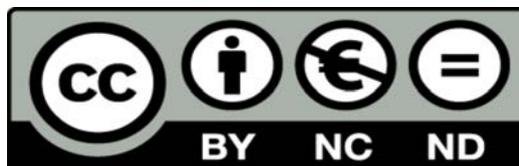




UNIVERSIDAD DE LA RIOJA

TESIS DOCTORAL

Título
Estudio del efecto de moléculas de pequeño tamaño que simulan la hipotermia en el metabolismo de la glucosa y de la obesidad
Autor/es
María Díaz de Cerio Flores
Director/es
Alfredo Martínez Ramírez y Josune García Sanmartín
Facultad
Facultad de Ciencia y Tecnología
Titulación
Departamento
Agricultura y Alimentación
Curso Académico



Estudio del efecto de moléculas de pequeño tamaño que simulan la hipotermia en el metabolismo de la glucosa y de la obesidad, tesis doctoral de María Díaz de Cerio Flores, dirigida por Alfredo Martínez Ramírez y Josune García Sanmartín (publicada por la Universidad de La Rioja), se difunde bajo una Licencia Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 3.0 Unported.
Permisos que vayan más allá de lo cubierto por esta licencia pueden solicitarse a los titulares del copyright.

© El autor
© Universidad de La Rioja, Servicio de Publicaciones, 2024
publicaciones.unirioja.es
E-mail: publicaciones@unirioja.es



TESIS DOCTORAL 2022

Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas y
Biotecnológicas

**ESTUDIO DEL EFECTO DE MOLECULAS DE
PEQUEÑO TAMAÑO QUE SIMULAN LA
HIPOTERMIA EN EL METABOLISMO DE LA
GLUCOSA Y DE LA OBESIDAD**

María Díaz De Cerio Flores

Directores:

Alfredo Martínez Ramírez

Josune García Sanmartin



TESIS DOCTORAL 2022

Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas y
Biotecnológicas

**ESTUDIO DEL EFECTO DE MOLECULAS
DE PEQUEÑO TAMAÑO QUE SIMULAN
LA HIPOTERMIA EN EL METABOLISMO
DE LA GLUCOSA Y LA OBESIDAD**

María Díaz De Cerio Flores

Director: Alfredo Martínez Ramírez

Directora: Josune García Sanmartín



ESTUDIO DEL EFECTO DE MOLECULAS DE PEQUEÑO TAMAÑO QUE SIMULAN LA HIPOTERMIA EN EL METABOLISMO DE LA GLUCOSA Y LA OBESIDAD

Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas y Biotecnológicas

Memoria presentada por Dña. María Díaz de Cerio Flores para aspirar al grado de Doctor por la Universidad de La Rioja

El presente trabajo ha sido realizado bajo la dirección del Dr. Alfredo Martínez Ramírez y la Dra. Miren Josune García Sanmartín, en el grupo de investigación de Angiogénesis del Centro de Investigaciones Biomédicas de La Rioja (CIBIR), y autorizamos su presentación ante el Tribunal que lo ha de juzgar.

Logroño, 16 de septiembre de 2022

Dr. Alfredo Martínez Ramírez

Dra. Josune García Sanmartín

Financiación

La candidata al doctorado ha recibido una beca predoctoral de la Consejería de Desarrollo Económico e Innovación para la investigación en los Centros Tecnológicos, Centros de Investigación y Empresas de la Comunidad Autónoma de La Rioja

*A mis abuelos,
A mis padres,
A Álvaro y Aurora,
Esta tesis es vuestro esfuerzo.*

