraron un aumento en el número de adipocitos pequeños y medianos, y una reducción de los adipocitos grandes respecto al grupo control, en ambas condiciones de alimentación (Figura 17B). Cabe resaltar que la distribución del tamaño de los adipocitos de los animales tratados con AAV9-FGF21 alimentados con dieta HFD era muy similar al de los animales administrados con el vector nulo en dieta Chow (Figura 17B).



**Figura 17. Área media y distribución de los adipocitos por área en el tejido adiposo epididimal. (A)** Área media de los adipocitos blancos del eWAT a las 14 semanas tras la administración intra-eWAT de los vectores AAV9-FGF21 o AAV9-Null en ratones machos C57BL/6 alimentados con dieta Chow o HFD. **(B)** Distribución de frecuencia del área de los adipocitos en los mismos grupos experimentales. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  EEM.  $n=4$  por grupo experimental. \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$  y \*\*\* $P<0.001$  versus el grupo alimentado con dieta Chow inyectado con vectores nulo. # $P<0.05$ , ## $P<0.01$  y ### $P<0.001$  versus el grupo alimentado con dieta HFD inyectado con vectores nulo.

Directamente relacionado con la hipertrofia del tejido adiposo blanco, se ha descrito un aumento de la inflamación, la cual está muy relacionada con la resistencia a la insulina en este tejido (Bluher, 2016; Choe et al., 2016). Esta inflamación está caracterizada con un aumento de la presencia de macrófagos proinflamatorios de tipo

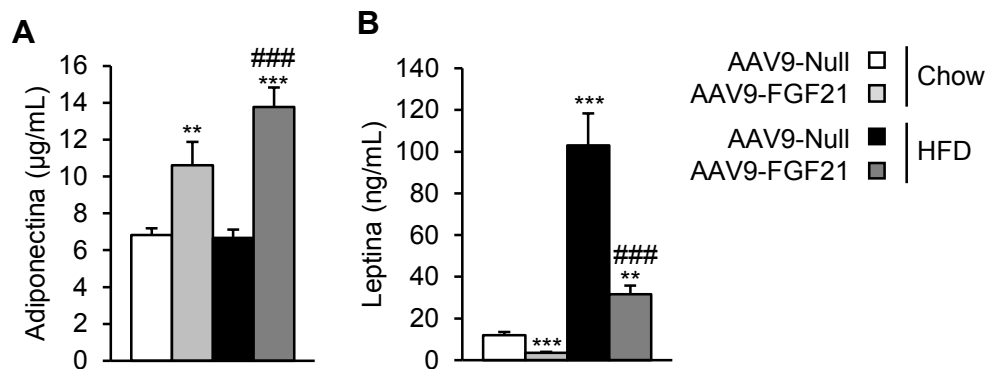
M1 en este tejido (Braune et al., 2017; Chylikova et al., 2018; Coats et al., 2017). Para evaluar este proceso inflamatorio en el eWAT, a partir de cortes histológicos se realizó un análisis inmunohistoquímico contra MAC2 (*Galectin-3*), proteína de la superficie celular de los macrófagos y utilizada como marcador de la presencia de macrófagos. En los tejidos adiposos inflamados, se produce un reclutamiento de macrófagos proinflamatorios de tipo M1, los cuales forman estructuras en forma de corona, conocidas como *Crown-like structures* (Choe et al., 2016). El análisis inmunohistoquímico confirmó que la dieta HFD en los animales tratados con vectores nulo provocó la inflamación del eWAT en comparación con los animales control con dieta Chow. Sin embargo, el tratamiento con AAV9-FGF21 fue capaz de prevenir el desarrollo de la inflamación en el eWAT, especialmente en los animales alimentados con dieta HFD, probablemente al disminuir el acúmulo de grasa en este tejido (Figura 18A). Estos resultados se confirmaron mediante RT-PCR, utilizando otros marcadores de la presencia macrófagos como los genes *F4/80* (*EGF-like module-containing mucin-like hormone receptor-like 1*) y *Cd68* (*cluster of differentiation 68*), los cuales estaban también disminuidos en los animales tratados con AAV9-FGF21 (Figura 18B).



**Figura 18. Evaluación de la inflamación del tejido adiposo blanco epididimal.** Ratones machos C57BL/6 alimentados con dieta Chow o HFD se trataron con AAV9-FGF21 o AAV9-Null a las 8 semanas de edad. **(A)** Imagen representativa de la tinción inmunohistoquímica contra MAC2 (marrón) en secciones del eWAT 14 semanas post-AAV. Escala: 100µm. **(B)** Niveles de expresión de *F4/80* y *Cd68* 14 semanas post-AAV medido mediante RT-PCR. Los resultados se expresan como la media ± EEM. FC, *Fold change*. n=8-11 por grupo experimental. \*P<0.05, \*\*P<0.01 y \*\*\*P<0.001 versus el grupo alimentado con dieta Chow inyectado con vectores nulo. #P<0.05, ##P<0.01 y ###P<0.001 versus el grupo alimentado con dieta HFD inyectado con vectores nulo.

En conjunto, los resultados del análisis del tejido adiposo blanco epididimal revelaron que el tratamiento con AAV9-FGF21 en animales alimentados con dieta HFD, fue capaz de prevenir la inflamación e hipertrofia de este tejido.

De acuerdo con la reducción de área media de los adipocitos y la reducción de la inflamación en el eWAT, se observó un incremento en los niveles circulantes de la adipocina adiponectina en los animales tratados con AAV9-FGF21 en ambas condiciones de dieta (Figura 19A). Esta adipocina ejerce un efecto antiobesogénico y antidiabético y disminuye la resistencia a la insulina al estimular la oxidación de los lípidos y las respuestas antiinflamatorias. Niveles disminuidos de esta hormona están correlacionados con un incremento del tamaño de los adipocitos asociada a la obesidad (Asayama et al., 2003; Choe et al., 2016; Meyer et al., 2013; Skurk et al., 2007). Los niveles de leptina (Figura 19B) disminuyeron en los animales tratados con AAV9-FGF21 respecto el grupo tratado con vectores nulo. La expansión del tejido adiposo durante la obesidad está asociada a un incremento de la secreción de leptina, hormona secretada principalmente por los adipocitos, regulando la señalización de la saciedad y la homeostasis energética (Coppari and Bjorbaedk, 2012).

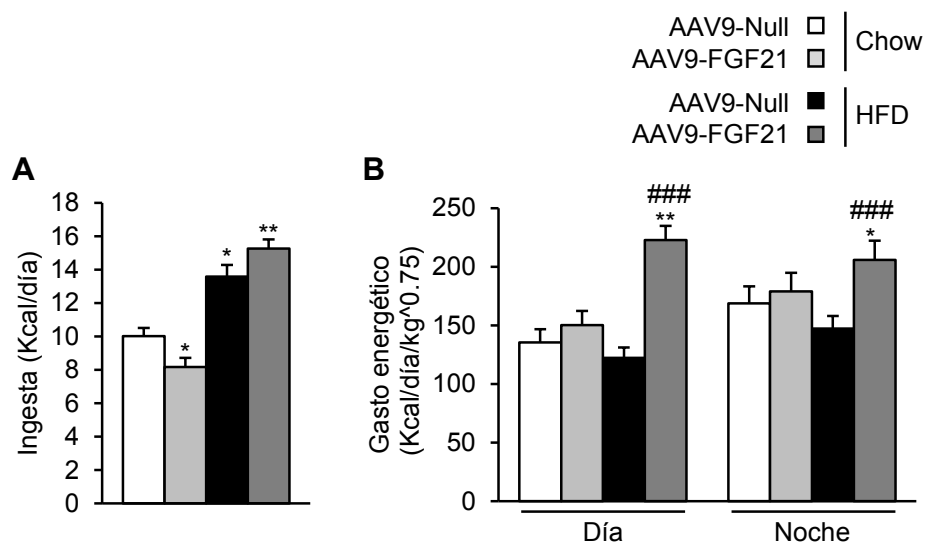


**Figura 19. Determinación de los niveles circulantes de leptina y adiponectina.** Niveles circulantes de adiponectina (A) y leptina (B) en ratones machos C57Bl/6 tratados con AAV9-FGF21 o AAV9-Null alimentados con dieta Chow o HFD a las 22 semanas de edad. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  EEM. n=8-11 por grupo experimental. \*P<0.05, \*\*P<0.01 y \*\*\*P<0.001 versus el grupo alimentado con dieta Chow inyectado con vectores nulo. #P<0.05, ##P<0.01 y ###P<0.001 versus el grupo alimentado con dieta HFD inyectado con vectores nulo.



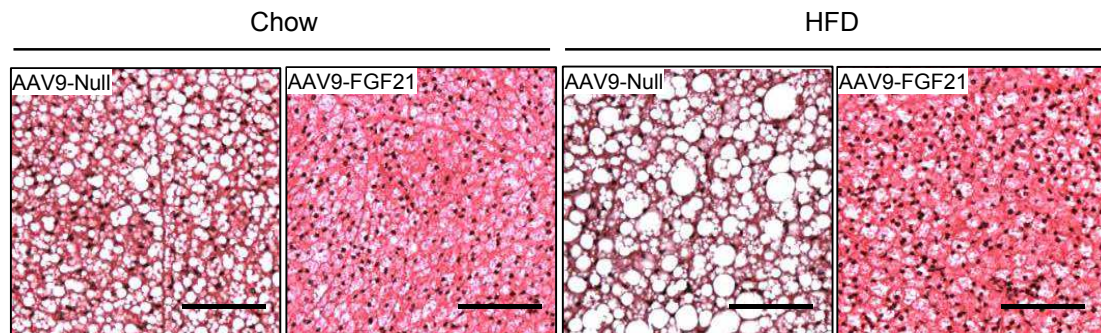
#### 2.4. Análisis del gasto energético y el *browning* en el tejido adiposo inducido por el tratamiento de AAV9-FGF21

La pérdida de peso y la disminución de la grasa observada en los animales tratados con AAV9-FGF21, tanto en dieta Chow como en dieta HFD, podría ser debida a una disminución en la ingesta de estos animales. Los animales alimentados con dieta Chow y tratados con AAV9-FGF21 mostraron una leve reducción de la ingesta respecto al grupo control en dieta Chow (Figura 20A). Sin embargo, los animales alimentados con una dieta HFD y administrados con AAV9-FGF21 no solo no comían menos, sino que comían más que los animales tratados con el vector nulo cuando estaban alimentados con dieta HFD (Figura 20A). Este resultado sugería que la pérdida de peso y grasa en los animales tratados con AAV9-FGF21, al menos en dieta HFD, podría deberse a un aumento del gasto energético en estos ratones. Mediante un estudio de calorimetría indirecta se determinó el gasto energético de estos animales a las 17 semanas de edad. Los animales tratados con AAV9-FGF21 alimentados con dieta Chow no presentaron diferencias significativas en el gasto energético ni durante el día ni durante la noche (Figura 20B). Sin embargo, los animales tratados con dichos vectores alimentados con HFD sí mostraron un claro aumento del gasto energético, tanto de día como de noche, respecto a los animales control tratados con vectores nulo en dieta HFD (Figura 20B).



**Figura 20. Análisis de la ingesta y del gasto energético de los animales. (A)** Medida de la ingesta diaria de los ratones machos C57Bl/6 tratados con AAV9-FGF21 o AAV9-Null alimentados con dieta Chow o HFD expresado en kilocalorías por día. **(B)** Análisis del gasto energético mediante calorimetría indirecta 9 semanas post-AAV de los mismos grupos experimentales. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  EEM.  $n=8-11$  por grupo experimental. \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$  y \*\*\* $P<0.001$  versus el grupo alimentado con dieta Chow inyectado con vectores nulo. # $P<0.05$ , ## $P<0.01$  y ### $P<0.001$  versus el grupo alimentado con dieta HFD inyectado con vectores nulo.

Dado el aumento en el gasto energético observado en los ratones tratados con AAV9-FGF21 en dieta HFD, se analizó la termogénesis no asociada al temblor del iBAT, principal tejido implicado en el gasto energético. El análisis histológico del iBAT confirmó el incremento en el depósito de grasa en este tejido inducido por la ingesta de la dieta HFD (Figura 21). Sin embargo, los animales tratados con AAV9-FGF21, tanto en dieta Chow como HFD, mostraron una clara reducción en el acúmulo de grasa en el iBAT, lo que sugería una activación metabólica (Figura 21).



**Figura 21. Análisis histológico del tejido adiposo marrón interescapular.** Imágenes representativas de cortes histológico con tinción de hematoxilina/eosina del iBAT en los ratones machos C57BL/6 alimentados con dieta Chow o HFD y tratados con AAV9-FGF21 o AAV9-Null a las 8 semanas de edad. Escala: 200µm.

Bajo ciertos estímulos, como el frío, el tejido adiposo blanco subcutáneo, en el que se incluye el tejido adiposo blanco inguinal (iWAT), es capaz de adquirir un fenotipo más propio del tejido adiposo marrón, y por tanto una mayor capacidad termogénica. En este proceso conocido como *browning* del tejido adiposo blanco, se produce un aumento en la presencia de adipocitos beige en este tejido. Durante el proceso de *browning*, estos adipocitos beige contribuyen en parte al aumento del gasto energético en este tejido (Janský, 1995). El origen de los adipocitos beige es controvertido, ya que se ha postulado que pueden originarse a partir de una transdiferenciación de los propios adipocitos blancos. Sin embargo, otros autores sostienen que los propios adipocitos progenitores presentes en el propio tejido podrían ser capaces de diferenciarse a adipocitos beige bajo ciertos estímulos (Barbatelli et al., 2010; Berry et al., 2016; Cinti, 2009; Lee et al., 2012, 2015, Wang et al., 2016, 2013; Wu et al., 2012; Xue et al., 2015). Independientemente de su origen, sí que existe un amplio consenso al definir los adipocitos beige como un nuevo tipo celular con un perfil de expresión único y distinto a los dos tipos clásicos de adipocitos, blancos y marrones (Wu et al., 2012).

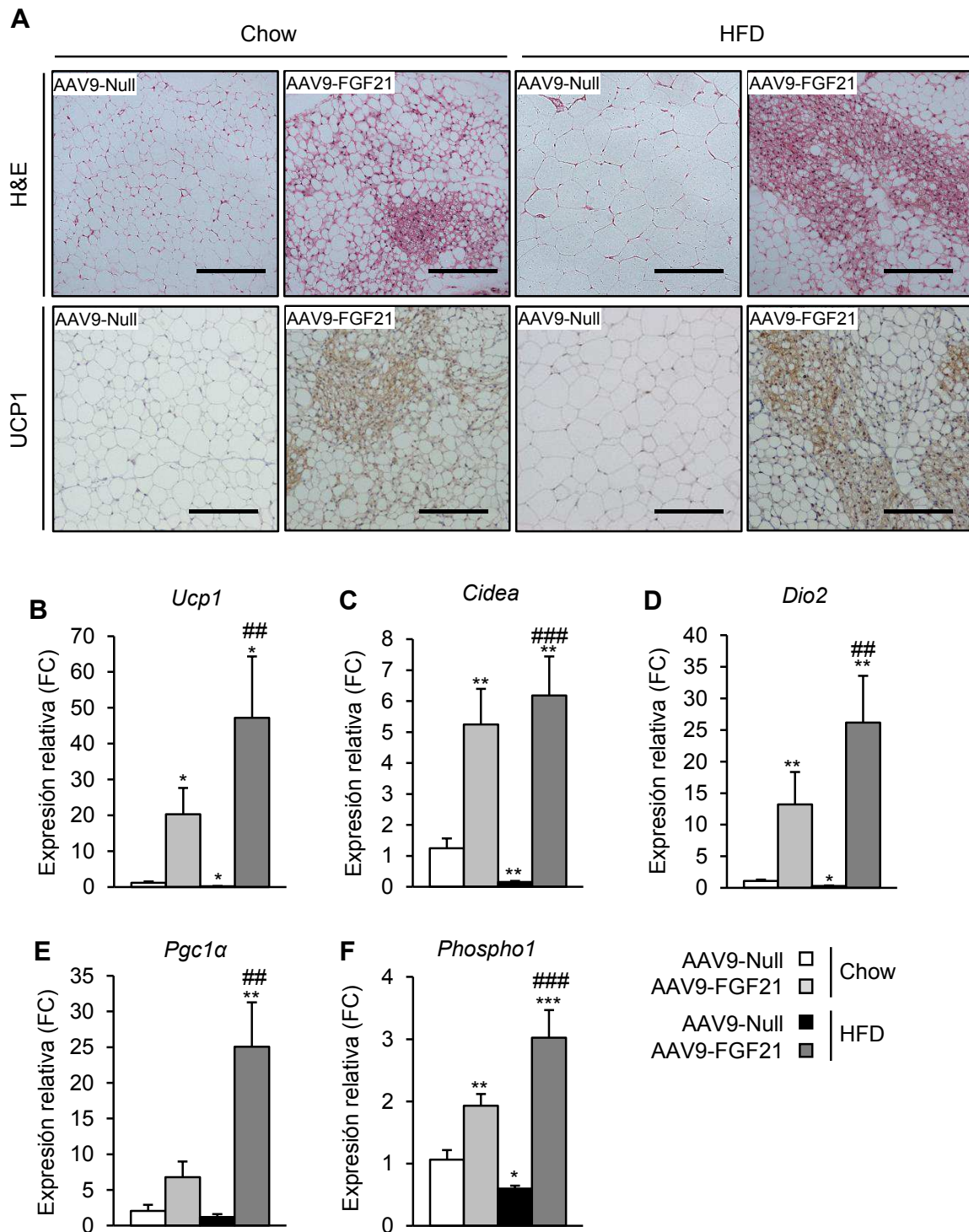
Dado que el *browning* del iWAT pudiera estar contribuyendo al aumento en el gasto energético observado en los ratones tratados con AAV9-FGF21, también se realizó un análisis histológico de cortes del iWAT. Además, se realizó un análisis inmunohistoquímico para detectar la proteína desacopladora UCP1, principal responsable de la termogénesis no asociada al temblor. Al igual que en el caso del iBAT, los animales tratados con los vectores nulo alimentados con la dieta HFD mostraron un incremento en el depósito de grasa en el iWAT, observándose un aumento del tamaño de los adipocitos, respecto a los ratones control en dieta Chow (Figura 22A). Sin embargo, se observó una disminución del tamaño de los adipocitos y la aparición de una población de adipocitos multiloculares (adipocitos beige) en los animales tratados con AAV9-FGF21 alimentados con dieta Chow o HFD (Figura 22A). Esta observación estaba de acuerdo con el aumento del gasto energético y la pérdida de peso observados en estos animales. La naturaleza de esta población de adipocitos multiloculares fue corroborada por el aumento marcado en la expresión de la proteína UCP1 observado en el análisis inmunohistoquímico del iWAT de los animales tratados con AAV9-FGF21, tanto en dieta Chow como en HFD (Figura 22A). Para confirmar y cuantificar estos resultados, también se determinó la expresión de *Ucp1* mediante RT-PCR (Figura 22B). En los ratones tratados con AAV9-Null, el análisis de la expresión de *Ucp1* reveló que la dieta HFD inducía una disminución en la expresión de este gen en el iWAT (Figura 22B). Sin embargo, la administración de AAV9-FGF21 incrementaba casi 20 veces la expresión de *Ucp1* en los animales alimentados con dieta Chow respecto a los ratones control (Figura 22B). Además, el tratamiento no sólo no redujo la expresión de *Ucp1* en los animales tratados con AAV9-FGF21 debido a la dieta grasa, sino que el aumento en la expresión era incluso mayor (alrededor de 2 veces) que el observado en los animales AAV9-FGF21 en dieta Chow (Figura 22B).

Para profundizar en el estudio del *browning* observado en el iWAT de los animales tratados con los vectores FGF21, se analizó la expresión de otros genes marcadores de este proceso tales como *Cell death-inducing DNA fragmentation factor, alpha subunit-like effector A (Cidea)*, *Deiodinase, iodothyronine, type II (Dio2)* y *Peroxisome proliferative activated receptor, gamma, coactivator 1 alpha (Pgc1 $\alpha$ )* (de Jesus et al., 2001; Liang and Ward, 2006; Rosell et al., 2014; Wu et al., 2012). Del mismo modo que sucedía con la expresión de *Ucp1*, la dieta HFD redujo los niveles de expresión tanto de *Cidea* como de *Dio2*, aunque no parecía modificar los niveles de *Pgc1 $\alpha$*  (Figura 22C-E). Paralelamente al aumento en la expresión de *Ucp1* observado en los animales AAV9-FGF21 en dieta Chow, los niveles de *Cidea*, *Dio2* y *Pgc1 $\alpha$* , incrementaron 5, 12 y 3 veces, respecto a los ratones control en dieta Chow (Figura

22C-E). Además, los animales tratados con AAV9-FGF21 en dieta HFD también mostraron un aumento en la expresión de *Cidea* (6 veces), *Dio2* (25 veces) y *Pgc1 $\alpha$*  (12 veces), respecto al grupo control en dieta Chow (Figura 22C-E). Todos estos resultados confirmaron que la administración intra-eWAT de vectores AAV9-FGF21 inducían *browning* en el iWAT, contribuyendo al aumento en el gasto energético y a la disminución del peso en los animales tratados.

Recientemente, se han descrito ciertos ciclos fútiles capaces de aumentar el gasto energético bajo diferentes estímulos, actuando independientemente de UCP1 y de la inducción del *browning* en el iWAT (Ikeda et al., 2017; Kazak et al., 2015). Así, se ha observado en animales *knock out* para *Ucp1* un incremento en el gen *Phosphatase orphan 1 (Phospho1)*, implicado en el ciclo fútil de la creatina, el cual aumentaría del gasto energético de manera independiente a UCP1 y al *browning* (Kazak et al., 2015). En nuestro estudio se observó una disminución en los niveles de expresión de *Phospho1* en los ratones control alimentados con dieta HFD, respecto a los mismos animales en dieta Chow (Figura 22F). Sin embargo, el tratamiento con AAV9-FGF21 aumentó significativamente la expresión de *Phospho1* en ambas dietas, siendo incluso más alta en los ratones alimentados con dieta HFD (Figura 22F).

Estos resultados indicaron que la administración intra-eWAT de vectores AAV9-FGF21 era capaz de prevenir la obesidad inducida por la dieta HFD a través de un incremento del gasto energético, tanto dependiente como independiente de UCP1, y que este efecto terapéutico era incluso mayor que el observado en animales alimentados con dieta Chow.



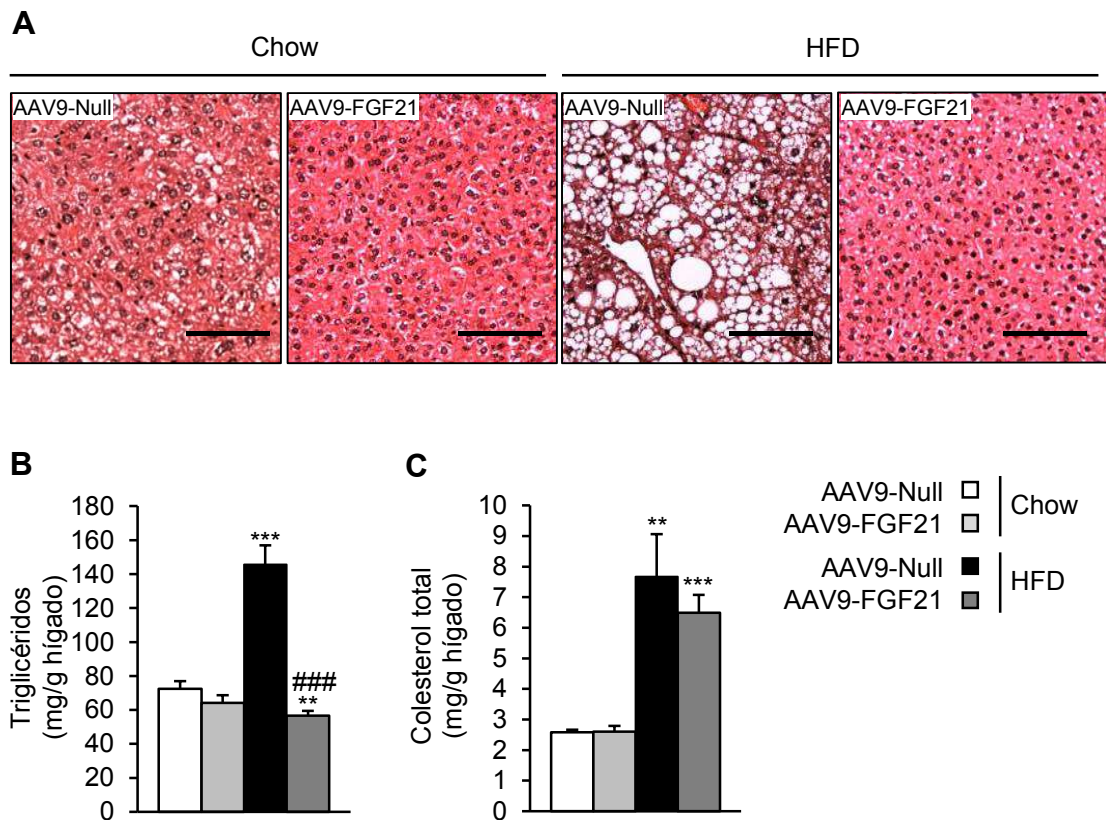
**Figura 22. Análisis histológico del tejido adiposo blanco inguinal. (A)** Imágenes representativas de cortes histológico con tinción de hematoxilina/eosina (panel superior) y análisis inmunohistoquímico contra UCP1 (panel inferior) del iWAT en ratones machos C57BL/6 alimentados con dieta Chow o HFD y tratados con AAV9-FGF21 o AAV9-Null. Escala: 100μm. **(B-F)** Niveles de expresión de *Ucp1*, *Cidea*, *Dio2*, *Pgc1α* y *Phospho1* en iWAT 14 tras el tratamiento con los vectores AAV. Los resultados se expresan como la media ± EEM. n=8-11 por grupo experimental. \*P<0.05, \*\*P<0.01 y \*\*\*P<0.001 versus el grupo alimentado con dieta Chow inyectado con vectores nulo. #P<0.05, ##P<0.01 y ###P<0.001 versus el grupo alimentado con dieta HFD inyectado con vectores nulo. FC, fold change.

## **2.5. Reversión de la esteatosis, la inflamación y la fibrosis hepáticas inducida por la dieta alta en lípidos**

Cuando la capacidad de almacenamiento del tejido adiposo se sobrepasa y no es capaz de almacenar más energía en forma de grasa, el exceso de lípidos se acumula en tejidos ectópicos, principalmente el hígado, originando una de las patologías más frecuentes y graves asociadas a la obesidad, la esteatosis hepática. El excesivo acúmulo de grasa en el hígado induce inflamación, y si ésta se mantiene durante mucho tiempo, puede desencadenar el desarrollo de fibrosis y, en último término, cirrosis hepática e incluso cáncer (Bertot and Adams, 2016).

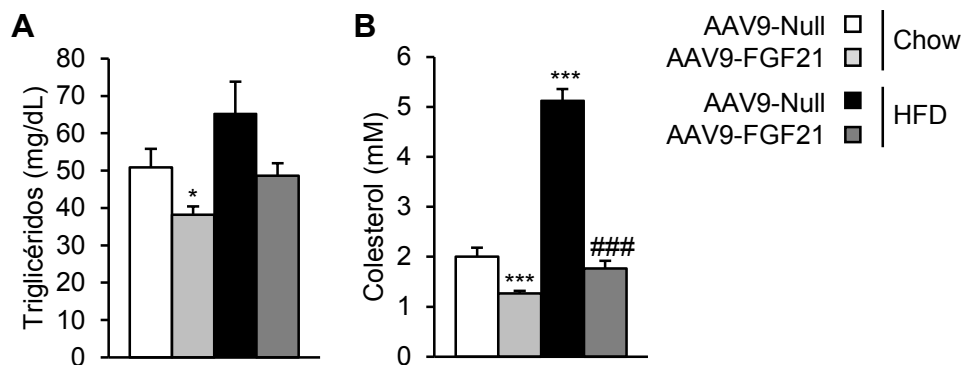
Para valorar la eficacia del tratamiento con los vectores AAV9-FGF21 en la obesidad inducida por la dieta HFD, se analizó histológicamente el hígado de estos animales. Los animales alimentados con la dieta HFD y tratados con los vectores nulo presentaban un marcado depósito de grasa en el hígado, comparado a los animales control en dieta Chow (Figura 23A). Mientras que el tratamiento con AAV9-FGF21 de los animales en dieta Chow no inducía cambios en el acúmulo de grasa respecto a sus ratones control, la administración del vector terapéutico en animales en dieta HFD fue capaz de prevenir la esteatosis inducida por este tipo de dieta (Figura 22A). Posteriormente, se analizaron tanto el contenido de triglicéridos como el de colesterol a partir de extractos lipídicos del hígado. No se observaron diferencias en el contenido de triglicéridos o de colesterol entre los dos grupos alimentados con dieta Chow (Figura 23B). Por el contrario, los animales alimentados con HFD y tratados con vectores nulo mostraron un aumento en la cantidad de triglicéridos y de colesterol total respecto a los ratones control en dieta Chow (Figura 23B y C). Los animales alimentados con HFD y tratados con AAV9-FGF21 no mostraron una reducción en la cantidad acumulada de colesterol pero si en la acumulación triglicéridos respecto a los ratones control en dieta HFD, presentando niveles similares a los animales en dieta Chow (Figura 23B y C). Estos resultados estaban de acuerdo con el análisis histopatológico previo, demostrando que los animales tratados con AAV9-FGF21 eran capaces de prevenir la esteatosis hepática inducida por la dieta alta en lípidos.





**Figura 23. Análisis histológico y contenido de triglicéridos y colesterol en hígado.** (A) Imágenes representativas de cortes histológicos del hígado tras tinción de hematoxilina/eosina en ratones C57BL/6 alimentados con dieta Chow o HFD y tratados con AAV9-FGF21 o AAV9-Null a las 8 semanas de edad. Escala: 200µm. (B y C) Contenido hepático de triglicéridos y colesterol total, 14 semanas post-AAV. Los resultados se expresan como a media  $\pm$  EEM.  $n=8-11$  por grupo experimental. \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$  y \*\*\* $P<0.001$  versus el grupo alimentado con dieta Chow inyectado con vectores nulo. # $P<0.05$ , ## $P<0.01$  y #### $P<0.001$  versus el grupo alimentado con dieta HFD inyectado con vectores nulo.

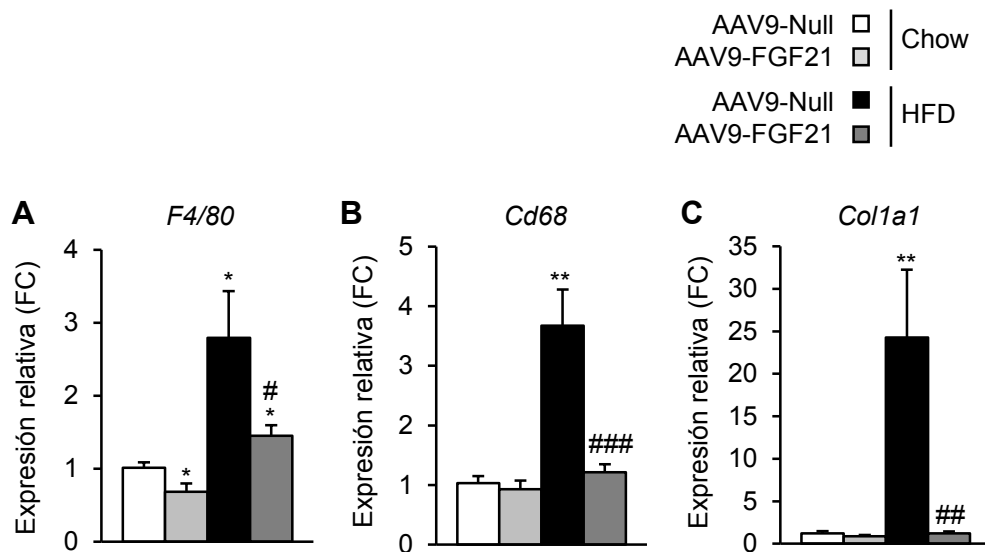
Posteriormente, se determinaron los niveles circulantes de triglicéridos y de colesterol. Como cabría esperar, los animales alimentados con HFD y tratados con vectores AAV9-Null presentaron niveles circulantes elevados de triglicéridos y colesterol respecto a los ratones control en dieta Chow (Figura 24). A pesar de que los animales tratados con AAV9-FGF21 y alimentados con dieta Chow no mostraron diferencias en estos parámetros a nivel hepático (Figura 23), sí que presentaron una disminución en los niveles circulantes tanto de triglicéridos como de colesterol, respecto a su grupo control (Figura 24). Además, los ratones administrados con los vectores AAV9-FGF21 y alimentados con dieta HFD mejoraron considerablemente sus niveles circulantes de triglicéridos y de colesterol, alcanzando niveles similares al de los animales control en dieta Chow (Figura 24).



**Figura 24. Niveles séricos de triglicéridos y colesterol.** Niveles séricos de triglicéridos (A) y colesterol (B) en los ratones machos C57BL/6 alimentado con dieta Chow o HFD y tratados con AAV9-FGF21 o AAV9-Null 14 semanas post-AAV. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  EEM.  $n=8-11$  por grupo experimental. \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$  y \*\*\* $P<0.001$  versus el grupo alimentado con dieta Chow inyectado con vectores nulo. # $P<0.05$ , ## $P<0.01$  y ### $P<0.001$  versus el grupo alimentado con dieta HFD inyectado con vectores nulo.

Dado que la esteatosis hepática puede llevar asociada un proceso inflamatorio del tejido, y éste a la fibrosis hepática, también se evaluó la inflamación y la fibrosis en el hígado de los animales tratados. Así, se analizaron en el hígado los niveles de expresión de marcadores de inflamación como son *F4/80* y *Cd68*, y de las fibras de colágeno de tipo 1 (*Col1a1*) (Figura 24A-C). En los animales control, la dieta HFD aumentó la expresión de *F4/80* y *Cd68* respecto a los animales tratados con los vectores nulo en dieta Chow (Figura 24A y B). Contrariamente, el tratamiento con AAV9-FGF21 en ratones en dieta HFD fue capaz de prevenir el desarrollo de inflamación asociada a la ingesta de una dieta rica en grasa (Figura 25A-B). En cuanto al estudio de la fibrosis en el hígado, la dieta HFD aumentó claramente los niveles de fibras de colágeno 1 en los animales control respecto a los ratones control en dieta Chow (Figura 25C). Sin embargo, los vectores AAV9-FGF21 fueron capaces de reducir claramente los niveles de expresión de las fibras de colágeno 1 en los animales alimentados con dieta HFD respecto a los animales control en HFD. Estos resultados confirmaron que el tratamiento con los vectores AAV9-FGF21 consiguió prevenir el desarrollo de inflamación y fibrosis en el hígado (Figura 25C).



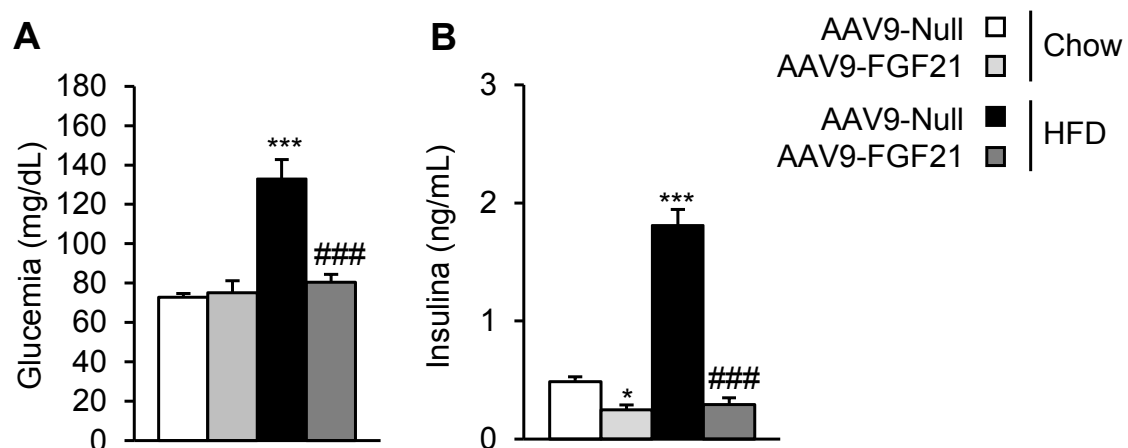


**Figura 25. Análisis de la inflamación y la fibrosis en el hígado.** (A-C) Niveles de expresión de genes marcadores de inflamación y fibrosis de los ratones machos C57BL/6 alimentado con dieta Chow o HFD y tratados con AAV9-FGF21 o AAV9-Null a las 8 semanas de edad. Niveles de expresión de *F4/80* (A), *Cd68* (B) y Colágeno 1 (*Col1a1*) (C) 14 semanas post-AAV. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  EEM. n=8-11 por grupo experimental. \*P<0.05, \*\*P<0.01 y \*\*\*P<0.001 versus el grupo alimentado con dieta Chow inyectado con vectores nulo. #P<0.05, ##P<0.01 y ###P<0.001 versus el grupo alimentado con dieta HFD inyectado con vectores nulo. FC, Fold change.

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

La inflamación del tejido adiposo, junto con la de otros tejidos, como el hígado, debida al excesivo acúmulo de grasa favorece la aparición del desarrollo de la intolerancia a la glucosa y de la resistencia a la insulina (Strissel et al., 2014). Por ello, se evaluó si el tratamiento con AAV9-FGF21 era también capaz de prevenir la resistencia a la insulina asociada a la dieta HFD. En primer lugar se determinaron los niveles circulantes de glucosa en ayunas 14 semanas tras el tratamiento con los vectores AAV. Se observó que los animales control en dieta HFD presentaban una ligera hiperglucemia respecto a sus controles en dieta Chow, aunque ninguno presentó niveles de hiperglucemia  $\geq 200$ mg/dL (Figura 26A). Mientras que la glucemia de los animales tratados con FGF21 en dieta Chow era similar a la de los ratones control, los animales administrados con el vector terapéutico en dieta HFD mostraron una clara disminución respecto a sus controles (Figura 26A). Esta disminución llevaba a una completa normalización de los niveles circulantes de glucosa respecto a los ratones control en dieta Chow (Figura 26A).

Además de la glucemia, también se determinó la insulinemia en ayunas de todos los animales del estudio. La dieta HFD en los animales control aumentaba los niveles circulantes de insulina respecto a sus controles en dieta Chow (Figura 26B). De nuevo, el tratamiento con AAV9-FGF21, tanto en animales en dieta Chow como en dieta HFD, fue capaz de reducir la insulinemia respecto a sus respectivos controles (Figura 26B). De hecho, el tratamiento con AAV9-FGF21 reducía los niveles circulantes de insulina a valores similares a los de los animales en dieta Chow (Figura 26B), indicando que estos animales eran sensibles a la insulina.

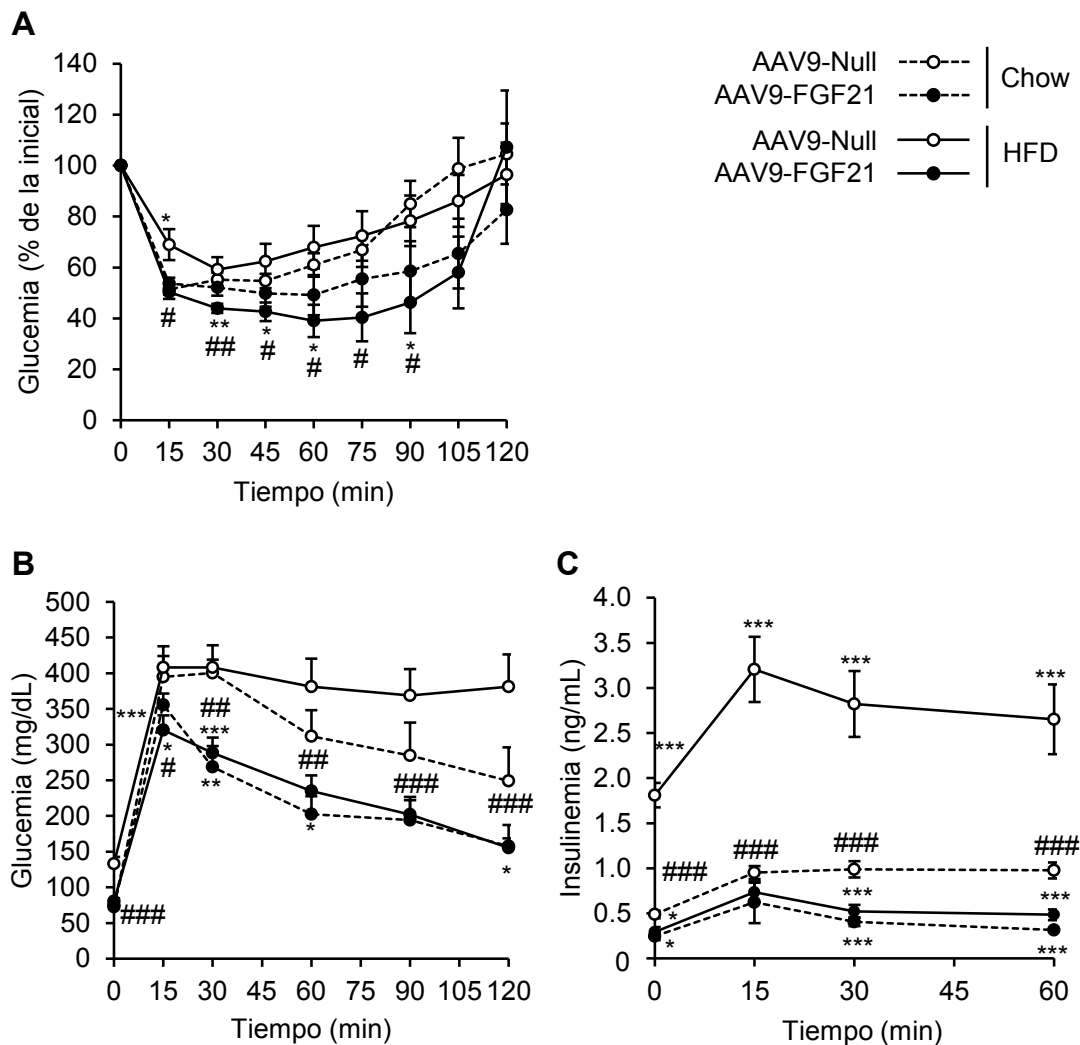


**Figura 26. Determinación de la glucemia y la insulinemia.** Glucemia (A) e insulinemia (B) en ayunas a las 14 y 11 semanas, respectivamente, en ratones machos C57BL/6 alimentado con dieta Chow o HFD y tratados con AAV9-FGF21 o AAV9-Null. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  EEM.  $n=8-11$  por grupo experimental. \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$  y \*\*\* $P<0.001$  versus el grupo alimentado con dieta Chow inyectado con vectores nulo. # $P<0.05$ , ## $P<0.01$  y ### $P<0.001$  versus el grupo alimentado con dieta HFD inyectado con vectores nulo.

Para confirmar si el tratamiento con los vectores AAV9-FGF21 era capaz de mejorar la sensibilidad a la insulina y la tolerancia a la glucosa, se realizó un test de tolerancia a la insulina (ITT) y un test de tolerancia a la glucosa (GTT) en los animales tratados. En el ITT, tras 11 semanas de dieta HFD, los ratones control ya presentaban una ligera resistencia a la insulina respecto a los controles en dieta Chow, mostrando una menor respuesta hipoglucemiante a la insulina exógena administrada transcurridos 15 minutos (Figura 27A). Por el contrario, la administración de insulina en los animales tratados con AAV9-FGF21 en dieta Chow provocaba una mayor reducción de la glucemia respecto a sus controles, indicando una mayor sensibilidad a la hormona (Figura 27A). Además, los animales tratados con AAV9-FGF21 en dieta HFD mostraban una respuesta a la insulina superior a todos los grupos experimentales (Figura 27A).

A las 14 semanas del inicio de la dieta HFD, los ratones tratados con los vectores nulo ya mostraban una clara intolerancia a la glucosa tras la administración de una dosis de 2 g glucosa/kg de peso, siendo prácticamente incapaces de reducir la glucemia (Figura 27B). Sin embargo, los animales tratados con AAV9-FGF21, tanto en dieta Chow como en dieta HFD, presentaron una mayor tolerancia a la glucosa respecto sus controles, incluso superior al de los controles en dieta Chow (Figura 27B).

Por último, también se determinó la insulinemia que presentaban los animales durante la primera hora del test de tolerancia a la glucosa. Los animales alimentados con dieta HFD y tratados con los vectores nulo presentaban unos altos niveles de insulina circulante respecto a sus controles en dieta Chow (Figura 27C). Este resultado sugerían que estos animales presentaban una mayor secreción de insulina para compensar la resistencia a la hormona que comienza a instaurarse (Figura 26C). Ambos grupos de animales tratados con AAV9-FGF21, tanto en dieta Chow como en HFD, mostraron menores niveles circulantes de insulina en respuesta a la administración de glucosa, siendo incluso inferiores a los de los controles en dieta Chow (Figura 27C). Estos resultados confirmaron que los animales tratados con AAV9-FGF21 eran más sensibles a la insulina y más tolerantes a la glucosa respecto a sus grupos control (Figura 27C).



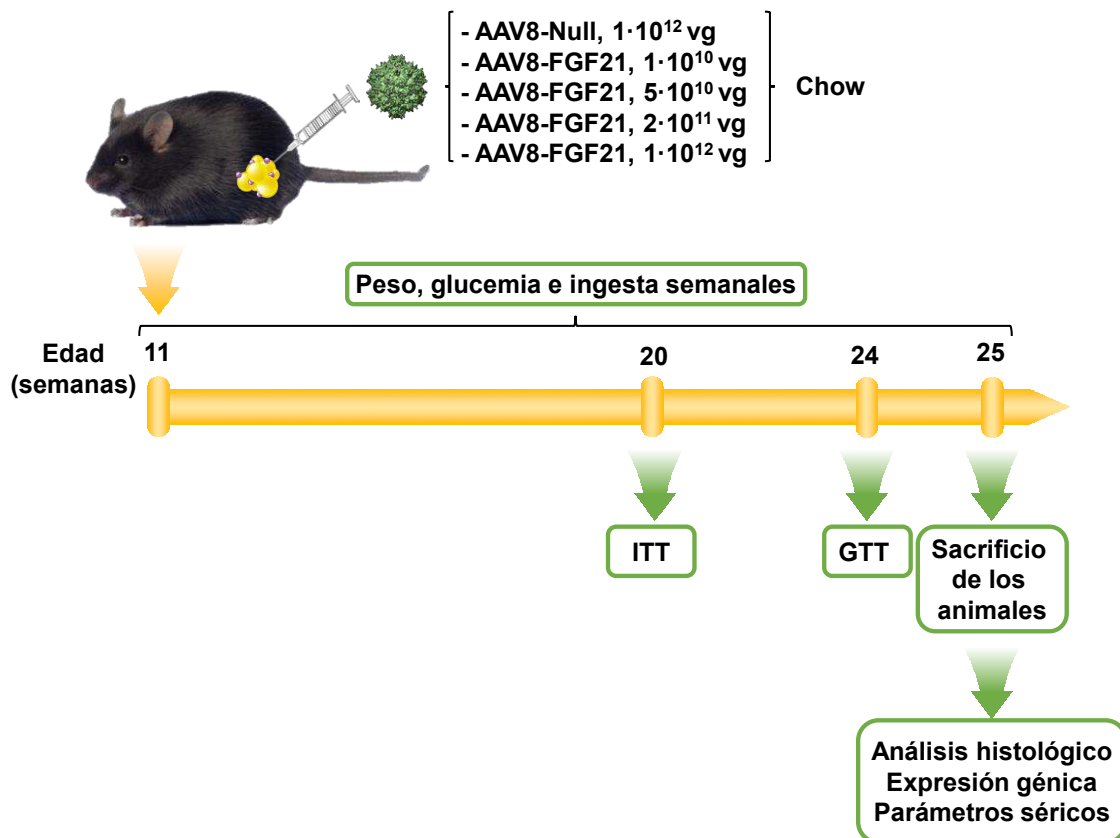
**Figura 27. Evaluación de la sensibilidad a la insulina y la tolerancia a la glucosa. (A)** Test de tolerancia a la insulina intraperitoneal (ITT) en ratones machos C57BL/6 alimentados con dieta Chow o HFD y tratados con AAV9-FGF21 o AAV9-Null 11 semanas post-AAV. **(B)** Test de tolerancia a la glucosa (GTT) 2 g/Kg intraperitoneal en ayuno de los mismos animales 14 semanas post-AAV. **(C)** Niveles de insulinemia durante el GTT 2g/kg. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  EEM.  $n=8-11$  por grupo experimental. \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$  y \*\*\* $P<0.001$  versus el grupo alimentado con dieta Chow inyectado con vectores nulo. # $P<0.05$ , ## $P<0.01$  y ### $P<0.001$  versus el grupo alimentado con dieta HFD inyectado con vectores nulo.

En resumen, los resultados obtenidos en esta parte del estudio demostraron que la administración local del vector AAV9-FGF21 en el tejido adiposo blanco epididimal medió una sobreexpresión de FGF21 en los tejidos adiposos y un aumento de este factor en circulación. Esto permitió prevenir el desarrollo de la obesidad inducida por la dieta en ratones. La disminución del peso y del contenido de grasa que presentaban estos animales, a pesar de seguir ingiriendo dieta rica en grasas, permitió prevenir la hipertrofia en el tejido adiposo y la esteatosis en el hígado, bloqueando la inflamación en estos tejidos y la fibrosis hepática. La disminución del peso corporal y la grasa muy probablemente fue debida a la inducción del *browning* del tejido adiposo blanco inguinal, la cual aumentaría la termogénesis no asociada al temblor mediante la sobreexpresión de UCP1 en este tejido, aumentando el gasto energético de los animales tratados con FGF21. Además, la administración del vector terapéutico mejoró la sensibilidad a la insulina y la tolerancia a la glucosa, contrarrestando el efecto diabetogénico de la dieta alta en lípidos. Por lo tanto, la aproximación de terapia génica en el tejido adiposo mediante una única administración del vector AAV9-FGF21 representa un novedoso y eficaz tratamiento para el tratamiento de la obesidad y la DT2.

### 3. ESTUDIO DE LOS EFECTOS DE LA SOBREEXPRESIÓN LOCAL DE FGF21 EN EL TEJIDO ADIPOSO DE RATONES *ob/ob*

Una vez observada la eficacia de la sobreexpresión de FGF21 en el eWAT en la prevención de la obesidad y la resistencia a la insulina en un modelo murino inducido por la dieta alta en lípidos, se analizó si el tratamiento también era capaz de revertir ambas patologías en un modelo murino de obesidad genética como los ratones *ob/ob*. Los ratones *ob/ob* son un modelo de obesidad severa y de resistencia a la insulina ampliamente utilizado para evaluar potenciales factores terapéuticos para la DT2 y la obesidad. Este modelo espontáneo presenta un déficit del gen de la leptina (*Lep*), una hormona con efecto saciante, por lo que estos animales muestran hiperfagia. Así, a pesar de alimentarse con una dieta Chow, los ratones *ob/ob* aumentan su peso corporal de forma muy marcada en muy poco tiempo. Además de obesidad severa, estos ratones también desarrollan hiperinsulinemia y muestran un reducido gasto energético (Friedman and Halaas, 1998).

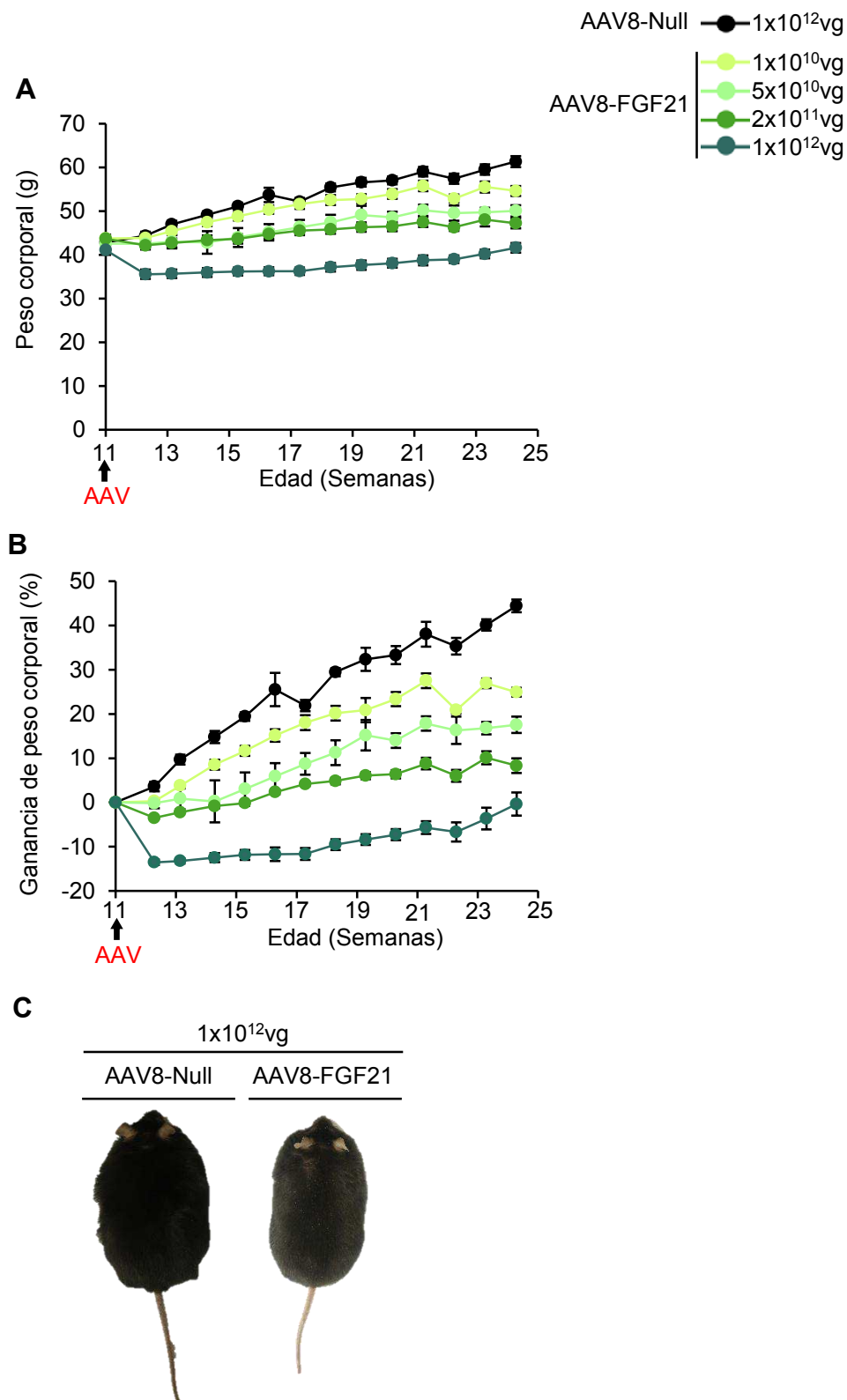
Con la finalidad de estudiar si la sobreexpresión de FGF21 a largo plazo era capaz de reducir la ganancia de peso y mejorar la sensibilidad a la insulina de los ratones *ob/ob*, se administró intra-eWAT diferentes dosis del vector AAV8-FGF21 ( $1 \times 10^{10}$ ,  $5 \times 10^{10}$ ,  $2 \times 10^{11}$  y  $1 \times 10^{12}$  vg/animal) en machos de 11 semanas de edad (Figura 28). Como control se utilizó un grupo de ratones machos *ob/ob* administrados con vectores AAV8-Null en el eWAT, utilizando la dosis más elevada de  $1 \times 10^{12}$  vg/animal (Figura 28). Tras administrar ambos vectores virales se realizó un seguimiento semanal del peso, glucemia e ingesta de los animales durante 14 semanas más, alcanzando los animales la edad de 25 semanas al final del estudio. Durante el seguimiento se realizaron una serie de pruebas metabólicas, como test de tolerancia a la insulina (ITT) y test de tolerancia a la glucosa (GTT). Los animales se sacrificaron y se analizaron los tejidos tanto a nivel histológico como a nivel de expresión de genes claves, y se evaluaron diferentes parámetros séricos (Figura 28).



**Figura 28. Diseño experimental de la administración intra-eWAT de vectores AAV8-FGF21 en ratones *ob/ob*.** Administración local en el eWAT de  $1 \cdot 10^{10}$ ,  $5 \cdot 10^{10}$ ,  $2 \cdot 10^{11}$  y  $10^{12}$  vg/animal de los vectores AAV8-FGF21 y AAV8-Null en ratones *ob/ob* de 11 semanas de edad. Los animales se alimentaron con dieta Chow. Se realizó un seguimiento semanal de los animales y pruebas metabólicas hasta el sacrificio a las 25 semanas de edad. ITT, test de tolerancia a la insulina; GTT, test de tolerancia a la glucosa; Chow, dieta estándar.  $n=6-9$  por grupo experimental.

### 3.1. Estudio de la disminución del peso corporal en ratones *ob/ob* mediante la administración de AAV8-FGF21 en el tejido adiposo

Se estudió la evolución del peso de los animales *ob/ob* tratados con las diferentes dosis crecientes de AAV8-FGF21. En primer lugar, se observó que los animales tratados con los vectores nulo continuaron aumentando de peso corporal de manera drástica, llegando a un incremento de la ganancia del peso corporal del 45% al final del experimento. Sin embargo, se observó un claro efecto dosis-dependiente en los animales tratados con los vector AAV8-FGF21 aumentando un 25%, 18%, 8% de peso corporal para las dosis  $1 \cdot 10^{10}$ ,  $5 \cdot 10^{10}$  y  $2 \cdot 10^{11}$  vg/animal, respectivamente. Cabe destacar que a la dosis más elevada de  $1 \cdot 10^{12}$  de AAV8-FGF21, se observó una reducción de un 10% del peso corporal de los animales al principio del tratamiento para aumentar ligeramente, finalizando el estudio con una disminución del 5% respecto a su peso inicial previo al tratamiento con AAV8-FGF21 (Figura 29A-C).



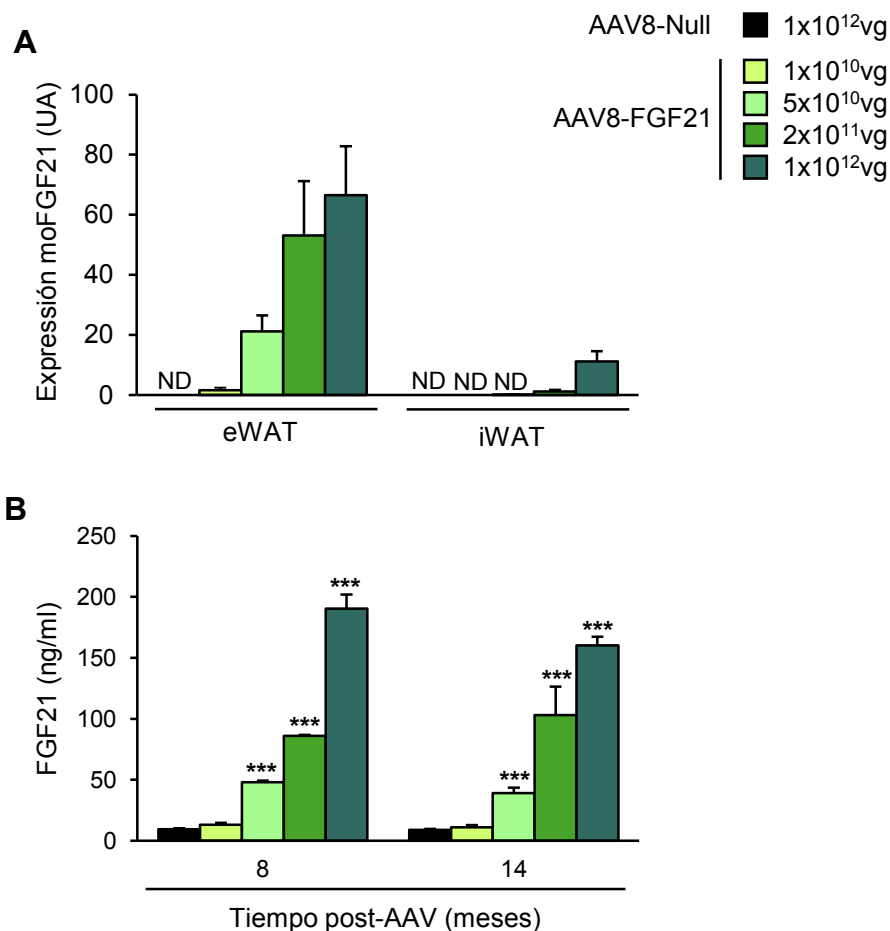
**Figura 29. Evaluación del peso y la ganancia del peso corporal de los animales tratados con AAV8-FGF21.** Ratones machos *ob/ob* se trataron con AAV8-FGF21 o AAV8-Null a las 11 semanas de edad. **(A)** Evolución del peso corporal absoluto en gramos (g). **(B)** Evolución de la ganancia del peso corporal en % respecto al peso corporal inicial. **(C)** Imágenes representativas de los animales pertenecientes a la dosis máxima de AAV8-FGF21 ( $1 \times 10^{12}$ vg/animal) y los ratones tratados con el vector nulo al final del estudio. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  EEM.  $n=6-8$



### 3.2. Expresión y secreción de FGF21 en los animales tratados con AAV8-FGF21

Tras el sacrificio de los animales se determinaron los niveles de expresión de moFGF21 en los depósitos adiposos blancos epididimal (eWAT) e inguinal (iWAT), ya que fueron los tejidos mayormente transducidos en el experimento previo (Figura 15A). El tejido donde se realizó la administración de los vectores, el eWAT, mostró un claro efecto dosis-dependiente en los niveles de expresión de moFGF21, detectándose niveles residuales de expresión en los animales tratados con la dosis  $1 \times 10^{10}$  vg/animal, mientras que los niveles incrementaron paulatinamente en función de la dosis (Figura 30A). En cuanto a la expresión del transgén en el iWAT, únicamente las dosis más elevadas de  $2 \times 10^{11}$  y  $1 \times 10^{12}$  vg/animal fueron capaces de transducir este tejido en los ratones *ob/ob* tratados con AAV8-FGF21 (Figura 30A).

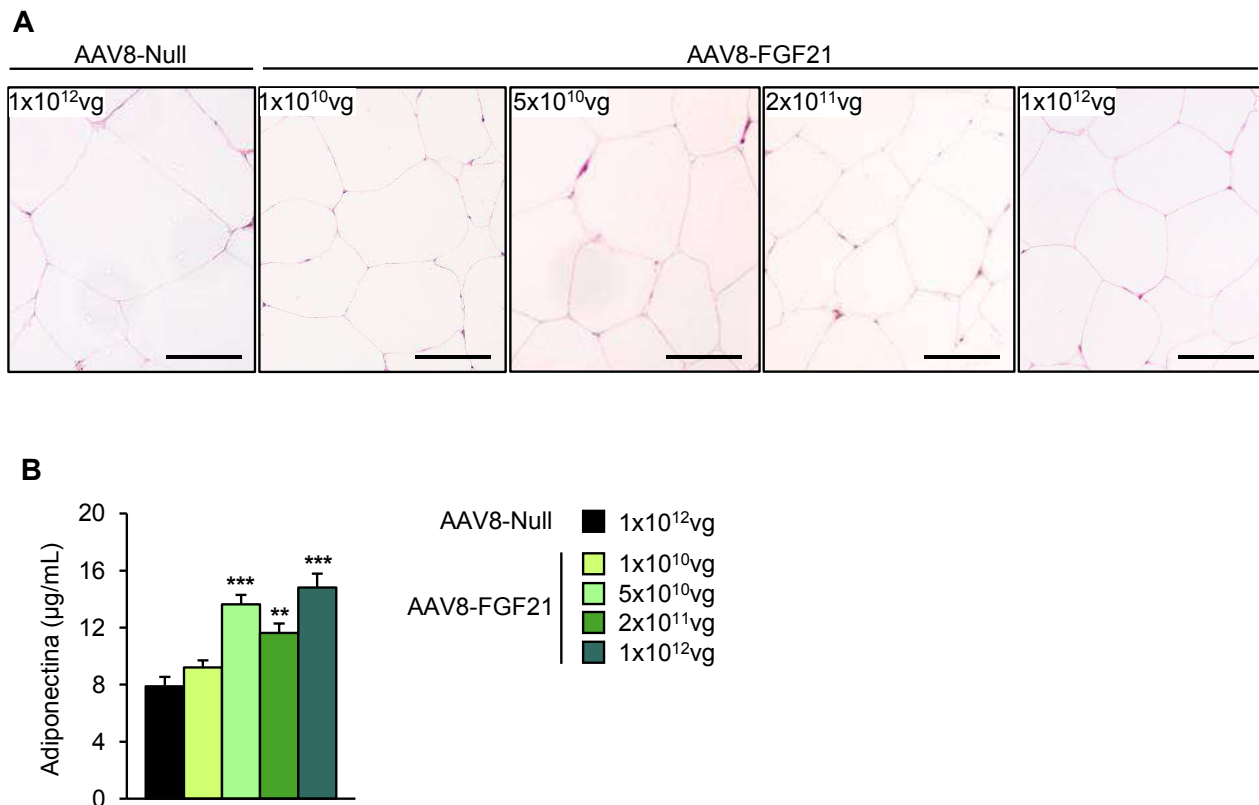
Tras comprobar la expresión del transgén, se determinaron los niveles circulantes de FGF21 tanto a las 8 semanas tras la administración de los vectores, como al final del estudio, a las 14 semanas después del tratamiento con AAV. Los resultados confirmaron que el incremento en los niveles circulantes de FGF21 inducido por la sobreexpresión del transgén no se vio afectado por el paso del tiempo ni por la pérdida de peso y grasa, manteniéndose estables a lo largo del estudio (Figura 30B). Dado que la dosis más baja de  $1 \times 10^{10}$  vg/animal no modificaba los niveles circulantes de FGF21 frente al grupo control tratado con AAV8-Null (figura 30B), ello confirmó la ausencia de efecto terapéutico a nivel de contrarrestar el aumento de peso a esa dosis (Figura 29A y B). El resto de dosis administradas inducían un claro aumento en los niveles circulantes de FGF21 respecto a los animales control, siguiendo un perfil dosis-dependiente que se correlacionaba con el menor incremento del peso corporal (Figura 30B).



**Figura 30. Niveles de expresión de moFGF21 en los tejidos adiposos blancos epididimal e inguinal y niveles circulantes de FGF21.** Ratones machos *ob/ob* se trataron con AAV8-FGF21 o AAV8-Null a las 11 semanas de edad. **(A)** Niveles de expresión de FGF21 murino optimizado (moFGF21) en eWAT y iWAT 14 semanas post-AAV. **(B)** Niveles séricos de FGF21 8 y 14 semanas post-AAV. ND, no detectado; UA, unidades arbitrarias; moFGF21; secuencia optimizada del CDS murino de Fgf21. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  EEM.  $n=6-8$  por grupo experimental. \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$  y \*\*\* $P<0.001$  versus el grupo inyectado con vectores nulo.

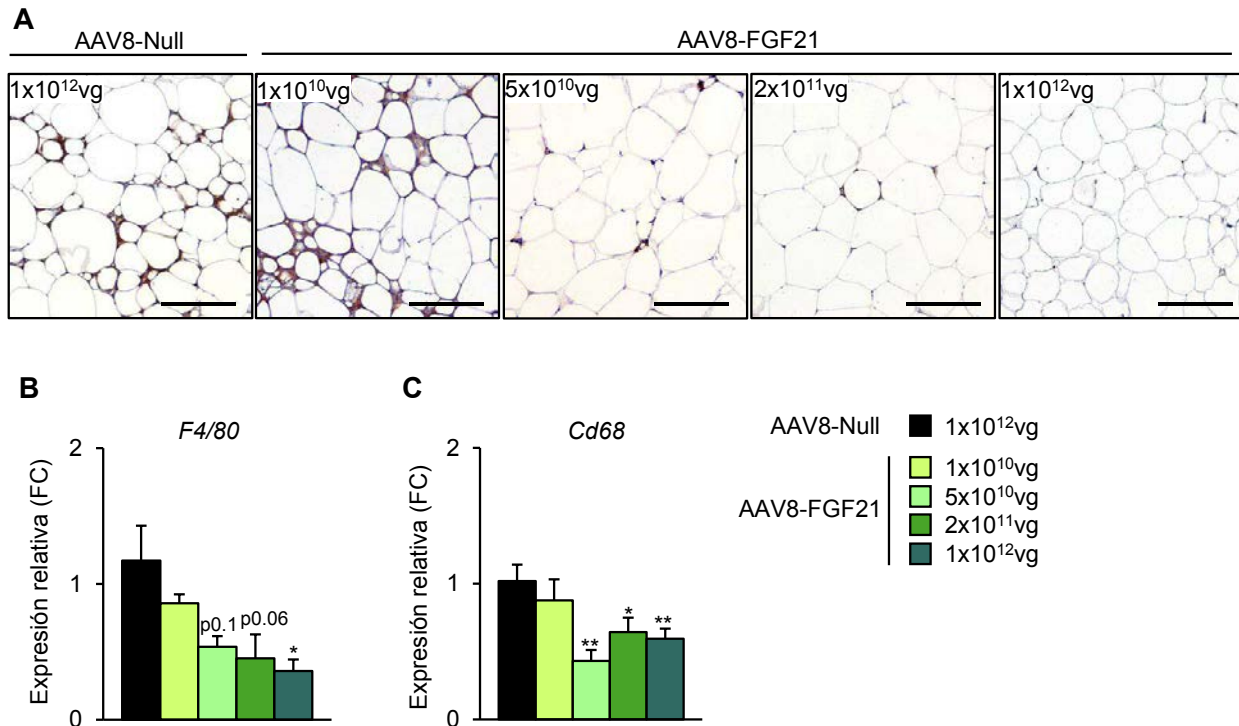
### 3.3. Disminución de la hipertrofia y la inflamación del eWAT en ratones *ob/ob* tratados con AAV8-FGF21

De manera similar al modelo murino de obesidad inducida por una dieta alta en grasa, los ratones *ob/ob* presentan una gran hipertrofia del eWAT y consecuentemente una marcada inflamación de este tejido a pesar de ser alimentados con dieta Chow. El análisis histológico de los eWATs reveló que solo las dosis más elevadas disminuyeron ligeramente el tamaño de los adipocitos, mientras que la dosis más baja no tuvo ningún efecto (Figura 31A). De manera similar, se observó que mientras que no hubo diferencia en los niveles de adiponectina entre la dosis baja de AAV8-FGF21 y AAV8-Null, con las subsiguientes dosis de AAV8-FGF21 sí que se observó un incremento progresivo de esta adipopina (Figura 31B).



**Figura 31. Análisis histológico del tejido adiposo blanco epididimal y niveles de adiponectina. (A)** Imágenes representativas de cortes histológicos con tinción de hematoxilina/eosina del eWAT en los ratones machos *ob/ob* tratados con AAV8-FGF21 o AAV8-Null a las 11 semanas de edad. Escala: 100µm. **(B)** Niveles séricos de adiponectina de los mismos ratones. Los resultados se expresan como la media ± EEM. n=6-8 por grupo experimental. \*P<0.05, \*\*P<0.01 y \*\*\*P<0.001 versus el grupo inyectado con vectores nulo.

Con la finalidad de evaluar la inflamación en el eWAT se realizó un análisis inmunohistoquímico contra MAC2 en cortes de este tejido. Los resultados confirmaron que los ratones *ob/ob* tratados con vectores nulo mostraron una clara inflamación del eWAT, reflejada en la aparición de las *Crown-like structures* (Figura 32A). Los ratones *ob/ob* tratados con la dosis menor del vector AAV8-FGF21 (1x10<sup>10</sup> vg/animal) no presentó ninguna mejoría en la inflamación respecto al grupo tratado con vectores nulo (Figura 32A). Sin embargo, el tratamiento con el resto de las dosis de AAV8-FGF21 utilizadas se consiguió reducir la inflamación, hasta revertirla por completo con la dosis mayor de 1x10<sup>12</sup> vg/animal (Figura 32A). Estos resultados se confirmaron mediante el análisis de la expresión de los marcadores *F4/80* y *Cd68* (Figura 32B y C). Así, estos resultados sugerían que el efecto de reversión de la inflamación en el eWAT inducida por el tratamiento con AAV8-FGF21 era dosis-dependiente.

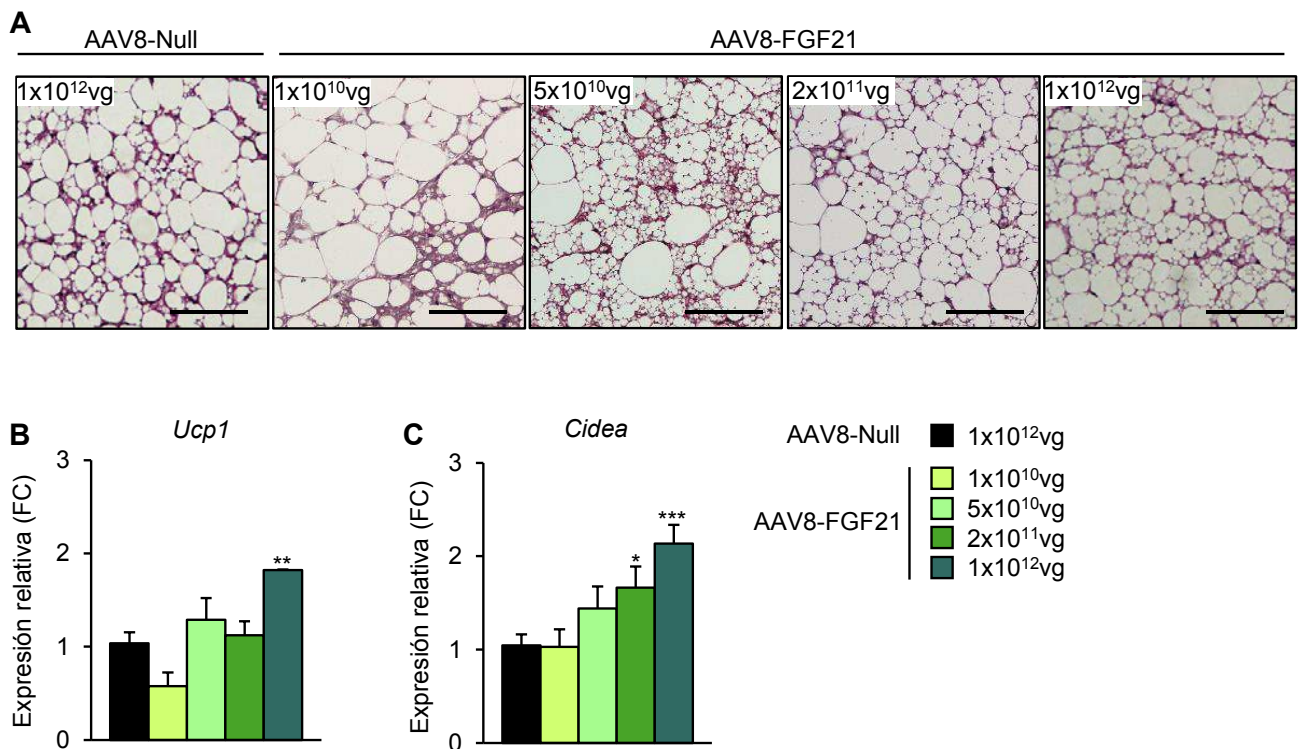


**Figura 32. Evaluación de la inflamación del tejido adiposo blanco epididimal.** Ratones machos *ob/ob* se trataron con AAV8-FGF21 o AAV8-Null a las 11 semanas de edad y se sacrificaron 14 semanas después. **(A)** Imágenes representativas de la tinción inmunohistoquímica contra MAC2 (marrón) en secciones del eWAT en ratones machos *ob/ob* 14 semanas post-AAV. Escala: 40µm. **(B-C)** Niveles de expresión de *F4/80* y *CD68* 14 semanas post-AAV. FC, *fold change*. Los resultados se expresan como la media ± EEM. n=6-8 por grupo experimental. \*P<0.05, \*\*P<0.01 y \*\*\*P<0.001 versus el grupo inyectado con vectores nulo.

### 3.4. Análisis del gasto energético y el *browning* en el tejido adiposo inducido por el tratamiento de AAV8-FGF21

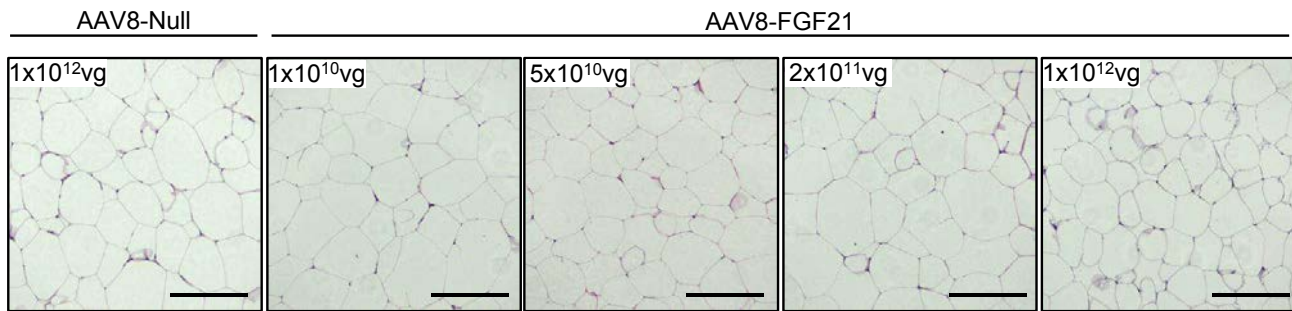
Una disminución en el peso de los animales sugiere un aumento del gasto energético, ya fuese a través de la inducción de la termogénesis no asociada al temblor en el iBAT o a través del *browning* del iWAT (Cypess et al., 2009; Kajimura et al., 2015; Wu et al., 2012). En primer lugar se evaluaron los efectos de la administración intra-eWAT de AAV8-FGF21 en cortes histológicos de tejido adiposo marrón, ya que es el tejido más activo termogénicamente (Cypess et al., 2009). Los animales *ob/ob* tratados con vectores nulo mostraron un incremento de la adiposidad en el iBAT, asemejándose más a un depósito adiposo blanco, como ya se había descrito previamente (Castracane and Henson, 2007; Himms-hagen and Desautels, 1978) (Figura 33A). El tratamiento con AAV8-FGF21 disminuyó la cantidad de grasa acumulada en este tejido de manera dosis-dependiente, siendo la dosis más alta la que mostró una mayor reducción (Figura 33A). También se determinaron los niveles de expresión de genes marcadores de termogénesis no asociada al temblor como *Ucp1* y *Cidea*. Mientras que la expresión de estos genes en los animales tratados con

la dosis más baja de AAV8-FGF21 no estaba alterada, el resto de dosis incrementaron de manera dosis-dependiente la expresión de Ucp1 y Cidea en el iBAT (Figura 33B y C). Estos resultados sugerían que los animales *ob/ob* tratados con AAV8-FGF21 presentaban un incremento del gasto energético.



**Figura 33. Análisis histológico y expresión de genes implicados en el gasto energético en el iBAT.** Ratones macho *ob/ob* se trataron con AAV8-FGF21 o AAV8-Null a las 11 semanas de edad. **(A)** Imágenes representativas de cortes histológicos con tinción de hematoxilina/eosina del iBAT 14 semanas post-AAV. Escala: 200µm. **(B y C)** Niveles de expresión de UCP1 y Cidea en iBAT 14 semanas post-AAV. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  EEM. FC, *fold change*. n=6-8 por grupo experimental. \*P<0.05, \*\*P<0.01 y \*\*\*P<0.001 versus el grupo inyectado con vectores nulo.

Posteriormente, se estudió la posible implicación del iWAT en la reducción del peso de los ratones *ob/ob* tratados con AAV8-FGF21. El análisis histológico del iWAT reveló una disminución del tamaño de los adipocitos de manera dosis-dependiente respecto a los ratones *ob/ob* tratados con los vectores nulo (Figura 34). Sin embargo, no se detectó la presencia de adipocitos multiloculares en el iWAT de los animales tratados con AAV8-FGF21 ni tan siquiera a la dosis máxima de AAV8-FGF21. Este resultado sugiere que en el caso de los ratones *ob/ob*, el tratamiento con los vectores codificantes para FGF21 no fue capaz de inducir el *browning* en iWAT (Figura 34).



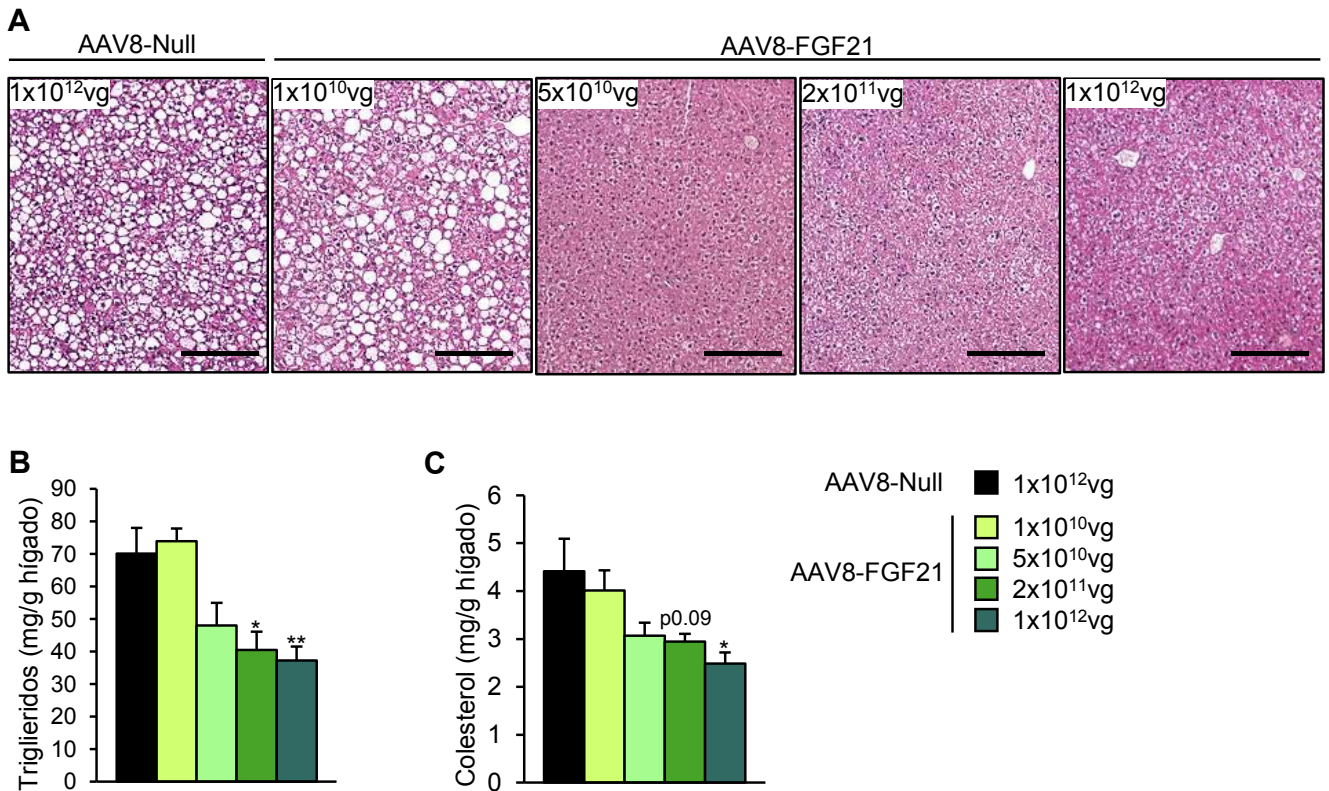
**Figura 34. Análisis histológico del tejido adiposo blanco inguinal subcutáneo.** Imágenes representativas de cortes histológico con tinción de hematoxilina/eosina del iWAT en los ratones machos *ob/ob* 14 semanas tras el tratamiento con AAV8-FGF21 o AAV8-Null. Escala: 100 $\mu$ m.

### 3.5. Disminución de la esteatosis, la inflamación y la fibrosis hepática en ratones *ob/ob*

Dado que los ratones *ob/ob* desarrollan una obesidad extrema, acumulan parte del exceso de grasa en el hígado. Esto lleva al desarrollo de hepatoesteatosis, inflamación, fibrosis y en último término puede llevar al desarrollo de tumores en el hígado (Bertot and Adams, 2016).

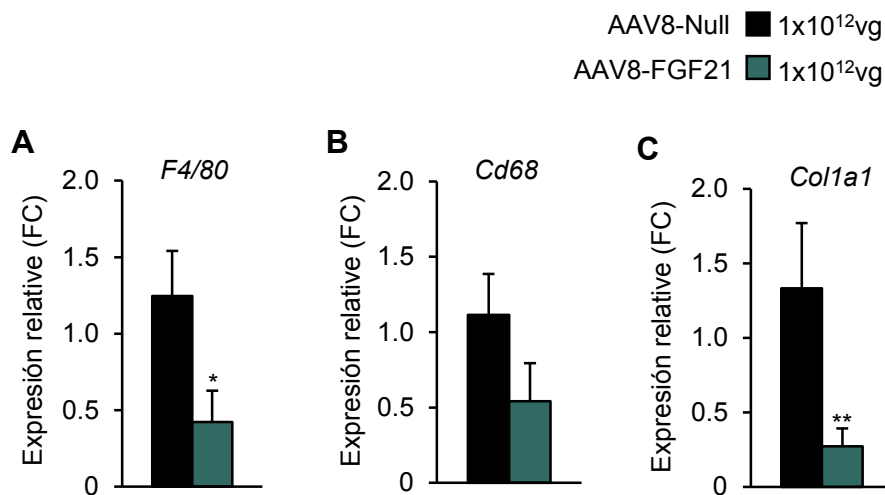
Cuando se analizaron los cortes histológicos del hígado de los ratones *ob/ob*, se observó que, mientras que no se detectaron diferencias entre el grupo control inyectado con AAV8-Null y la dosis  $1 \times 10^{10}$  vg/animal de AAV8-FGF21, el resto de dosis sí que fueron capaces de revertir la esteatosis en el hígado (Figura 35A). Posteriormente, se cuantificó el grado de esteatosis hepática en todos los grupos de animales tratados, determinando tanto los niveles hepáticos de triglicéridos como de colesterol. De acorde al alto grado de esteatosis observada en los animales *ob/ob* tratados con vectores nulo, estos ratones presentaron niveles hepáticos muy elevados tanto de triglicéridos como colesterol total (Figura 35B y C). Aunque la dosis más baja de AAV8-FGF21 no modificó la cantidad de triglicéridos y colesterol en el hígado, las subsiguientes dosis sí fueron capaces de reducir los niveles de ambos parámetros (Figura 35B y C).





**Figura 35. Análisis histológico y contenido de triglicéridos y colesterol en hígado.** (A) Imágenes representativas de cortes histológico con tinción de hematoxilina/eosina de hígado en los ratones machos *ob/ob* tratados con AAV8-FGF21 o AAV8-Null a las 8 semanas de edad. Escala: 100µm. (B) Contenido hepático de triglicéridos y colesterol 14 semanas post-AAV. Los resultados se expresan como la media ± EEM. n=6-8 por grupo experimental. \*P<0.05, \*\*P<0.01 y \*\*\*P<0.001 versus el grupo inyectado con vectores nulo.

El gran acúmulo de grasa en el hígado de los animales *ob/ob* lleva a un estado proinflamatorio y fibrosis (Jimenez et al., 2018; Trak-Smayra et al., 2011). Para analizar si el tratamiento con AAV8-FGF21 era capaz de revertir y evitar la fibrosis en este tejido, se determinaron los niveles de expresión de los marcadores de inflamación *F4/80* y *Cd68* y del marcador de fibrosis, colágeno 1 (*Col1a1*) (Figura 36A-C). El tratamiento con AAV8-FGF21 disminuyó los niveles de expresión de *F4/80* y *Cd68* respecto a los observados en el grupo control (Figura 36B y C). Los niveles de expresión de colágeno 1 también disminuyeron significativamente por el tratamiento con AAV8-FGF21 (Figura 36A). Por tanto, dicho tratamiento consiguió disminuir la inflamación y la fibrosis en el hígado de los ratones *ob/ob*.



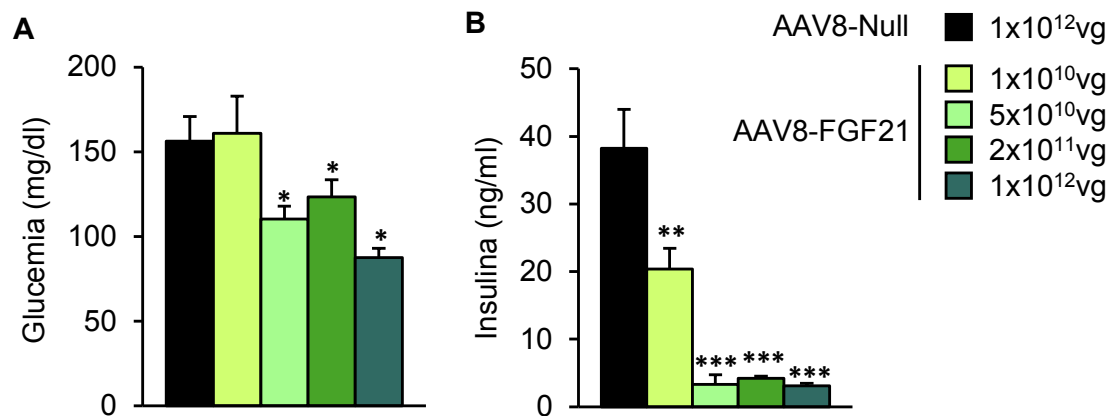
**Figura 36. Análisis de la inflamación y la fibrosis en el hígado.** (A-C) Niveles de expresión de genes marcadores de inflamación y fibrosis de los ratones *ob/ob* machos C57BL/6 tratados con AAV8-FGF21 o AAV8-Null a las 11 semanas de edad. Niveles de expresión de *F4/80* (A), *Cd68* (B) y Colágeno 1 (*Col1a1*) (C) 14 semanas post-AAV. Los resultados se expresan como a media  $\pm$  EEM.  $n=6-8$  por grupo experimental. \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$  y \*\*\* $P<0.001$  versus el grupo inyectado con vectores nulo. FC, *fold change*.