Abreviaturas

ABS	Acetil Buteno Estireno	IR	receptor de la insulina
ALMS	Síndrome de Alström	IRES	Sitio interno de entrada al ribosoma
AMPc	Monofosfato de adenosina cíclico	IRT	Test de resistencia a la insulina
AOS	Síndrome de apnea obstructiva del sueño	IRT	Test de resistencia a la insulina
ATP	Adenosín trifosfato	JBTS	Síndrome de Joubert
BBS	Síndrome de Bardet-Biedl	m	Ratón
cDNA	ADN complementario	NAFLD	Hígado graso no alcoholico
CIRP	Proteína de unión al RNA inducible por frío	NCI	National Cancer Institute
CSP	Porteína de respuesta a frío	NPH	Nefronoptisis
DIO	Diet induced obesity	OMS	Organización Mundial de la Salud
ECDS	Compuesto disruptor endocrino	OrO	Oil Red O
eCIRP	CIRP extracelular	p100	Placas de petri de 100 mm
ENT	Enfermedades no transmisibles	PET-G	Polietileno-glicol
EPOC	Enfermedad pulmonar obstructiva crónica	PFAS	Sustancias perfluoroalquiladas
FBS	Suero bovino fetal	PKD	Enfermedad poliquística del riñón
FDM	Modelado por deposición fundida	PLA	Ácido poliláctico
FEV	Fracción del estroma vascular	PPA	Paridad de poder adquisitivo
g	Cabra	PVDF	Fluoruro de polivinilideno
gp	Conejo de indias	qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa conejo
GPCRs	Receptores acoplados a proteínas G	r	Proteína con motivo de unión al RNA 3
GWAS	Estudios de asociación de todo el genoma	RBM3	Proteína con motivo de unión al RNA 3
HDL	Colesterol de lipoproteínas de alta densidad	RNA^m	ARN mensajero
Hg	Hedgehog	RPA	Proteína de replicación A
hnRNP	Ribonucleoproteínas nucleares heterogéneas	rpm	Revoluciones por minuto
hPA	Preadipocitos humanos	RT	Retrotranscripción
HTVS	Cribado de alto rendimiento	RTKs	Receptores tirosín quinasa
IARC	Centro Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer	SERCA	Retículo sarco/endoplásmico Ca ²⁺ -ATPasa
IBMX	3-isobutil-1-metilxantina	SHO	Síndrome de hipoventilación por obesidad
IFT	Sistema de transporte intraflagelar	SLS	Síndrome de Senior-Löken
IMC	Índice de masa corporal	SM	Moléculas de pequeño tamaño
i.p.	intraperitoneal	SNP	Polimorfismos de un solo nucleótido
IPGTT	Test intraperitoneal de tolerancia a la glucosa	TA	Temperatura ambiente
		TGF	Factor de transformación del crecimiento
		TZ	Zona de transición
		UCP	Proteína desacopladora 1

UV Ultravioleta
WCRF/AICR Fondo Mundial de
Investigación del

WNT Cáncer/Agencia Internacional
de Investigación del Cáncer
Wingless

Agradecimientos y reflexiones

Nunca se me ha dado especialmente bien agradecer con palabras, eso es así. A lo largo de la vida de una persona es increíble la cantidad de veces que hay que dar las gracias. Gracias de las de verdad. Gracias de las que el decir "muchas gracias" se queda corto, aunque lo digas con todo el amor de tu corazón, con tanto amor que hasta los angelitos lloran de emoción. Pues yo ahí fallo. Y fallo bien. Nada de sutilezas, cojo la medida, llamo a la NASA y la pongo en órbita. "Tenga la barra de pan. - Muchas gracias, señor, tenga un riñón" . Mal.

Con esta trayectoria, es obvio que soy de esa gente que es más de agradecer con actos que con palabras. Obras son amores y no buenas razones que dicen. En mi caso los actos y obras se traducen más en pasteles y tartas, válgase la ironía siendo los agradecimientos de una tesis basada en la obesidad. Pero bueno, cosas de las incongruencias humanas y del sentido del humor de la vida.

Todos a los que estoy agradecida lo sabéis, así que salvo excepciones no daré nombres, y creo que no es necesario extenderme mucho más. Caliento el horno:

- A todos mis compañeros de la 2ª planta, una tarta Guinness, una de queso y un bizcocho para vosotros. Con eso creo que cubro todos los frentes y todos los gustos.
- A mis co-directores: Alfredo el día que salde todas mis deudas contigo acabas empachado, y no se me olvida la tarta de queso que tenemos pendiente. Y Josu, tú me lo pones más difícil, pero... ¡reto aceptado!
- A mi familia de BSM solo quiero deciros dos palabras: Bodega, ¿Cuándo? Sincronizad vuestras agendas que ya sabéis que no me gusta cuando pasáis hambre.
- A mi familia de sangre, una buena comilona en el merendero, de esas que nos dan la cena, con sus entrantes, 2 platos de rigor y no menos 5 postres (sin contar la fruta, que esa va a otro estómago)
- Doc, nuestro hermano, nuestro padrino, a ti hasta te haría unas fabes con morcilla salada (¡salada!) si fuese necesario.
- A mis padres, gracias, para bien o para mal soy lo que sois.
- Álvaro de Soria, te cocinaría todos los días de mi vida.
- Aurora, mi niña, mi cascabel, ya no le tendremos que robar minutos al trabajo. Ya mamá es para ti.