### 3.6. Reversión de la resistencia a la insulina en ratones *ob/ob*

El excesivo depósito de grasa en tejidos como el hígado de los ratones *ob/ob*, junto con la inflamación generalizada tanto en los tejidos adiposos como no adiposos, están íntimamente ligados con el desarrollo de la intolerancia a la glucosa y de la resistencia a la insulina en estos tejidos (Makki et al., 2013). Por eso, a continuación se evaluó la homeostasis de la glucosa en los ratones *ob/ob* tratados con los vectores virales.

Los animales tratados con AAV8-Null presentaron una ligera hiperglucemia, aunque ningún animal presentó una glucemia  $\geq 200$ mg/dL (Figura 37A). En cambio, el tratamiento con AAV8-FGF21 a dosis superiores a  $5 \times 10^{10}$  vg/animal fueron capaces de reducir la glucemia respecto a los animales control. Paralelamente, mientras que los ratones *ob/ob* control presentaban una marcada hiperinsulinemia, el tratamiento con AAV8-FGF21 redujo significativamente los niveles de esta hormona (Figura 37B).

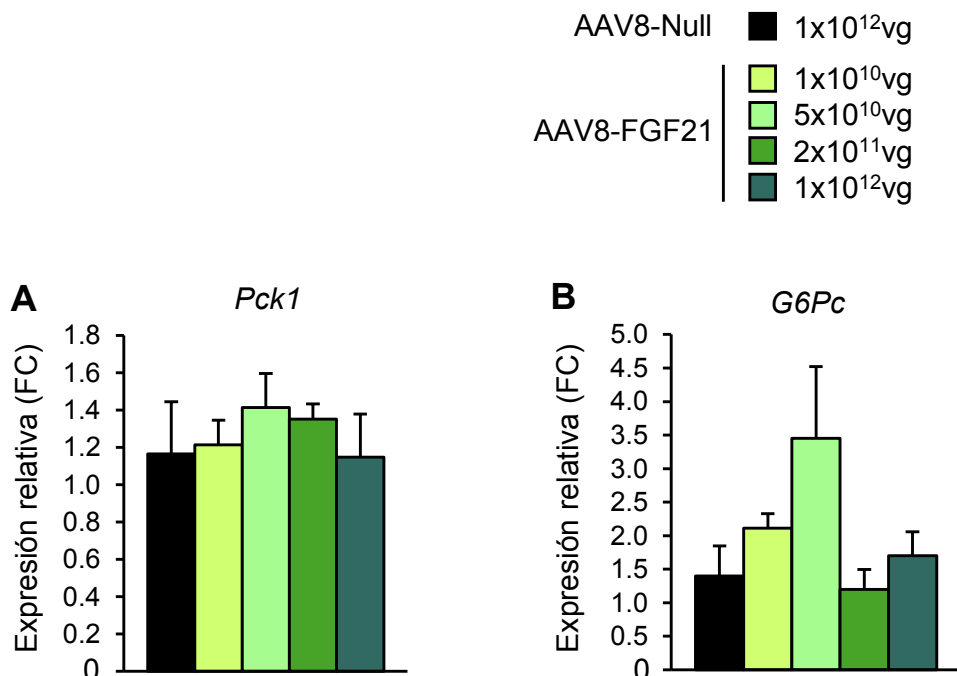
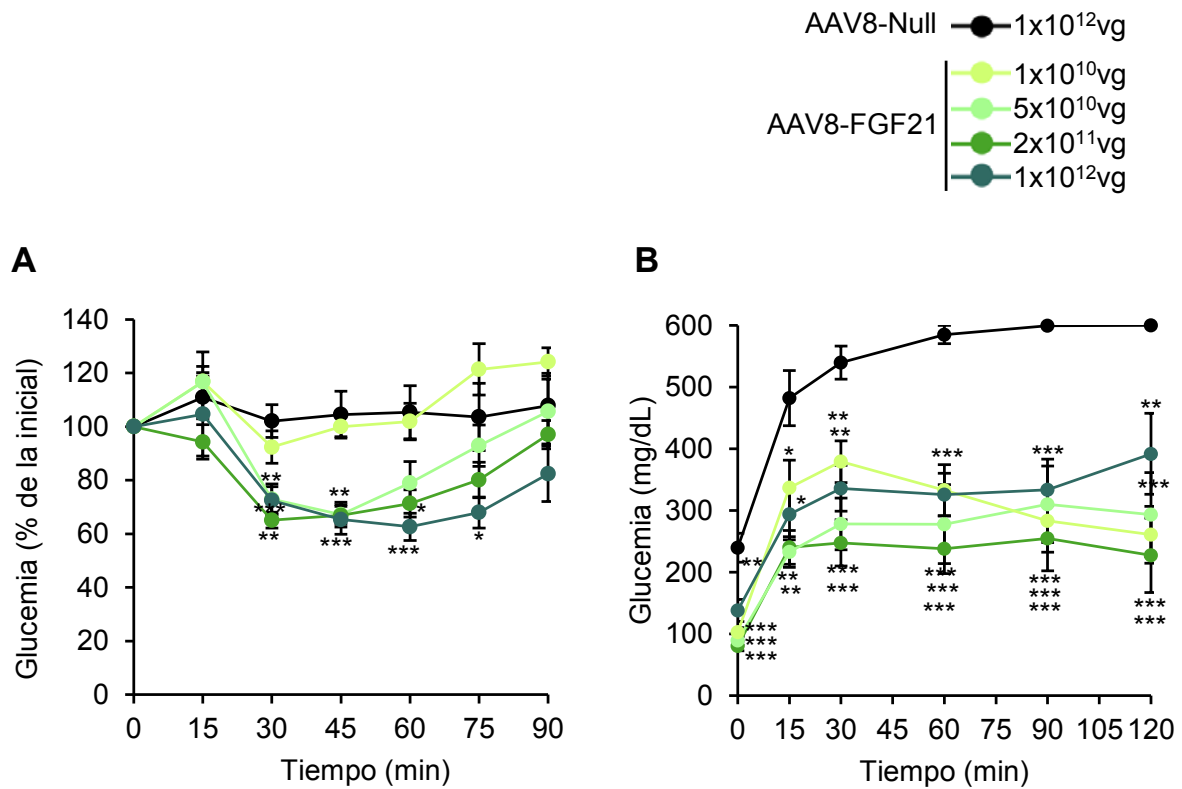




**Figura 37. Determinación de la glucemia y la insulinemia.** Glucemia (A) e insulinemia (B) en alimentación 14 y 11 semanas, respectivamente, en ratones machos *ob/ob* tratados con AAV8-FGF21 o AAV8-Null. Los resultados se expresan como la media ± EEM. n=6-8 por grupo experimental. \*P<0.05, \*\*P<0.01 y \*\*\*P<0.001 versus el grupo inyectado con vectores nulo.

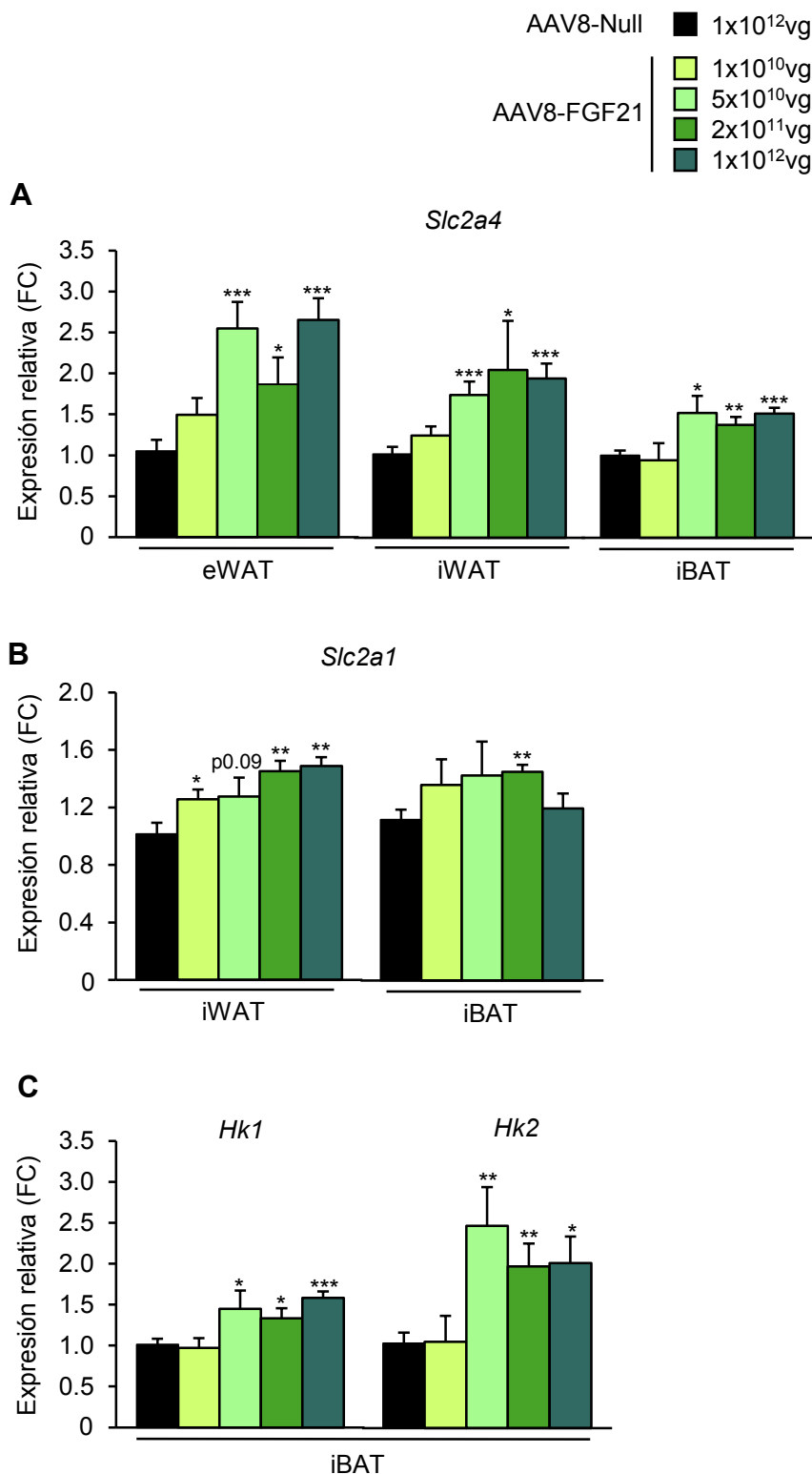
A las 20 semanas de edad, los ratones *ob/ob* control tratados con AAV8-Null mostraron una clara resistencia a la insulina, ya que fueron incapaces de reducir sus niveles circulantes de glucosa tras la administración exógena de insulina (Figura 40A). De manera similar, los animales tratados con la dosis de  $1 \times 10^{10}$  vg/animal no respondieron a la insulina exógena (Figura 38A). En cambio, las subsiguientes dosis del vector terapéutico mejoraron la sensibilidad a la insulina de los animales *ob/ob* tratados (Figura 38A). Dos semanas más tarde, se realizó un test de tolerancia a la glucosa en los mismos animales. Mientras que los ratones tratados con vectores nulo mostraban una clara intolerancia a la glucosa, todos los grupos experimentales tratados con AAV8-FGF21 mostraron una mejor tolerancia a la glucosa (Figura 38B). Estos resultados demostraron el claro efecto terapéutico del tratamiento con AAV8-FGF21 en la reversión de la resistencia a la insulina e intolerancia a la glucosa en los ratones *ob/ob*.

Dado que la reducción en la glucemia observada por tratamiento con AAV8-FGF21 podría deberse a una inhibición de la gluconeogénesis hepática, se evaluaron algunos genes claves de esta vía mediante análisis por RT-PCR. No se observaron diferencias significativas en la expresión de los genes *glucose-6-phosphatase, catalytic (G6Pc)* y *phosphoenolpyruvate carboxykinase 1, cytosolic (Pck1)*, ambas enzimas claves en la gluconeogénesis, entre los grupos tratados con los vectores terapéuticos y los ratones tratados con los vectores nulo (Figura 39).



Dado que la disminución de los niveles circulantes de glucosa observada en los ratones *ob/ob* tratados con AAV8-FGF21 no era debida a alteraciones en la gluconeogénesis hepática, se evaluó la captación de glucosa por los tejidos periféricos como el tejido adiposo y el músculo esquelético. Para ello, se determinó la expresión génica de los transportadores de glucosa tipo 1 y 4 (Slc2a1 y Slc2a4, respectivamente) y las enzimas hexoquinasas 1 y 2 (Hk1 y Hk2 respectivamente) en el eWAT, iWAT e iBAT y el cuádriceps. Aunque no se observaron diferencias en la expresión de Glut4 en el músculo en los animales tratados con AAV8-FGF21 respecto a los controles nulo (datos no mostrados), todos los depósitos adiposos analizados presentaron un aumento en la expresión de este transportador en los animales tratados con las dosis más altas (Figura 40). Resultados similares se obtuvieron al analizar la expresión de Glut1 (Slc2a1) en el iWAT e iBAT de los animales tratados con AAV8-FGF21 (Figura 40A). Además, la administración de los vectores terapéuticos incrementó los niveles de expresión de Hk1 y Hk2 en el tejido adiposo marrón (Figura 40). Estos resultados sugieren que la reducción de la glucemia en estos animales podría ser debida al incremento en la captación de glucosa en todos los depósitos adiposos, especialmente del iWAT y del iBAT, para mantener la elevada demanda energética de esos tejidos tras el tratamiento con AAV8-FGF21.

En resumen, el tratamiento local del eWAT con los vectores AAV8-FGF21 revirtió el desarrollo de obesidad del modelo murino *ob/ob*. Además, los animales tratados con las dosis de  $5 \times 10^{10}$  vg/animal o superiores presentaron niveles circulantes de FGF21 altos, los cuales se mantuvieron elevados durante las 14 semanas de seguimiento del estudio. Estos niveles circulantes eran capaces de reducir la cantidad de grasa, la hipertrofia de los adipocitos y la inflamación de los tejidos adiposos. El tratamiento con AAV8-FGF21 consiguió disminuir la cantidad de grasa a través del incremento en el gasto energético en el iBAT. Sin embargo, el *browning* del iWAT no contribuyó al aumento del gasto energético. Además el tratamiento con AAV8-FGF21 fue capaz de prevenir el desarrollo de hepatoesteatosis resistencia a la insulina e la intolerancia a la glucosa asociados al fenotipo de los ratones *ob/ob*.



**Figura 40. Análisis de la expresión de la captación y procesamiento de glucosa en los principales depósitos adiposo.** Ratones macho *ob/ob* se trataron con AAV8-FGF21 o AAV8-Null a las 11 semanas de edad. **(A)** Niveles de expresión del transportador de glucosa tipo 4 (*Slc2a4*) en eWAT, iWAT e iBAT 14 semanas post-AAV. **(B)** Niveles de expresión del transportador de glucosa tipo 1 (*Slc2a1*) en iWAT e iBAT de los mismos animales. **(C)** Niveles de expresión de la hexoquinasa 1 (HK1) y la hexoquinasa 2 (HK2) en iWAT de los mismos animales. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  EEM. Fc, *fold change*. n=6-8 por grupo experimental. \*P<0.05, \*\*P<0.01 y \*\*\*P<0.001 *versus* el grupo inyectado con vectores nulo.



**Parte II. ESTUDIO DE LOS EFECTOS DE LA SOBREENPRESIÓN  
DE FGF21 EN EL MÚSCULO ESQUELÉTICO**



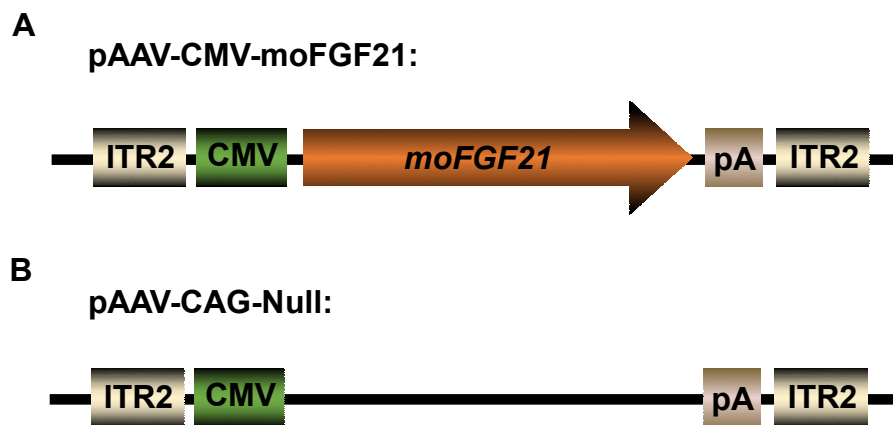
## 1. DISEÑO Y GENERACIÓN DE LOS VECTORES AAV PARA MEDIAR EXPRESIÓN DE FGF21 EN EL MÚSCULO ESQUELÉTICO

El músculo esquelético es un órgano muy accesible y con potencial para secretar proteínas terapéuticas (Callejas et al., 2013; Haurigot et al., 2010; Jaén et al., 2017). Así, a continuación se estudió si el músculo esquelético, al igual que el tejido adiposo, podría utilizarse como órgano con capacidad para secretar FGF21 al torrente circulatorio, y con ello prevenir y tratar el desarrollo de la DT2 y la obesidad.

El vector AAV de serotipo 1 presenta un potente tropismo por el músculo esquelético (Chao et al., 2000; Lisowski et al., 2015; Miyagoe-Suzuki and Takeda, 2010; Wu et al., 2006). Por tanto, para mediar la expresión de FGF21 en el músculo esquelético, se diseñó un vector AAV1 codificante para el gen murino optimizado *Fgf21* (Gene ID: 56636), bajo el promotor potente y ubicuo del cytomegalovirus humano (CMV). Todo ello flanqueado por las *inverted terminal repeats* (ITRs), necesarias para la encapsidación del constructo. Debido al elevado tropismo que presentan los vectores AAV1 por el músculo esquelético tras una inyección local y que este serotipo no atraviesa los endotelios de los vasos (Wang et al., 2011), no se utilizó ninguna secuencia reguladora de la expresión del transgén para delimitar la expresión del gen terapéutico en dicho tejido. Además, en el caso de que parte del vector inyectado se escapara a circulación, sería el hígado el que mayoritariamente se transduciría, no obstante se ha descrito que el promotor CMV se silencia en hígado, perdiéndose la expresión del gen de interés (Al-Dosari et al., 2006; Herweijer et al., 2001). El plásmido resultante se denominó pAAV-CMV-moFGF21 y se generó el plásmido pAAV-CMV-Null para la producción de vectores AAV control, el cual presenta el mismo promotor CMV, polyA e ITRs que el transgén de interés, pero no codifica para ninguna proteína (Figura 41).

A partir de estos plásmidos se generaron los AAV de serotipo 1 (AAV1) mediante el sistema de triple transfección en células embrionarias de riñón humano 293 (HEK293) (Ayuso et al., 2010) (apartado 2.3 de Materiales y Métodos). A los AAV resultantes se les denominaron AAV1-FGF21 y AAV1-Null.



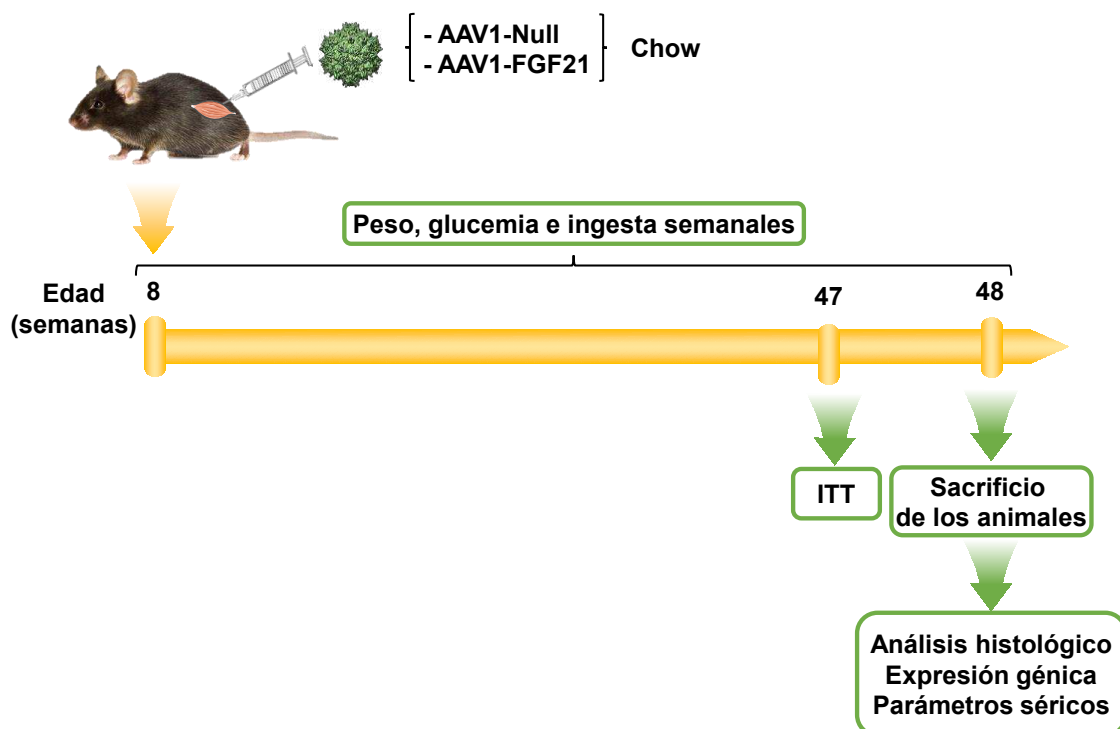


**Figura 41. Representación esquemática de los plásmidos utilizados en la producción de los vectores virales.** El plásmido pAAV-CMV-moFGF21 fue generado para expresar la proteína murina FGF21 específicamente en el músculo esquelético **(A)**, mientras que el plásmido control pAAV-CMV-Null se utilizó para generar los vectores virales nulo **(B)**. ITR2, *Inverte Inverted Terminal Repeats* del vector AAV2; CMV: promotor y *enhancer* del cytomegalovirus humano; moFGF21: secuencia optimizada del CDS murino de Fgf21; pA: secuencia de poliadenilación del virus del simio 40. Los constructos no están representados a escala.

## 2. ESTUDIO DE LOS EFECTOS DE LA SOBREEXPRESIÓN LOCAL DE FGF21 EN EL MÚSCULO ESQUELÉTICO EN RATONES SANOS

Una vez generado el vector AAV1-FGF21, se evaluó si el músculo esquelético era capaz de secretar la proteína FGF21 a largo plazo. Para ello, ratones C57BL/6 de 8 semanas de edad se inyectaron con los vectores AAV1-FGF21 a una dosis de  $5 \times 10^{10}$  vg/músculo en tres músculos esqueléticos de ambas extremidades posteriores (cuádriceps, gastrocnemio y tibialis cranialis). Por tanto, la dosis total de vector administrada por animal fue de  $3 \times 10^{11}$  vg. Los animales control se administraron a la misma dosis con el vector AAV1-Null (Figura 42).

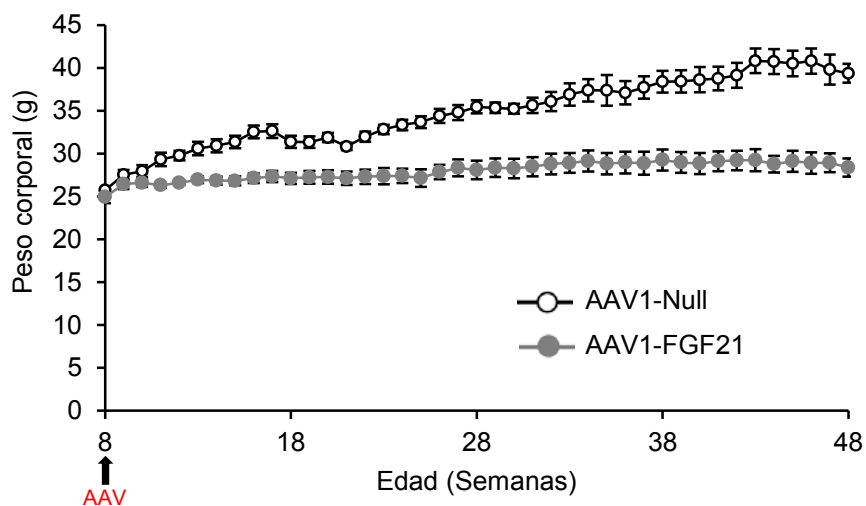
Tras la administración de los vectores AAV1-FGF21, se llevó a cabo un seguimiento semanal de peso, glucemia e ingesta de los animales, durante 40 semanas. Al final del estudio se realizó un test de tolerancia a la insulina (ITT) para evaluar si los animales tratados presentaban una mejor sensibilidad a la insulina. Los animales se sacrificaron a las 48 semanas de edad y se analizaron los tejidos a nivel histológico, la expresión de genes claves, y se evaluaron parámetros séricos (Figura 42).



**Figura 42. Diseño experimental de la administración en el músculo esquelético de vectores AAV1-FGF21.** Administración local en los músculos cuádriceps, gastrocnemio y tibialis de  $3 \times 10^{11}$  vg/animal de los vectores AAV1-FGF21 y AAV1-Null en ratones C57BL/6 de 8 semanas de edad. Los animales se alimentaron con una dieta Chow. Se realizó un seguimiento semanal de los animales hasta el sacrificio a las 48 semanas de edad. Además se realizó un ITT a las 47 semanas de edad. ITT, Test de tolerancia a la insulina; Chow, dieta estándar. n=6-7 por grupo experimental.

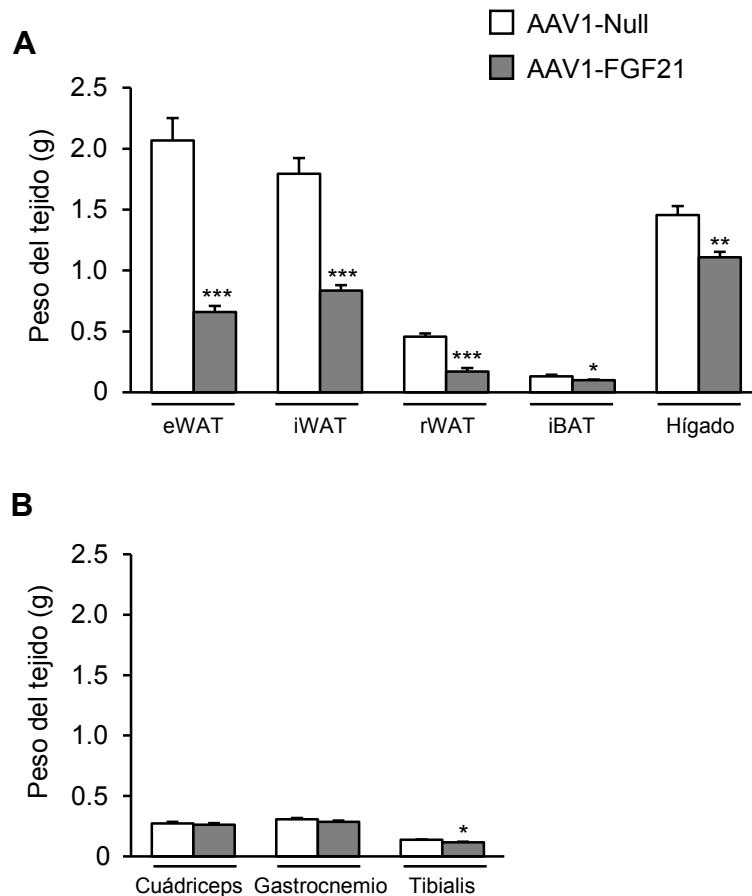
## 2.1. Estudio de la sobreexpresión de FGF21 a largo plazo en ratones alimentados con dieta estándar en el músculo esquelético

Tras la administración del vector AAV1-FGF21 se evaluó la evolución del peso corporal de los animales de manera semanal. Los animales control tratados con vectores nulo fueron incrementando el peso paulatinamente con la edad, a pesar de estar alimentados con una dieta Chow (Figura 43). Este aumento en el peso era probablemente el resultado de la disminución de la tasa metabólica asociada al envejecimiento (St-Onge and Gallagher, 2010). Por contra, los animales tratados con AAV1-FGF21 mantuvieron su peso corporal inicial (Figura 43).



**Figura 43. Evaluación del peso corporal de los animales tratados con AAV1-FGF21.** Ratones machos C57Bl/6 se administraron intra-muscularmente con vectores AAV1-FGF21 o AAV1-Null a una dosis de  $3 \times 10^{11}$ vg/animal a las 8 semanas de edad. Evolución del peso corporal absoluto en gramos a lo largo del estudio (g). Los resultados se expresan como la media  $\pm$  EEM.  $n=5-7$  por grupo experimental. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  y \*\*\* $P < 0.001$  versus el grupo inyectado con vectores nulo.

Al final del estudio, tras 40 semanas de seguimiento, se obtuvieron y pesaron los tres músculos esqueléticos inyectados, cuádriceps, gastrocnemio y tibialis, los depósitos adiposos eWAT, iWAT, rWAT e iBAT y el hígado. El tratamiento con AAV1-FGF21 contrarrestó el acúmulo de grasa en todos los tejidos adiposos y el hígado, en comparación con los animales tratados con vectores nulo (Figura 44A). En cuanto al peso de los músculos esqueléticos inyectados, no se observaron diferencias en el cuádriceps y el gastrocnemio, pero sí una ligera disminución del peso del tibialis respecto al grupo control (Figura 44B).



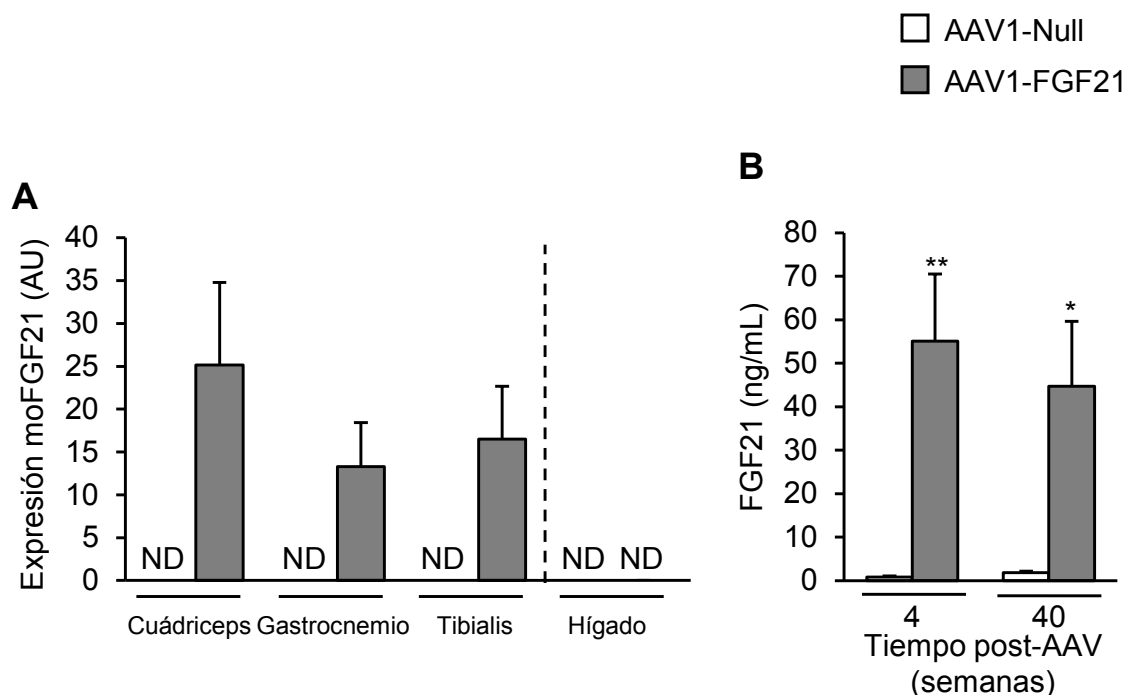
**Figura 44. Peso de los tejidos.** Ratones macho C57Bl/6 se trataron con AAV1-FGF21 o AAV1-Null a las 8 semanas de edad. A las 48 semanas de edad, se determinó el peso de los depósitos adiposos y el hígado (**A**) y los músculos esqueléticos que se inyectaron (**B**). Los resultados se expresan como la media  $\pm$  EEM.  $n=5-7$  por grupo experimental. \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$  y \*\*\* $P<0.001$  versus el grupo inyectado con vectores nulo.

## 2.2. Expresión y secreción de FGF21 en los animales tratados con AAV1-FGF21

Los animales se sacrificaron y se comprobó la expresión de moFGF21 en los tres músculos inyectados transcurridas 40 semanas del tratamiento con AAV1-FGF21. Se analizó también la expresión en el hígado como control, debido a su posible transducción durante la administración intramuscular (Al-Dosari et al., 2006; Herweijer et al., 2001). Como era de esperar, los tres músculos tratados expresaban niveles de moFGF21 similares entre ellos, mientras que no se observó expresión del transgén en el hígado (Figura 45A). Este resultado confirmaba que el efecto terapéutico observado en el peso de los animales tras el tratamiento con AAV1-FGF21 se debía únicamente a la expresión del transgén por parte del músculo esquelético (Figura 45A).

A continuación, se evaluaron los niveles circulantes de FGF21 a las 4 semanas tras la administración de los vectores y al finalizar el estudio, 40 semanas después del tratamiento. Los niveles circulantes de esta hormona eran muy similares en ambos

tiempos analizados (Figura 45B). Así, los resultados confirmaron que el músculo esquelético era capaz de secretar FGF21 al torrente circulatorio de manera eficiente y sostenida tras la administración de los vectores AAV intramuscularmente (Figura 45B).



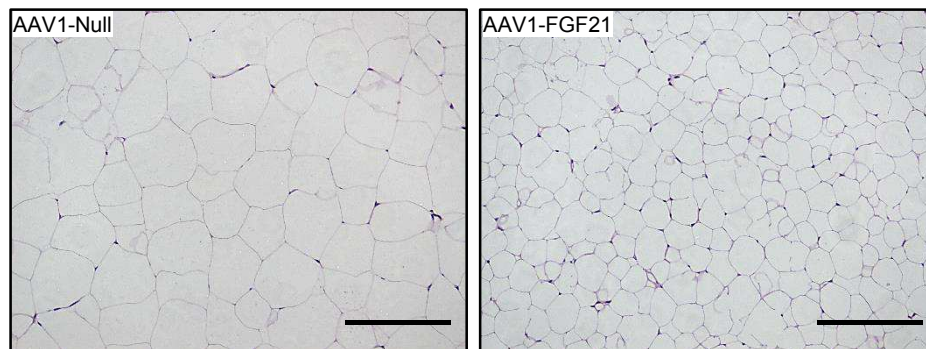
**Figura 45. Niveles de expresión de moFGF21 en los tres músculos inyectados y el hígado y niveles circulantes de FGF21.** Ratones macho C57Bl/6 se trataron con AAV1-FGF21 o AAV1-Null a las 8 semanas de edad. **(A)** Niveles de expresión de FGF21 murino optimizado (moFGF21) en cuádriceps, gastrocnemio, tibialis e hígado 40 semanas post-AAV medido mediante RT-PCR. **(B)** Niveles séricos de FGF21 40 semanas post-AAV. ND, no detectado; moFGF21; secuencia optimizada del CDS murino de *Fgf21*; UA, unidades arbitrarias. Los resultados se expresan como a media  $\pm$  EEM.  $n=5-7$  por grupo experimental. \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$  y \*\*\* $P<0.001$  versus el grupo inyectado con vectores nulo.

### 2.3. Análisis del depósito de lípidos en el eWAT

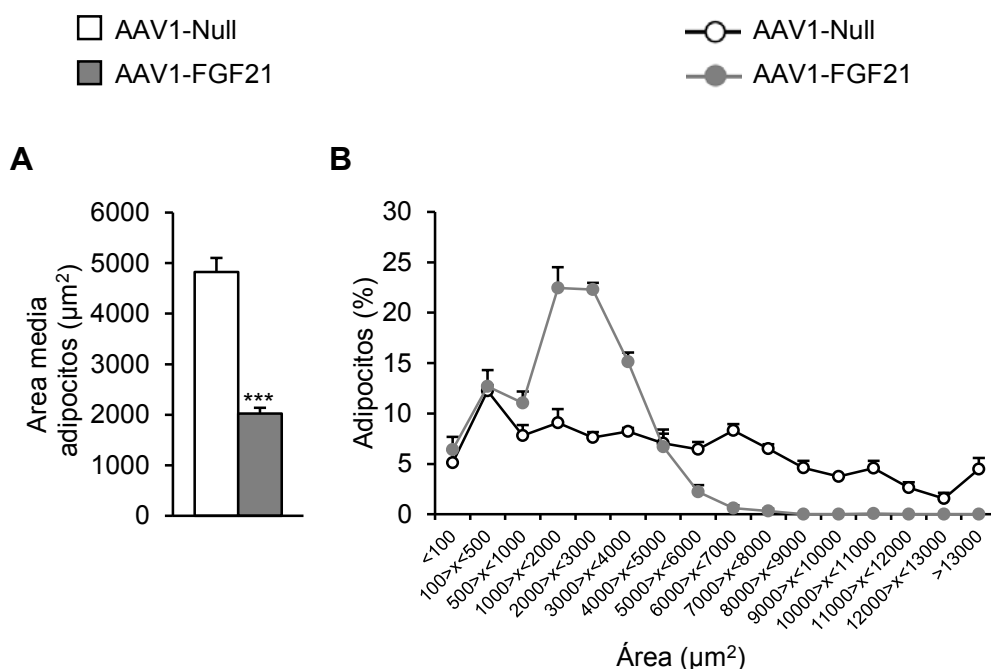
El envejecimiento está altamente asociado con un incremento de la adiposidad (Basu et al., 2013; Tchkonja et al., 2013). Por ello, al finalizar el estudio se realizó un análisis histológico del eWAT para evaluar la adiposidad de los animales tratados con AAV1-FGF21. Este análisis permitió comprobar que el tratamiento con AAV1-FGF21 consiguió reducir la cantidad de grasa y el tamaño de los adipocitos del eWAT respecto a los ratones control, siendo capaz de prevenir la acumulación de grasa e hipertrofia debida al envejecimiento (Figura 46).

Estos resultados fueron confirmados mediante un análisis de la morfometría de los adipocitos del eWAT. El tamaño medio de los adipocitos de los animales tratados con AAV1-FGF21 fue significativamente menor al de los animales tratados con vectores nulo (Figura 47A). Además, mientras que los animales control presentaban

una mayor frecuencia de adipocitos más grandes y una menor frecuencia de los más pequeños, el tratamiento con los vectores AAV1-FGF21 cambió la distribución, con una reducción de la frecuencia de adipocitos grandes y un aumento de los pequeños (Figura 47B). Por tanto, la administración intramuscular de AAV1-FGF21 en animales control alimentados con dieta Chow fue capaz de disminuir la adiposidad y la hipertrofia del eWAT en comparación con los ratones control, tras 40 semanas de tratamiento.

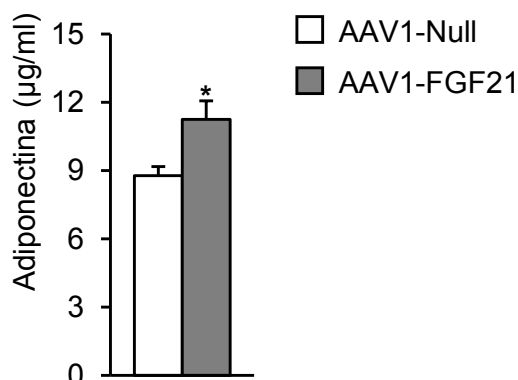


**Figura 46. Análisis histológico del tejido adiposo blanco epididimal.** Imágenes representativas de cortes histológico con tinción de hematoxilina/eosina del eWAT en los ratones machos C57BL/6 tratados con AAV1-FGF21 o AAV1-Null a las 8 semanas de edad. Escala: 100µm.



**Figura 47. Área media y distribución de los adipocitos por área en el tejido adiposo epididimal. (A)** Área media de los adipocitos blancos del eWAT 40 semanas post-AAVs intra-muscular de los vectores AAV1-FGF21 o AAV1-Null en ratones machos C57BL/6. **(B)** Distribución de frecuencia del área de los adipocitos en los mismos grupos experimentales. Los resultados se expresan como a media ± EEM. n=4 por grupo experimental. \*P<0.05, \*\*P<0.01 y \*\*\*P<0.001 versus el grupo inyectado con vectores nulo.

De acuerdo con estos resultados, el tratamiento con AAV1-FGF21 incrementó los niveles de adiponectina respecto al grupo control (Figura 48).

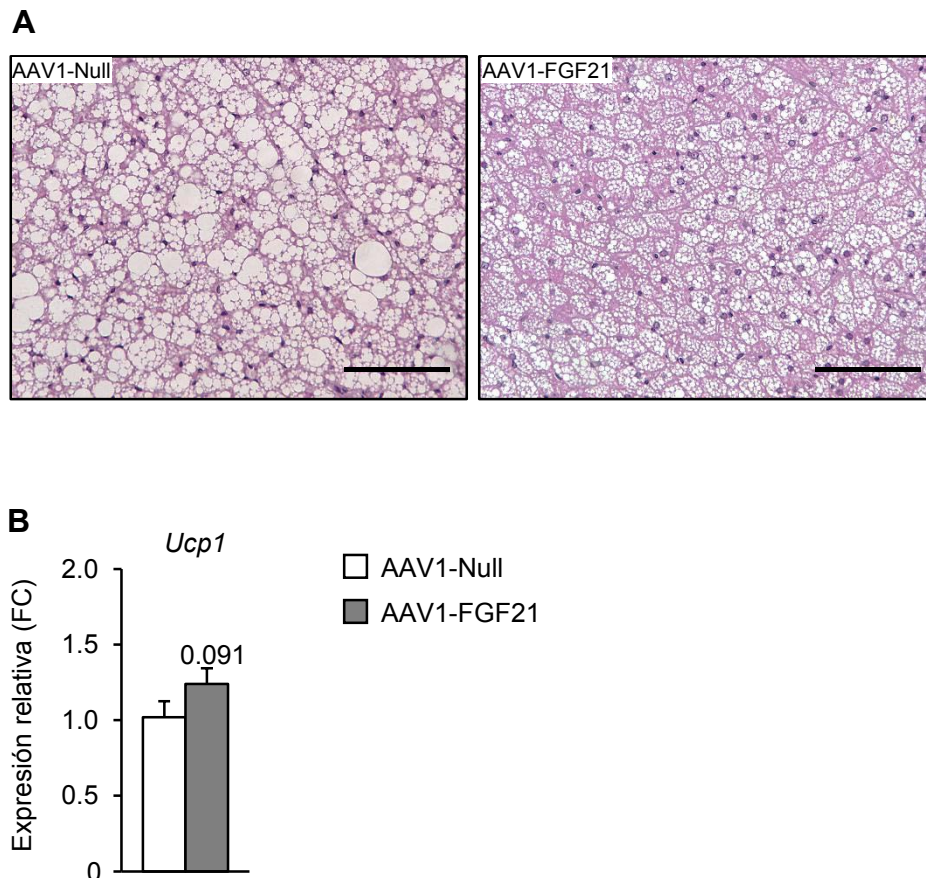


**Figura 48. Determinación de los niveles circulantes adiponectina.** Niveles circulantes de adiponectina en ratones macho C57Bl/6 tratados con AAV1-FGF21 o AAV1-Null 40 semanas post-AAV. Los resultados se expresan como a media  $\pm$  EEM.  $n=5-7$  por grupo experimental. \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$  y \*\*\* $P<0.001$  versus el grupo inyectado con vectores nulo.

Los resultados del análisis del eWAT revelaron que en animales control alimentados con dieta Chow de 48 semanas de edad, el tratamiento con AAV1-FGF21 fue capaz de disminuir la adiposidad en este tejido.

#### 2.4. Análisis del gasto energético y el *browning* en el tejido adiposo inducido por el tratamiento con AAV1-FGF21

Dada la prevención de la ganancia de peso debida al envejecimiento, mediada por el tratamiento de AAV1-FGF21 (Figura 44), se evaluó si estos animales tratados presentaban un aumento del gasto energético a través del incremento de la termogénesis no asociada al temblor o el *browning*. En primer lugar, se llevó a cabo un análisis histológico de cortes del iBAT con tinción de hematoxilina/eosina, y se determinó la expresión de marcadores de la termogénesis no asociada al temblor como UCP1 en este tejido. El iBAT de los animales control tratados con vectores nulo mostraba adipocitos marrones con vacuolas lipídicas más grandes, indicando un fenotipo más típico de adipocito blanco (Figura 49A). Sin embargo, el tratamiento con AAV1-FGF21 redujo el acúmulo de grasa en el iBAT (Figura 49A). Mediante análisis por RT-PCR se observó que los niveles de expresión de la proteína desacopladora UCP1 tendían a estar aumentados en los animales tratados con AAV1-FGF21 respecto al grupo control (Figura 49B). Estos resultados confirmaron el aumento del gasto energético del iBAT en estos animales.

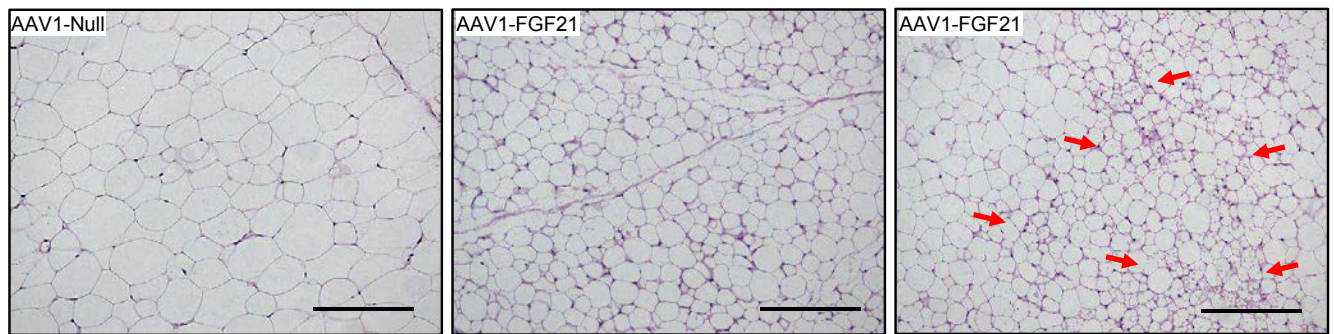


**Figura 49. Análisis histológico y expresión de UCP1 en el tejido adiposo marrón. (A)** Imágenes representativas de cortes histológico con tinción de hematoxilina/eosina del iBAT en los ratones machos C57BL/6 tratados con AAV1-FGF21 o AAV1-Null a las 8 semanas de edad. Escala: 200 $\mu$ m. **(B)** Niveles de expresión de *Ucp1* en iBAT 40 semanas post-AAV. Los resultados se expresan como a media  $\pm$  EEM. n=5-7 por grupo experimental. \*P<0.05, \*\*P<0.01 y \*\*\*P<0.001 versus el grupo inyectado con vectores nulo. FC, *fold change*.

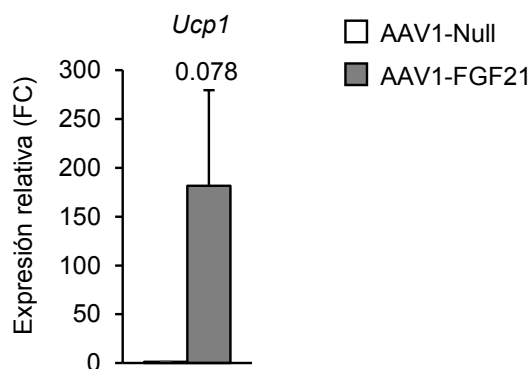
Tras analizar el iBAT, también se evaluó el iWAT. El análisis histológico del iWAT permitió observar una reducción del tamaño de los adipocitos del iWAT en los animales tratados con AAV1-FGF21. Además, en algunos animales se puede observar la presencia de zonas con alto contenido en adipocitos multiloculares, lo cual sugería inducción del *browning* (Figura 50A). Al determinar los niveles de expresión de *Ucp1* en el iWAT, se observó un gran incremento en la expresión de esta proteína desacopladora (Figura 50B). Por tanto, estos resultados en el iWAT sugerían que el tratamiento con AAV1-FGF21 medió una inducción del *browning*, lo cual contribuiría a aumentar el gasto energético en estos animales, conjuntamente con los efectos observados en el iBAT.



A



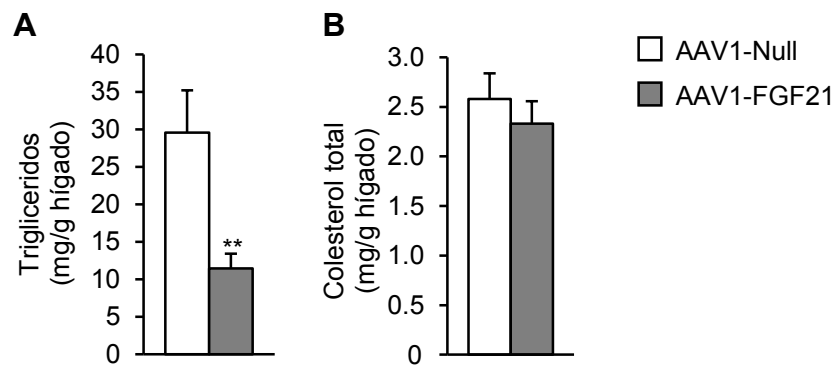
B



**Figura 50. Análisis histológico y expresión de UCP1 en el tejido adiposo blanco inguinal. (A)** Imágenes representativa de cortes histológicos con tinción de hematoxilina/eosina del iWAT en los ratones machos C57BL/6 tratados con AAV1-FGF21 o AAV1-Null a las 8 semanas de edad. Las flechas rojas indican áreas con adipocitos multiloculares (*browning*). Escala: 100 $\mu$ m. **(B)** Niveles de expresión de *Ucp1* en el iWAT 40 semanas post-AAV. Los resultados se expresan como a media  $\pm$  EEM. n=5-7 por grupo experimental. \*P<0.05, \*\*P<0.01 y \*\*\*P<0.001 versus el grupo inyectado con vectores nulo. FC, *fold change*; UA, Unidades arbitrarias.

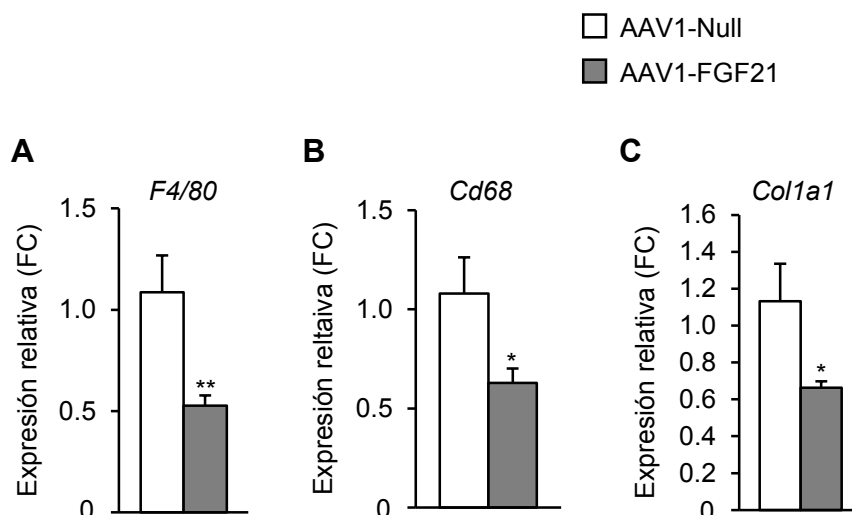
## 2.5. Disminución del contenido lipídico en hígado inducida por el tratamiento con AAV1-FGF21

Pese a su gran capacidad de regeneración, el hígado es uno de los órganos metabólicamente más importantes que empeoran por el envejecimiento (Michalopoulos, 2013). Como el hígado contribuye en gran medida a la mejora de la calidad de vida, se analizaron cortes histológicos de este tejido. Aunque en el análisis histopatológico del hígado no se apreció ninguna diferencia entre los ratones control y los tratados con AAV1-FGF21 (*datos no mostrados*), si se observó una reducción en el contenido hepático de triglicéridos en los ratones tratados con AAV1-FGF21 (Figura 51A). No se observaron diferencias en el contenido de colesterol total en los extractos lipídicos del hígado (Figura 51B).



**Figura 51. Contenido hepático de triglicéridos y colesterol.** Niveles hepáticos de triglicéridos (A) y colesterol total (B) 40 semanas post-AAV en los ratones machos C57BL/6 tratados con AAV1-FGF21 o AAV1-Null a las 8 semanas de edad. Los resultados se expresan como a media  $\pm$  EEM.  $n=5-7$  por grupo experimental. \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$  y \*\*\* $P<0.001$  versus el grupo inyectado con vectores nulo.

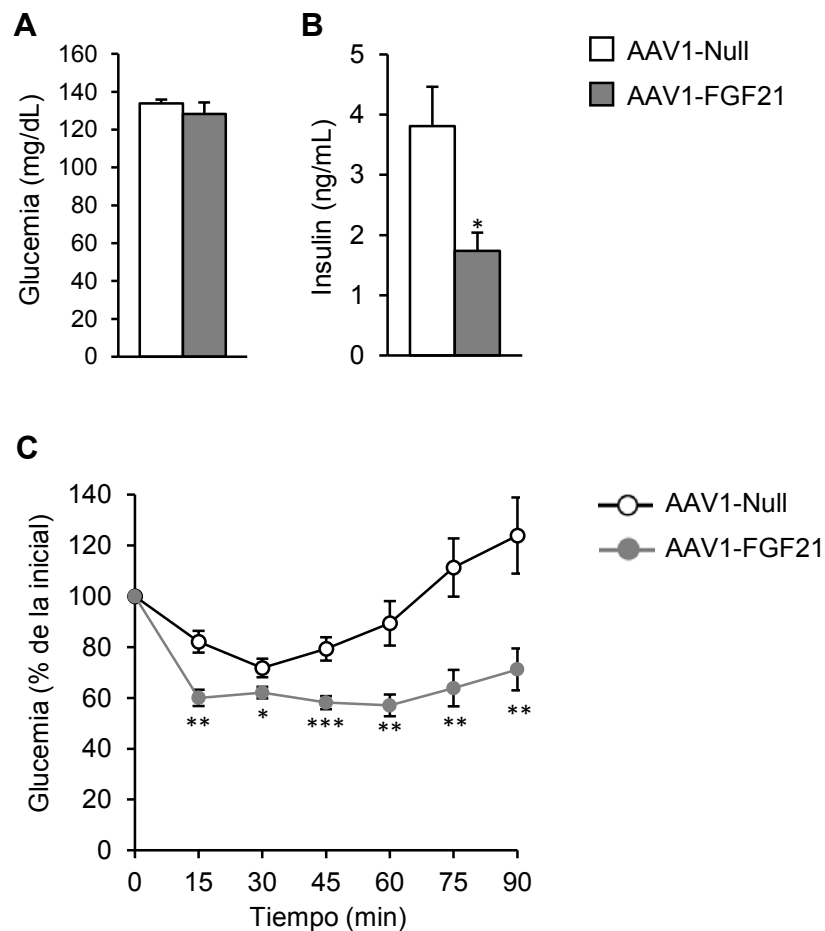
Paralelamente, se evaluó la presencia o ausencia de inflamación y fibrosis en el hígado de los animales tratados. Para ello se determinaron los niveles de expresión de *F4/80* y *Cd68*, junto con la expresión el gen de las fibras de colágeno 1 (*Col1a1*) (Figura 52A y B). Los resultados demostraron que la administración intramuscular con los vectores AAV1-FGF21 consiguió disminuir de forma significativa, tanto los marcadores de inflamación como la fibrosis, respecto al grupo control (Figura 52A-C).



**Figura 52. Evaluación de la inflamación y fibrosis en el hígado.** Ratones macho C57Bl/6 se trataron con AAV1-FGF21 o AAV1-Null a las 8 semanas de edad. Niveles de expresión de *F4/80* (A), *Cd68* (B) y colágeno 1 (*Col1a1*) (C) para evaluar la inflamación y la fibrosis en el hígado. Los resultados se expresan como a media  $\pm$  EEM.  $n=5-7$  por grupo experimental. \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$  y \*\*\* $P<0.001$  versus el grupo inyectado con vectores nulo. FC, fold change.

## 2.6. Mejora de la sensibilidad a la insulina por el tratamiento con AAV1-FGF21

Dado que el tratamiento con AAV1-FGF21 redujo la ganancia de peso inducida por el envejecimiento de los animales (Figura 43) y disminuyó la acumulación de grasa en el tejido adiposo (Figura 44), cabría esperar una mejora en el metabolismo de la glucosa y la sensibilidad a la insulina. Mientras que no se observaron diferencias significativas en la glucemia y todos los animales eran normoglucémicos (Figura 53A), los niveles de insulina estaban disminuidos por el tratamiento con AAV1-FGF21 (Figura 53B), sugiriendo una mayor sensibilidad a la insulina. Para comprobarlo, a las 39 semanas de la administración de los vectores AAV se realizó un test de tolerancia a la insulina, en el que se observó que los animales tratados con AAV1-FGF21 mostraban una mayor sensibilidad a la insulina que el grupo control tratado con vectores nulo (Figura 53C).



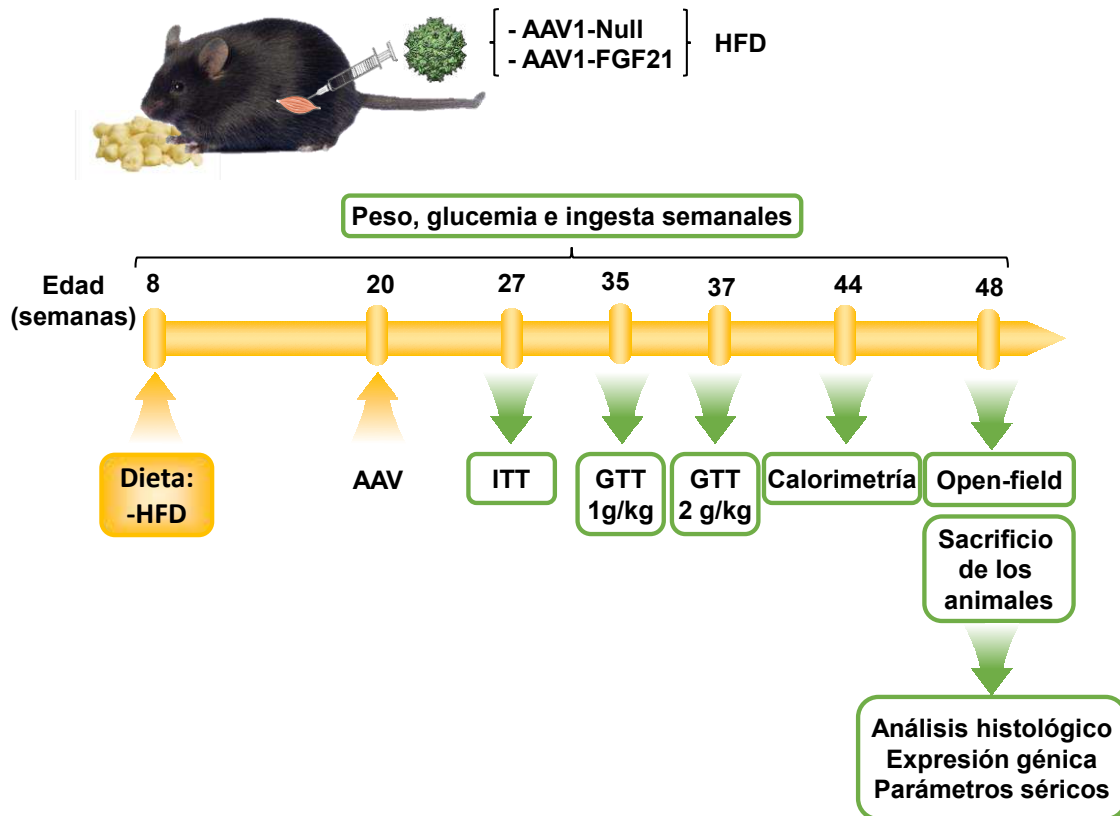
**Figura 53. Determinación de la glucemia e insulinemia y evaluación de la sensibilidad a la insulina.** Glucemia (A) e insulinemia (B) en alimentación 40 semanas post-AAV en los ratones machos C57BL/6 tratados con AAV1-FGF21 o AAV1-Null. (C) Test de tolerancia a la insulina (ITT) 39 semanas post-AAV de los mismos animales. Los resultados se expresan como a media  $\pm$  EEM.  $n=5-7$  por grupo experimental. \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$  y \*\*\* $P<0.001$  versus el grupo inyectado con vectores nulo.

En conjunto, estos resultados confirmaron que la sobreexpresión de FGF21, mediada por la transducción con vectores AAV1-FGF21 del músculo esquelético, era capaz de producir niveles elevados y sostenidos de FGF21 circulante. Los elevados niveles circulantes de FGF21 previnieron la ganancia de peso y la hipertrofia de los adipocitos observada durante el envejecimiento de ratones control alimentados con dieta Chow durante las 40 semanas del estudio. Dado que los animales tratados con AAV1-FGF21 mantuvieron estable su peso inicial durante todo el estudio, este estudio confirmaba la seguridad del tratamiento. Además, el tratamiento previno el acúmulo de grasa en todos los tejidos adiposos y el hígado, debido al aumento del gasto energético, observado tanto en el iBAT como en el iWAT. Además, la administración intramuscular de los vectores AAV1-FGF21 redujo la inflamación y la fibrosis hepática en comparación con los animales control. Por último, la sensibilidad a la insulina mejoró por el tratamiento con AAV1-FGFF21 respecto a los animales tratados con vectores nulo.

### **3. ESTUDIO DE LOS EFECTOS DE LA SOBREENPRESIÓN LOCAL DE FGF21 EN EL MÚSCULO ESQUELÉTICO EN RATONES OBESOS ALIMENTADOS CON DIETA ALTA EN LÍPIDOS**

Una vez comprobada la capacidad del músculo esquelético para sobreexpresar y secretar FGF21 de manera eficaz, segura y sostenida mediante la administración de vectores AAV, se valoró su eficacia para revertir la obesidad y resistencia a la insulina en ratones con obesidad inducida por la dieta alta en lípidos.

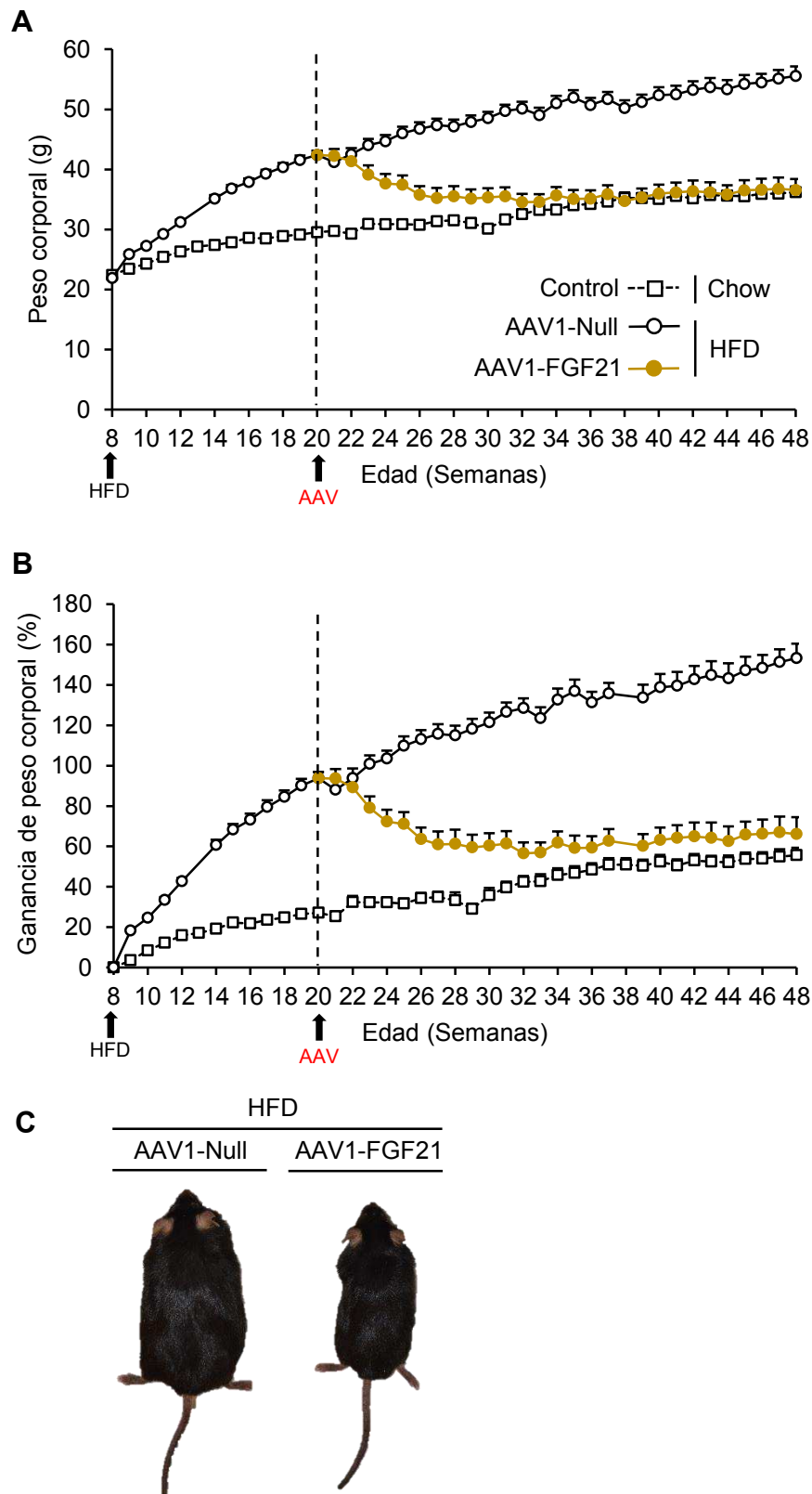
Ratones machos control C57Bl/6 se empezaron a alimentar con una dieta HFD a partir de las 8 semanas de edad. Tras 12 semanas de dieta (a las 20 semanas de edad), se administraron los vectores AAV1-FGF21 y AAV1-Null en los mismos músculos esqueléticos y a la misma dosis de  $3 \times 10^{11}$ vg/animal que en el estudio anterior. A continuación, se realizó un seguimiento semanal de pesos, glucemias e ingesta de los animales desde el inicio de la dieta HFD hasta el final del estudio. A lo largo del estudio también se realizaron pruebas metabólicas como un ITT, un GTT, una prueba de calorimetría indirecta y al final del estudio los ratones se sometieron a un test de comportamiento (*Open-field*). Los animales se sacrificaron a las 48 semanas de edad y se analizaron los tejidos a nivel histológico, la expresión de genes claves y se evaluaron parámetros séricos (Figura 54).



**Figura 54. Diseño experimental de la administración en el músculo esquelético de vectores AAV1-FGF21.** Administración local en cuádriceps, gastrocnemio y tibialis de  $3 \times 10^{11}$  vg de los vectores AAV1-FGF21 y AAV1-Null en ratones C57BL/6 obesos de 20 semanas de edad alimentados con dieta alta en lípidos. Se realizó un seguimiento semanal de los animales y pruebas metabólicas hasta el sacrificio a las 48 semanas de edad. ITT, test de tolerancia a la insulina; GTT, test de tolerancia a la glucosa; HFD, dieta alta en lípidos. n= 9-10 por grupo experimental.

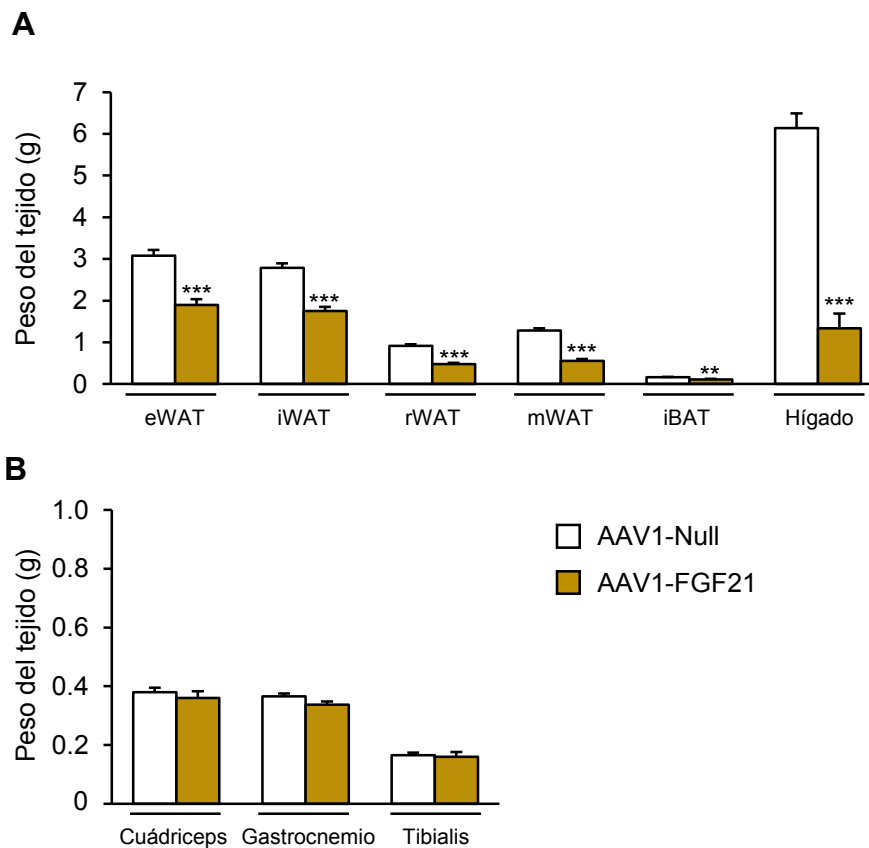
### 3.1. Reversión de la obesidad inducida por la dieta en ratones mediante la administración de AAV1-FGF21 en el músculo esquelético

Los animales alimentados con dieta alta en lípidos incrementaron su peso corporal alrededor de un 95% respecto a su peso inicial durante las primeras 12 semanas de dieta HFD (Figura 55A y B). Tras la administración con los vectores AAV, los animales tratados con AAV1-Null continuaron incrementando su peso corporal hasta alcanzar un 145% de ganancia de peso respecto a su peso inicial (Figura 55A y B). Contrariamente, el grupo de animales tratados con AAV1-FGF21 fue capaz, no sólo de prevenir el aumento de peso corporal debido a la ingesta de dieta HFD, sino que revirtió la ganancia de peso conseguida durante las 12 semanas previas (Figura 55A-C). De hecho, los animales tratados con AAV1-FGF21 llegaron incluso a alcanzar el peso de animales control C57Bl/6 alimentados con dieta Chow (Figura 55A y B). Una vez los animales tratados con AAV1-FGF21 normalizaron su peso, éste se mantuvo estable hasta el final del experimento (Figura 55A y B).



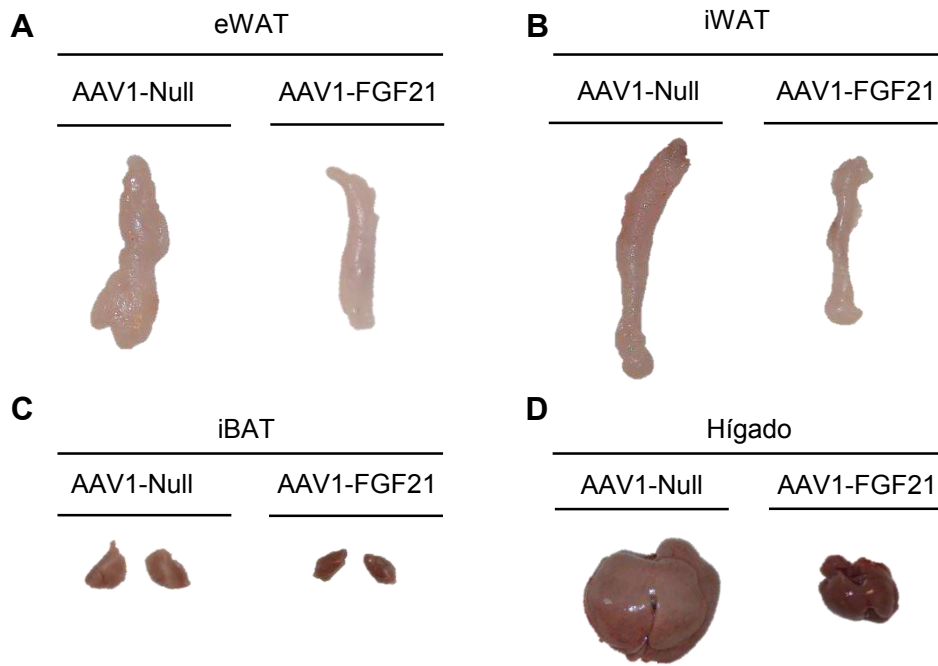
**Figura 55. Evaluación del peso y ganancia del peso corporal de los animales tratados con vectores AAV1-FGF21.** Ratones machos C57Bl/6 con obesidad inducida por la dieta HFD se trataron con AAV1-FGF21 o AAV1-Null a las 20 semanas de edad. **(A)** Evolución del peso corporal absoluto en gramos (g). **(B)** Evolución de la ganancia del peso corporal en % respecto al peso corporal inicial. **(C)** Imágenes representativas de los animales pertenecientes a cada grupo experimental al final del estudio. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  EEM.  $n=9-10$  por grupo experimental. \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$  y \*\*\* $P<0.001$  versus el grupo inyectado con vectores nulo.

Al finalizar el estudio, se obtuvieron y pesaron los tres músculos esqueléticos inyectados cuádriceps, gastrocnemio y tibialis, los depósitos adiposos eWAT, iWAT, rWAT e iBAT y el hígado. Los animales tratados con AAV1-FGF21 mostraron una reducción del peso de todos los depósitos adiposos y del hígado, respecto al grupo control tratado con vectores nulo (Figura 56A y 57). Además, la administración de los vectores AAVs no alteró el peso de los tres músculos tratados (Figura 56B).



**Figura 56. Peso de los tejidos.** Ratones machos C57Bl/6 obesos se trataron con AAV1-FGF21 o AAV1-Null a las 20 semanas de edad. A las 49 semanas de edad, se midió el peso de los principales depósitos adiposos, el hígado (**A**) y los músculos inyectados (**B**). Los resultados se expresan como la media  $\pm$  EEM.  $n=9-10$  por grupo experimental. \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$  y \*\*\* $P<0.001$  versus el grupo inyectado con vectores nulo.



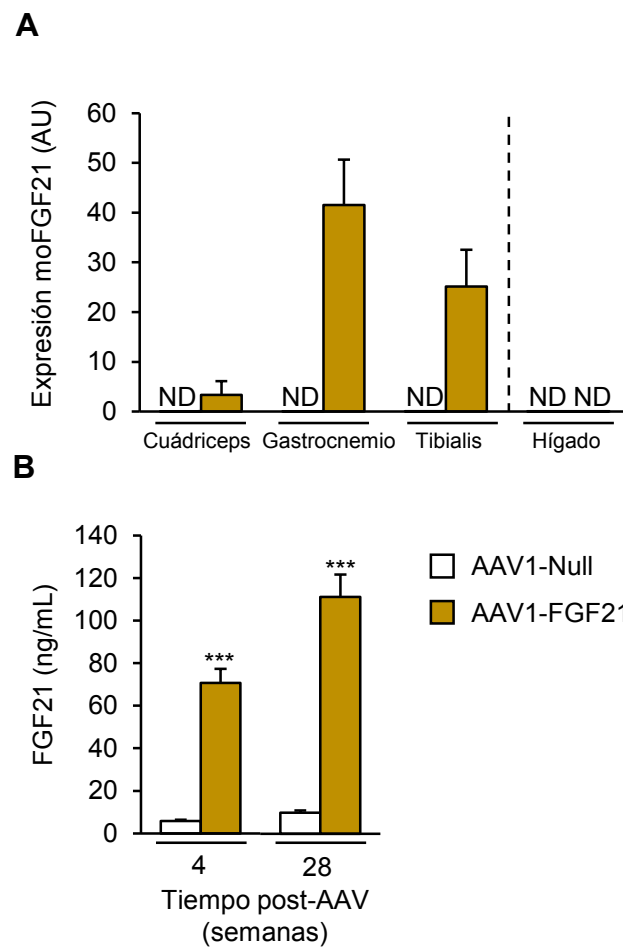


**Figura 57. Evaluación macroscópica de los tres depósitos adiposos principales y del hígado.** Ratones macho C57Bl/6 obesos se trataron con AAV1-FGF21 o AAV1-Null a las 20 semanas de edad. A las 48 semanas de edad, se extrajeron los tres depósitos adiposos más representativos, eWAT (A), iWAT (B) e iBAT (C) y el hígado (D).

### 3.2. Expresión y secreción de FGF21 en los animales tratados con AAV1-FGF21

Tras 28 semanas del tratamiento con los vectores AAV1-FGF21, los animales fueron sacrificados y se comprobó la expresión del transgén en los tres músculos inyectados. También se analizó su expresión en el hígado para descartar una posible transducción por el vector AAV1-FGF21. Mientras que los tres músculos esqueléticos administrados mostraron una expresión elevada del transgén de interés, no se detectó expresión de moFGF21 en el hígado (Figura 58A).

Paralelamente, se evaluaron los niveles circulantes de FGF21 tras 4 semanas de la administración de los vectores y al finalizar el estudio, 28 semanas post-AAV. A pesar de la pérdida de peso corporal observada en los animales tratados con AAV1-FGF21, estos animales mostraron elevados niveles circulantes de la proteína FGF21 y no se observó una disminución debida al paso del tiempo (Figura 58B).

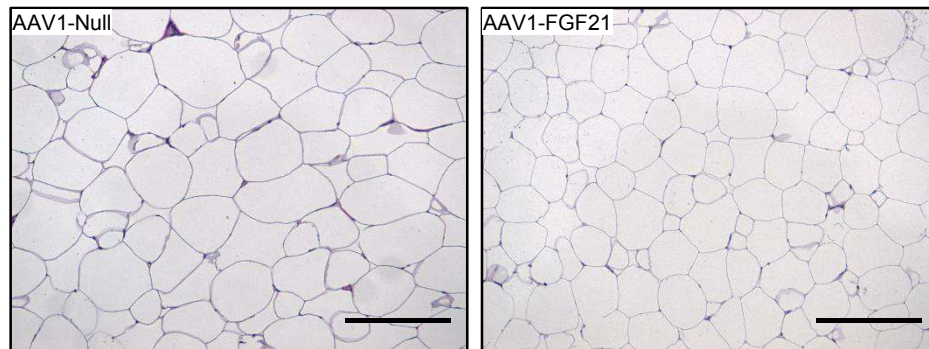


**Figura 58. Niveles de expresión de moFGF21 en los tres músculos inyectados y en el hígado, y niveles circulantes de FGF21.** Ratones macho C57Bl/6 con obesidad inducida por la dieta HFD se trataron con AAV1-FGF21 o AAV1-Null a las 20 semanas de edad. **(A)** Niveles de expresión de FGF21 murino optimizado (moFGF21) en cuádriceps, gastrocnemio, tibialis e hígado 28 semanas post-AAV. **(B)** Niveles séricos de FGF21 4 y 28 semanas post-AAV. ND, no detectado; moFGF21; secuencia optimizada del CDS murino de *Fgf21*; UA, unidades arbitrarias. Los resultados se expresan como a media  $\pm$  EEM. n=9-10 por grupo experimental. \*P<0.05, \*\*P<0.01 y \*\*\*P<0.001 versus el grupo inyectado con vectores nulo.

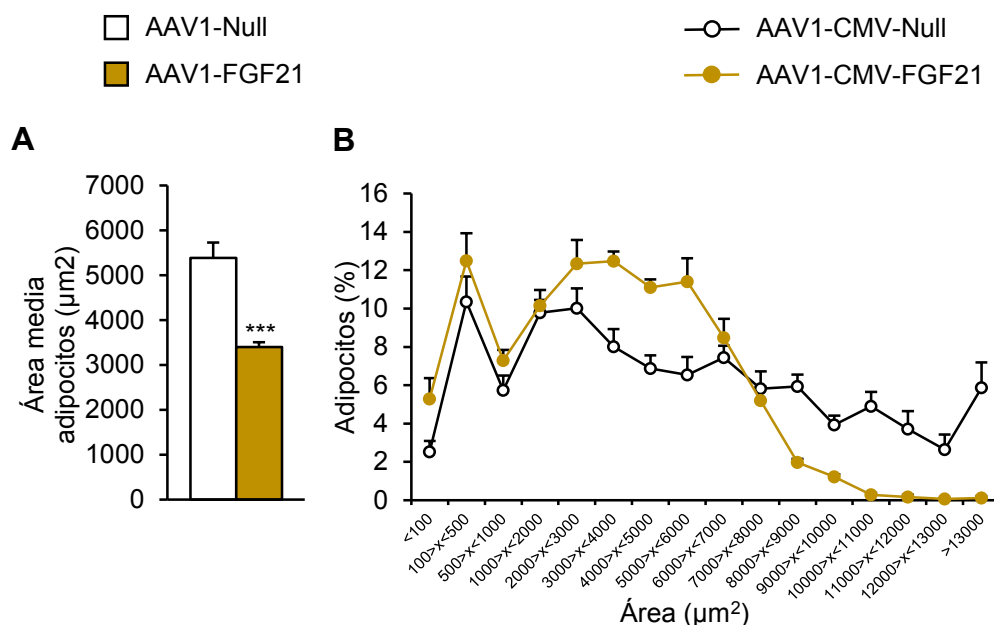
### 3.3. Reversión de la hipertrofia y la inflamación del eWAT inducida por la dieta alta en lípidos

El análisis de los cortes histológicos del eWAT teñidos con hematoxilina/eosina mostró que los animales obesos tratados con los vectores nulo presentaban adipocitos de gran tamaño debido a la hipertrofia inducida por la dieta HFD. Sin embargo, los ratones tratados con AAV1-FGF21 fueron capaces de revertir la hipertrofia de los adipocitos del eWAT, a pesar de seguir alimentándose con dieta HFD (Figura 59). Estos resultados se confirmaron mediante un análisis de la morfometría de los adipocitos del eWAT. Así, se observó que el tratamiento con AAV1-FGF21 en

animales obesos inducidos por una dieta HFD reducía de manera significativa el tamaño de los adipocitos respecto al grupo control tratado con vectores nulo (Figura 60A). Además, los animales tratados con AAV1-FGF21 mostraban un incremento en el número de adipocitos más pequeños y una reducción en el número de los adipocitos más grandes, una distribución inversa a la de los animales control (Figura 60B).

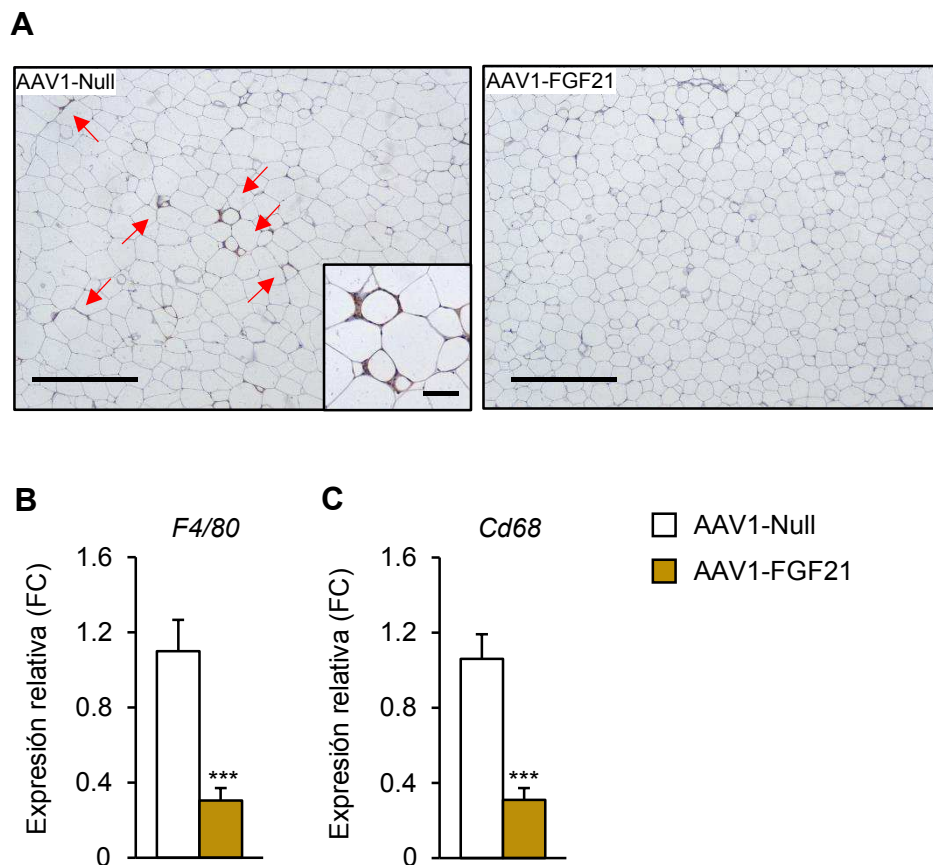


**Figura 59. Análisis histológico del tejido adiposo blanco epididimal.** Imágenes representativas de cortes histológicos con tinción de hematoxilina/eosina del eWAT en los ratones machos C57BL/6 obesos tratados con AAV1-FGF21 o AAV1-Null a las 20 semanas de edad. Escala: 100µm.



**Figura 60. Área media y distribución de los adipocitos por área en el tejido adiposo epididimal. (A)** Área media de los adipocitos blancos del eWAT a las 28 semanas tras la administración intra-muscular de los vectores AAV1-FGF21 o AAV1-Null en ratones machos C57BL/6 con obesidad inducida por la dieta HFD. **(B)** Distribución de frecuencia del área de los adipocitos en los mismos grupos experimentales. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  EEM. n=9-10 por grupo experimental. \*P<0.05, \*\*P<0.01 y \*\*\*P<0.001 versus el grupo inyectado con vectores nulo.

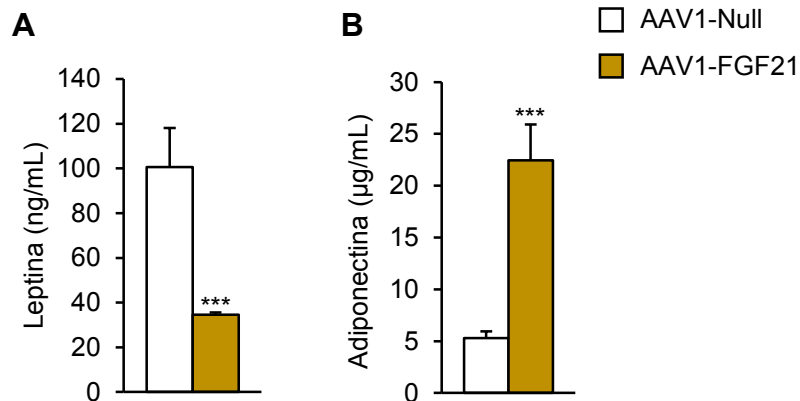
Para valorar el grado de inflamación que presentaba el eWAT de los animales tratados, se realizó un análisis inmunohistoquímico contra MAC2, el cual demostró la reversión de la inflamación inducida por la dieta HFD en los animales tratados con AAV1-FGF21 (Figura 61A). Paralelamente, los niveles de expresión de los marcadores de macrófagos *F4/80* y *Cd68* también estaban disminuidos en los animales obesos que sobreexpresaban FGF21 en el músculo esquelético (Figura 61B y C).



**Figura 61. Evaluación de la inflamación del tejido adiposo blanco epididimal.** Ratones machos C57BL/6 obesos se trataron con AAV1-FGF21 o AAV1-Null a las 20 semanas de edad. **(A)** Cortes histológicos con tinción inmunohistoquímica contra MAC2 (marrón) en eWAT. Niveles de expresión de *F4/80* **(B)** y *Cd68* **(C)** 28 semanas post-AAV medido mediante RT-PCR. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  EEM. FC, *Fold change*.  $n=9-10$  por grupo experimental. \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$  y \*\*\* $P<0.001$  versus el grupo inyectado con vectores nulo.

De acuerdo con la reducción de la adiposidad y la hipertrofia del eWAT, la administración intramuscular de AAV1-FGF21 en animales obesos fue capaz de reducir los niveles circulantes de leptina (Figura 62A) y aumentar los de adiponectina (Figura 62B) respecto al grupo control. Estos niveles circulantes de ambas adipocinas en los animales AAV1-FGF21 contribuirían muy probablemente a una

reducción de la inflamación y una mejora de la homeostasis de la glucosa (Ikuni et al., 2008; Klöting et al., 2010; Stern et al., 2016).

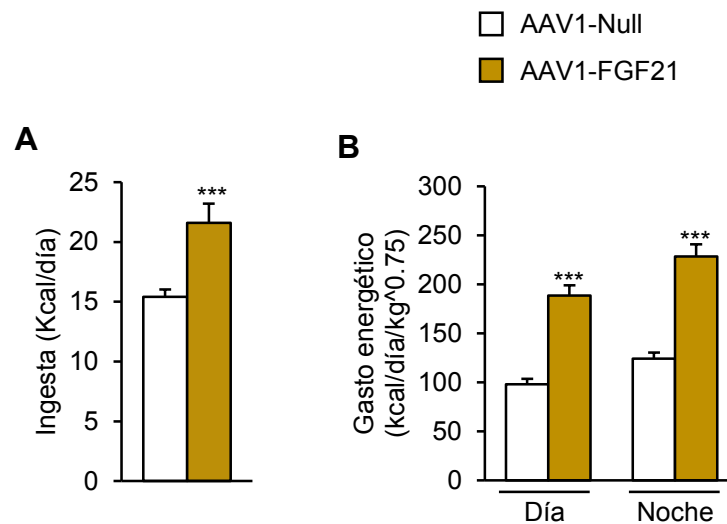


**Figura 62. Determinación de los niveles circulantes de leptina y adiponectina.** Niveles circulantes de leptina (A) y adiponectina (B) 28 semanas post-AAVs en los ratones machos C57Bl/6 con obesidad inducida por la dieta HFD tratados con AAV1-FGF21 o AAV1-Null a las 20 semanas de edad. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  EEM. n=9-10 por grupo experimental. \*P<0.05, \*\*P<0.01 y \*\*\*P<0.001 versus el grupo alimentado con dieta chow inyectado con vectores nulo.