A todos, gracias, de las de todo el amor de mi corazón, del que hasta los angelitos lloran de emoción. **Gracias.**

Los que me conocéis sabéis que me encanta la comedia, pero ahora llega el momento de ponerse un poco más serios. Esta era mi última reflexión de la tesis que, por el formato formal y académico del grueso del trabajo no tiene cabida con el resto, un poco más científicas y bastante menos filosóficas. Así que va a ser como empezar la comida por el digestivo.

Hoy en día el mundo científico está siendo devorado por el monstruo del ya y de la utilidad práctica, y parece que está perdiendo el espíritu de la búsqueda y el entendimiento, de la fascinación por el funcionamiento de la vida, del saber por saber. Ya parece que no interesa fabricar pensadores, solo trituradores de artículos. De los males de la ciencia quizás este sea el más preocupante. El más urgente sin duda es el que se escucha por los pasillos o al lado de la máquina de café, si se presta un poco de atención, y que cada día suena más alto. ¿Qué pasa con los científicos? Publica o muere. ¿Hasta cuándo la vocación y el conocimiento científico van a justificar el sistema actual? Yo ya he sacrificado los dos primeros años de vida de mi primogénita, como si la investigación fuese un dios sacado de una película de Indiana Jones. Y miro a mi alrededor y no soy ni la única ni la que más ha sacrificado, ni de lejos, al fin y al cabo, yo apenas acabo de empezar. Tiempo, burocracia, inestabilidad, precariedad... o abandono¹. Qué triste elección.

Pero estamos a tiempo. Aún quedan descubrimientos maravillosos, los cilios primarios son una buena prueba de ello. Recuperemos la ciencia, apostemos por la básica, y por la aplicada. Fascinémonos otra vez por las maravillas de la naturaleza, tomémonos el tiempo que se merece en disfrutar de cada paso del camino y, por qué no, de cada tropiezo. La investigación de por sí ya es una amante ingrata, que pide mucho y da poco, por eso, investigadores, en vuestra mano está exigir un cambio en el modelo, pasar de investigación de batalla a buena investigación. Y así, quizás, a vosotros os escuchen. Y así, quizás, nuestros hijos puedan dedicarse a esta extraordinaria profesión sin renunciar a la vida y con el valor que se merece. Al final, la investigación es la mejor profesión del mundo, pero al fin y al cabo solo es una profesión.

RESUMEN	7
INTRODUCCIÓN	9
1. Obesidad	9
1.1. ¿Qué es?.....	9
1.2. Incidencia.....	10
1.3. Causas	11
1.4. Consecuencias.....	16
1.5. Soluciones actuales	23
2. Tejido adiposo.....	25
2.1. grasa blanca.....	25
2.2. Grasa Parda	26
2.3. Grasa Beige.....	27
2.4. Termogénesis.....	29
2.5. Hipotermia terapéutica como terapia frente a la obesidad.....	33
3. Moléculas de respuesta a frío: CIRP y RBM3	34
3.1. Estructura	34
3.2. Función	35
3.3. Inconvenientes	38
3.4. Mecanismo.....	39
4. Cilio primario	40
4.1. ¿Qué es?	40
4.2. Estructura	40
4.3. Biogénesis del cilio primario	43
HIPÓTESIS.....	53
OBJETIVOS.....	55
MATERIAL Y MÉTODOS.....	57
1. Ensayos con líneas celulares	57
1.1. Línea celular R28.....	57
1.2. Línea celular 3T3-L1	64
2. Experimentos in vivo.....	66
2.1. Prueba piloto en ratas	66
2.2. Modelo animal.....	66
3. Ensayos con cultivos primarios humanos.....	73