Por tanto, el tratamiento intramuscular de ratones obesos con AAV1-FGF21 no solo fue capaz de disminuir el peso corporal y el peso del eWAT, sino que también revirtió la inflamación inducida por la dieta HFD.

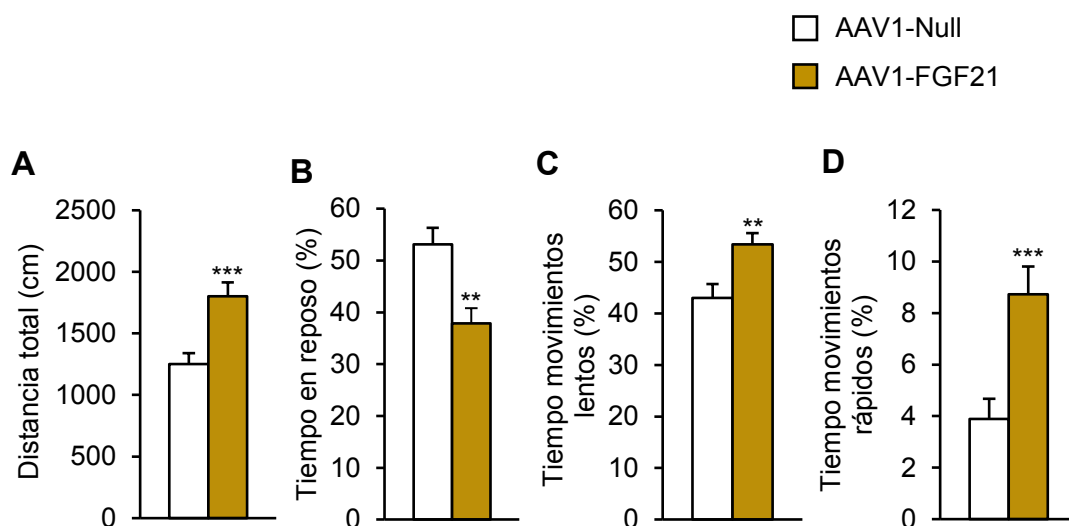
### 3.4. Análisis del gasto energético y el *browning* en el tejido adiposo inducido por el tratamiento de AAV1-FGF21

La disminución del peso de los animales tratados con AAV1-FGF21 no fue debida a una reducción de la ingesta, ya que incluso estos animales comían más respecto al grupo control (Figura 63A). Esta hiperfagia observada en los animales tratados con los vectores terapéuticos correlacionaba con la disminución de sus niveles circulantes de leptina (Figura 62A). Dado que la reducción del peso corporal podría ser debida a un incremento del gasto energético en los animales tratados con FGF21, se realizó un análisis de calorimetría indirecta a las 44 semanas de edad para determinar el gasto energético. La calorimetría indirecta reveló que los animales tratados con AAV1-FGF21 en el músculo esquelético mostraban un aumento muy significativo del gasto energético respecto al grupo control, tanto durante el período diurno como nocturno (Figura 63B).



**Figura 63. Análisis de la ingesta y del gasto energético de los animales.** (A) Medida de la ingesta diaria de los ratones macho C57Bl/6 obesos tratados con AAV1-FGF21 o AAV1-Null en kilocalorías por día. (B) Análisis del gasto energético mediante calorimetría indirecta 24 semanas post-AAV de los mismos animales. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  EEM. n=9-10 por grupo experimental. \*P<0.05, \*\*P<0.01 y \*\*\*P<0.001 versus el grupo inyectado con vectores nulo.

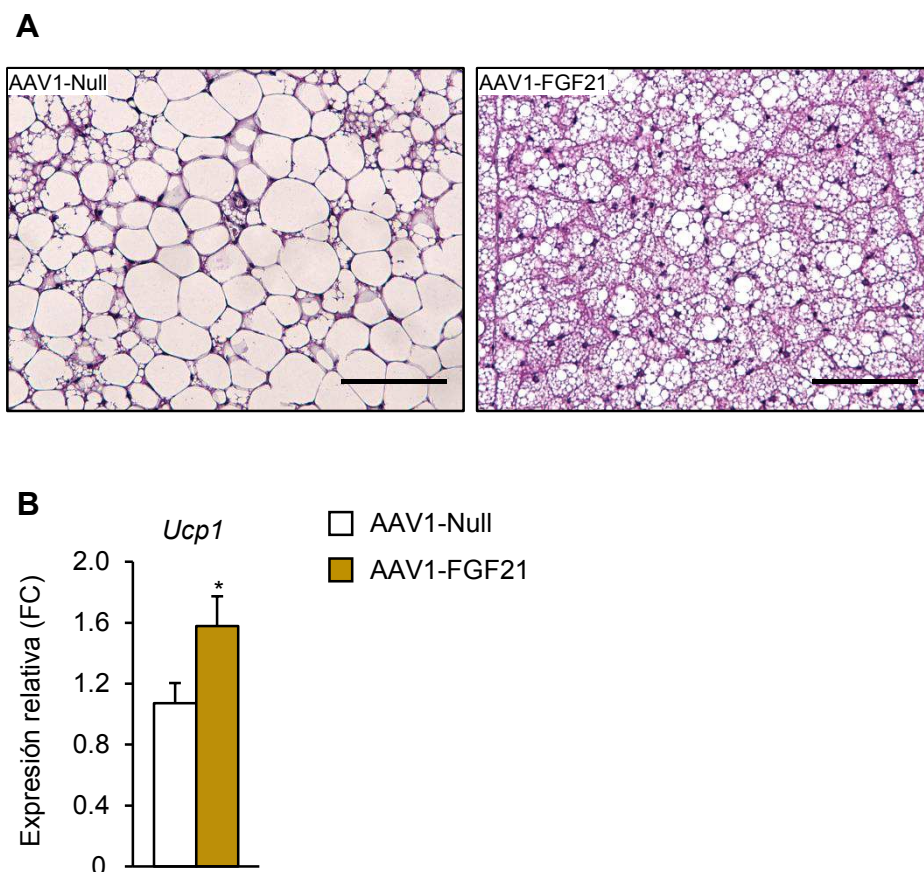
El tratamiento intramuscular con AAV1-FGF21 de los animales obesos no solo aumentó su gasto energético sino que también incrementaron su actividad locomotora (Figura 64A-D). Los animales tratados con AAV1-FGF21 recorrían una mayor distancia, permanecían menos tiempo en reposo y pasaban más tiempo en movimiento, tanto lento como rápido, respecto a los animales obesos tratados con AAV1-Null (Figura 64A-D). Los resultados de la calorimetría indirecta y la actividad locomotora, estarían de acuerdo con la disminución del peso observado en estos animales.



**Figura 64. Evaluación de la actividad locomotora.** Test del Open-field realizado a ratones machos C57Bl/6 con obesidad inducida por la dieta HFD tratados con AAV1-FGF21 o AAV1-Null. El test se realizó a 28 semanas después de la administración de los vectores AAVs. (A) Distancia total recorrida. (B) Tiempo en reposo. (C) Tiempo en movimientos lentos. (D) Tiempo en movimientos rápidos. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  EEM. n=9-10 por grupo experimental. \*P<0.05, \*\*P<0.01 y \*\*\*P<0.001 versus el grupo inyectado con vectores nulo.

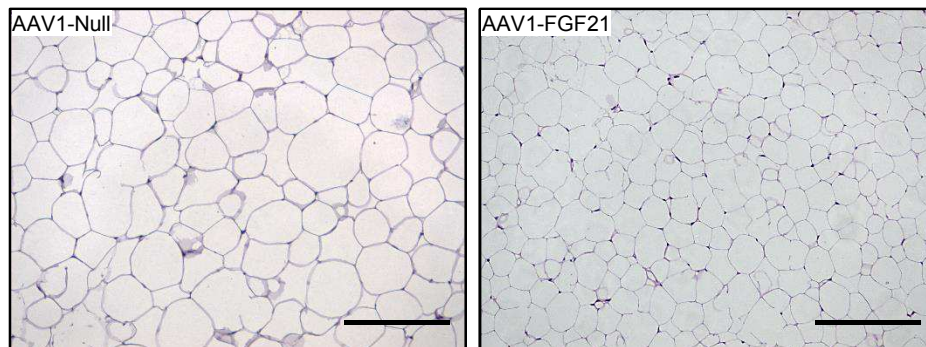


Dado que el iBAT y el iWAT son los principales tejidos responsables del aumento de la termogénesis no asociada al temblor y, por tanto, del aumento del gasto energético, se realizaron análisis histológicos de ambos tejidos. Mientras que la dieta alta en lípidos incrementó el depósito de grasa en el iBAT en los ratones obesos control, mostrando un aspecto más típicamente de tejido adiposo blanco, los animales tratados con AAV1-FGF21 fueron capaces de revertir este acúmulo de lípidos (Figura 65A). Para confirmar el aumento de la termogénesis no asociada al temblor, se analizaron los niveles de expresión de *Ucp1* mediante RT-PCR. El aumento en la expresión de *Ucp1* en el iBAT observado en los animales tratados con AAV1-FGF21 indicaba un marcado aumento de la termogénesis no asociada al temblor en este tejido (Figura 65B).



**Figura 65. Análisis histológico y del gasto energético en el tejido adiposo marrón. (A)** Imágenes representativas de cortes histológicos con tinción de hematoxilina/eosina del iBAT en los ratones machos C57BL/6 con obesidad inducida por la dieta HFD se trataron con AAV1-FGF21 o AAV1-Null a las 20 semanas de edad. Escala: 200 $\mu$ m. **(B)** Niveles de expresión de *Ucp1* en iBAT 29 semanas post-AAV. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  EEM. n=9-10 por grupo experimental. \*P<0.05, \*\*P<0.01 y \*\*\*P<0.001 versus el grupo inyectado con vectores nulo.

En cuanto al iWAT, mientras que los animales tratados con vectores nulo presentaban adipocitos hipertróficos, el tratamiento con AAV1-FGF21 disminuyó de manera significativa el tamaño de los adipocitos en el iWAT (Figura 66). Sin embargo, no se observó la presencia de adipocitos multiloculares (*browning*) en el iWAT en ninguno de los animales tratados con AAV1-FGF21, indicando que el tratamiento no había inducido *browning* en este tejido.



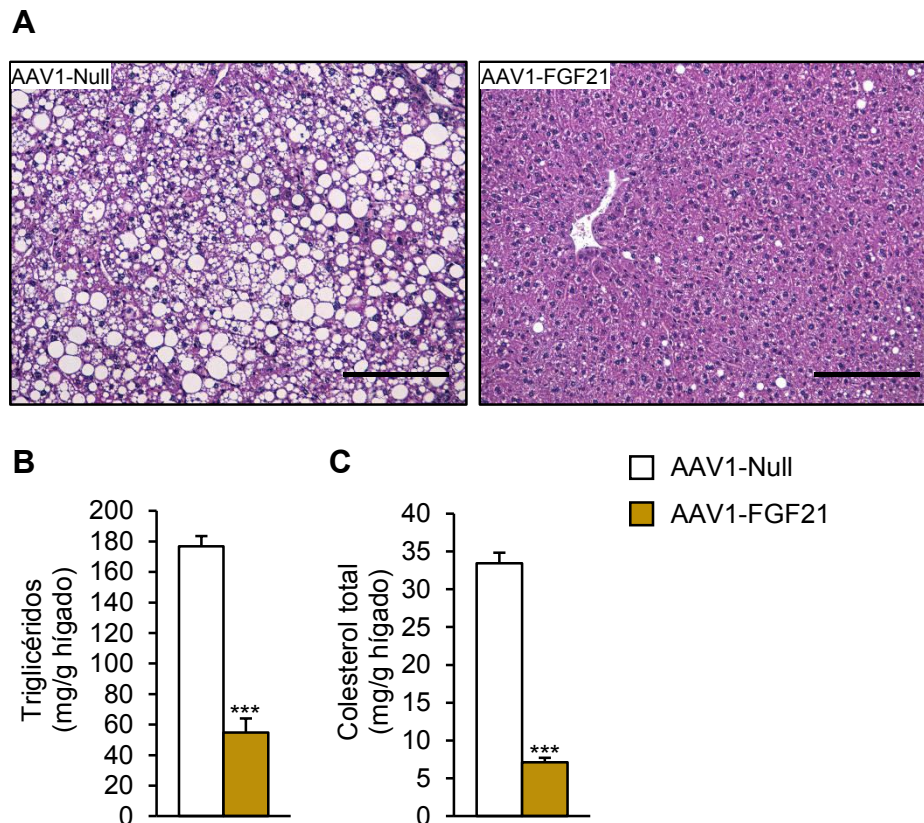
**Figura 66. Análisis histológico del tejido adiposo blanco inguinal. (A)** Imágenes representativas de cortes histológico con tinción de hematoxilina/eosina del iWAT en los ratones machos C57BL/6 con obesidad inducida por la dieta HFD y tratados con AAV1-FGF21 o AAV1-Null a las 20 semanas de edad. Escala: 100µm.

### 3.5. Reversión de la esteatosis, la inflamación y la fibrosis hepática inducida por la dieta alta en lípidos

Para evaluar si la sobreexpresión de FGF21 en el músculo esquelético en animales obesos era capaz de revertir la acumulación ectópica de grasa en el hígado inducida por la dieta HFD, se realizó un análisis histológico del hígado. Mientras que los animales control tratados con AAV1-Null mostraron una hepatoesteatosis muy marcada, el tratamiento con AAV1-FGF21 revertió este fenotipo, confiriendo al hígado el aspecto de un animal en dieta Chow (Figura 67A).

Paralelamente, se analizaron los niveles hepáticos de triglicéridos y de colesterol. Los animales tratados con AAV1-Null mostraban niveles muy elevados tanto de triglicéridos como de colesterol, mientras que los animales tratados con AAV1-FGF21 revirtieron de forma muy marcada ambos niveles (Figura 67B y C).





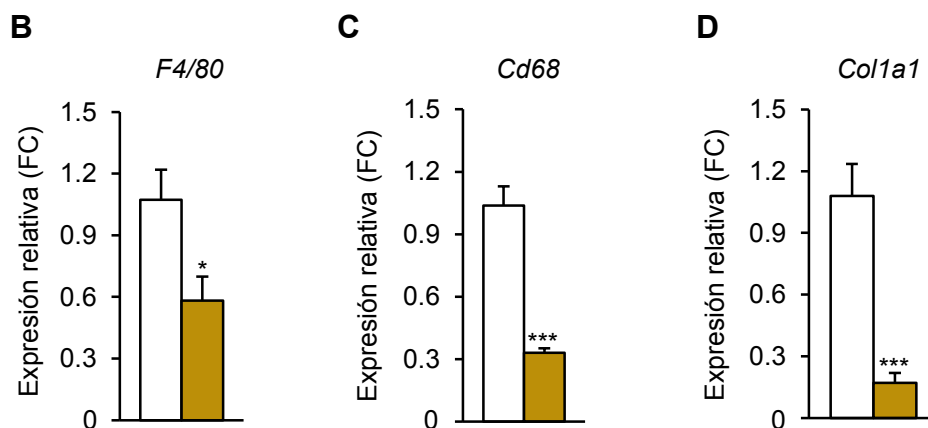
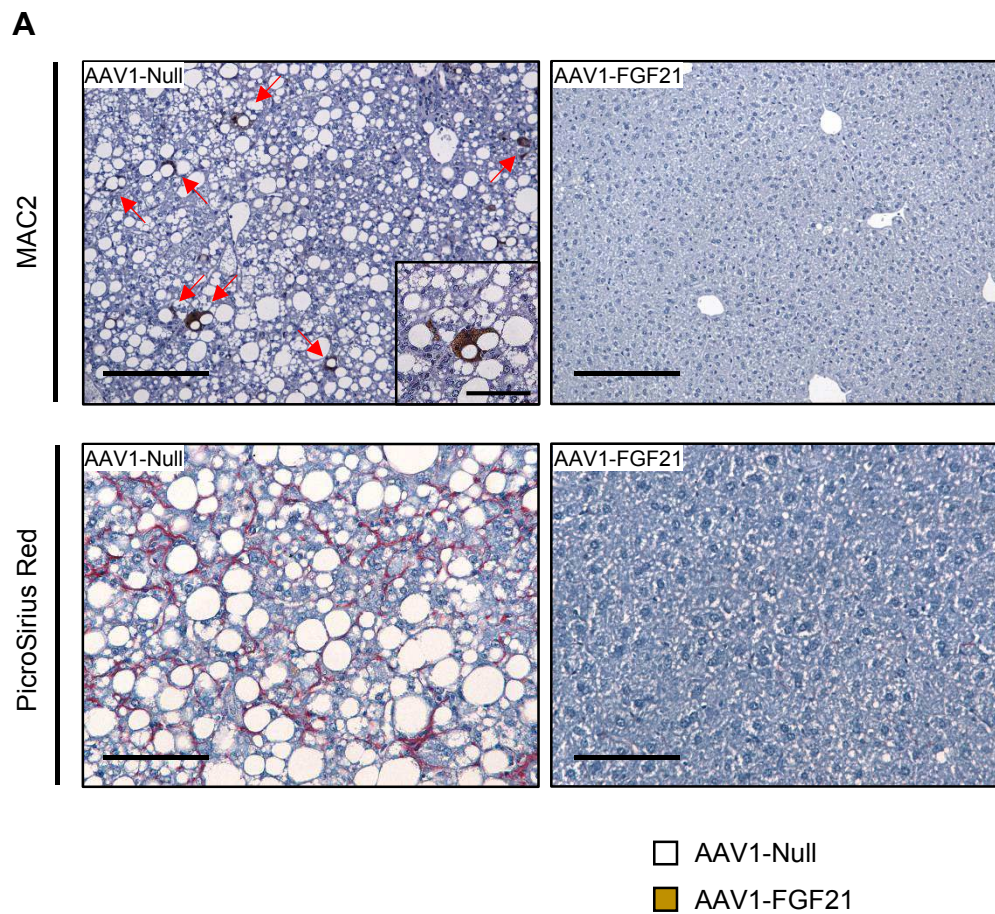
**Figura 67. Análisis histológico y contenido de triglicéridos y colesterol en hígado.** (A) Imágenes representativas de cortes histológicos con tinción de hematoxilina/eosina de hígado en los ratones machos C57BL/6 obesos tratados con AAV1-FGF21 o AAV1-Null a las 20 semanas de edad. Escala: 100 $\mu$ m. (B) Contenido hepático de triglicéridos y colesterol 28 semanas post-AAV. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  EEM. n=9-10 por grupo experimental. \*P<0.05, \*\*P<0.01 y \*\*\*P<0.001 versus el grupo inyectado con vectores nulo.

Posteriormente, a partir de cortes histológicos de hígado se realizaron un análisis inmunohistoquímico contra MAC2 (*Galectin-3*) para valorar el grado de inflamación y una tinción *PicroSirius Red* para analizar la fibrosis, así como un análisis de la expresión génica de *F4/80*, *Cd68* y *Col1a1*. El análisis inmunohistoquímico contra MAC2 demostró que los animales tratados con AAV1-FGF21 consiguieron revertir la inflamación en el hígado inducida por la dieta alta en lípidos comparado con los animales obesos tratados con vectores nulo (Figura 68A).

Por otro lado, la tinción *PicroSirius Red* permite marcar en color rojo las fibras de colágenos de la matriz extracelular de los tejidos. La acumulación excesiva de fibras de colágeno en el tejido indican la aparición de fibrosis en el mismo (Lattouf et al., 2014). La tinción *PicroSirius Red* a partir de cortes histológicos del hígado mostró que los animales tratados con vectores nulo presentaban una clara inducción de la fibrosis hepática (Figura 68A). Sin embargo, esta fibrosis fue completamente revertida

por el tratamiento con AAV1-FGF21 (Figura 68A). La expresión de los genes marcadores de inflamación, *F4/80* y *Cd68* y el marcador de fibrosis colágeno *Col1a1* en el hígado de los animales tratados con AAV1-FGF21 estaban reducidas respecto al grupo control obeso (Figura 68B-D).

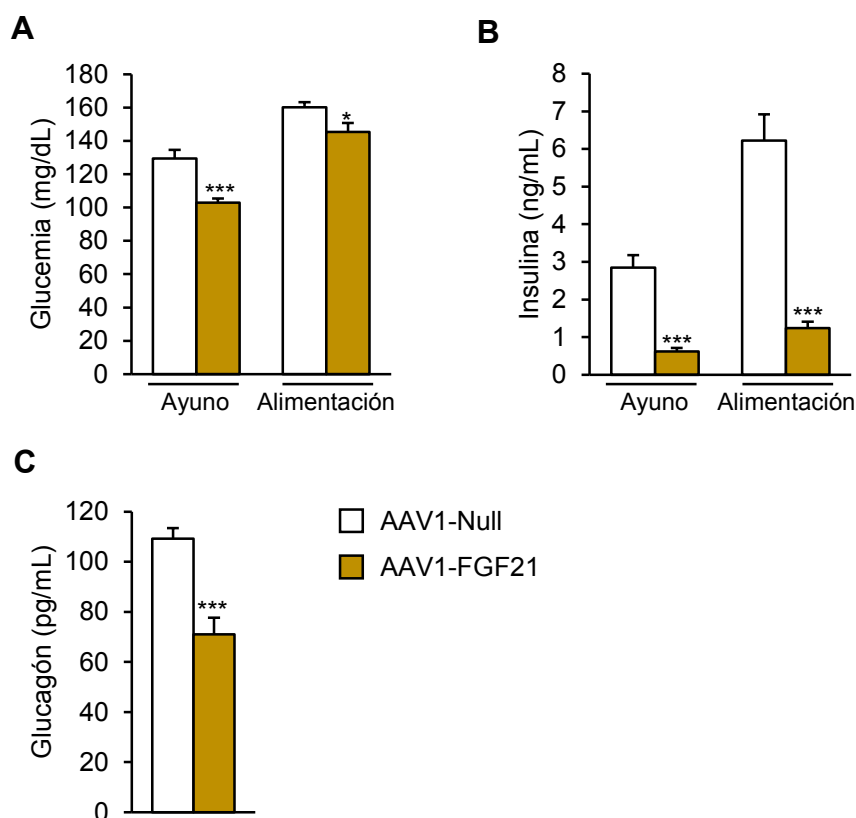
La ingesta de dieta HFD a largo plazo en ratones está asociada al desarrollo de neoplasias en el hígado (Cuadrado et al., 2005; Hill-Baskin et al., 2009). En el momento de la eutanasia de los animales del estudio, se observó una incidencia de tumores hepáticos del 50% (5/10) en los animales tratados con vectores nulo. Por contra, ningún animal (0/9) tratado con AAV1-FGF21 desarrolló dichos tumores, demostrando la eficacia de este tratamiento no solo en la prevención de la hepatoesteatosis, inflamación y fibrosis, sino también en la aparición de tumores hepáticos asociada a la dieta HFD.



**Figura 68. Análisis de la inflamación y la fibrosis en el hígado.** (A) Imágenes representativas de tinción inmunohistoquímica contra MAC2 (marrón) (panel superior) y tinción *PicroSirius Red* (rojo) (panel inferior) a partir de cortes histológicos del hígado en los ratones obesos tratados con AAV1-FGF21 o AAV1-Null. Escala: 40µm y 200 µm respectivamente. (B-D) Niveles de expresión de *F4/80*, *Cd68* y Colágeno 1 (*Col1a1*) 28 semanas post AAV. Los resultados se expresan como la media ± EEM. n=9-10 por grupo experimental. \*P<0.05, \*\*P<0.01 y \*\*\*P<0.001 versus el grupo inyectado con vectores nulo.

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

Dado que la dieta HFD induce resistencia a la insulina, se evaluó la homeostasis de la glucosa para determinar si el tratamiento de AAV1-FGF21 era capaz de revertirla. Pese a que en todo momento los animales control se mantuvieron por debajo de glucemias  $\geq 200$ mg/dL, el tratamiento con AAV1-FGF21 consiguió reducir las glucemias, tanto en alimentación como en ayunas, sin llegar a hipoglucemia (Figura 69A). Paralelamente, el tratamiento con AAV1-FGF21 también normalizó la insulinemia, tanto en alimentación como en ayunas, respecto a la hiperinsulinemia que mostraban los animales tratados con los vectores nulo (Figura 69B). Además, los animales tratados con AAV1-FGF21 mostraron menores niveles circulantes de glucagón respecto al grupo control, sugiriendo una disminución de la gluconeogénesis del hígado que contribuiría a la disminución de la glucemia observada (Figura 69C).

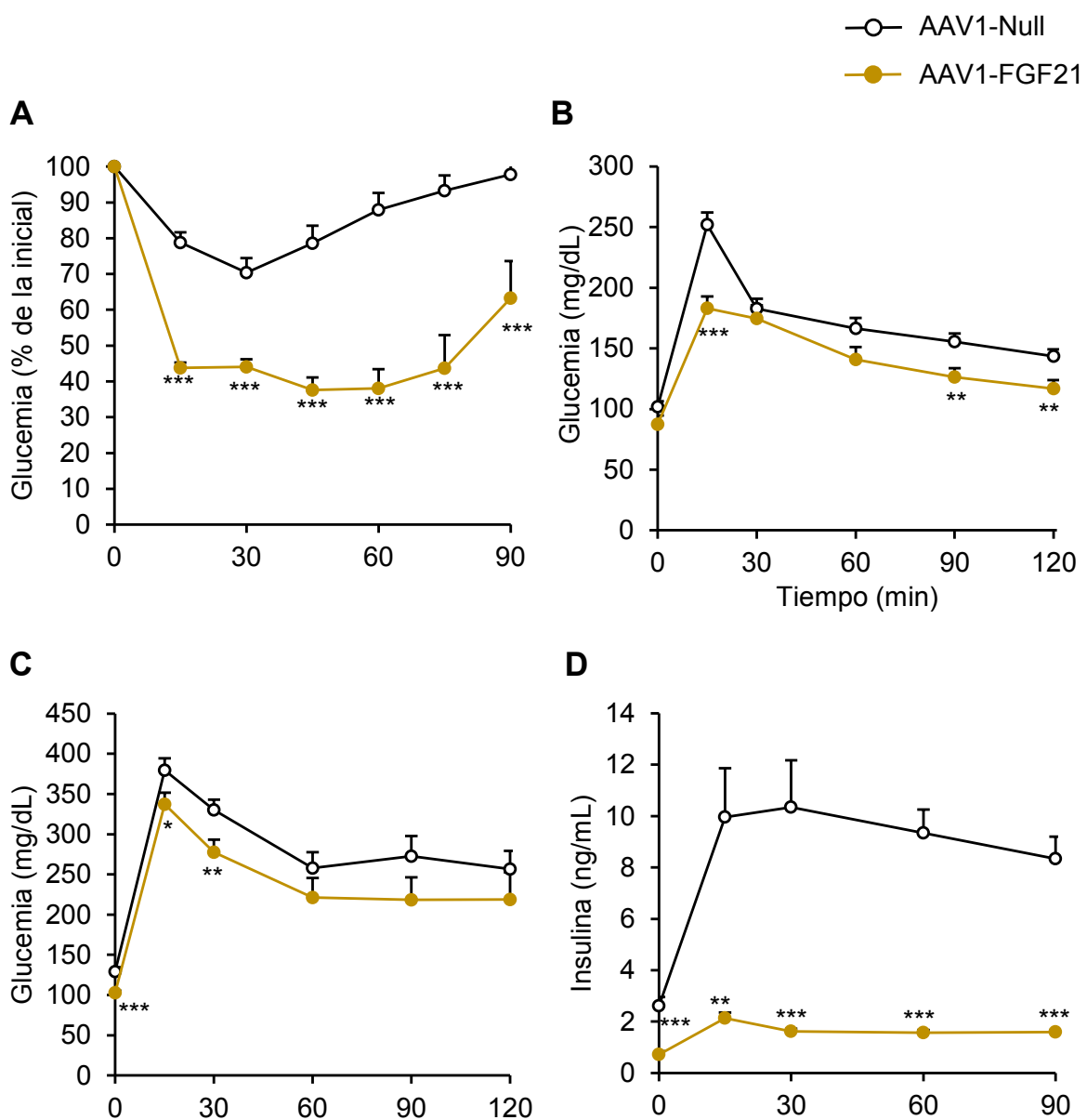


**Figura 69. Determinación de la glucemia, insulinemia y glucagón.** Glucemia (A) e insulinemia (B) en alimentación y en ayunas 7 y 17 semanas post-AAV, respectivamente, en ratones obesos administrados intramuscularmente con AAV1-FGF21 o AAV1-Null. (C) Niveles séricos de glucagón en animales ayunados, tras 12 semanas del tratamiento. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  EEM. n=9-10 por grupo experimental. \*P<0.05, \*\*P<0.01 y \*\*\*P<0.001 versus el grupo inyectado con vectores nulo.

Trascurridas 7 semanas de la administración de los vectores AAV, se realizó un test de tolerancia a la insulina. Los animales tratados con AAV1-Null mostraron una gran resistencia a la insulina, fenotipo revertido por el tratamiento con AAV1-FGF21 (Figura 70A). De manera similar, a las 15 semanas post-administración de los vectores AAV, los animales tratados con vectores nulo mostraron una marcada intolerancia a la glucosa, tras un test de tolerancia a la glucosa utilizando una dosis de 1 g de glucosa/kg. Sin embargo, el tratamiento con AAV1-FGF21 fue capaces de revertir esta intolerancia (Figura 70B). Dos semanas más tarde, se obtuvieron resultados similares al repetir el test de tolerancia a la glucosa utilizando una dosis de 2 g de glucosa/kg (Figura 70C).

Cuando se determinaron los valores de insulina en sangre durante la realización del GTT a 2 g de glucosa/kg, mientras que los animales control mostraban niveles muy elevados de insulina circulante para contrarrestar la sobredosis de glucosa administrada, los animales tratados con AAV1-FGF21 presentaron niveles significativamente más bajos (Figura 70D). Por tanto, la administración intramuscular de los vectores AAV1-FGF21 en animales obesos indujo un incremento en la sensibilidad a la insulina y una mayor tolerancia a la glucosa, necesitando menores niveles circulantes de la hormona para responder eficientemente a los cambios en la glucemia.

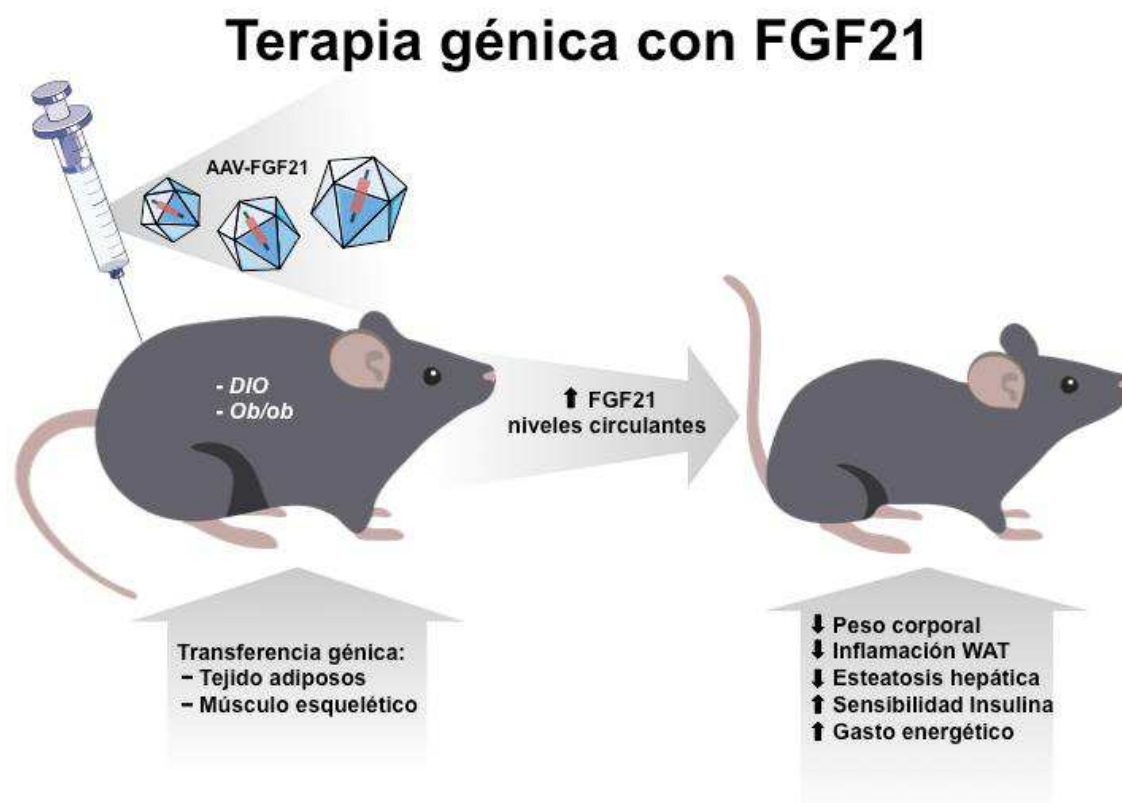
En resumen, el tratamiento con vectores AAV1-FGF21 en el músculo esquelético en ratones con obesidad inducida por la dieta alta en lípidos medió una sobreexpresión de FGF21 en este tejido y un aumento los niveles circulantes de este factor de manera sostenida a lo largo de todo el estudio. Este tratamiento con AAV1-FGF21 revirtió la ganancia de peso, la adiposidad y la hipertrofia del tejido adiposo inducida por la dieta HFD, lo cual no fue debido a la disminución de la ingesta, sino al aumento tanto del gasto energético como de la actividad locomotora de estos animales. El aumento del gasto energético fue debido principalmente a la inducción de la termogénesis no asociada al temblor en el iBAT. Junto con la reducción del peso de todos los tejidos adiposos, se observó una disminución del peso, del acúmulo de grasa, de la inflamación y la fibrosis en el hígado. Finalmente, el tratamiento con AAV1-FGF21 contrarrestó la resistencia a la insulina y la intolerancia a la glucosa inducida por la dieta HFD. Por tanto, la aproximación de terapia génica en el músculo esquelético mediante vectores AAV1-FGF21 representa un nuevo tratamiento para revertir la obesidad y la DT2 inducida por la dieta alta en lípidos.



**Figura 70. Evaluación de la sensibilidad a la insulina y la tolerancia a la glucosa. (A)** Test de tolerancia a la insulina intraperitoneal (ITT) en los ratones machos C57BL/6 con obesidad inducida por la dieta HFD y tratados con AAV1-FGF21 o AAV1-Null, 7 semanas post-AAV. **(B)** Test de tolerancia a la glucosa (GTT) de 1 g/Kg intraperitoneal en ayuno de los mismos animales 15 semanas post-AAV. **(C)** Test de tolerancia a la glucosa (GTT) de 2 g/Kg intraperitoneal en ayuno de los mismos animales 17 semanas post-AAV. **(D)** Niveles de insulinemia durante el GTT de 2 g/kg a 17 semanas post-AAV. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  EEM.  $n=9-10$  por grupo experimental. \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$  y \*\*\* $P<0.001$  versus el grupo inyectado con vectores nulo.



En conclusión, la sobreexpresión de FGF21, tanto en el eWAT como en el músculo esquelético, mediante terapia génica con vectores AAV, permitió aumentar los niveles circulantes de la proteína FGF21 de manera constante y duradera en el tiempo. Este incremento de la proteína circulante permitió prevenir y revertir el desarrollo de la obesidad en modelos murinos de obesidad, induciendo una pérdida de peso corporal, una disminución de la adiposidad e inflamación del tejido adiposo blanco, una disminución de la hepatoesteatosis, un aumento del gasto energético y una mejora de la sensibilidad a la insulina (Figura 71). Por tanto, los datos obtenidos demuestran que el tratamiento con vectores AAV que codifican para FGF21, dirigidos al eWAT o al músculo esquelético, podrían suponer una alternativa terapéutica para la DT2 y la obesidad en un futuro.



**Figura 71. Efectos terapéuticos de la manipulación genética del tejido adiposo y el músculo esquelético mediante vectores AAV codificantes para FGF21 sobre la obesidad y la diabetes tipo 2.** La sobreexpresión de FGF21 mediante vector AAV en el músculo esquelético y el tejido adiposo epididimal en modelos de obesidad inducidos por la dieta (DIO) y en los modelos genéticos *ob/ob* fue capaz de disminuir el peso corporal, aumentar el gasto energético, disminuir la adiposidad y la inflamación del tejido adiposo, revertir la esteatosis hepática y mejorar en la sensibilidad a la insulina en todos los modelos murinos utilizados.

## **V. DISCUSIÓN**





En las últimas décadas, la incidencia de DT2 y obesidad ha incrementado de manera sumamente alarmante. Sin embargo, ninguno de los tratamientos actuales es efectivo y, además, muchos de ellos presentan importantes efectos secundarios. Por ello, es necesario el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas tanto para prevenir como para revertir el desarrollo de DT2 y obesidad. En lo que a esto respecta, el factor de crecimiento fibroblástico 21 (FGF21) se ha postulado como un prometedor agente terapéutico para la DT2 y la obesidad (Kharitononkov and DiMarchi, 2015).

Los estudios realizados en esta tesis doctoral han permitido demostrar que la ingeniería genética del tejido adiposo epididimal (eWAT) mediante una única administración de vectores AAVs codificantes para FGF21 es capaz de prevenir y revertir la obesidad y la resistencia a la insulina. Los vectores AAV de serotipo 8 y 9 utilizados mostraron una elevada eficacia en la transducción del tejido adiposo, mediando un incremento elevado y sostenido en el tiempo de los niveles circulantes de FGF21. Además, cabe destacar que resultados similares a los obtenidos mediante la administración de vectores AAV8 y AAV9 en el tejido adiposo fueron observados cuando se administraron intramuscularmente vectores AAV1 codificantes para FGF21.

La administración de los vectores AAV codificantes para FGF21 en ambas aproximaciones de terapia génica, tanto en ratones con obesidad inducida por la dieta como en ratones *ob/ob*, medió una reducción del peso corporal proporcional a la dosis administrada. La pérdida de peso corporal fue paralela a la disminución del peso de los depósitos adiposos blancos. De acuerdo con la reducción de los depósitos adiposos blancos, se normalizaron los niveles circulantes de adiponectina. Además, a diferencia de los ratones control tratados con vectores AAV-Null, los animales tratados con vectores AAV codificantes para FGF21 no mostraron inflamación en el eWAT. Observaciones similares se han descrito en ratones transgénicos que sobreexpresan FGF21 en el hígado (Tg-FGF21) o en animales tratados con la proteína FGF21 nativa o análogos/miméticos de FGF21 (Adams et al., 2012; Berglund et al., 2009; BonDurant et al., 2017; Coskun et al., 2008; Emanuelli et al., 2014; Foltz et al., 2012; Hale et al., 2012a; Hecht et al., 2012; Li et al., 2018; Markan and Potthoff, 2016; Smith et al., 2013; So and Leung, 2016; Stanislaus et al., 2017; Talukdar et al., 2016; Xu et al., 2009; Zhang and Li, 2015).

Los animales tratados con los AAV-FGF21 en el tejido adiposo o en el músculo esquelético redujeron el peso corporal a pesar de mostrar un aumento de la ingesta. Se ha descrito en la bibliografía que tanto los ratones Tg-FGF21 como ratones

tratados con proteína exógena también muestran un incremento de la ingesta (Coskun et al., 2008; Inagaki et al., 2008; Kharitononkov et al., 2005; Laeger et al., 2017). En paralelo, los ratones tratados con AAV-FGF21 también presentaron mayor actividad locomotora y gasto energético, resultados similares a los descritos por otros autores (Coskun et al., 2008). Los elevados niveles de expresión de UCP1 en el iBAT de los ratones tratados con vectores AAV-FGF21, sugeriría que la termogénesis no asociada a temblor contribuyó en el aumento del gasto energético.

Sin embargo, actualmente existe controversia sobre si se requiere UCP1 para que FGF21 pueda mediar sus efectos metabólicos terapéuticos. Se ha descrito que el tratamiento de ratones *Knock out* para UCP1 aumenta el gasto energético tras la administración de análogos de FGF21 (Véniant et al., 2015). Sin embargo, en otro estudio, ratones *Knock out* para UCP1 tratados con FGF21 no fueron capaces de incrementar la tasa metabólica (Samms et al., 2015). Otros autores han demostrado que después de la extirpación del iBAT en ratones, los efectos terapéuticos de FGF21 siguen manteniéndose (Bernardo et al., 2015; Camporez et al., 2013; Emanuelli et al., 2014). En estos estudios, los efectos de FGF21 sobre el gasto energético siguen manteniéndose debido al incremento de la expresión de *Ucp1* en el iWAT de los ratones tratados con FGF21 (Bernardo et al., 2015). Por todo ello, no se puede descartar que los efectos de FGF21 sobre el gasto energético no sean UCP1-dependientes.

Pese a que se ha descrito que FGF21 es capaz de inducir *browning* (Adams et al., 2013; Douris et al., 2015; Emanuelli et al., 2014; Fisher et al., 2012; Hondares et al., 2010), los animales obesos tratados con AAV-FGF21 en el tejido adiposo o el músculo esquelético no mostraron un incremento de adipocitos multiloculares en el iWAT. Sin embargo, cuando la administración de los vectores AAV se produjo en el mismo momento en el que se inició la dieta alta en lípidos sí que se observó una inducción del *browning* en el tejido adiposo subcutáneo. Resultados similares fueron observados en animales control alimentados con dieta estándar y tratados con miméticos de FGF21 (Véniant et al., 2015). En el citado estudio solo se observó *browning* en ratones control y no en aquellos ratones que presentaban obesidad inducida por la dieta (Véniant et al., 2015). Estos resultados junto con los de esta tesis doctoral sugerirían que el tratamiento con FGF21 no sería capaz de inducir *browning* en el tejido adiposo subcutáneo disfuncional debido a la obesidad y la inflamación asociada (Guilherme et al., 2008; Hajer et al., 2008; Muir et al., 2016), mientras que los adipocitos blancos plenamente funcionales de los animales sanos sí que serían

capaces de responder (Wernstedt Asterholm et al., 2014). La ausencia en nuestro estudio de *browning* en el iWAT de ratones obesos tratados con AAV-FGF21, junto con resultados similares en ratones y primates obesos tratados con análogos de FGF21 (Talukdar et al., 2016; Véniant et al., 2015), sugeriría que el *browning* del iWAT no es uno de los principales mecanismos responsables de los efectos anti-obesogénicos de FGF21.

Estudios recientes han demostrado la existencia de mecanismos alternativos a la termogénesis no asociada al temblor mediada por UCP1, como el ciclo fútil de la creatina, por los que el tejido adiposo podría mejorar la homeostasis energética (Nedergaard et al., 2001; Nicholls et al., 1978). Tanto en la aproximación de terapia génica en la que se modificó genéticamente el tejido adiposo epididimal como en la que se modificó el músculo esquelético, el tratamiento con vectores AAV codificantes para FGF21 incrementó la expresión de Phospho1, principal regulador del ciclo fútil de la creatina (Kazak et al., 2015). Así, mecanismos independientes de UCP1 también contribuirían al aumento del gasto energético mediado por el tratamiento con los vectores AAV-FGF21.

La esteatohepatitis no alcohólica (NASH) es una de las principales comorbilidades de la obesidad en humanos, además de estar estrechamente relacionada con la resistencia a la insulina en el hígado (Birkenfeld and Shulman, 2014; DeFronzo, 2004; McGarry, 2002). El tratamiento con AAV-FGF21 en el eWAT y en el músculo esquelético fue capaz de revertir la esteatosis hepática así como la inflamación y fibrosis en ambos modelos de obesidad evaluados. Además, el tratamiento con AAV-FGF21 redujo de manera significativa los niveles hepáticos de triglicéridos y de colesterol. De manera similar, los ratones transgénicos que sobreexpresa FGF21 específicamente en el hígado también mostraron una disminución del contenido de triglicéridos en el hígado (Zhang et al., 2012).

Como resultado del fenotipo observado en el tejido adiposo blanco y marrón y en el hígado, los ratones tratados con los vectores AAV-FGF21 mostraron una mejora muy importante en la sensibilidad a la insulina, evidenciada por la normalización de la hiperinsulinemia, la mayor tolerancia a la glucosa y un aumento en la respuesta hipoglucemiante de la insulina exógena administrada. De manera similar, los efectos beneficiosos del tratamiento farmacológico con FGF21 sobre la mejoría de la sensibilidad a la insulina se han descrito previamente tanto en ratones, ratas y primates (Adams et al., 2013; Berglund et al., 2009; Camporez et al., 2013;

Charoenphandhu et al., 2017; Emanuelli et al., 2014; Hale et al., 2012b; Kharitonov et al., 2007; Stanislaus et al., 2017). Sin embargo, los estudios preclínicos llevados a cabo en pacientes humanos obesos con análogos de FGF21, no han sido capaces de demostrar una reducción de la glucemia pese a que sí que se ha observado una mejora de la insulinemia en ayuno (Gaich et al., 2013). Por tanto, quedaría por determinar si el incremento de los niveles circulantes sostenidos de FGF21 mediante aproximaciones de terapia génica, serían capaces de mejorar la glucemia y la sensibilidad a la insulina en pacientes humanos obesos.

El envejecimiento y el consumo crónico de dietas altas en grasas son dos factores altamente relacionados con la aparición de tumores, especialmente en el hígado (Park et al., 2010; Sun and Karin, 2012; Tang et al., 2012; Zinger et al., 2017). La transferencia génica mediante vectores AAV codificantes para FGF21 al músculo esquelético fue capaz de prevenir la aparición de neoplasias hepáticas inducidas por la dieta alta en lípidos en comparación con los animales tratados con los vectores AAV nulo. La prevención de los hepatocarcinomas inducidos por la dieta alta en lípidos, también ha sido recientemente descrita mediante la administración de vectores AAV que codificaban para FGF21 en el hígado (Jimenez et al., 2018). Resultados similares fueron observados en ratones Tg-FGF21 o mediante el tratamiento con proteína recombinante FGF21, debido a que estos tratamientos retrasaron la aparición de hepatocarcinomas inducidos químicamente (Huang et al., 2006; Xu et al., 2015)

Un punto muy importante a destacar sobre las aproximaciones de terapia génica con vectores AAV codificantes para FGF21 en las que se modifica el tejido adiposo o el músculo esquelético, es que una vez que el peso de los animales tratados se normalizó, éste se mantuvo estable y no continuó descendiendo. Además, la administración de vectores AAV codificantes para FGF21 en ratones control alimentados con dieta estándar también demostró ser segura, debido a que estos animales no entraron en caquexia incluso cuando los niveles circulantes de FGF21 fueron mucho más elevados que los niveles que mediaron la normalización del peso y la reversión de la resistencia a la insulina en animales obesos.

Por otra parte, cabe destacar que la administración de vectores AAV1 codificantes para FGF21 en el músculo esquelético medió un envejecimiento más saludable de los animales control, lo que se evidenció por el mantenimiento del peso corporal, una menor adiposidad, niveles de triglicéridos en hígado disminuidos y mejora de la resistencia a insulina mediada por la edad. En este sentido, efectos

similares sobre el peso corporal, los niveles séricos y hepáticos de triglicéridos y la sensibilidad a la insulina fueron observados en ratones transgénicos que sobreexpresan FGF21 en el hígado de aproximadamente 30 meses de edad (Zhang et al., 2012).

El potencial de FGF21 para el tratamiento de la obesidad y la resistencia a la insulina ha llevado a la industria farmacéutica a desarrollar miméticos y análogos de la proteína FGF21 endógena con mejoras en sus propiedades farmacocinéticas (So and Leung, 2016; Zhang and Li, 2015). La terapia génica supone una alternativa muy atractiva frente a estas moléculas sintéticas. En primer lugar, permite alcanzar niveles terapéuticos sostenidos de la proteína de interés mediante una única administración. Además, las aproximaciones de terapia génica permiten administrar vectores que codifican la proteína nativa, la cual es reconocida por el sistema inmunitario como proteína propia, por lo que no despierta respuesta inmunológica a diferencia de los análogos/miméticos. También, la utilización de la proteína FGF21 nativa evita posibles activaciones de vías de señalización celulares inespecíficas. Los vectores AAV, a diferencia de otros vectores virales utilizados en terapia génica, no están asociados a ninguna patología en humanos y poseen baja inmunogenicidad y un excelente perfil de seguridad (Mingozzi and High, 2011a). Estas características han hecho especialmente atractiva la utilización de estos vectores virales en numerosos ensayos clínicos *in vivo* (Colella et al., 2018). En especial, el músculo esquelético fue el órgano diana del primer tratamiento de terapia génica aprobado en Europa, Glybera®. Este tratamiento se basaba en la administración intramuscular de vectores AAV1 codificantes para la lipoproteína lipasa (LPL) para el tratamiento de la deficiencia de la lipoproteína lipasa hereditaria (Scott, 2015). Pero además de esta aproximación, el músculo esquelético es un órgano diana ampliamente utilizado en aproximaciones de terapia génica tales como la miopatía miotubular ligada al cromosoma X (Childers et al., 2014), la deficiencia de la  $\alpha$ -antitripsina (Flotte et al., 2011), la distrofia muscular Limber-Girdler tipo 2 (Mendell et al., 2009), la distrofia muscular de Duchenne (Braun et al., 2014; Wang et al., 2007), la hemofilia B (Cohn et al., 2007) y la diabetes tipo 1 (Callejas et al., 2013; Jaén et al., 2017; Mas et al., 2006).

En nuestro laboratorio previamente se ha demostrado que la ingeniería genética del hígado mediante AAVs codificantes para FGF21, al igual que la ingeniería genética del tejido adiposo epididimal y el músculo esquelético con vectores AAV codificantes para FGF21, consigue aumentar los niveles circulantes de esta hormona y con ello, revertir la DT2 y la obesidad en diferentes modelos murinos (Jimenez et al.,

2018). Gran parte de los pacientes con obesidad muestran una elevada inflamación y fibrosis hepática, que en algunos casos puede desembocar en el desarrollo de cirrosis hepática. Esta condición podría comprometer negativamente la ingeniería genética del hígado mediante los vectores codificantes para FGF21. De hecho, hay estudios que revelan que la inflamación debida a la acumulación ectópica de grasa en el hígado disminuye la transducción de los AAVs (Hösel et al., 2012). Además, la transducción del hígado implica la administración sistémica de vectores virales AAV, por lo que la eficiencia de transducción hepática puede verse comprometida por los anticuerpos neutralizantes preexistentes que algunos pacientes podrían presentar frente a los AAVs (Fitzpatrick et al., 2018). Para este conjunto de pacientes, una posible solución terapéutica podría ser la ingeniería genética del eWAT o del músculo esquelético. Ambas aproximaciones de terapia génica han demostrado mediar el incremento de los niveles circulantes de FGF21 de manera sostenida en el tiempo y alcanzando niveles terapéuticos del mismo. En caso de observarse efecto adverso debido al incremento de los niveles circulantes de FGF21 y con la finalidad de disminuir la expresión de esta proteína en el tejido diana transducido, la extracción parcial de una porción de músculo esquelético o del tejido adiposo serían menos invasivas y presentarían menor riesgo quirúrgico que una hepatectomía parcial. De hecho, se realizan operaciones de liposucción con la finalidad de eliminar la grasa abdominal sobrante de manera rutinaria. La administración local de los AAVs en el músculo esquelético o en el tejido adiposo permitiría minimizar la exposición de los vectores a posibles anticuerpos neutralizantes que puedan presentar los pacientes, así como disminuir el riesgo de despertar una respuesta inmunológica contra los vectores AAVs (Kay, 2011; Manno et al., 2003; Mingozzi and High, 2011b). Pese a que ni el músculo esquelético ni el eWAT presentan la habilidad que posee el hígado de mediar tolerancia hacia el transgén (Mingozzi et al., 2003), en el caso de la terapia génica con vectores AAV-FGF21 no se requeriría ya que la proteína expresada es una proteína endógena por lo que no es necesario crear tolerancia hacia ella.

En conclusión, en esta tesis doctoral se ha demostrado que la ingeniería genética del tejido adiposo y del músculo esquelético mediante vectores AAV codificantes para FGF21 permitió prevenir y revertir la obesidad y la DT2 en modelos murinos obesos y de resistencia a la insulina. Además, el tratamiento con AAV-FGF21 en animales control promovió que estos animales envejecieran de manera más saludable. Estos resultados proporcionan las bases para la traslación clínica de estas aproximaciones de terapia génica para el tratamiento de la DT2, la obesidad y sus comorbilidades asociadas en humanos en el futuro.

## **VI. CONCLUSIONES**





1. La administración de vectores AAV9-FGF21 en el eWAT al inicio de la alimentación con una dieta alta en lípidos resultó en un incremento de los niveles circulantes de FGF21 y una prevención del desarrollo de obesidad y resistencia a la insulina.
2. Este tratamiento también incrementó el gasto energético a través de la inducción del browning del iWAT y la termogénesis no asociada al temblor en el iBAT.
3. La administración intra-eWAT del vector AAV8-FGF21 en ratones genéticamente obesos ob/ob fue capaz de revertir la obesidad y la resistencia a la insulina.
4. Los elevados niveles circulantes de FGF21 en animales ob/ob revirtieron la hipertrofia e inflamación del tejido adiposo, así como la esteatosis, inflamación y fibrosis del hígado.
5. Los ratones ob/ob que sobreexpresaban FGF21 en el eWAT mostraron un aumento del gasto energético mediado por el incremento en el iBAT de la termogénesis no asociada al temblor.
6. El incremento de los niveles circulante de FGF21 tras la administración intra-eWAT en ratones ob/ob normalizó la hiperinsulinemia e incrementó la sensibilidad a la insulina y la tolerancia a la glucosa.
7. Cuando se estudió el efecto de la sobreexpresión de FGF21 mediada por vectores AAV1 en el músculo esquelético de ratones sanos, se observó un incremento de los niveles circulantes de FGF21 y una prevención de la ganancia de peso y resistencia a la insulina asociados a la edad.
8. El tratamiento intramuscular con vectores AAV1-FGF21 fue capaz de revertir la obesidad y resistencia a la insulina inducidas por la dieta alta en lípidos en ratones.

9. Los elevados niveles circulantes de FGF21 mediados por la sobreexpresión de FGF21 en el musculo de ratones obesos fueron capaces de revertir la hipertrofia e inflamación del tejido adiposo, así como la esteatosis, inflamación y fibrosis del hígado. Además, este tratamiento previno el desarrollo de hepatocarcinomas inducidos por el consumo crónico de una dieta alta en lípidos.
10. Los ratones obesos tratados con AAV1-FGF21 intramuscularmente mostraron un aumento del gasto energético mediado por el incremento en el iBAT de la termogénesis no asociada al temblor.
11. El tratamiento intramuscular con AAV1-FGF21 fue capaz de normalizar la hiperinsulinemia e incrementó la sensibilidad a la insulina y la tolerancia a la glucosa inducida por el consumo crónico de una dieta alta en lípidos.
12. En conclusión, los resultados obtenidos en esta tesis doctoral constituyen las bases para la futura traslación clínica de las aproximaciones de terapia génica basadas en la modificación del tejido adiposo o del músculo esquelético con AAV-FGF21 para el tratamiento de la DT2 y la obesidad en humanos.

## **VII. MATERIALES Y MÉTODOS**



## 1. MATERIALES

### 1.1. Animales

En los estudios de esta tesis doctoral se utilizaron ratones machos consanguíneos de la cepa C57BL/6JOlaHsd de 8 semanas de edad y ratones B6.V-Lepob/OlaHsd (*ob/ob*) de 11 semanas de edad (Envigo, Barcelona, España). Los animales se estabularon en una instalación libre de patógenos (SER-CBATEG, UAB) y se mantuvieron en condiciones controladas de temperatura ( $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$ ), luz (ciclos de luz-oscuridad de 12 h) y humedad y se alimentaron *ad libitum* con una dieta estándar (*2018S Teklad Global Diets*®, Envigo, Madison, Wisconsin, EEUU) o una dieta alta en lípidos (*TD.88137 Teklad Diets*, Envigo).

Antes de la toma de muestras, los animales se anestesiaron mediante anestesia inhalatoria (Isoflorano, IsoFlo®, *Abbott Animal Health*, Illinois, EEUU) y eutanasiaron por decapitación. Las muestras de tejidos se obtuvieron por la mañana e inmediatamente se conservaron en formaldehído al 4% ( $\text{CH}_2\text{O}$ , pH 7) (Panreac, Barcelona, España) o se congelaron en nitrógeno líquido ( $\text{N}_2$ ) para posteriormente guardarlas a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Las muestras de sangres se centrifugaron a  $12000\text{ g}$  durante 10 min y el suero obtenido se mantuvo a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta la determinación de parámetros circulantes. Todos los procedimientos experimentales se realizaron bajo la legislación vigente y aprobados por el Comité de Ética y de Experimentación Animal y Humana de la Universitat Autònoma de Barcelona (UAB).

### 1.2. Cepas bacterianas

Se utilizó la cepa *E.coli XL2Blue* (*Agilent Technologies*, Santa Clara, CA, EEUU) para obtener y amplificar los dos plásmidos utilizados en este trabajo. Dado que todos los plásmidos contenían el gen de selección de resistencia a la ampicilina, los cultivos bacterianos se crecieron en medio LB (*Miller's LB Broth*, Conda, Madrid, España) con un 2% de agar y  $50\text{ }\mu\text{g/mL}$  de ampicilina.

### 1.3. Anticuerpos

Las muestras de los diferentes tejidos estudiados se fijaron en una solución tamponada de formol al 4% y se incluyeron en bloques de parafina. Posteriormente se obtuvieron secciones de 2-3  $\mu\text{m}$  para la realización de las incubaciones con los anticuerpos correspondientes. Los anticuerpos que se utilizaron para la detección de proteínas mediante técnicas inmunohistoquímicas fueron los que se indican en la Tabla 3.

Tabla 3. Listado de anticuerpos.

	Reactividad	Especie	Proveedor (referencia)
<b>Inmunohistoquímica</b>			
Anti-Mac2	Ratón	Rata	Cederlane (CL8942AP)
Anti-rata (IgG)	Rata	Conejo	Dako (E0467)
Anti-UCP1	Ratón	Conejo	Abcam (ab10983)
Anti-conejo (IgG)	Conejo	Cabra	Invitrogen (31820)

### 1.4. Reactivos

Los reactivos utilizados en las técnicas de biología molecular fueron suministrados por *Roche (Roche Diagnostics Corp. IN, EEUU)*, *Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, EEUU)*, *Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, EEUU)*, *Amersham Biosciences (Piscataway, NJ, EEUU)*, *Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EEUU)*, *Promega Corporation (Madison, WI, EEUU)*, *BASF (Barcelona, España)*, *Qiagen (Hilden, Alemania)* y *MP Biomedicals (Irvine, CA, EEUU)*. Los medios de cultivo y los antibióticos se obtuvieron en *PAA (Paschin, Austria)* y el suero (FBS) y *F68 Pluronic® de Gibco (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific)*.

### 1.5. Plásmidos

Para la generación de los plásmidos de interés, el plásmido comercial pMA-moFgf21, que contenía la secuencia murina con optimización de codón para FGF21, fue obtenido en *GeneArt (Invitrogen, Alemania)*. Los plásmidos generados y utilizados en este estudio se resumen en la Tabla 4.

Tabla 4. Listado de plásmidos generados.

Nombre	Promotor	Gen de interés	PolyA
pAAV-CAG-moFgf21-dmirT	CAG	moFgf21- miRT122a miRT1	$\beta$ -globina de conejo
pAAV-CAG-Null	CAG	-	$\beta$ -globina de conejo
pAAV-CMV-moFgf21	CMV	moFgf21	SV40
pAAV-CMV-Null	CMV	-	SV40

mo, secuencia murina con optimización de codón; CAG, *CMV early enhancer/chicken  $\beta$ -actin promoter*; CMV, *human cytomegalovirus immediate early enhancer and promoter*; miRT122a miRT1, secuencia diana para los microRNAs 122a y 1; SV40, señal de poliadenilación del *simian virus 40*.

El promotor CAG es un promotor híbrido formado por el promotor de la  $\beta$ -actina de pollo y el *enhancer* del citomegalovirus, el cual media una expresión fuerte y ubicua del transgen. El promotor del citomegalovirus humano o CMV también media una fuerte expresión de manera ubicua.

Las estrategias utilizadas en la generación de los plásmidos se resumen en la Tabla 5.

Tabla 5. Estrategias para la obtención de los plásmidos de interés.

Nombre		Estrategia de clonaje	Origen
<b>pAAV-CAG-moFgf21-dmirT</b>	Vector	pAAV-CAG-eGFP-dmirT digerido con NheI y HincII	CBATEG
	Inserto	pMA-moFgf21 digerido con NheI y SmaI	Comercial
<b>pAAV-CAG-Null</b>		CBATEG	CBATEG
<b>pAAV-CMV-moFgf21</b>	Vector	pAAV-CMV-int-hIns digerido con Sall y extremos romos	CBATEG
	Inserto	pMA-moFgf21 digerido con NheI y NotI	Comercial
<b>pAAV-CMV-Null</b>		CBATEG	CBATEG

mo, secuencia murina con optimización de codón; CAG, *CMV early enhancer/chicken  $\beta$ -actin promoter*; CMV, *human cytomegalovirus immediate early enhancer and promoter*; eGFP, *enhanced Green Fluorescent Protein*; hINS, gen de la insulina humana; dmiRT, secuencia diana para los microRNAs 122a y 1; SV40, señal de poliadenilación del *simian virus 40*.



## 2. MÉTODOS

### 2.1. Técnicas básicas de DNA

#### 2.1.1. Preparación del DNA plasmídico

Para la obtención de pequeñas cantidades de DNA plasmídico (3-4 µg) se realizaron mini preparaciones (minipreps) según el protocolo de lisis alcalina originariamente descrito por Birnboim (Birnboim and Doly, 1979). Para ello, las bacterias con el DNA plasmídico se cultivaron en 3 mL del medio de cultivo LB y el antibiótico adecuado (ampicilina), durante 12-16 h a 37°C. A partir de 1.5 mL del medio crecido, se precipitaron la bacterias y se resuspendieron en una solución RNAsa/TE (TrisHCl 50 mM, EDTA 10 mM, pH 8). A continuación, se procedió a la lisis alcalina (200 mM NaOH, 1% SDS) seguida de la precipitación selectiva del DNA genómico y proteínas desnaturalizadas con una solución de acetato de potasio a pH ácido (3 M KAc pH 5.5). Durante la obtención del DNA plasmídico, el RNA bacteriano se degradó por la adición de la enzima RNAsa (100 µg/ml).

Para obtener grandes cantidades de DNA, se realizaron maxi preparaciones (maxipreps, a partir de las cuales se obtienen como máximo 1 mg de plásmido), mega preparaciones (megapreps, para obtener un máximo de 2.5 mg de plásmido) o giga preparaciones (gigapreps, para obtener un máximo de 12 mg de plásmido), a partir de 200, 500 o 1500 mL de medio de cultivo respectivamente. El método de extracción de DNA en grandes cantidades también está basado en la lisis alcalina, aunque en estos casos, la purificación del DNA se realizó a través de las columnas de absorción *GeneJET Endo-Free Plasmid Maxiprep Kit (Thermo Scientific)* para las maxi preps y las columnas *Endo-Free Plasmid Mega Kit* o *Endo-Free Plasmid Giga Kit (Qiagen, Thermo Fisher Scientific)* para la mega o gigapreps respectivamente.

#### 2.1.2. Digestión del DNA plasmídico con enzimas de restricción

Cada enzima de restricción requiere unas condiciones específicas de pH, fuerza iónica y temperatura para asegurar la correcta digestión del DNA. En todas las digestiones enzimáticas se siguieron las instrucciones comerciales (*Fermentas, Thermo Fisher Scientific*). El DNA se digirió con una unidad de enzima por cada µg de DNA a digerir en el tampón suministrado por el fabricante durante una hora a la temperatura óptima de cada enzima. En los casos en los que el DNA plasmídico debía

ser digerido por dos enzimas de restricción, las digestiones se llevaron a cabo conjuntamente siempre que las condiciones de tampón y temperatura fueran compatibles. En cambio, si las enzimas presentaban requerimientos diferentes, tras la primera digestión el DNA se precipitaba para purificarlo de sales y las enzimas utilizadas. Para la precipitación de DNA digerido se añadió el doble del volumen de etanol absoluto (C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>O) y 10% del volumen de AcNa 3 M pH 5.2 para posteriormente centrifugarlo a máxima velocidad. Tras eliminar el sobrenadante, se añadió etanol al 70% para facilitar la resuspensión del pellet de DNA y se volvió a centrifugar a máxima velocidad. Finalmente, se eliminó el sobrenadante y el pellet fue resuspendido en el volumen adecuado de agua. Una vez el DNA digerido con la primera enzima fue precipitado, se volvió a digerir con la segunda reacción enzimática.

El DNA digerido fue sometido a electroforesis a través de un gel de agarosa al 1 o 2%, según el tamaño de las bandas esperadas, se cortó la banda de interés y se purificó mediante el *kit GeneJET® Gel Extraction (Thermo Fisher Scientific)* siguiendo las instrucciones del fabricante. El DNA fue eluído en 30 µL de tampón de elución y cuantificado en el espectrofotómetro *Nanodrop 1000 (Thermo Fisher Scientific Inc., EEUU)*.

### **2.1.3. Generación de extremos romos de fragmentos de DNA**

En los casos en los que se necesitaran extremos romos para el clonaje y la digestión con la enzima de restricción produjera extremos cohesivos, el fragmento digerido fue tratado con el *kit Klenow Fragment ((1U/µl), Fermentas)*. El kit contiene la enzima *Klenow* que mantiene la actividad polimerasa 5'→3' y la actividad exonucleasa 3'→5', pero ha perdido la actividad exonucleasa 5'→3'. Así, en presencia de una doble cadena de DNA y de deoxinucleótidos trifosfatos (dNTPs), la *Klenow* genera los extremos del DNA romos.

### **2.1.4. Desfosforilación de los fragmentos de DNA**

Una vez digerido y purificado, si los extremos del DNA plasmídico lineal eran compatibles, éstos podían volver a religar. Esto representaba un grave contratiempo especialmente en el caso del fragmento de DNA contuviera la resistencia al antibiótico, generalmente el procedente del plásmido vector. Para evitarlo fue necesario realizar una desfosforilación para eliminar los residuos fosfatos del extremo 5'. Para la desfosforilación se utilizó una unidad de fosfatasa alcalina por cada 1-5 µg de DNA

(*FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase* (1 U/μl), *Fermentas*) en su tampón comercial al 1X. La reacción de desfosforilación se realizó durante 10 min a 37°C siguiendo el protocolo comercial. Posteriormente se inactivó la fosfatasa alcalina a 75°C durante 5 min para evitar cualquier reacción de la enzima en la reacción de ligación con el inserto.

### 2.1.5. Ligación: construcción de moléculas híbridas

La ligación de fragmentos de DNA consiste en la construcción de moléculas híbridas de DNA a partir de diferentes fragmentos lineales que se combinan formando un plásmido circular. Se denomina vector al fragmento lineal que contiene la secuencia de DNA que conferirá resistencia a un antibiótico a las bacterias que incorporen el plásmido circular resultante de la ligación. En este trabajo, este vector además contenía las regiones necesarias para la encapsidación del DNA de cadena simple, llamadas *inverted terminal repeats* (ITRs). Por otro lado, se denomina inserto al fragmento lineal que habitualmente contiene el gen y las secuencias reguladores de interés. La ligación puede llevarse a cabo gracias a la acción de la enzima DNA ligasa del bacteriófago T4 (New England Biolabs). Para la ligación, los fragmentos de DNA de interés se añadieron a distintos ratios molares de vector:inserto (1:5, 1:10 y 1:20) con la enzima T4 DNA ligasa y el tampón correspondiente siguiendo el protocolo establecido por el fabricante. Los productos resultantes de la ligación se transformaron en células competentes *E.coli* de la cepa *XL2Blue* (*Agilent technologies*, Santa Clara, CA, EEUU).

Para comprobar si las ligaciones son correctas, se utilizaron tres tipos de controles: control de vector, control ligasa y control inserto (Tabla 6).

**Tabla 6. Controles utilizados en las ligaciones**

Nombre	Control vector	Control ligasa	Control inserto
Vector desfosforilado	X	X	
Inserto			X
Ligasa		X	X
Tampón ligasa	X	X	X
H2O	X	X	X

El control de vector y el control de inserto nos permiten determinar si se realizó correctamente el corte de la banda de interés en el gel de electroforesis y no se arrastró parte del plásmido vector parental. Por otro lado, el control ligasa proporciona información del éxito o no de la desfosforilación del vector. La ausencia de colonias de crecimiento de bacterias transformadas a partir de cada uno de los controles sugiere que la ligación puede haberse dado correctamente. La ausencia de colonias en los controles de vector e inserto demuestra que tanto el DNA vector como DNA inserto están bien linealizados y no contienen la resistencia al antibiótico. En cambio la ausencia de colonias en el control ligasa demuestra que la desfosforilación del DNA vector ha funcionado correctamente y no se ha producido la religación del fragmento lineal que contiene la resistencia al antibiótico.

#### **2.1.6. Transformación en células competentes *E.coli* XL2-blue**

Los productos de la ligación de DNA se introdujeron en bacterias competentes mediante la electroporación de las bacterias. Para ello, se utilizaron 40  $\mu\text{L}$  de bacterias *E.coli* XL2-Blue ( $2 \times 10^{10}$  bacterias/mL) previamente descongeladas en hielo, a las que se les añadió 1  $\mu\text{L}$  (aproximadamente 10 ng) de la reacción de ligación del DNA o de DNA control. Tras una incubación en hielo durante 5 min, las bacterias se electroporaron a 2500 V con un electroporador (Bio-Rad). Posteriormente se diluyeron en 100  $\mu\text{L}$  de LB, se sembraron en placas de LB con ampicilina y se incubaron a 37 °C durante toda la noche.

A la mañana siguiente, en las placas de LB de las ligaciones que contenían más colonias susceptibles de contener el plásmido circular resultante, se picaron las colonias, utilizando una punta de pipeta, y se cultivaron en minipreps. Posteriormente se extrajo el DNA de las minipreps y se comprobó el DNA que habían incorporado las bacterias.

#### **2.1.7. Separación y visualización de fragmentos de DNA**

El gel de agarosa utilizado en la electroforesis es el método estándar utilizado para separar, identificar y purificar fragmentos de DNA. Para separar fragmentos de DNA de entre 0.2 y 7 Kb se usaron geles de agarosa al 1%. Los geles de agarosa se prepararon disolviendo agarosa en tampón de electroforesis 1X TAE (Trisacetate pH 8.3, 40 mM y EDTA 1 mM). Las muestras se cargaron en el gel con 1X de tampón de carga (Fermentas) y se corrieron con el tampón de electroforesis 1X TAE a 80 V.

La visualización del DNA en el gel se consiguió mediante la adición de bajas concentraciones de bromuro de etidio fluorescente al gel (0.5 µg/mL), el cual se intercala entre las hélices del DNA. La presencia de DNA se visualizó utilizando luz ultravioleta (UV) de baja longitud de onda (310 nm) a través de un transiluminador y un sistema de cámaras (*Syngene*). Como marcador de tamaño molecular de DNA se utilizó el *GeneRuler* 1 Kb y el *GeneRuler* 100 pb (*Thermo Scientific*).

## **2.2. Células eucariotas en cultivo**

### **2.2.1. Células HEK293**

Las células *Human embryonic kidney cells* 293 (HEK293) son células embrionarias de riñón humano que se utilizaron para comprobar *in vitro* la expresión de los plásmidos generados. Además, este tipo celular es el utilizado en la producción de vectores virales AAV. Las células HEK293 se mantuvieron en medio de cultivo DMEM (PAA) con 2 mM de glutamina y suplementado con suero fetal bovino (FBS) al 10% (inactivado por calor) en un incubador ajustado a 37°C y al 8.5% de CO<sub>2</sub>. Cuando las células alcanzaron una confluencia del 70% se tripsinizaron y se plaquearon a diferentes diluciones para continuar con su mantenimiento en cultivo hasta su utilización.

### **2.2.2. Transfección de las células en cultivo con DNA**

Para analizar la expresión *in vitro* de los constructos generados, se transfectaron los plásmidos pAAV-CAG-moFGF21-dmirT, pAAV-CAG-Null, pAAV-CMV-moFGF21 y pAAV-CMV-Null en células HEK293. Se utilizó la técnica de transfección con lipofectamina (Lipofectamine™2000, Invitrogen) basada en la formación de un complejo hidrofóbico lipofectamina-DNA que favorece la entrada del DNA en la célula. Se utilizó una proporción de lipofectamina/DNA de 10 µL de lipofectamina (1 mg/mL) por 4 µg de DNA para placas de cultivo de 6 pozos. Para una óptima transfección, las células HEK293 se transfectaron cuando estaban al 70-80% de confluencia. El cultivo de las células transfectadas finalizó a las 24-48 h post-transfección para el análisis de las muestras.

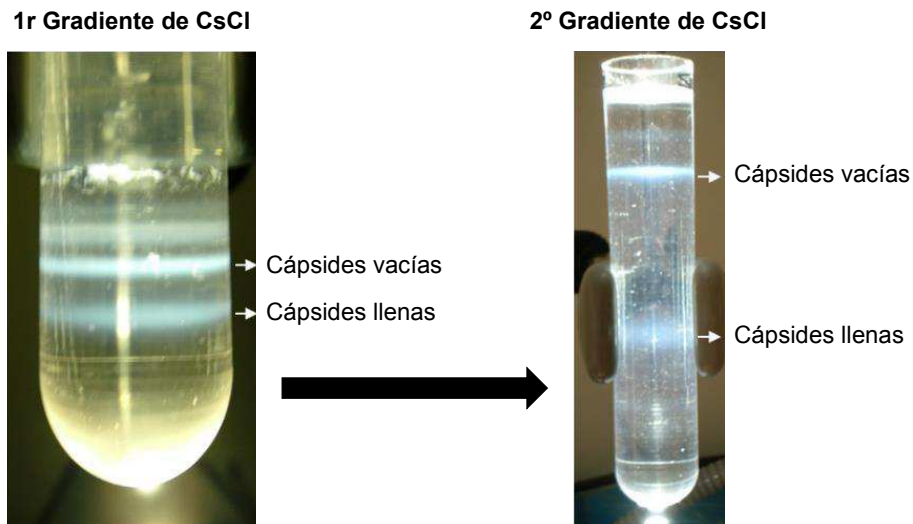
## 2.3. Producción, purificación y titulación de vectores virales adenoasociados

### 2.3.1. Producción y purificación

Las partículas infectivas de vectores virales AAV1, AAV8 y AAV9 de cadena simple se generaron en cultivos celulares HEK293 cultivados en Roller Botllles (RB) (*Greinner Bio-One*) mediante un protocolo de triple transfección (Ayuso et al., 2010). Estas celulares HEK293 contienen el gen adenoviral E1 del adenovirus 5 integrado de forma estable en el genoma celular. Las células se cultivaron en RB hasta que alcanzaron el 80% de confluencia en medio DMEM suplementado con el 10% de FBS + 1% Penicilina/Estreptavidina. Entonces, cada RB se co-transfectó con 30 mL de fosfato cálcico con 150 µg de cada uno de los siguientes plásmidos: 1) pAAV-CAG-moFGF21-dmirT o pAAV-CAG-Null o pAAV-CMV-moFGF21 o pAAV-CMV-Null; 2) un plásmido de empaquetamiento pREP/CAP que codificaba para los genes AAV Rep2 y Cap1, Cap8 o Cap9 (según si usábamos el plásmido con Cap1, *Cap8* o *Cap9* generaremos vectores AAV1, AAV8 o AAV9 respectivamente); y 3) un plásmido auxiliar adenoviral denominado pWEAD que contenían los genes codificantes para las funciones auxiliares de los adenovirus. Los plásmidos pREP/CAP y pWEAD fueron proporcionados por la Dra. K.A. High, del Children's Hospital of Philadelphia, EEUU y se amplificaron en Plasmid Factory.

Tres días después de la co-transfección, las células se recogieron y centrifugaron a 2.500 g durante 15 min a 4 °C. El medio fue guardado a 4 °C y el pellet celular se reconstituyó en TMS (50 mM TrisHCl, 150 mM NaCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 8.0) y se sonicó para lisar las células y liberar los vectores de su interior. El lisado fue centrifugado a 2.500 g durante 30 min y el sobrenadante resultante se añadió al medio de cultivo previamente guardado a 4°C. A continuación, las partículas virales se precipitaron mediante una incubación de 15 h en PEG 8000 al 8% (*Sigma*) a 4°C. Pasado dicho periodo, los vectores se precipitaron por centrifugación a 4.000 g durante 30 min. El nuevo pellet, que contenía los vectores virales procedentes tanto del medio de cultivo como del lisado celular, se reconstituyó con TMS, se trató con benzonasa (*Merck*) durante 1 h a 37°C y finalmente se centrifugó a 10.000 g durante 10 min. El sobrenadante resultante se cargó en tubos de 37,5mL *Ultra clear* (*Beckman*) que contenían un gradiente discontinuo de CsCl de densidad 1,5 (5 ml) y 1,3 g/mL (10 mL). A continuación, se centrifugaron a 27.000 rpm durante 17 h en un rotor SW32T (*Beckman*). Las bandas que contenían los vectores (Figura 72) se recogieron con agujas de 18 G y

se transfirieron a tubos *Ultra clear* de 12,5 ml. El resto del tubo de 12.5 ml se llenó con CsCl a 1,379 g/ml para generar un gradiente continuo (Figura 72). Estos tubos se centrifugaron a 38.000 rpm en un rotor SW40Ti (*Beckman*) durante 48 h. Finalmente, los AAVs que han encapsidado el transgén se recogen y dializan con PBS + 0.001% Plurónico® F68 mediante una membrana de 10 kDa (*Slide-A-Lyzer Dialysis Products*, Pierce) y posteriormente se filtraron mediante filtros de 0.22  $\mu\text{m}$  (*Millipore*).



**Figura 72. Purificación de los vectores AAVs.** Imagen representativa del primer gradiente de CsCl. Este permite separar los vectores que contienen el transgén, de la mayor parte de impurezas y cápsides vacías. El segundo gradiente de CsCl permite separar los AAVs llenos, de impurezas de densidad similar a la de los AAVs llenos, de especies intermedias y de AAVs vacíos. Adaptado de (Ayuso et al., 2010).

### 2.3.2. Titulación de genomas virales por PicoGreen

Los genomas virales de los diferentes lotes de vectores rAAV generados se determinaron mediante *PicoGreen* (*Invitrogen*). La cuantificación o titulación de cada vector se realizó en paralelo con un vector de referencia de concentración conocida para garantizar la validez de los resultados. *PicoGreen* es una sonda fluorescente que tiene una alta sensibilidad al DNA de doble cadena y emite muy poca fluorescencia en presencia de proteínas, DNA de cadena simple o RNA. Para poder medir los genomas virales de los vectores virales con *PicoGreen*, primero las cápsides de los AAV tienen que ser lisadas para que las cadenas simples positivas y negativas encapsidadas dentro de los vectores AAV se junten y formen DNA de doble cadena. Como recta patrón se utilizó un DNA de concentración conocida (*fago lambda*) suministrado por el fabricante.

Con la finalidad de asegurar que el título del vector viral no se sobreestimaba debido a la presencia de DNA contaminante externo a las cápsides en la preparación viral final, se procesó en paralelo el mismo vector sin lisar, para poder restar esta contribución a la obtenida de los genomas virales encapsidados.

A continuación a 2  $\mu\text{L}$  de muestra se le añadieron 8  $\mu\text{L}$  de PBS + 0.001% PF68 y 10  $\mu\text{L}$  de tampón de lisis (20 mM TRIS-HCl; 200mM NaCl, SDS 0.2%; pH: 7.4). Las muestras se incubaron 1 h a 70°C (muestras lisadas). En paralelo se añadió el mismo volumen de muestra a 8  $\mu\text{L}$  de PBS + 0.001% PF68 y 10  $\mu\text{L}$  de TE. Estas muestras se mantuvieron a temperatura ambiente (muestras no lisadas). A los 20  $\mu\text{L}$  de muestras lisadas y sin lisar se les añadieron 180 $\mu\text{L}$  de TE.

En una placa de 96 pozos de color negro se añadió 180  $\mu\text{L}$  de sonda Picogreen 1X diluida en TE a cada pozo. Se añadió por triplicado 20  $\mu\text{L}$  de cada concentración de la recta patrón, 20  $\mu\text{L}$  de muestra con las cápsides lisadas y 20  $\mu\text{L}$  de muestra con las cápsides sin lisar.

La fluorescencia se midió a 535 nm excitando previamente a 485 nm en el fluorímetro Synergy HTX (*BioTek Instrument Inc.*). A la fluorescencia de cada muestra digerida (con los genomas virales formando DNA de doble cadena) se le restó la fluorescencia de la misma muestra sin digerir (correspondiente al *background*). A la fluorescencia del DNA referente se le restó la fluorescencia del TE (*background*).

La concentración de genomas virales por ml se obtuvo interpolando la fluorescencia de la muestra en la regresión lineal obtenida de las diferentes concentraciones del DNA referente y sus respectivas fluorescencias (Tabla 7).

**Tabla 7. Cuantificación final de los genomas virales**

Vector viral	Título (vg/mL)
AAV9-CAG-moFgf21-dmirT	$4.37 \cdot 10^{13}$
AAV9-CAG-Null	$6.85 \cdot 10^{13}$
AAV8-CAG-moFgf21-dmirT	$5.1 \cdot 10^{13}$
AAV8-CAG-Null	$6.26 \cdot 10^{13}$
AAV1-CMV-moFgf21	$5.44 \cdot 10^{13}$
AAV1-CMV-Null	$1.82 \cdot 10^{13}$



### **2.3.3. Cuantificación de las partículas virales por Sypro Ruby Protein Gel Staining**

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

El volumen apropiado del vector de interés y diferentes diluciones del vector de referencia de concentración conocida se mezclaron con el tampón 4X Laemli hasta un volumen final de 20 $\mu$ L. Tras 5 min de ebullición, las muestras se cargaron en un gel al 10% Bis-Tris Gel 1.5 mm de 15 pocillos (*Invitrogen*) y se corrieron a 120 V durante 2 h y 30 min. Las proteínas del gel se fijaron con una mezcla de agua (H<sub>2</sub>O) Milli-Q, Metanol (CH<sub>3</sub>OH) y ácido acético (CH<sub>3</sub>COOH). A continuación, el gel se dejó incubando en 100 ml de *Sypro Ruby Protein Gel Staining* (*Invitrogen*) durante toda la noche. Al día siguiente el gel se lavó con una mezcla de agua (H<sub>2</sub>O) Milli-Q, Metanol (CH<sub>3</sub>OH) y ácido acético (CH<sub>3</sub>COOH) y finalmente solamente agua (H<sub>2</sub>O) Milli-Q. La fluorescencia de las proteínas se detecta con un transiluminador UV.

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

## **2.4. Administración de los vectores virales**

### **2.4.1. Administración local de AAV8 y AAV9 en el tejido adiposo blanco epididimal**

Para la administración de los vectores virales AAV en el eWAT, los ratones se anestesiaron con una inyección intraperitoneal de ketamina (100 mg/Kg) (*Imalgene500*®, *Merial*, Barcelona, España) y xilacina (10 mg/Kg) (*Rompun*®, *Bayer*, Leverkusen, Alemania). Una vez anestesiados se afeitó la zona abdominal de los ratones, y a continuación se realizó una laparotomía con la finalidad de exponer ambos depósitos eWAT. La dosis elegida de vectores AAV8 y 9 se resuspendió en

una solución salina al 0.001% Pluronic F68 (*Gibco, Invitrogen, Life Technologies*) hasta un volumen final de 200  $\mu$ L por animal. Debido al tamaño del eWAT, se realizaron dos administraciones de 50  $\mu$ L a cada depósito adiposo (una cercana al testículo y otra en la zona media del depósito) con una jeringa de 0.5 mL de insulina (*B. Braun, Melsungen, Alemania*) acoplada a una aguja de 30 G. Una vez acabada la administración se añadieron 1-2 gotas de solución salina estéril en el abdomen (*B. Braun, Barcelona, España*) y se suturó la pared abdominal con sutura no reabsorbible (Dafilo blue 4/0 DS24 (G0935344), B. Braun) y la piel con sutura reabsorbible (Safil violet 5/0 DS 12 (G1048507), B. Braun). Tras la cirugía los ratones se mantuvieron en una manta calefactora hasta su total recuperación de la anestesia, evitando así la pérdida de temperatura corporal. Tras la recuperación los animales se estabularon nuevamente en sus jaulas.

#### **2.4.2. Administración local de AAV1 en el músculo esquelético**

Los ratones se anestesiaron con una inyección intraperitoneal de ketamina (100 mg/Kg) (Imalgene500®) y xilacina (10 mg/Kg) (Rompun®) para administrar los vectores AAV1 en el músculo esquelético. Ambas extremidades posteriores se afeitaron para identificar e inyectar fácilmente los músculos *tibialis cranialis*, *gastrocnemius* y *quadriceps femoris*. La dosis elegida de vectores AAV1 se resuspendió en una solución salina al 0.001% Pluronic F68 (*Gibco*) hasta un volumen final de 180  $\mu$ L. Cada ratón fue inyectado con 180  $\mu$ L (30  $\mu$ L por músculo) con una jeringa de 0.5 mL de insulina (*B. Braun*) acoplada a una aguja de 30 G. Los ratones se recuperaron de la anestesia en una manta calefactora para evitar la pérdida de temperatura corporal y posteriormente se estabularon en sus jaulas.

#### **2.5. Determinación del consumo de alimentos**

La ingesta, tanto de dieta estándar como de dieta alta en lípidos, se determinó calculando la media de gramos consumidos al día por jaula, siendo del mismo grupo experimental todos los animales de cada jaula. La cantidad de comida ingerida se obtuvo mediante la diferencia de la cantidad añadida inicialmente y la comida remanente 7 días después. El resultado se expresó como kcal ingeridas al día por animal teniendo en cuenta el aporte calórico de cada tipo de dieta, siendo de 3.348 y 4.5 Kcal/g el valor de la dieta estándar y dieta alta en lípidos respectivamente.

## 2.6. Test de tolerancia a la insulina

Para valorar la sensibilidad a la insulina, los ratones se sometieron a un test de tolerancia a la insulina administrando una sobrecarga de insulina y cuantificando su respuesta hipoglucemiante. Tras retirar la comida a los animales se determinó la glucemia basal a partir de una gota de sangre de la vena de la cola mediante el sistema *Glucometer contour Xt (Bayer)*. A continuación se les administró una dosis intraperitoneal de 0.75 UI de insulina (*Humulin Regular, Eli Lilly*) por Kg de peso del animal. A partir de este momento, se realizaron determinaciones de glucemia a los 15, 30, 45, 60, 75 y 90 min tras la administración de la insulina. Durante este período se privó a los animales de comida y agua. Los resultados se expresaron como porcentaje de los niveles circulantes de glucosa en los diferentes puntos del experimento respecto a los niveles basales previos a la administración de la insulina.

## 2.7. Test de tolerancia a la glucosa

Para valorar la tolerancia a la glucosa se administró una sobrecarga de glucosa a animales ayunados durante 16 h. Previamente a la administración de la glucosa se analizó la glucemia basal y posteriormente se administró una dosis intraperitoneal de 1 o 2 g de glucosa por kg de ratón. A partir de este momento, se determinó la glucemia a los 15, 30, 60 y 90 min tras la administración del azúcar. Durante el test, se privó a los animales de comida o agua. Los resultados de las glucemias se expresaron como mg/dL en los diferentes puntos del test.

## 2.8. Calorimetría indirecta

Para determinar el gasto energético de los ratones se utilizó un circuito calorimétrico abierto (*Oxylet, Panlab, Cornellà, España*) para monitorizar el consumo de oxígeno (O<sub>2</sub>) y la producción de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) simultáneamente en ocho jaulas metabólicas. Los ratones se aclimataron a las cámaras metabólicas durante 24h y se registraron datos durante 3 min a intervalos de 15 min en cada cámara de manera ininterrumpida. Los datos de O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> se determinaron tanto en el ciclo diurno como el nocturno durante otras 24h y los resultados se ajustaron al peso corporal elevado (Peso corporal<sup>0.75</sup>). Para calcular el gasto energético se utilizó el software *Metabolism* proporcionado por el fabricante.

## 2.9. Test de actividad locomotora (*Open-field*)

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

El área donde se situaba a los animales estaba dividida en tres cuadrados concéntricos: centro (14x14 cm), periferia (27x27 cm) y borde (41x41 cm). La actividad motora y exploradora de los animales se evaluó durante los primeros 6 min del test y la distancia total cubierta se determinó mediante un sistema de seguimiento por vídeo (SMART Junior, Panlab).

## 2.10. Determinación de parámetros séricos

La sangre de los animales fue obtenida de la cola (vena caudal), o bien a partir de la decapitación de los ratones al final de los experimentos. Cuando fue necesario obtener suero de la cola de animales en experimentación, la sangre se recogió en tubos capilares no heparinizados (Microvette® CB 300 Z, Sarstedt, Nümbrecht, Alemania) y se dejó reposar durante 1 h a 4 °C. Posteriormente, se centrifugó a 12000 g durante 10 min a 4°C, seguidamente el suero se guardó a -80 °C hasta el momento de la determinación de los diferentes parámetros. Para la obtención del suero de la sangre por decapitación, se utilizaron los tubos *SST™ Tubes* (365968, *BD Microtainer®*) y se procesaron de igual forma que los sueros de cola.

### 2.10.1. Determinación de hormonas

Los niveles de proteína FGF21 circulante se determinaron a partir de 50 µL de suero con el ensayo inmunoenzimático *Mouse/Rat FGF-21 ELISA kit* (MF2100, R&Dsystems) siguiendo las instrucciones del fabricante. El límite de detección máximo

del ensayo es de 2 ng/mL y se realizaron las diluciones pertinentes para que las muestras de todas las dosis se encontrasen dentro del rango de detección.

A partir de 5 µL de suero se determinó la insulina circulante mediante el ensayo inmunoenzimático *Rat Insulin ELISA kit (90010, Crystal Chem)* siguiendo las instrucciones del fabricante. Dado que el nivel de detección máximo es de 10 ng/mL, se realizaron diluciones de la muestra cuando fue necesario. Además de determinarse la insulinemia a tiempo final, también se cuantificó en el GTT a 2 g/kg a tiempo 0, 15, 30 y 60 min.

Los niveles de glucagón se midieron a partir de los sueros de los animales ayunados. Para prevenir la degradación de glucagón a las sangres, se añadió a la sangre 35 µl de aprotinina (250 KUI/mL, Sigma-Aldrich), un inhibidor de proteasas. A partir de 100 µl del suero se determinaron los niveles de glucagón mediante el kit glucagón radioinmunoensayo (RIA) (*Millipore*). Para la cuantificación se utilizó el contador gamma *Packard Cobra II Gamma Counter 5002*.

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

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

### **2.10.2. Determinación de metabolitos**

Los niveles de triglicéridos en suero se determinaron mediante espectrofotometría utilizando el kit comercial *Triglycerides CP (A11A01640 Horiba-ABX, Montpellier, Francia)*. Los niveles de colesterol total en suero se determinaron por espectrofotometría utilizando el kit comercial *Cholesterol CP (A11A01634, Horiba-ABX)*. Todos estos metabolitos se determinaron en un autoanalizador PENTRA 400 (*Horiba-ABX*).

## 2.11. Determinación del contenido de triglicéridos y colesterol total hepáticos

Para determinar los niveles hepáticos de triglicéridos y colesterol total, se obtuvieron extractos lipídicos utilizando una mezcla de cloroformo:metanol (2:1) siguiendo el método de Folch (Folch et al., 1956). Para ello, se pesaron fragmentos congelados de hígado de aproximadamente 100 mg y se homogenizaron en 15 mL de cloroformo:metanol (2:1). Las fases lipídicas y acuosas se separaron mediante la adición de 3 mL de ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) al 0.05% y se mantuvieron durante toda la noche a 4 °C. Una vez separadas las fases, se eliminó la fase superior y se recuperó 1 mL de la fase inferior lipídica en un tubo de cristal de 5 mL. A continuación, se les añadió 1 mL de una solución de cloroformo/Tritón 100X al 1% y se incubaron en un baño a 90°C. Para lavar de impurezas y concentrar la muestra, se añadió cloroformo por las paredes del tubo de cristal y se volvieron a incubar las muestras a 90 °C. Esta operación se repitió hasta tres veces. Una vez se evaporó todo el cloroformo, se resuspendió en 500  $\mu$ L de  $H_2O$  Milli-Q en un baño a 37 °C, y posteriormente se homogenizó totalmente con la ayuda de agitación y una pipeta. Una vez resuspendidos, se determinó la cantidad de triglicéridos y colesterol total de la misma forma que en suero.

## 2.12. Análisis de expresión del mRNA por *real-time PCR*

### 2.12.1. Extracción de RNA mensajero

El RNA mensajero (mRNA) fue obtenido a partir de la homogenización de los diferentes tejidos (*Polytron® MICCRA-KIT D-9, ART Prozess & Labortechnik GmbH & Co. KG, Mullheim, Alemania*) en 1 mL de *QIAzol (QIAGEN)* para los depósitos adiposos o de 1 mL de *Tripure (Roche)* para el resto de tejidos, utilizando un homogenizador. A continuación se siguió el protocolo comercial de purificación de RNA en columnas *RNeasy Mini Kit (QIAGEN)* para extraer el RNA total. Todas las muestras se trataron con DNAsal (*RNase-Free DNase Set*) en las columnas de purificación con la finalidad de eliminar la posible contaminación de DNA genómico. Las muestras fueron eluidas en 30  $\mu$ L de agua destilada libre de RNAsas, menos las de hígado, que al contener gran cantidad de RNA fueron eluidas en 50  $\mu$ L. Finalmente, se determinó la concentración y pureza del RNA extraído determinando la absorbancia a 260nm con un Nanodrop (*ND-1000, Thermo Scientific*).

### 2.12.2. Retrotranscripción de RNA a DNA complementario

En la retrotranscripción del RNA total a DNA complementario (cDNA) se utilizó el kit comercial *Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit* (Roche) y el termociclador *MasterCycler Eppendorf Gradient S* (Eppendorf) siguiendo las instrucciones del fabricante. A partir de 1 µg de RNA y la adición de *Oligo-dT* y hexámeros de oligonucleótidos al azar como *primers* de la reacción se llevó a cabo la primera etapa de incubación (Tabla 8). Una vez finalizada, se añadieron los inhibidores de RNAsas, el tampón de la reacción, los deoxinucleótidos y la transcriptasa reversa, y se procedió a la segunda etapa de incubación (Tabla 8). Una muestra de cada grupo experimental fue utilizada como grupo control negativo de la reacción al no añadirle transcriptasa reversa, para detectar posibles contaminaciones con DNA genómico del RNA extraído. Una vez finalizada la retrotranscripción se diluyeron los cDNAs 1/10 y se congelaron a -20°C.

Tabla 8. Etapas de la reacción de retrotranscripción.

	Temperatura	Tiempo
Primera incubación	65 °C	10 min
	4 °C	Pausa
Segunda incubación	25 °C	15 min
	55 °C	45 min
	85 °C	5 min
	4 °C	Fin

### 2.12.3. PCR cuantitativa a tiempo real

La PCR cuantitativa a tiempo real o *Real-Time PCR* (RT-PCR) es el método más utilizado para el análisis de la expresión del mRNA de diversos genes. Se realizó la RT-PCR para cuantificar la expresión de los genes, listados a continuación con sus respectivos *primers* (Tabla 9), en el *LightCycler® 480* (Roche) utilizando *LightCycler® 480 SYBR Green I Master* (Roche) como reactivo. El SYBR Green I se introduce en la estructura secundaria de la doble hélice del ADN y se acopla energéticamente a los ácidos nucleicos de éste, incrementando notablemente su tasa de emisión fluorescente lo que permitirá su cuantificación.

Tabla 9. Listado de *primers utilizados en la RT-PCR*

Gen	Primer Forward (5'→3')	Primer Reverse (5'→3')
CD68	GGGGCTCTTGGGAACCTACAC	CAAGCCCTCTTTAAGCCCCA
Cidea	CCTACGACATCCGATGCACA	GTATGTGCCCGCATAGACCA
Col1	GACTGGAAGAGCGGAGAGTA	CCTTGATGGCGTCCAGGTT
Dio2	AATTATGCCTCGGAGAAGACCG	GGCAGTTGCCTAGTGAAAGGT
G6Pc	TCTTGTCAGGCATTGCTGTG	ATCCAAGCGCGAAACCAAAC
F4/80	CTTTGGCTATGGGCTTCCAGTC	GCAAGGAGGACAGAGTTTATC
HK1	ACGGTCAAAATGCTGCCTTC	ATTCGTTCTCCGAGATCCA
HK2	TTGCTGAAGGAAGCCATTCCG	TGCTTCCAGTGCCAACAATG
IL-1 $\beta$	TGTAATGAAAGACGGCACACC	TCTTCTTTGGGTATTGCTTGG
moFGF21	CCTAACCAGGACGCCACAAG	GTTCCACCATGCTCAGAGGG
Pck1	TTCTTCAGCTTGCGGATGAC	AAGTTCGTGGAAGGCAATGC
Pgc1 $\alpha$	ATGAATGCAGCGGTCTTAGC	GGACGTCTTTGTGGCTTTTG
Phospho1	AGCTGGAGACCAACAGTTTC	TCCCTAGATAGGCATCGTAGTC
Rplp0	TCCCACCTTGCTCCAGTCT	ACTGGTCTAGGACCCGAGAAG
Slc2a1	TCGGCCTGTTTGTTAATCGC	TAAGCACAGCAGCCACAAAG
Slc2a4	TGCCCGAAAGAGTCTAAAGC	TCCGTTTCTCATCCTTCAGC
UCP1	GGATTGGCCTCTACGACTCAG	TGTAGGCTGCCCAATGAACA

mo, secuencia murina con optimización de codón.

Cada reacción de RT-PCR (LightCycler® 480 SYBR Green I Master, Roche) se realizó en un volumen total de 10  $\mu$ L el cual contenía (Tabla 10):

Tabla 10. Componentes de la reacción SYBR Green.

Reacción SYBR Green
5 $\mu$ L 2X LightCycler480 SYBRGreen I Master
0.2 $\mu$ L primer forward (10 M)
0.2 $\mu$ L primer reverse (10 M)
2.6 $\mu$ L H <sub>2</sub> O Milli-Q
2 $\mu$ L cDNA (dil. 1/10)

Las muestras de cDNA diluido se cargaron por triplicado en placas de 384 pocillos. Una vez cargada la placa se procedió a la reacción de amplificación con el termociclador *LightCycler® 480*. La reacción consistió en una preincubación de 5 min a 95 °C con una variación de temperatura de 4.8 °C/s para una desnaturalización inicial. Posteriormente, se llevaron a cabo 45 ciclos de amplificación en 4 etapas: desnaturalización (10 s a 95°C a 4.8°C/s), *annealing* (10 s a 60 °C a 2.5 °C/s), amplificación (10 s a 72°C a 4.8°C/s) y 30 s a 60°C. Tras la amplificación, se realizó



una curva de desnaturalización del DNA amplificado o *melting* que consta de una rampa de temperatura de 5 s a 95 °C a 4.8 °C/s, seguido de 1 min a 65°C a 2.5 °C/s para terminar en una temperatura de 97°C a 0.11°C/s. Finalmente se produjo un enfriamiento de la placa hasta 4 °C con una variación de temperatura de 2.5 °C/s durante 30s.

Los resultados del termociclador se revisaron e interpretaron con la finalidad de detectar y eliminar posibles errores producidos a la hora de cargar la placa o en el proceso de amplificación. Se calculó la media de las triplicas y su desviación estándar, eliminándose aquellas triplicas que se alejaban de la media una desviación estándar superior a 0.3.

Los resultados obtenidos de la RT-PCR se expresan como *Cycle threshold* o Ct, definida como el ciclo fraccional de PCR en el cual se reporta una fluorescencia superior a la fluorescencia basal. Los datos se normalizaron por las Cts del gen de referencia (o *housekeeping*) *Ribosomal protein lateal stalk subunit P0* (Rplp0) de cada muestra, para cuantificar la expresión relativa de los diferentes genes de interés respecto al gen de referencia. Para ello se utilizó el método delta-delta-Ct ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) descrito por Livak (Livak and Schmittgen, 2001) para realizar los cálculos. En este método, ampliamente utilizado, se asume una duplicación óptima en cada ciclo de RT-PCR con una tasa de amplificación del 100%. Las Cts indican el número de ciclo al que la cantidad del cDNA del gen diana ha amplificado y tanto las muestras de ensayo como las de referencia, se ajustan a las Cts del gen normalizador. El valor resultante sirve para determinar la diferencia de expresión respecto a un grupo control. En el caso de que el grupo control no presentara amplificación de Cts, las Cts del gen de interés se normalizaron directamente con las Cts del *housekeeping* del propio animal obteniendo como resultado unidades arbitrarias del gen de interés.

### **2.13. Análisis histológico**

Inmediatamente tras el sacrificio de los animales, una porción de eWAT, iWAT, iBAT e hígado se fijaron en paraformaldehído al 4% durante 12-24 h para después incluirse en parafina y seccionarse en cortes de 2-3  $\mu\text{m}$  de grosor. Los cortes se desparafinaron mediante 2 lavados con xilol durante 10 min, 2 lavados con etanol 100% 5 min y 2 lavados con etanol 96% 5 min.

### **2.13.1. Tinción con hematoxilina/eosina**

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

### **2.13.2. Determinación del área media de los adipocitos**

A partir de cortes histológicos de eWAT teñidos con hematoxilina/eosina se realizó un estudio morfométrico para cuantificar el área de los adipocitos y determinar su distribución por tamaño. Se tomaron imágenes a 100X de 6 campos de 2 cortes por animal. Mediante el analizador de imágenes *AnalySIS 3.0* (Soft Imaging System, Center Valley, PA, EEUU) se determinó el área en  $\mu\text{m}^2$  de cada adipocito entero presente en el campo. A partir de los datos obtenidos se calculó el área media de los adipocitos por grupo experimental y la distribución por tamaño en un histograma como porcentaje del número total de adipocitos contados por cada categoría de tamaño.

### **2.13.3. Inmunohistoquímica contra Mac-2 y UCP1**

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

En el caso de la inmunohistoquímica de UCP1, las secciones desparafinadas se lavaron con PBS 1X. Posteriormente se hizo un tratamiento enzimático con tampón citrato sódico pH6 en una olla a presión. Después se lavaron otra vez con PBS 1X y se inhibió la peroxidasa endógena con una solución de PBS, etanol ( $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$ ) y peróxido de hidrogeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Después de un tercer lavado con PBS se bloqueó la membrana con *Goat Serum 25%* (Sigma) y avidina (Vector SP-2001) en PBS durante 30 min. Posteriormente se realizó la incubación con el anticuerpo primario contra UCP1

durante toda la noche (apartado 1.3 de Materiales y Métodos, Tabla 3). El día siguiente se hicieron varios lavados con PBS y se procedió a la incubación con el anticuerpo secundario biotinilado durante 1 h. Se rebelaron con el producto comercial *ABC Complex* (*Vector Laboratories Ltd.*). Finalmente las secciones se tiñeron con hematoxilina de Mayer y se montaron para analizarse en el microscopio.

#### **2.13.4. Tinción PicroSirius Red**

Para evaluar la fibrosis hepática se realizó una tinción *PicroSirius Red* la cual tiñe las fibras de colágenos de la matriz extracelular del tejido. Primeramente las muestras desparafinadas se volvieron a rehidratar. Seguidamente se tiñeron con hematoxilina de Weigert durante 10 min. Las muestras se lavaron con agua (H<sub>2</sub>O) para eliminar el exceso de hematoxilina. A continuación se tiñeron con azul alcian pH 2.5 durante 30 min. Volvieron a lavarse las muestras con agua, para finalmente teñirse con PicroSirius (Sigma-Aldrich) durante 1 h y 15 min. Para finalizar se pasaron por *acidified water*, se volvieron a deshidratar y a montar en portaobjetos para analizarse en el microscopio.

#### **2.14. Análisis estadístico**

Los resultados se expresaron como la media  $\pm$  error estándar de la media (EEM). El análisis de los resultados entre los distintos grupos experimentales se realizó mediante el test t de *Student* de datos no emparejados en comparativas de 2 grupos o a través de la tabla ANOVA de dos factores para comparativas de más de 2 grupos. Se consideró que las diferencias eran significativas cuando  $p \leq 0.05$  (intervalo de confianza del 95%).

## **VIII. BIBLIOGRAFÍA**



- Adamczak, M., and Wiecek, A. (2013). The Adipose Tissue as an Endocrine Organ. *Semin. Nephrol.* 33, 2–13.
- Adams, A.C., Astapova, I., Fisher, F.M., Badman, M.K., Kurgansky, K.E., Flier, J.S., Hollenberg, A.N., and Maratos-Flier, E. (2010). Thyroid hormone regulates hepatic expression of fibroblast growth factor 21 in a PPAR $\alpha$ -dependent manner. *J. Biol. Chem.* 285, 14078–14082.
- Adams, A.C., Yang, C., Coskun, T., Cheng, C.C., Gimeno, R.E., Luo, Y., and Kharitonov, A. (2012a). The breadth of FGF21's metabolic actions are governed by FGFR1 in adipose tissue. *Mol. Metab.* 2, 31–37.
- Adams, A.C., Coskun, T., Rovira, A.R.I., Schneider, M.A., Raches, D.W., Micanovic, R., Bina, H.A., Dunbar, J.D., and Kharitonov, A. (2012b). Fundamentals of FGF19 & FGF21 action in vitro and in vivo. *PLoS One* 7, e38438.
- Adams, A.C., Halstead, C.A., Hansen, B.C., Irizarry, A.R., Martin, J.A., Myers, S.R., Reynolds, V.L., Smith, H.W., Wroblewski, V.J., and Kharitonov, A. (2013). LY2405319, an Engineered FGF21 Variant, Improves the Metabolic Status of Diabetic Monkeys. *PLoS One* 8, e65763.
- Ahima, R.S. (2011). Review series introduction Digging deeper into obesity. *J. Clin. Invest.* 121, 2011–2014.
- Al-Dosari, M., Zhang, G., Knapp, J.E., and Liu, D. (2006). Evaluation of viral and mammalian promoters for driving transgene expression in mouse liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 339, 673–678.
- 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 (2011). Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 34 Suppl 1, S62-9.
- American Diabetes Association (2016). Classification and diagnosis of diabetes. *Diabetes Care* 39 (suplem, 13–22.
- American Diabetes Association (2018a). Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes-2018. *Diabetes Care* 41, S13–S27.
- American Diabetes Association (2018b). Lifestyle Management: Standards of Medical Care in Diabetes-2018. *Diabetes Care* 41, S38–S50.
- American Diabetes Association (2018c). Pharmacologic Approaches to Glycemic Treatment: Standards of Medical Care in Diabetes-2018. *Diabetes Care* 41, S73–S85.
- American Diabetes Association (2018d). Obesity Management for the Treatment of Type 2 Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes-2018. *Diabetes Care* 41, S65–S72.
- Amouzou, C., Breuker, C., Fabre, O., Bourret, A., Lambert, K., Birot, O., Fédou, C., Dupuy, A.-M., Cristol, J.-P., Sutra, T., et al. (2016). Skeletal Muscle Insulin Resistance and Absence of Inflammation Characterize Insulin-Resistant Grade I Obese Women. *PLoS One* 11, e0154119.
- Anderson, W. (1998). Human gene therapy. *Nature* 392, 25–30.

- Arner, P., Pettersson, A., Mitchell, P.J., Dunbar, J.D., Kharitonov, A., and Ryde, M. (2008). FGF21 attenuates lipolysis in human adipocytes – A possible link to improved insulin sensitivity. *582*, 1725–1730.
- Aroda, V.R., Edelstein, S.L., Goldberg, R.B., Knowler, W.C., Marcovina, S.M., Orchard, T.J., Bray, G.A., Schade, D.S., Temprosa, M.G., White, N.H., et al. (2016). Long-term Metformin Use and Vitamin B12 Deficiency in the Diabetes Prevention Program Outcomes Study. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 101, 1754–1761.
- Arruda, V.R., Schuettrumpf, J., Herzog, R.W., Nichols, T.C., Robinson, N., Lotfi, Y., Mingozzi, F., Xiao, W., Couto, L.B., High, K.A., et al. (2008). Safety and efficacy of factor IX gene transfer to skeletal muscle in murine and canine hemophilia B models by adeno-associated viral vector serotype 1 Safety and efficacy of factor IX gene transfer to skeletal muscle in murine and canine hemophilia B mode. *103*, 85–92.
- Asayama, K., Hayashibe, H., Dobashi, K., Uchida, N., Nakane, T., Kodera, K., Shirahata, A., and Taniyama, M. (2003). Decrease in Serum Adiponectin Level Due to Obesity and Visceral Fat Accumulation in Children. *Obes. Res.* 11, 1072–1079.
- Ashcroft, F.M., and Rorsman, P. (2012). Diabetes mellitus and the beta cell: The last ten years. *Cell* 148, 1160–1171.
- Astrup, A., Carraro, R., Finer, N., Harper, A., Kunesova, M., Lean, M., Niskanen, L., and Rasmussen, M. (2011). Safety, tolerability and sustained weight loss over 2 years with the once-daily human GLP-1 analog, liraglutide. *Int. J. Obes.* 36, 843–854.
- Ayuso, E., Mingozzi, F., and Bosch, F. (2010a). Production, purification and characterization of adeno-associated vectors. *Curr. Gene Ther.* 10, 423–436.
- Ayuso, E., Mingozzi, F., Montane, J., Leon, X., Anguela, X.M., Haurigot, V., Edmonson, S.A., Africa, L., Zhou, S., High, K.A., et al. (2010b). High AAV vector purity results in serotype- and tissue-independent enhancement of transduction efficiency. *Gene Ther.* 17, 503–510.
- 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 Metab.* 5, 426–437.
- Badman, M.K., Koester, A., Flier, J.S., Kharitonov, A., and Maratos-Flier, E. (2009). Fibroblast Growth Factor 21-Deficient Mice Demonstrate Impaired Adaptation to Ketosis. *Endocrinology* 150, 4931–4940.
- Balakrishnan, B., and Jayandharan, G.R. (2014). Basic Biology of Adeno-Associated Virus (AAV) Vectors Used in Gene Therapy. *Curr. Gene Ther.* 14, 86–100.
- Barbatelli, G., Murano, I., Madsen, L., Hao, Q., Jimenez, M., Kristiansen, K., Jacobino, J.P., De Matteis, R., and Cinti, S. (2010). The emergence of cold-induced brown adipocytes in mouse white fat depots is determined predominantly by white to brown adipocyte transdifferentiation. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 298, E1244–53.
- Basu, S., Yoffe, P., Hills, N., and Lustig, R.H. (2013). The Relationship of Sugar to Population-Level Diabetes Prevalence: An Econometric Analysis of Repeated Cross-Sectional Data. *PLoS One* 8.

- Beenken, A., and Mohammadi, M. (2009). The FGF family: biology, pathophysiology and therapy. *Nat. Rev. Drug Discov.* 8, 235–253.
- Bennett, J., Wellman, J., Marshall, K.A., McCague, S., Ashtari, M., DiStefano-Pappas, J., Elci, O.U., Chung, D.C., Sun, J., Wright, J.F., et al. (2016). Safety and durability of effect of contralateral-eye administration of AAV2 gene therapy in patients with childhood-onset blindness caused by RPE65 mutations: a follow-on phase 1 trial. *Lancet* 388, 661–672.
- Berglund, E.D., Li, C.Y., Bina, H.A., Lynes, S.E., Michael, M.D., Shanafelt, A.B., Kharitononkov, 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.
- Bernardo, B., Lu, M., Bandyopadhyay, G., Li, P., Zhou, Y., Huang, J., Levin, N., Tomas, E.M., Calle, R.A., Erion, D.M., et al. (2015). FGF21 does not require interscapular brown adipose tissue and improves liver metabolic profile in animal models of obesity and insulin-resistance. *Sci. Rep.* 5, 1–13.
- Berry, D.C., Jiang, Y., and Graff, J.M. (2016). Mouse strains to study cold-inducible beige progenitors and beige adipocyte formation and function. *Nat. Commun.* 7, 10184.
- Bertot, L.C., and Adams, L.A. (2016). The natural course of non-alcoholic fatty liver disease. *Int. J. Mol. Sci.* 17.
- Billes, S.K., Sinnayah, P., and Cowley, M.A. (2014). Naltrexone/bupropion for obesity: An investigational combination pharmacotherapy for weight loss. *Pharmacol. Res.* 84, 1–11.
- Billings, L.K., and Florez, J.C. (2010). The genetics of type 2 diabetes: what have we learned from GWAS? *Ann N Y Acad Sci.* 1212, 59–77.
- Birkenfeld, A.L., and Shulman, G.I. (2014). Nonalcoholic fatty liver disease, hepatic insulin resistance, and type 2 Diabetes. *Hepatology* 59, 713–723.
- Birnboim, H.C., and Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7, 1513–1523.
- 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 A/J and C57BL/6 mice. *Metabolism.* 47, 1354–1359.
- Blüher, M. (2016). Adipose tissue inflammation: a cause or consequence of obesity-related insulin resistance? *Clin. Sci.* 130, 1603–1614.
- BonDurant, L.D., Ameka, M., Naber, M.C., Markan, K.R., Idiga, S.O., Acevedo, M.R., Walsh, S.A., Ornitz, D.M., and Potthoff, M.J. (2017). FGF21 Regulates Metabolism Through Adipose-Dependent and -Independent Mechanisms. *Cell Metab.* 25, 935–944.e4.
- 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. *Nat. Med.* 19, 1147–1152.



- Bowe, B., Xie, Y., Li, T., Yan, Y., Xian, H., and Al-aly, Z. (2018). Articles The 2016 global and national burden of diabetes mellitus attributable to PM 2 · 5 air pollution. *Lancet Planet. Heal.* 2, e301–e312.
- Braun, R., Wang, Z., Mack, D.L., and Childers, M.K. (2014). Gene therapy for inherited muscle diseases: Where genetics meets rehabilitation medicine. *Am. J. Phys. Med. Rehabil.* 93, S97–S107.
- Braune, J., Weyer, U., Hobusch, C., Mauer, J., Brüning, J.C., Bechmann, I., and Gericke, M. (2017). IL-6 Regulates M2 Polarization and Local Proliferation of Adipose Tissue Macrophages in Obesity. *J. Immunol.* 198, 2927–2934.
- Brunton, S.A. (2015). The potential role of sodium glucose co-transporter 2 inhibitors in the early treatment of type 2 diabetes mellitus. *Int. J. Clin. Pract.* 69, 1071–1087.
- Buchlis, G., Podsakoff, G.M., Radu, A., Hawk, S.M., Flake, A.W., Mingozzi, F., and High, K.A. (2012). Brief report Factor IX expression in skeletal muscle of a severe hemophilia B patient 10 years after AAV-mediated gene transfer. *119*, 3038–3041.
- 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.
- Callejas, D., Mann, C.J., Ayuso, E., Lage, R., Grifoll, I., Roca, C., Andaluz, A., Ruiz-de Gopegui, R., Montane, J., Munoz, S., et al. (2013). Treatment of Diabetes and Long-Term Survival After Insulin and Glucokinase Gene Therapy. *Diabetes* 62, 1718–1729.
- Camporez, J.P.G., Jornayvaz, F.R., Petersen, M.C., Pesta, D., Guigni, B.A., Serr, J., Zhang, D., Kahn, M., Samuel, V.T., Jurczak, M.J., et al. (2013). Cellular mechanisms by which FGF21 improves insulin sensitivity in male mice. *Endocrinology* 154, 3099–3109.
- Carter, B.J. (2004). Adeno-associated virus and the development of adeno-associated virus vectors: A historical perspective. *Mol. Ther.* 10, 981–989.
- Castracane, V.D., and Henson, M.C. (2007). The Obese (ob/ob) Mouse and the Discovery of Leptin. In *Leptin*, V.D. Castracane, and M.C. Henson, eds. (Boston, MA: Springer US), pp. 1–9.
- Cerf, M.E. (2015). High fat programming of beta cell compensation, exhaustion, death and dysfunction. *Pediatr. Diabetes* 16, 71–78.
- Chang J, Nicolas E, Marks D, Sander C, Lerro A, Buendia MA, Xu C, Mason WS, Moloshok T, Bort R, Zaret KS, T.J.M. (2004). miR-122, a mammalian liver-specific microRNA, is processed from hcr mRNA and may downregulate the high affinity cationic amino acid transporter CAT-1. *RNA Biol* 1, 106–113.
- Chao, L., Marcus-Samuels, B., Mason, M.M., Moitra, J., Vinson, C., Arioglu, E., Gavrilova, O., and Reitman, M.L. (2000). Adipose tissue is required for the antidiabetic, but not for the hypolipidemic, effect of thiazolidinediones. *J. Clin. Invest.* 106, 1221–1228.
- Charoenphandhu, N., Suntornsaratoon, P., Krishnamra, N., Sa-nguanmoo, P., Tanajak, P., Wang, X., Liang, G., Li, X., Jiang, C., Chattipakorn, N., et al. (2017). Fibroblast growth factor-21 restores insulin sensitivity but induces aberrant bone microstructure in obese insulin-resistant rats. *J. Bone Miner. Metab.* 35, 142–149.

- Cheng, D. (2005). Prevalence, predisposition and prevention of type II diabetes. *Nutr. & Metab.* 2, 29.
- Childers, M.K., Joubert, R., Poulard, K., Moal, C., Grange, R.W., Doering, J.A., Lawlor, M.W., Rider, B.E., Jamet, T., Danièle, N., et al. (2014). Gene therapy prolongs survival and restores function in murine and canine models of myotubular myopathy. *Sci. Transl. Med.* 6, 1–16.
- Choe, S.S., Huh, J.Y., Hwang, I.J., Kim, J.I., and Kim, J.B. (2016). Adipose tissue remodeling: Its role in energy metabolism and metabolic disorders. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. 7.
- Chylikova, J., Dvorackova, J., Tauber, Z., and Kamarad, V. (2018). M1/M2 macrophage polarization in human obese adipose tissue. *Biomed. Pap.* 162, 79–82.
- Cinti, S. (2009). Transdifferentiation properties of adipocytes in the adipose organ. *Am. J. Physiol. Metab.* 297, E977–E986.
- Coats, B.R., Schoenfelt, K.Q., Barbosa-Lorenzi, V.C., Peris, E., Cui, C., Hoffman, A., Zhou, G., Fernandez, S., Zhai, L., Hall, B.A., et al. (2017). Metabolically Activated Adipose Tissue Macrophages Perform Detrimental and Beneficial Functions during Diet-Induced Obesity. *Cell Rep.* 20, 3149–3161.
- Cohn, E.F., Zhuo, J., Kelly, M.E., and Chao, H.J. (2007). Efficient induction of immune tolerance to coagulation factor IX following direct intramuscular gene transfer. *J. Thromb. Haemost.* 5, 1227–1236.
- Colella, P., Ronzitti, G., and Mingozi, F. (2018). Emerging Issues in AAV-Mediated In Vivo Gene Therapy. *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.* 8, 87–104.
- Coppari, R., and Bjorbaedk, C. (2012). Leptine revisited: its mechanism of action and potential for treating diabetes. *Nat. Rev. Drug Discov.* 11, 692–708.
- 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.
- 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. *Obes. Surg.* 15, 442–446.
- Cypess, A.M., Lehman, S., Williams, G., Tal, I., Rodman, D., Goldfine, A.B., Kuo, F.C., Palmer, E.L., Tseng, Y.-H., Doria, A., et al. (2009). Identification and Importance of Brown Adipose Tissue in Adult Humans. *N. Engl. J. Med.* 360, 1509–1517.
- Cyphert, H.A., Ge, X., Kohan, A.B., Salati, L.M., Zhang, Y., and Hillgartner, F.B. (2012). Activation of the farnesoid X receptor induces hepatic expression and secretion of fibroblast growth factor 21. *J. Biol. Chem.* 287, 25123–25138.
- DeFronzo, R. a (2004). Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Med. Clin. North Am.* 88, 787–835, ix.
- DeFronzo, R.A., and Tripathy, D. (2009). Skeletal muscle insulin resistance is the primary defect in type 2 diabetes. *Diabetes Care* 32 Suppl 2, S157-63.

- Degirolamo, C., Sabbà, C., and Moschetta, A. (2016). Therapeutic potential of the endocrine fibroblast growth factors FGF19, FGF21 and FGF23. *Nat. Rev. Drug Discov.* 15, 51–69.
- Deyle, D.R., and Russell, D.W. (2009). Adeno-associated virus vector integration. *Curr. Opin. Mol. Ther.* 11, 442–447.
- Dimas, A.S., Lagou, V., Barker, A., Knowles, J.W., Mägi, R., Hivert, M.F., Benazzo, A., Rybin, D., Jackson, A.U., Stringham, H.M., et al. (2014). Impact of type 2 diabetes susceptibility variants on quantitative glycemic traits reveals mechanistic heterogeneity. *Diabetes* 63, 2158–2171.
- Ding, X., Boney-Montoya, J., Owen, B.M., Bookout, A.L., Coate, K.C., Mangelsdorf, D.J., and Kliewer, S.A. (2012).  $\beta$ Klotho Is Required for Fibroblast Growth Factor 21 Effects on Growth and Metabolism. *Cell Metab.* 16, 387–393.
- Disbrow, G.L., Sunitha, I., Baker, C.C., Hanover, J., and Schlegel, R. (2003). Codon optimization of the HPV-16 E5 gene enhances protein expression. *Virology* 311, 105–114.
- Donath, M., and Halban, P. (2004). Decreased beta-cell mass in diabetes: significance, mechanisms and therapeutic implications. *Diabetologia* 47, 581–589.
- Donath, M.Y., Böni-Schnetzler, M., Ellingsgaard, H., Halban, P.A., and Ehses, J.A. (2010). Cytokine production by islets in health and diabetes: cellular origin, regulation and function. *Trends Endocrinol. Metab.* 21, 261–267.
- Douris, N., Stevanovic, D.M., Fisher, M., Ffolliott M., Cisu, T.I., Chee, M.J., Nguyen, N.L., Zarebidaki, E., Adams, A.C., Kharitonov, A., Flier, J.S., et al. (2015). Central Fibroblast Growth Factor 21 Browns White Fat via Sympathetic Action in Male Mice. *Endocrinology* 156, 2470–2481.
- Dupuis, J., Langenberg, C., Prokopenko, I., Saxena, R., Soranzo, N., Jackson, A.U., Wheeler, E., Glazer, N.L., Bouatia-Naji, N., Gloyn, A.L., et al. (2010). New genetic loci implicated in fasting glucose homeostasis and their impact on type 2 diabetes risk. *Nat. Genet.* 42, 105–116.
- Dyson, P.A. (2010). The therapeutics of lifestyle management on obesity. *Diabetes. Obes. Metab.* 12, 941–946.
- Emanuelli, B., Vienberg, S.G., Smyth, G., Cheng, C., Stanford, K.I., Arumugam, M., Michael, M.D., Adams, A.C., Kharitonov, A., and Kahn, C.R. (2014). Interplay between FGF21 and insulin action in the liver regulates metabolism. *J. Clin. Invest.* 124, 515–527.
- European, C. (2013). Seventh Report on the Statistics on the Number of Animals used for Experimental and other Scientific Purposes in the Member States of the European Union.
- Farooqi, I.S., Keogh, J.M., Yeo, G.S.H., Lank, E.J., Cheetham, T., and O’Rahilly, S. (2003). Clinical Spectrum of Obesity and Mutations in the Melanocortin 4 Receptor Gene. *N. Engl. J. Med.* 348, 1517–1526.
- FDI (2017). IDF Diabetes Atlas eighth edition.

- Ferrari, F.K., Samulski, T., Shenk, T., and Samulski, R.J. (1996). Second-strand synthesis is a rate-limiting step for efficient transduction by recombinant adeno-associated virus vectors. *J. Virol.* 70, 3227–3234.
- Fisher, F.M., and Maratos-Flier, E. (2016). Understanding the Physiology of FGF21. *Annu. Rev. Physiol.* 78, 223–241.
- Fisher, f. M., Kleiner, S., Douris, N., Fox, E.C., Mepani, R.J., Verdeguer, F., Wu, J., Kharitonkov, A., Flier, J.S., Maratos-Flier, E., et al. (2012). FGF21 regulates PGC-1 $\alpha$  and browning of white adipose tissues in adaptive thermogenesis. *Genes Dev.* 26, 271–281.
- Fitzpatrick, Z., Leborgne, C., Barbon, E., Masat, E., Ronzitti, G., van Wittenberghe, L., Vignaud, A., Collaud, F., Charles, S., Simon Sola, M., et al. (2018). Influence of Pre-existing Anti-capsid Neutralizing and Binding Antibodies on AAV Vector Transduction. *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.* 9, 119–129.
- Flotte, T.R., Trapnell, B.C., Humphries, M., Carey, B., Calcedo, R., Rouhani, F., Campbell-Thompson, M., Yachnis, A.T., Sandhaus, R.A., McElvaney, N.G., et al. (2011). Phase 2 Clinical Trial of a Recombinant Adeno-Associated Viral Vector Expressing  $\alpha$  1 -Antitrypsin: Interim Results. *Hum. Gene Ther.* 22, 1239–1247.
- Folch, J., Lees, M., and Sloane, Stanley, G.H. (1956). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. 497–509.
- 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. *Sci. Transl. Med.* 4, 162ra153.
- Fon Tacer, K., Bookout, A.L., Ding, X., Kurosu, H., John, G.B., Wang, L., Goetz, R., Mohammadi, M., Kuro-o, M., Mangelsdorf, D.J., et al. (2010). Research Resource: Comprehensive Expression Atlas of the Fibroblast Growth Factor System in Adult Mouse. *Mol. Endocrinol.* 24, 2050–2064.
- Friedman, J.M., and Halaas, J.L. (1998). Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature* 395, 763–770.
- Frühbeck, G., Becerril, S., Sáinz, N., Garrastachu, P., and García-Velloso, M.J. (2009). BAT: a new target for human obesity? *Trends Pharmacol. Sci.* 30, 387–396.
- Fu, L., John, L.M., Adams, S.H., Yu, X.X., Tomlinson, E., Renz, M., Williams, P.M., Soriano, R., Corpuz, R., Moffat, B., et al. (2004). Fibroblast growth factor 19 increases metabolic rate and reverses dietary and leptin-deficient diabetes. *Endocrinology* 145, 2594–2603.
- Van Gaal, L.F., Mertens, I.L., and De Block, C.E. (2006). Mechanisms linking obesity with cardiovascular disease. *Nature* 444, 875–880.
- Gaich, G., Chien, J.Y., Fu, H., Glass, L.C., Deeg, M.A., Holland, W.L., Kharitonkov, A., Bumol, T., Schilske, H.K., and Moller, D.E. (2013). The Effects of LY2405319, an FGF21 Analog, in Obese Human Subjects with Type 2 Diabetes. *Cell Metab.* 18, 333–340.

- Gavaldà-Navarro, A., Hondares, E., Giralt, M., Mampel, T., Iglesias, R., and Villarroya, F. (2015). Fibroblast growth factor 21 in breast milk controls neonatal intestine function. *Sci. Rep.* 5, 13717.
- Gesta, S., Tseng, Y.H., and Kahn, C.R. (2007). Developmental Origin of Fat: Tracking Obesity to Its Source. *Cell* 131, 242–256.
- Goetz, R., Beenken, A., Ibrahim, O.A., Kalinina, J., Olsen, S.K., Eliseenkova, A. V, Xu, C., Neubert, T.A., Zhang, F., Linhardt, R.J., et al. (2007). Molecular Insights into the Klotho-Dependent, Endocrine Mode of Action of Fibroblast Growth Factor 19 Subfamily Members. *Mol. Cell. Biol.* 27, 3417–3428.
- Goldstein, D. (1992). Beneficial health effects of modest weight loss. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 16, 397–415.
- Gómez-Hernández, A., Beneit, N., Díaz-Castroverde, S., and Escribano, Ó. (2016). Differential Role of Adipose Tissues in Obesity and Related Metabolic and Vascular Complications. *Int. J. Endocrinol.* 2016, 1216783.
- González-Muniesa, P., Martínez-González, M.A., Hu, F.B., Després, J.P., Matsuzawa, Y., Loos, R.J.F., Moreno, L.A., Bray, G.A., and Martínez, J.A. (2017). Obesity. *Nat. Rev. Dis. Prim.* 3.
- Greenway, F.L., Fujioka, K., Plodkowski, R. a, Mudaliar, S., Guttadauria, M., Erickson, J., Kim, D.D., and Dunayevich, E. (2010). Effect of naltrexone plus bupropion on weight loss in overweight and obese adults (COR-1): a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet* 376, 595–605.
- Gregg, E.W., Sattar, N., and Ali, M.K. (2016). The changing face of diabetes complications. *Lancet. Diabetes Endocrinol.* 4, 537–547.
- Guilherme, A., Virbasius, J. V, Puri, V., and Czech, M.P. (2008). Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 367–377.
- Guo, L., Costanzo-Garvey, D.L., Smith, D.R., Zavorka, M.E., Venable-Kang, M., MacDonald, R.G., Lewis, R.E., Barker, D.J., Eriksson, J.G., Forsen, T.J., et al. (2016). Cell non-autonomous regulation of hepatic IGF-1 and neonatal growth by Kinase Suppressor of Ras 2 (KSR2). *Sci. Rep.* 6, 1–11.
- Hajer, G.R., van Haefen, T.W., and Visseren, F.L.J. (2008). Adipose tissue dysfunction in obesity, diabetes, and vascular diseases. *Eur. Heart J.* 29, 2959–2971.
- Halban, P.A. (2008). Cell therapy for type 2 diabetes : is it desirable and can we get it ? *10*, 205–211.
- Hale, C., Helmering, J., Chen, M.M., Stanislaus, S., Ve, M.M., Busby, J., Vonderfecht, S., Xu, J., and Lloyd, D.J. (2012a). FGF21 Promotes Metabolic Homeostasis via White Adipose and Leptin in Mice. *PLoS One* 7.
- Hale, C., Chen, M.M., Stanislaus, S., Chinookoswong, N., Hager, T., Wang, M., Véniant, M.M., and Xu, J. (2012b). Lack of Overt FGF21 Resistance in Two Mouse Models of Obesity and Insulin Resistance. *Endocrinology* 153, 69–80.
- Haslam, D.W., and James, W.P.T. (2005). Obesity. *Lancet* 366, 1197–1209.

- Haurigot, V., Mingozi, F., Buchlis, G., Hui, D.J., Chen, Y., Basner-Tschakarjan, E., Arruda, V.R., Radu, A., Franck, H.G., Wright, J.F., et al. (2010). Safety of AAV factor IX peripheral transvenular gene delivery to muscle in hemophilia B dogs. *Mol. Ther.* 18, 1318–1329.
- 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.
- Herath, H., Herath, R., and Wickremasinghe, R. (2017). Gestational diabetes mellitus and risk of type 2 diabetes 10 years after the index pregnancy in Sri Lankan women—A community based retrospective cohort study. *PLoS One* 12, e0179647.
- Herweijer, H., Zhang, G.F., Subbotin, V.M., Budker, V., Williams, P., and Wolff, J.A. (2001). Time course of gene expression after plasmid DNA gene transfer to the liver. *J. Gene Med.* 3, 280–291.
- Hill-Baskin, A.E., Markiewski, M.M., Buchner, D.A., Shao, H., DeSantis, D., Hsiao, G., Subramaniam, S., Berger, N.A., Croniger, C., Lambris, J.D., et al. (2009). Diet-induced hepatocellular carcinoma in genetically predisposed mice. *Hum. Mol. Genet.* 18, 2975–2988.
- Himms-hagen, J., and Desautels, M. (1978). A mitochondrial defect in brown adipose tissue of the obese (ob/ob) mouse: Reduced binding of purine nucleotides and failure to respond to cold by an increase in binding. *83*, 628–634.
- Hirata, R.K., and Russell, D.W. (2000). Design and packaging of adeno-associated virus gene targeting vectors. *J. Virol.* 74, 4612–4620.
- Holman, R.R., Paul, S.K., Bethel, M.A., Matthews, D.R., and Neil, H.A.W. (2008). 10-Year Follow-up of Intensive Glucose Control in Type 2 Diabetes. *N. Engl. J. Med.* 359, 1577–1589.
- Hondares, E., Rosell, M., Gonzalez, F.J., Giralt, M., Iglesias, R., and Villarroya, F. (2010). Hepatic FGF21 expression is induced at birth via PPAR $\alpha$  in response to milk intake and contributes to thermogenic activation of neonatal brown fat. *Cell Metab.* 11, 206–212.
- Hondares, E., Iglesias, R., Giralt, A., Gonzalez, F.J., Giralt, M., Mampel, T., and Villarroya, F. (2011). Thermogenic activation induces FGF21 expression and release in brown adipose tissue. *J. Biol. Chem.* 286, 12983–12990.
- Hösel, M., Broxtermann, M., Janicki, H., Esser, K., Arzberger, S., Hartmann, P., Gillen, S., Kleeff, J., Stabenow, D., Odenthal, M., et al. (2012). Toll-like receptor 2-mediated innate immune response in human nonparenchymal liver cells toward adeno-associated viral vectors. *Hepatology* 55, 287–297.
- Hsuchou, H., Pan, W., and Kastin, A.J. (2007). The fasting polypeptide FGF21 can enter brain from blood. *Peptides* 28, 2382–2386.
- Hu, F.B. (2003). Television Watching and Other Sedentary Behaviors in Relation to Risk of Obesity and Type 2 Diabetes Mellitus in Women. *Jama* 289, 1785.
- Hu, F.B., Manson, J.E., Stampfer, M.J., Colditz, G., Liu, S., Solomon, C.G., and Willett, W.C. (2001). Diet, lifestyle, and the risk of type 2 diabetes mellitus in women. *N. Engl. J. Med.* 345, 790–797.

- Huang, X., Yu, C., Jin, C., Yang, C., Xie, R., Cao, D., Wang, F., and McKeehan, W.L. (2006). Forced expression of hepatocyte-specific fibroblast growth factor 21 delays initiation of chemically induced hepatocarcinogenesis. *Mol. Carcinog.* 45, 934–942.
- likuni, N., Lam, Q.L.K., Lu, L., Matarese, G., and La Cava, A. (2008). Leptin and Inflammation. *Curr. Immunol. Rev.* 4, 70–79.
- Ikeda, K., Kang, Q., Yoneshiro, T., Camporez, J.P., Maki, H., Homma, M., Shinoda, K., Chen, Y., Lu, X., Maretich, P., et al. (2017). UCP1-independent signaling involving SERCA2b-mediated calcium cycling regulates beige fat thermogenesis and systemic glucose homeostasis. *Nat. Med.* 23, 1454–1465.
- Imamura, M., and Maeda, S. (2011). Genetics of type 2 diabetes: the GWAS era and future perspectives [Review]. *Endocr. J.* 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 Metab.* 5, 415–425.
- Inagaki, T., Lin, V.Y., Goetz, R., Mohammadi, M., Mangelsdorf, D.J., and Kliewer, S.A. (2008). Inhibition of growth hormone signaling by the fasting-induced hormone FGF21. *Cell Metab.* 8, 77–83.
- Ingalls, A.M., Dickie, M.M., and Snell, G.D. (1996). Obese, a New Mutation in the House Mouse\*. *Obes. Res.* 4, 101–101.
- Ingvorsen, C., Karp, N.A., and Lelliott, C.J. (2017). The role of sex and body weight on the metabolic effects of high-fat diet in C57BL/6N mice. *Nutr. Diabetes* 7, e261.
- 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 betaklotho, which encodes a novel Klotho family protein. *Mech. Dev.* 98, 115–119.
- Itoh, N., and Ornitz, D.M. (2004). Evolution of the Fgf and Fgfr gene families. *TRENDS Genet.* 20, 14–20.
- Jackness, C., Karmally, W., Febres, G., Conwell, I.M., Ahmed, L., Bessler, M., McMahan, 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.
- Jaén, M.L., Vilà, L., Elias, I., Jimenez, V., Rodó, J., Maggioni, L., Ruiz-de Gopegui, R., Garcia, M., Muñoz, S., Callejas, D., et al. (2017a). Long-Term Efficacy and Safety of Insulin and Glucokinase Gene Therapy for Diabetes: 8-Year Follow-Up in Dogs. *Mol. Ther. - Methods Clin. Dev.* 6, 1–7.
- Jaén, M.L., Vilà, L., Elias, I., Jimenez, V., Rodó, J., Maggioni, L., Ruiz-de Gopegui, R., Garcia, M., Muñoz, S., Callejas, D., et al. (2017b). Long-Term Efficacy and Safety of Insulin and Glucokinase Gene Therapy for Diabetes: 8-Year Follow-Up in Dogs. *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.* 6, 1–7.

- Janský, L. (1995). Humoral thermogenesis and its role in maintaining energy balance. *Physiol. Rev.* 75.
- de Jesus, L.A., Carvalho, S.D., Ribeiro, M.O., Schneider, M., Kim, S.W., Harney, J.W., Larsen, P.R., and Bianco, A.C. (2001). The type 2 iodothyronine deiodinase is essential for adaptive thermogenesis in brown adipose tissue. *J. Clin. Invest.* 108, 1379–1385.
- 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 Mol. Med.* e8791.
- 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.
- Kajimura, S., Spiegelman, B.M., and Seale, P. (2015). Brown and beige fat: Physiological roles beyond heat generation. *Cell Metab.* 22, 546–559.
- Karaderi, T., Drong, A.W., and Lindgren, C.M. (2015). Insights into the Genetic Susceptibility to Type 2 Diabetes from Genome-Wide Association Studies of Obesity-Related Traits. *Curr. Diab. Rep.* 15, 83.
- Kasim, N.B., Huri, H.Z., Vethakkan, S.R., Ibrahim, L., and Abdullah, B.M. (2016). Genetic polymorphisms associated with overweight and obesity in uncontrolled Type 2 diabetes mellitus. *Biomark. Med.* 10, 403–415.
- Kay, M.A. (2011). State-of-the-art gene-based therapies: the road ahead. *Nat. Rev. Genet.* 12, 316–328.
- Kazak, L., Chouchani, E.T., Jedrychowski, M.P., Erickson, B.K., Shinoda, K., Cohen, P., Vetrivelan, R., Lu, G.Z., Laznik-Bogoslavski, D., Hasenfuss, S.C., et al. (2015). A creatine-driven substrate cycle enhances energy expenditure and thermogenesis in beige fat. *Cell* 163, 643–655.
- Kelly, E.J., and Russell, S.J. (2009). MicroRNAs and the Regulation of Vector Tropism. *Mol. Ther.* 17, 409–416.
- Kharitonov, A., and DiMarchi, R. (2015). FGF21 Revolutions: Recent Advances Illuminating FGF21 Biology and Medicinal Properties. *Trends Endocrinol. Metab.* 26, 608–617.
- Kharitonov, A., and DiMarchi, R. (2017). Fibroblast growth factor 21 night watch: advances and uncertainties in the field. *J. Intern. Med.* 281, 233–246.
- Kharitonov, A., Shiyanova, T.L., Koester, A., Ford, A.M., Micanovic, R., Galbreath, E.J., Sandusky, G.E., Hammond, L.J., Moyers, J.S., Owens, R.A., et al. (2005). FGF-21 as a novel metabolic regulator. *J. Clin. Invest.* 115, 1627–1635.
- Kharitonov, 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., 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.
- Kilkenny, D.M., and Rocheleau, J.V. (2016). The FGF21 Receptor Signaling Complex: Klotho $\beta$ , FGFR1c, and Other Regulatory Interactions. *Vitam. Horm.* 101, 17–58.
- Kim, H.W., Lee, J.E., Cha, J.J., Hyun, Y.Y., Kim, J.E., Lee, M.H., Song, H.K., Nam, D.H., Han, J.Y., Han, S.Y., et al. (2013). Fibroblast growth factor 21 improves insulin resistance and ameliorates renal injury in db/db mice. *Endocrinology* 154, 3366–3376.
- Kitahara, C.M., Flint, A.J., Berrington de Gonzalez, A., Bernstein, L., Brotzman, M., MacInnis, R.J., Moore, S.C., Robien, K., Rosenberg, P.S., Singh, P.N., et al. (2014). Association between Class III Obesity (BMI of 40-59 kg/m<sup>2</sup>) and Mortality: A Pooled Analysis of 20 Prospective Studies. *PLoS Med.* 11, 1–14.
- Klötting, N., Fasshauer, M., Dietrich, A., Kovacs, P., Schön, M.R., Kern, M., Stumvoll, M., and Blüher, M. (2010). Insulin-sensitive obesity. *Am. J. Physiol. Metab.* 299, E506–E515.
- Knowler, W.C., Barrett-Connor, E., Fowler, S.E., Hamman, R.F., Lachin, J.M., Walker, E.A., and Nathan, D.M. (2002). Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin. *N. Engl. J. Med.* 346, 393–403.
- Kolb, H., and Martin, S. (2017). Environmental/lifestyle factors in the pathogenesis and prevention of type 2 diabetes. *BMC Med.* 15, 131.
- Kotterman, M.A., and Schaffer, D. V (2014). Engineering adeno-associated viruses for clinical gene therapy. *Nat. Rev. Genet.* 15, 445–451.
- Ladenheim, E.E. (2015). Liraglutide and obesity: a review of the data so far. *Drug Des. Development Ther.* 9, 1867–1875.
- Laeger, T., Baumeier, C., Wilhelmi, I., Würfel, J., Kamitz, A., and Schürmann, A. (2017). FGF21 improves glucose homeostasis in an obese diabetes-prone mouse model independent of body fat changes. *Diabetologia.*
- Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Yalcin, A., Meyer, J., Lendeckel, W., and Tuschl, T. (2002). Identification of Tissue-Specific MicroRNAs from Mouse.
- Lattouf, R., Younes, R., Lutomski, D., Naaman, N., Godeau, G., Senni, K., and Changotade, S. (2014). Picrosirius Red Staining. *J. Histochem. Cytochem.* 62, 751–758.
- Leahy, J.L. (2005). Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Arch. Med. Res.* 36, 197–209.
- Lee, M.-J., Wu, Y., and Fried, S.K. (2010). Adipose tissue remodeling in pathophysiology of obesity. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 13, 371–376.
- Lee, M.S., Choi, S.-E., Ha, E.S., An, S.-Y., Kim, T.H., Han, S.J., Kim, H.J., Kim, D.J., Kang, Y., and Lee, K.-W. (2012a). Fibroblast growth factor-21 protects human skeletal muscle myotubes from palmitate-induced insulin resistance by inhibiting stress kinase and NF- $\kappa$ B. *Metabolism.* 61, 1142–1151.

- Lee, Y.-H., Petkova, A.P., Mottillo, E.P., and Granneman, J.G. (2012b). In vivo identification of bipotential adipocyte progenitors recruited by  $\beta$ 3-adrenoceptor activation and high-fat feeding. *Cell Metab.* 15, 480–491.
- Lee, Y.-H., Petkova, A.P., Konkar, A.A., and Granneman, J.G. (2015). Cellular origins of cold-induced brown adipocytes in adult mice. *FASEB J.* 29, 286–299.
- Li, H., Gao, Z., Zhang, J., Ye, X., Xu, A., Ye, J., and Jia, W. (2012). Sodium butyrate stimulates expression of fibroblast growth factor 21 in liver by inhibition of histone deacetylase 3. *Diabetes* 61, 797–806.
- Li, H., Wu, G., Fang, Q., Zhang, M., Hui, X., Sheng, B., Wu, L., Bao, Y., Li, P., Xu, A., et al. (2018). Fibroblast growth factor 21 increases insulin sensitivity through specific expansion of subcutaneous fat. *Nat. Commun.* 9, 272.
- Li, X., Stanislaus, S., Asuncion, F., Niu, Q.-T., Chinookoswong, N., Villasenor, K., Wang, J., Wong, P., Boyce, R., Dwyer, D., et al. (2017). FGF21 Is Not a Major Mediator for Bone Homeostasis or Metabolic Actions of PPAR $\alpha$  and PPAR $\gamma$  Agonists. *J. Bone Miner. Res.* 32, 834–845.
- Li, Y., Wong, K., Walsh, K., Gao, B., and Zang, M. (2013). Retinoic acid receptor  $\beta$  stimulates hepatic induction of fibroblast growth factor 21 to promote fatty acid oxidation and control whole-body energy homeostasis in mice. *J. Biol. Chem.* 288, 10490–10504.
- Liang, H., and Ward, W.F. (2006). PGC-1 $\alpha$ : a key regulator of energy metabolism. *Adv. Physiol. Educ.* 30, 145–151.
- Liang, Q., Zhong, L., Zhang, J., Wang, Y., Bornstein, S.R., Triggle, C.R., Ding, H., Lam, K.S.L., and Xu, A. (2014). FGF21 Maintains Glucose Homeostasis by Mediating the Cross Talk Between Liver and Brain During Prolonged Fasting. *Diabetes* 63, 4064–4075.
- Lim, E.L., Hollingsworth, K.G., Aribisala, B.S., Chen, M.J., Mathers, J.C., and Taylor, R. (2011). Reversal of type 2 diabetes: Normalisation of beta cell function in association with decreased pancreas and liver triacylglycerol. *Diabetologia* 54, 2506–2514.
- Lisowski, L., Tay, S.S., and Alexander, I.E. (2015a). Adeno-associated virus serotypes for gene therapeutics. *Curr. Opin. Pharmacol.* 24, 59–67.
- Lisowski, L., Tay, S.S., and Alexander, I.E. (2015b). Adeno-associated virus serotypes for gene therapeutics. *Curr. Opin. Pharmacol.* 24, 59–67.
- Liu, S.Q., Roberts, D., Kharitonov, A., Zhang, B., Hanson, S.M., Li, Y.C., Zhang, L.-Q., and Wu, Y.H. (2013). Endocrine Protection of Ischemic Myocardium by FGF21 from the Liver and Adipose Tissue. *Sci. Rep.* 3, 2767.
- Liu, X., Magee, D., Wang, C., McMurphy, T., Slater, A., During, M., and Cao, L. (2014). Adipose tissue insulin receptor knockdown via a new primate-derived hybrid recombinant AAV serotype. *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.* 1, 1–9.
- Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2<sup>- $\Delta\Delta$ CT</sup> Method. *Methods* 25, 402–408.
- Loher, H., Kreis, R., Boesch, C., and Christ, E. (2016). The flexibility of ectopic lipids. *Int. J. Mol. Sci.* 17.

- Louboutin, J.-P., Wang, L., and Wilson, J.M. (2005). Gene transfer into skeletal muscle using novel AAV serotypes. *J. Gene Med.* 7, 442–451.
- Lundåsen, T., Hunt, M.C., Nilsson, L.M., Sanyal, S., Angelin, B., Alexson, S.E.H., and Rudling, M. (2007). PPAR $\alpha$  is a key regulator of hepatic FGF21. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 360, 437–440.
- Luo, Y., and McKeehan, W.L. (2013). Stressed liver and muscle call on adipocytes with FGF21. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. 4, 1–6.
- Makki, K., Froguel, P., and Wolowczuk, I. (2013). Adipose tissue in obesity-related inflammation and insulin resistance: cells, cytokines, and chemokines. *ISRN Inflamm.* 2013, 139239.
- Manno, C.S., Chew, A.J., Hutchison, S., Larson, P.J., Herzog, R.W., Arruda, V.R., Tai, S.J., Ragni, M. V, Thompson, A., Ozelo, M., et al. (2003). AAV-mediated factor IX gene transfer to skeletal muscle in patients with severe hemophilia B. *Analgesia* 101, 2963–2972.
- Markan, K.R., and Potthoff, M.J. (2016). Metabolic fibroblast growth factors (FGFs): Mediators of energy homeostasis. *Semin. Cell Dev. Biol.* 53, 85–93.
- Martino, A.T., Herzog, R.W., Anegon, I., and Adjali, O. (2011). Measuring immune responses to recombinant AAV gene transfer. *Methods Mol. Biol.* 807, 259–272.
- Marzola, P., Boschi, F., Moneta, F., Sbarbati, A., and Zancanaro, C. (2016). Preclinical in vivo imaging for fat tissue identification, quantification, and functional characterization. *Front. Pharmacol.* 7, 1–14.
- Mas, A., Montané, J., Anguela, X.M., Muñoz, S., Douar, A.M., Riu, E., Otaegui, P., and Bosch, F. (2006). Reversal of type 1 diabetes by engineering a glucose sensor in skeletal muscle. *Diabetes* 55, 1546–1553.
- Mashili, F.L., Austin, R.L., Deshmukh, A.S., Fritz, T., Caidahl, K., Bergdahl, K., Zierath, J.R., Chibalin, A. V, Moller, D.E., Kharitononkov, A., et al. (2011). Direct effects of FGF21 on glucose uptake in human skeletal muscle: implications for type 2 diabetes and obesity. *Diabetes. Metab. Res. Rev.* 27, 286–297.
- McCarthy, M.I. (2010). Genomics, type 2 diabetes, and obesity. *N. Engl. J. Med.* 363, 2339–2350.
- McCarty, D.M., Monahan, P.E., and Samulski, R.J. (2001). Self-complementary recombinant adeno-associated virus (scAAV) vectors promote efficient transduction independently of DNA synthesis. *Gene Ther* 8, 1248–1254.
- McCarty, D.M., Young, S.M., and Samulski, R.J. (2004). Integration of adeno-associated virus (AAV) and recombinant AAV vectors. *Annu. Rev. Genet.* 38, 819–845.
- McGarry, J.D. (2002). Dysregulation of Fatty Acid Metabolism in the Etiology of Type 2 Diabetes. *Diabetes* 51, 7–18.
- Mendell, J.R., Rodino-Klapac, L.R., Rosales-Quintero, X., Kota, J., Coley, B.D., Galloway, G., Craenen, J.M., Lewis, S., Malik, V., Shilling, C., et al. (2009). Limb-girdle muscular dystrophy type 2D gene therapy restores  $\alpha$ -sarcoglycan and associated proteins. *Ann. Neurol.* 66, 290–297.

- Meyer, L.K., Ciaraldi, T.P., Henry, R.R., Wittgrove, A.C., and Phillips, S.A. (2013). Adipose tissue depot and cell size dependency of adiponectin synthesis and secretion in human obesity. *Adipocyte* 2, 217–226.
- Michalopoulos, G.K. (2013). Principles of liver regeneration and growth homeostasis. *Compr. Physiol.* 3, 485–513.
- Mingozzi, F., and High, K.A. (2011). Therapeutic in vivo gene transfer for genetic disease using AAV: progress and challenges. *Nat. Rev. Genet.* 12, 341–355.
- Mingozzi, F., Liu, Y.-L., Dobrzynski, E., Kaufhold, A., Liu, J.H., Wang, Y., Arruda, V.R., High, K.A., and Herzog, R.W. (2003). Induction of immune tolerance to coagulation factor IX antigen by in vivo hepatic gene transfer. *J. Clin. Invest.* 111, 1347–1356.
- Mitchell, S.J.S.J.S.E., Madrigal-Matute, J., Scheibye-Knudsen, M., Fang, E., Aon, M., González-Reyes, J.A.J.A., Cortassa, S., Kaushik, S., Gonzalez-Freire, M., Patel, B., et al. (2016). Effects of Sex, Strain, and Energy Intake on Hallmarks of Aging in Mice. *Cell Metab.* 23, 1093–1112.
- Miyagoe-Suzuki, Y., and Takeda, S. (2010). Gene therapy for muscle disease. *Exp. Cell Res.* 316, 3087–3092.
- Mohammadi, M., Olsen, S.K., and Ibrahimi, O.A. (2005). Structural basis for fibroblast growth factor receptor activation. *Cytokine Growth Factor Rev.* 16, 107–137.
- Montague, C.T., Farooqi, I.S., Whitehead, J.P., Soos, M.A., Rau, H., Wareham, N.J., Sewter, C.P., Digby, J.E., Mohammed, S.N., Hurst, J.A., et al. (1997). Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans. *Nature* 387, 903–908.
- Morris, A., Voight, B., and Teslovich, T. (2012). Large-scale association analysis provides insights into the genetic architecture and pathophysiology of type 2 diabetes. *Nat. Genet.* 44, 981–990.
- Muir, L.A., Neeley, C.K., Meyer, K.A., Baker, N.A., Brosius, A.M., Washabaugh, A.R., Varban, O.A., Finks, J.F., Zamarron, B.F., Flesher, C.G., et al. (2016). Adipose tissue fibrosis, hypertrophy, and hyperplasia: Correlations with diabetes in human obesity. *Obesity (Silver Spring)*. 24, 597–605.
- Muise, E.S., Azzolina, B., Kuo, D.W., El-Sherbeini, M., Tan, Y., Yuan, X., Mu, J., Thompson, J.R., Berger, J.P., and Wong, K.K. (2008). Adipose fibroblast growth factor 21 is up-regulated by peroxisome proliferator-activated receptor gamma and altered metabolic states. *Mol. Pharmacol.* 74, 403–412.
- Mulligan, R.C. (1993). The basic science of gene therapy. *Science* 260, 926–932.
- Mulvihill, E.E., and Drucker, D.J. (2014). Pharmacology, physiology, and mechanisms of action of dipeptidyl peptidase-4 inhibitors. *Endocr. Rev.* 35, 992–1019.
- Murea, M., Ma, L., and Freedman, B.I. (2012). Genetic and environmental factors associated with type 2 diabetes and diabetic vascular complications. *Rev. Diabet. Stud.* 9, 6–22.
- Naldini, L. (2015). Gene therapy returns to centre stage. *Nature* 526, 351–360.

- Naumer, M., Sonntag, F., Schmidt, K., Nieto, K., Panke, C., Davey, N.E., Popa-Wagner, R., and Kleinschmidt, J.A. (2012). Properties of the Adeno-Associated Virus Assembly-Activating Protein. *J. Virol.* 86, 13038–13048.
- Nedergaard, J., Golozoubova, V., Matthias, A., Asadi, A., Jacobsson, A., and Cannon, B. (2001). UCP1: the only protein able to mediate adaptive non-shivering thermogenesis and metabolic inefficiency. *Biochim. Biophys. Acta* 1504, 82–106.
- Nicholls, D.G., Bernson, V.S., and Heaton, G.M. (1978). The identification of the component in the inner membrane of brown adipose tissue mitochondria responsible for regulating energy dissipation. *Experientia. Suppl.* 32, 89–93.
- Nilsson, C., Raun, K., Yan, F., Larsen, M.O., and Tang-Christensen, M. (2012). Laboratory animals as surrogate models of human obesity. *Acta Pharmacol. Sin.* 33, 173–181.
- Nishikawa, S., Yasoshima, A., Doi, K., Nakayama, H., and Uetsuka, K. (2007). Involvement of sex, strain and age factors in high fat diet-induced obesity in C57BL/6J and BALB/cA mice. *Exp. Anim.* 56, 263–272.
- Nishimura, T., Nakatake, Y., Konishi, M., and Itoh, N. (2000). Identification of a novel FGF, FGF-21, preferentially expressed in the liver. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Struct. Expr.* 1492, 203–206.
- Nolan, C.J., Damm, P., and Prentki, M. (2011). Type 2 diabetes across generations: From pathophysiology to prevention and management. In *The Lancet*, pp. 169–181.
- Nygaard, E.B., Vienberg, S.G., Orskov, C., Hansen, H.S., and Andersen, B. (2012). Metformin stimulates FGF21 expression in primary hepatocytes. *Exp. Diabetes Res.*
- Nygaard, E.B., Møller, C.L., Kievit, P., Grove, K.L., and Andersen, B. (2014). Increased fibroblast growth factor 21 expression in high-fat diet-sensitive non-human primates (*Macaca mulatta*). *Int. J. Obes.* 38, 183–191.
- O'Neill, S.M., Hinkle, C., Chen, S.J., Sandhu, A., Hovhannisyan, R., Stephan, S., Lagor, W.R., Ahima, R.S., Johnston, J.C., and Reilly, M.P. (2014). Targeting adipose tissue via systemic gene therapy. *Gene Ther.* 21, 653–661.
- Ogawa, Y., Kurosu, H., Yamamoto, M., Nandi, A., Rosenblatt, K.P., Goetz, R., Eliseenkova, A. V., Mohammadi, M., and Kuro-o, M. (2007). betaKlotho is required for metabolic activity of fibroblast growth factor 21. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104, 7432–7437.
- Oishi, K., and Tomita, T. (2011). Thiazolidinediones are potent inducers of fibroblast growth factor 21 expression in the liver. *Biol. Pharm. Bull.* 34, 1120–1121.
- Oishi, K., Konishi, M., Murata, Y., and Itoh, N. (2011). Time-imposed daily restricted feeding induces rhythmic expression of Fgf21 in white adipose tissue of mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 412, 396–400.
- Oulion, S., Bertrand, S., and Escriva, H. (2012). Evolution of the FGF Gene Family. *Int. J. Evol. Biol.* 2012, 1–12.
- Owen, B.M., Bookout, A.L., Ding, X., Lin, V.Y., Atkin, S.D., Gautron, L., Kliewer, S.A., and Mangelsdorf, D.J. (2013). FGF21 contributes to neuroendocrine control of female reproduction. *Nat. Med.* 19, 1153–1156.

- Owen, B.M., Ding, X., Morgan, D.A., Coate, K.C., Bookout, A.L., Rahmouni, K., Kliewer, S.A., and Mangelsdorf, D.J. (2014). FGF21 Acts Centrally to Induce Sympathetic Nerve Activity, Energy Expenditure, and Weight Loss. *Cell Metab.* 20, 670–677.
- Ozata, M., Ozdemir, I.C., and Licinio, J. (1999). Human Leptin Deficiency Caused by a Missense Mutation: Multiple Endocrine Defects, Decreased Sympathetic Tone, and Immune System Dysfunction Indicate New Targets for Leptin Action, Greater Central than Peripheral Resistance to the Effects of Leptin, and Spontaneous Correction of Leptin-Mediated Defects. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 84, 3686–3695.
- Pacak, C.A., Mah, C.S., Thattaliyath, B.D., Conlon, T.J., Lewis, M.A., Cloutier, D.E., Zolotukhin, I., Tarantal, A.F., and Byrne, B.J. (2006). Recombinant Adeno-Associated Virus Serotype 9 Leads to Preferential Cardiac Transduction In Vivo. *Circ. Res.* 99.
- Pan, X., Shao, Y., Wu, F., Wang, Y., Xiong, R., Zheng, J., Tian, H., Wang, B., Wang, Y., Zhang, Y., et al. (2018). FGF21 Prevents Angiotensin II-Induced Hypertension and Vascular Dysfunction by Activation of ACE2/Angiotensin-(1-7) Axis in Mice. *Cell Metab.* 27, 1323–1337.e5.
- Park, E.J., Lee, J.H., Yu, G., He, G., Ali, S.R., and Ryan, G. (2010). Dietary and genetic obesity promote liver inflammation and tumorigenesis by enhancing IL-6 and TNF expression. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 299, 197–208.
- Pastor, 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.
- Patel, R., Bookout, A.L., Magomedova, L., Owen, B.M., Consiglio, G.P., Shimizu, M., Zhang, Y., Mangelsdorf, D.J., Kliewer, S.A., and Cummins, C.L. (2015). Glucocorticoids regulate the metabolic hormone FGF21 in a feed-forward loop. *Mol. Endocrinol.* 29, 213–223.
- Peeters, A., Barendregt, J.J., Willekens, F., Mackenbach, J.P., Mamun, A. Al, and Bonneux, L. (2003). Obesity in Adulthood and Its Consequences for Life Expectancy: A Life-Table Analysis. *Ann. Intern. Med.* 138, 24–32.
- Pi-Sunyer, F.X. (2002). The obesity epidemic: pathophysiology and consequences of obesity. *Obes. Res.* 10 Suppl 2, 97S–104S.
- Pi-Sunyer, X., Astrup, A., Fujioka, K., Greenway, F., Halpern, A., Krempf, M., Lau, D.C.W., le Roux, C.W., Violante Ortiz, R., Jensen, C.B., et al. (2015). A Randomized, Controlled Trial of 3.0 mg of Liraglutide in Weight Management. *N. Engl. J. Med.* 373, 11–22.
- Planavila, A., Redondo, I., Hondares, E., Vinciguerra, M., Munts, C., Iglesias, R., Gabrielli, L.A., Sitges, M., Giralt, M., van Bilsen, M., et al. (2013). Fibroblast growth factor 21 protects against cardiac hypertrophy in mice. *Nat. Commun.* 4, 1–12.
- Planavila, A., Redondo-Angulo, I., and Villarroya, F. (2015). FGF21 and Cardiac Physiopathology. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. 6, 1–7.
- Potthoff, M.J., Inagaki, T., Satapati, S., Ding, X., He, T., Goetz, R., Mohammadi, M., Finck, B.N., Mangelsdorf, D.J., Kliewer, S.A., et al. (2009). FGF21 induces PGC-1 $\alpha$  and regulates carbohydrate and fatty acid metabolism during the adaptive starvation response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 10853–10858.

- Pryor, R., and Cabreiro, F. (2015). Repurposing metformin: an old drug with new tricks in its binding pockets. *Biochem. J.* 471, 307–322.
- Ramachandrappa, S., and Farooqi, I.S. (2011). Genetic approaches to understanding human obesity. *J Clin Invest* 121, 2080–2086.
- Reitman, M.L. (2013). FGF21 mimetic shows therapeutic promise. *Cell Metab.* 18, 307–309.
- Rodgers, R.J., Tschöp, M.H., and Wilding, J.P.H. (2012). Anti-obesity drugs: past, present and future. *Dis. Model. Mech.* 5, 621–626.
- Rodriguez, A.R., Plascencia-villa, G., Witt, C.M., Yu, J., José-yacamán, M., Chambers, J.P., Perry, G., Guentzel, M.N., and Arulanandam, B.P. (2015). Chlamydia pneumoniae promotes dysfunction of pancreatic beta cells. *Cell. Immunol.* 295, 83–91.
- Rosell, M., Kaforou, M., Frontini, A., Okolo, A., Chan, Y.-W., Nikolopoulou, E., Millership, S., Fenech, M.E., MacIntyre, D., Turner, J.O., et al. (2014). Brown and white adipose tissues: intrinsic differences in gene expression and response to cold exposure in mice. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 306, E945-64.
- Rothber, A.E., McEwen, L.N., Kraftson, A.T., Fowler, C.E., and Herman, W.H. (2014). Very-low-energy diet for type 2 diabetes: An underutilized therapy. *J. Diabetes Complications* 28, 506–510.
- Ruan, H., Hacohen, N., Golub, T.R., Van Parijs, L., and Lodish, H.F. (2002). Tumor necrosis factor- $\alpha$  suppresses adipocyte-specific genes and activates expression of preadipocyte genes in 3T3-L1 adipocytes: nuclear factor- $\kappa$ B activation by TNF- $\alpha$  is obligatory. *Diabetes* 51, 1319–1336.
- Salminen, A., Kaarniranta, K., and Kauppinen, A. (2017). Regulation of longevity by FGF21: Interaction between energy metabolism and stress responses. *Ageing Res. Rev.* 37, 79–93.
- Samms, R.J., Smith, D.P., Cheng, C.C., Antonellis, P.P., Perfield, J.W., Kharitonov, A., Gimeno, R.E., and Adams, A.C. (2015). Discrete Aspects of FGF21 In Vivo Pharmacology Do Not Require UCP1. *Cell Rep.* 11, 991–999.
- Samulski, R.J., Berns, K.I., Tan, M., and Muzyczka, N. (1982). Cloning of adeno-associated virus into pBR322: rescue of intact virus from the recombinant plasmid in human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 79, 2077–2081.
- Sarruf, D.A., Thaler, J.P., Morton, G.J., German, J., Fischer, J.D., Ogimoto, K., and Schwartz, M.W. (2010). Fibroblast growth factor 21 action in the brain increases energy expenditure and insulin sensitivity in obese rats. *Diabetes* 59, 1817–1824.
- Sattar, N., and Gill, J.M.R. (2014). Type 2 diabetes as a disease of ectopic fat? *BMC Med.* 12, 123.
- Scallan, C.D., Jiang, H., Liu, T., Patarroyo-White, S., Sommer, J.M., Zhou, S., Couto, L.B., and Pierce, G.F. (2006). Human immunoglobulin inhibits liver transduction by AAV vectors at low AAV2 neutralizing titers in SCID mice. *Blood* 107, 1810–1817.
- Schäfer, S.A., Machicao, F., Fritsche, A., Häring, H., and Kantartzis, K. (2011). New type 2 diabetes risk genes provide new insights in insulin secretion mechanisms. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 93, S9–S24.

- Scott, K. a (2012). Effects of Chronic Social Stress on Obesity. *Curr. Obes. Rep.* 1, 16–25.
- Scott, L.J. (2015). Alipogene tiparovec: A review of its use in adults with familial lipoprotein lipase deficiency. *Drugs* 75, 175–182.
- Shao, M., Yu, L., Zhang, F., Lu, X., Li, X., Cheng, P., Lin, X., He, L., Jin, S., Tan, Y., et al. (2015). Additive protection by LDR and FGF21 treatment against diabetic nephropathy in type 2 diabetes model. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* 309, E45–E54.
- Shingara, J., Keiger, K., Shelton, J., Laosinchai-Wolf, W., Powers, P., Conrad, R., Brown, D., and Labourier, E. (2005). An optimized isolation and labeling platform for accurate microRNA expression profiling. *RNA* 11, 1461–1470.
- Singhal, G., Fisher, F.M., Chee, M.J., Tan, T.G., El Ouaamari, A., Adams, A.C., Najarian, R., Kulkarni, R.N., Benoist, C., Flier, J.S., et al. (2016a). Fibroblast Growth Factor 21 (FGF21) Protects against High Fat Diet Induced Inflammation and Islet Hyperplasia in Pancreas. *PLoS One* 11, 1–20.
- Singhal, G., Douris, N., Fish, A.J., Zhang, X., Adams, A.C., Flier, J.S., Pissios, P., and Maratos-Flier, E. (2016b). Fibroblast growth factor 21 has no direct role in regulating fertility in female mice. *Mol. Metab.* 5, 690–698.
- Skurk, T., Alberti-Huber, C., Herder, C., and Hauner, H. (2007). Relationship between Adipocyte Size and Adipokine Expression and Secretion. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 92, 1023–1033.
- Smith, R., Duguay, A., Bakker, A., Li, P., Weiszmann, J., Thomas, M.R., Alba, B.M., Wu, X., Gupte, J., Yang, L., et al. (2013). FGF21 can be mimicked in vitro and in vivo by a novel anti-FGFR1c/ $\beta$ -Klotho bispecific protein. *PLoS One* 8, e61432.
- Smith, R.J., Nathan, D.M., Arslanian, S.A., Groop, L., Rizza, R.A., and Rotter, J.I. (2010a). Individualizing therapies in type 2 diabetes mellitus based on patient characteristics: what we know and what we need to know. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 95, 1566–1574.
- Smith, S.R., Weissman, N.J., Anderson, C.M., Sanchez, M., Chuang, E., Stubbe, S., Bays, H., and Shanahan, W.R. (2010b). Multicenter, placebo-controlled trial of lorcaserin for weight management. *N. Engl. J. Med.* 363, 245–256.
- Snyder, R.O., Audit, M., and Francis, J.D. (2011). rAAV vector product characterization and stability studies. *Methods Mol. Biol.* 807, 405–428.
- So, W.Y., and Leung, P.S. (2016). Fibroblast Growth Factor 21 As an Emerging Therapeutic Target for Type 2 Diabetes Mellitus. *Med. Res. Rev.* 36, 672–704.
- Sørensen, T.I., Price, R. a, Stunkard, a J., and Schulsinger, F. (1989). Genetics of obesity in adult adoptees and their biological siblings. *BMJ* 298, 87–90.
- Srivastava, A., Lusby, E.W., and Berns, K.I. (1983). Nucleotide sequence and organization of the adeno-associated virus 2 genome. *J. Virol.* 45, 555–564.
- 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.



- Stanislaus, S., Hecht, R., Yie, J., Hager, T., Hall, M., Spahr, C., Wang, W., Weiszmann, J., Li, Y., Deng, L., et al. (2017). A Novel Fc-FGF21 With Improved Resistance to Proteolysis, Increased Affinity Toward  $\beta$ -Klotho, and Enhanced Efficacy in Mice and Cynomolgus Monkeys. *Endocrinology* 158, 1314–1327.
- Stern, J.H., Rutkowski, J.M., and Scherer, P.E. (2016). Adiponectin, Leptin, and Fatty Acids in the Maintenance of Metabolic Homeostasis through Adipose Tissue Crosstalk. *Cell Metab.* 23, 770–784.
- Strissel, K.J., Gerald, D. 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, 230–338.
- Strobel, A., Issad, T., Camoin, L., Ozata, M., and Strosberg, A.D. (1998). A leptin missense mutation associated with hypogonadism and morbid obesity. *Nat. Genet.* 18, 213–215.
- Stumvoll, M., Goldstein, B.J., and van Haeften, T.W. (2005). Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy. *Lancet* 365, 1333–1346.
- Sumithran, P., and Proietto, J. (2014). Benefit-risk assessment of orlistat in the treatment of obesity. *Drug Saf.* 37, 597–608.
- Sun, B., and Karin, M. (2012). Obesity, Inflammation and Liver Cancer. *J Hepatol* 56, 704–713.
- 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. *Mol. Endocrinol.* 22, 1006–1014.
- Sweetman, D., Goljanek, K., Rathjen, T., Oustanina, S., Braun, T., Dalmay, T., and Münsterberg, A. (2008). Specific requirements of MRFs for the expression of muscle specific microRNAs, miR-1, miR-206 and miR-133. *Dev. Biol.* 321, 491–499.
- Tahrani, A.A., Bailey, C.J., Del Prato, S., and Barnett, A.H. (2011). Management of type 2 diabetes: New and future developments in treatment. *Lancet* 378, 182–197.
- Talukdar, S., Zhou, Y., Li, D., Rossulek, M., Dong, J., Somayaji, V., Weng, Y., Clark, R., Lanba, A., Owen, B.M., et al. (2016). A Long-Acting FGF21 Molecule, PF-05231023, Decreases Body Weight and Improves Lipid Profile in Non-human Primates and Type 2 Diabetic Subjects. *Cell Metab.* 23, 427–440.
- Tam, C.H.T., Ho, J.S.K., Wang, Y., Lee, H.M., Lam, V.K.L., Germer, S., Martin, M., So, W.Y., Ma, R.C.W., Chan, J.C.N., et al. (2010). Common Polymorphisms in MTNR1B, G6PC2 and GCK Are Associated with Increased Fasting Plasma Glucose and Impaired Beta-Cell Function in Chinese Subjects. *PLoS One* 5, e11428.
- 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: relationship with plasma FGF21 and body adiposity. *Diabetes* 60, 2758–2762.
- Tang, F.Y., Pai, M.H., and Chiang, E.P.I. (2012). Consumption of high-fat diet induces tumor progression and epithelial-mesenchymal transition of colorectal cancer in a mouse xenograft model. *J. Nutr. Biochem.* 23, 1302–1313.

- Taylor, R. (2008). Pathogenesis of type 2 diabetes: tracing the reverse route from cure to cause. *Diabetologia* 51, 1781–1789.
- Tchernof, A., and Després, J.-P. (2013). Pathophysiology of human visceral obesity: an update. *Physiol. Rev.* 93, 359–404.
- Tchkonia, T., Thomou, T., Zhu, Y., Karagiannides, I., Pothoulakis, C., Jensen, M.D., and Kirkland, J.L. (2013). Mechanisms and metabolic implications of regional differences among fat depots. *Cell Metab.* 17, 644–656.
- Thompson, A.C.S., Bruss, M.D., Nag, N., Kharitonov, A., Adams, A.C., and Hellerstein, M.K. (2014). Fibroblast Growth Factor 21 Is Not Required for the Reductions in Circulating Insulin-Like Growth Factor-1 or Global Cell Proliferation Rates in Response to Moderate Calorie Restriction in Adult Mice. *PLoS One* 9.
- Torgerson, J.S., Brldrin, M.N., Hauptman, J., and Sjöström, L. (2004). XENical in the Prevention of Diabetes in Obese Subjects ( XENDOS ) Study. *Diabetes Care* 27, 155–161.
- Trak-Smayra, V., Paradis, V., Massart, J., Nasser, S., Jebara, V., and Fromenty, B. (2011). Pathology of the liver in obese and diabetic ob/ob and db/db mice fed a standard or high-calorie diet. *Int. J. Exp. Pathol.* 92, 413–421.
- Trayhurn, P., Thurlby, P., and James, W.P.T. (1977). Thermogenic defect in pre-obese ob/ob mice. *Nature* 266, 60–62.
- Tuomilehto, J. (2013). The emerging global epidemic of type 1 diabetes. *Curr. Diab. Rep.* 13, 795–804.
- Turner, R.C., Cull, C.A., Frighi, V., and Holman, R.R. (1999). Glycemic control with diet, sulfonylurea, metformin, or insulin in patients with type 2 diabetes mellitus: progressive requirement for multiple therapies (UKPDS 49). UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. *JAMA* 281, 2005–2012.
- 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.
- Vegiopoulos, A., Rohm, M., and Herzig, S. (2017). Adipose tissue: between the extremes. *EMBO J.* 36, 1999–2017.
- Véniant, M.M., Komorowski, R., Chen, P., Stanislaus, S., Winters, K., Hager, T., Zhou, L., Wada, R., Hecht, R., and Xu, J. (2012). Long-acting FGF21 has enhanced efficacy in diet-induced obese mice and in obese rhesus monkeys. *Endocrinology* 153, 4192–4203.
- Véniant, M.M., Sivits, G., Helmering, J., Komorowski, R., Lee, J., Fan, W., Moyer, C., and Lloyd, D.J. (2015). Pharmacologic Effects of FGF21 Are Independent of the “Browning” of White Adipose Tissue. *Cell Metab.* 21, 731–738.
- Verrotti, A., Scaparrotta, A., Agostinelli, S., Di Pillo, S., Chiarelli, F., and Grosso, S. (2011). Topiramate-induced weight loss: A review. *Epilepsy Res.* 95, 189–199.
- Voight, B.F., Scott, L.J., Steinthorsdottir, V., Andrew, P., Aulchenko, Y.S., Thorleifsson, G., Mcculloch, L.J., and Ferreira, T. (2010). Twelve type 2 diabetes susceptibility loci identified through large-scale association analysis. *Nat. Genet.* 42, 579–589.

- Wang, H., Liu, L., Lin, J.Z., Aprahamian, T.R., and Farmer, S.R. (2016). Browning of White Adipose Tissue with Roscovitine Induces a Distinct Population of UCP1+ Adipocytes. *Cell Metab.* 24, 835–847.
- 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. *J. Thromb. Haemost.* 9, 2009–2019.
- Wang, Q.A., Tao, C., Gupta, R.K., and Scherer, P.E. (2013). Tracking adipogenesis during white adipose tissue development, expansion and regeneration. *Nat. Med.* 19, 1338–1344.
- Wang, Z., Kuhr, C.S., Allen, J.M., Blankinship, M., Gregorevic, P., Chamberlain, J.S., Tapscott, S.J., and Storb, R. (2007). Sustained AAV-mediated dystrophin expression in a canine model of duchenne muscular dystrophy with a brief course of immunosuppression. *Mol. Ther.* 15, 1160–1166.
- 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.
- Wei, W., Dutchak, P.A., Wang, X., Ding, X., Wang, X., Bookout, A.L., Goetz, R., Mohammadi, M., Gerard, R.D., Dechow, P.C., et al. (2012). Fibroblast growth factor 21 promotes bone loss by potentiating the effects of peroxisome proliferator-activated receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, 3143–3148.
- Wei, W., An, X.R., Jin, S.J., Li, X.X., and Xu, M. (2018). Inhibition of insulin resistance by PGE1 via autophagy-dependent FGF21 pathway in diabetic nephropathy. *Sci. Rep.* 8, 1–14.
- 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.
- Wernstedt Asterholm, I., Tao, C., Morley, T.S., Wang, Q.A., Delgado-Lopez, F., Wang, Z.V., and Scherer, P.E. (2014). Adipocyte Inflammation Is Essential for Healthy Adipose Tissue Expansion and Remodeling. *Cell Metab.* 20, 103–118.
- WHO (1999). Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus and its Complications.
- WHO (2016). Global Report on Diabetes. ISBN 978, 92–94.
- WHO (2017). Obesity and overweight.
- Winzell, M.S., and Ahrén, B. (2004). The high-fat diet-fed mouse: a model for studying mechanisms and treatment of impaired glucose tolerance and type 2 diabetes. *Diabetes* 53 Suppl 3, S215-9.
- 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.

- Wu, Z., Miller, E., Agbandje-McKenna, M., and Samulski, R.J. (2006). 2,3 and 2,6 N-Linked Sialic Acids Facilitate Efficient Binding and Transduction by Adeno-Associated Virus Types 1 and 6. *J. Virol.* 80, 9093–9103.
- 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. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 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. (2009). Fibroblast growth factor 21 reverses hepatic steatosis, increases energy expenditure, and improves insulin sensitivity in diet-induced obese mice. *Diabetes* 58, 250–259.
- Xu, P., Zhang, Y., Wang, W., Yuan, Q., Liu, Z., Rasoul, L.M., Wu, Q., Liu, M., Ye, X., Li, D., et al. (2015). Long-Term Administration of Fibroblast Growth Factor 21 Prevents Chemically-Induced Hepatocarcinogenesis in Mice. *Dig. Dis. Sci.* 60, 3032–3043.
- Xue, R., Lynes, M.D., Dreyfuss, J.M., Shamsi, F., Schulz, T.J., Zhang, H., Huang, T.L., Townsend, K.L., Li, Y., Takahashi, H., et al. (2015). Clonal analyses and gene profiling identify genetic biomarkers of the thermogenic potential of human brown and white preadipocytes. *Nat. Med.* 21, 760–768.
- Yakaryılmaz, F.D., and Öztürk, Z.A. (2017). Treatment of type 2 diabetes mellitus in the elderly. *World J. Diabetes* 8, 278–285.
- Yang, H., Feng, A., Lin, S., Yu, L., Lin, X., Yan, X., Lu, X., and Zhang, C. (2018). Fibroblast growth factor-21 prevents diabetic cardiomyopathy via AMPK-mediated antioxidation and lipid-lowering effects in the heart. *Cell Death Dis.* 9, 227.
- Yki-Järvinen, H. (2004). Thiazolidinediones. *N. Engl. J. Med.* 351, 1106–1118.
- Zhang, J., and Li, Y. (2015). Fibroblast Growth Factor 21 Analogs for Treating Metabolic Disorders. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. 6, 168.
- Zhang, C., Huang, Z., Gu, J., Yan, X., and Lu, X. (2015). Fibroblast growth factor 21 protects the heart from apoptosis in a diabetic mouse model via extracellular signal-regulated kinase 1 / 2-dependent signalling pathway. *Diabetologia* 1937–1948.
- Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L., and Friedman, J.M. (1994). Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372, 425–431.
- Zhang, Y., Xie, Y., Berglund, E.D., Coate, K.C., He, T.T., Katafuchi, T., Xiao, G., Potthoff, M.J., Wei, W., and Wan, Y. (2012). The starvation hormone, fibroblast growth factor-21, extends lifespan in mice. *Elife* 1.
- 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. *Biochem. J.* 473, 605–614.
- Zhu, S., Wu, Y., Ye, X., Ma, L., Qi, J., Yu, D., Wei, Y., Lin, G., Ren, G., and Li, D. (2016). FGF21 ameliorates nonalcoholic fatty liver disease by inducing autophagy. *Mol. Cell. Biochem.* 420, 107–119.
- Zinger, A., Cho, W.C., and Ben-Yehuda, A. (2017). Cancer and Aging - the Inflammatory Connection. *Aging Dis.* 8, 611–627.

Zinman, B., Wanner, C., Lachin, J.M., Fitchett, D., Bluhmki, E., Hantel, S., Mattheus, M., Devins, T., Johansen, O.E., Woerle, H.J., et al. (2015). Empagliflozin, Cardiovascular Outcomes, and Mortality in Type 2 Diabetes. *N. Engl. J. Med.* 373, 1–12.