4.	Técnicas generales	75
4.1.	Western Blotting	75
4.2.	Expresión génica mediante qPCR	77
4.3.	Inmunofluorescencia en tejidos	80
4.4.	Inmunofluorescencia en células	82
4.5.	Tinción con Oil red O	83
5.	Minería de datos	84
6.	Análisis estadístico	84
	RESULTADOS	85
1.	Caracterización de moléculas de pequeño tamaño para simular hipotermia	85
1.1.	Contexto	85
1.2.	Caracterización de SMs que modulan la expresión de CIRP	86
1.3.	Efecto de la confluencia en células R28 tratadas con zr17-2 (10 μ M)	88
1.4.	Comparación de anticuerpos anti-CIRP	89
2.	zr17-2 como molécula moduladora del metabolismo relacionado con la obesidad 90	
2.1.	Experimentos <i>in vitro</i>	90
2.2.	Experimentos <i>in vivo</i>	92
2.3.	Experimentos <i>ex vivo</i>	105
3.	Cilio primario	109
3.1.	Cilio primario e hipotermia	109
3.2.	Experimentos de flujo	114
	DISCUSIÓN	127
1.	Contexto y resumen del trabajo	127
2.	Caracterización de las SMs que simulan la hipotermia	128
3.	Zr17-2 como molécula moduladora del metabolismo relacionado con la obesidad 128	
3.1.	Experimentos <i>in vitro</i>	128
3.2.	Experimentos <i>in vivo</i>	130
3.3.	Tratamiento de ratones con zr17-2 en termoneutralidad	132
3.4.	Ensayo piloto con distintas cepas de rata	133
3.5.	Experimento piloto de tratamiento a medio plazo y su efecto en los niveles de glucosa e insulina	134
3.6.	Experimentos de obesidad inducida por dieta alta en grasas (DIO)	135
3.7.	Experimentos <i>ex vivo</i>	137
4.	Cilio primario	139
4.1.	Cilio primario e hipotermia	139
4.2.	Cilio primario y flujo	140
4.3.	CIRP y RBM3 en centrosomas	142
5.	Reflexiones	142

CONCLUSIONES.....	145
BIBLIOGRAFÍA	147
ANEXOS.....	1

La obesidad y el sobrepeso son un problema de salud mundial creciente que afecta en torno a 2000 millones de personas, sin importar edad, origen ni estatus socioeconómico. Las consecuencias que conllevan tanto en la salud como a nivel económico hacen imprescindible encontrar una solución efectiva para frenar su expansión. Pero su origen multifactorial, con componentes genéticos, ambientales y sociales, hace extremadamente difícil su control. Por ello, se están constantemente buscando nuevas terapias que potencien el efecto de los hábitos saludables en personas con sobrepeso y obesidad y que ayuden en la lucha contra la enfermedad.

La termogénesis es una herramienta natural que tiene el organismo para responder ante el frío, generando calor principalmente a partir de ácidos grasos. Por ello, es una diana muy interesante en el desarrollo de nuevas terapias anti-obesidad. Sin embargo, la hipotermia, aunque sea moderada puede ser potencialmente peligrosa para aplicarla como tratamiento contra la obesidad.

Teniendo esto en mente, se diseñaron unas moléculas de pequeño tamaño capaces de simular la respuesta de la hipotermia en el organismo, pero sin la necesidad de someter al individuo al frío. Estas moléculas, entre las que se encuentra zr17-2, aumentan los niveles de la proteína de respuesta al frío (CSP) CIRP en cultivos celulares. Además, zr17-2 se testó en distintos tejidos de modelos animales para estudiar su comportamiento en el contexto de la obesidad y el síndrome metabólico.

Durante el transcurso de esta investigación se profundizó en el posible mecanismo de captación del frío en las células, estudiando el comportamiento de las CSPs, CIRP y RBM3, en el cilio primario. El cilio primario es una estructura capaz de detectar y transmitir cambios en el ambiente al interior de la célula y, como se ha visto en el desarrollo de este trabajo, CIRP y RBM3 están íntimamente ligadas a él.

Introducción

1. OBESIDAD

1.1. ¿QUÉ ES?

La obesidad es una enfermedad crónica prevenible de origen multifactorial que se caracteriza por acumulación excesiva de grasa o hipertrofia general del tejido adiposo en el cuerpo; es decir, cuando la reserva natural de energía de los humanos y otros mamíferos almacenada en forma de grasa corporal se incrementa hasta un punto en que pone en riesgo la salud o la vida. Esta acumulación se da cuando hay un desequilibrio entre las calorías ingeridas y las calorías consumidas.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define como obesidad poseer un IMC (índice de masa corporal, cociente entre la estatura y el peso de un individuo al cuadrado) igual o superior a 30 kg/m² y sobrepeso un IMC mayor o igual a 25 kg/m² en adultos (Tabla 1). También se considera signo de obesidad un perímetro abdominal en hombres mayor o igual a 102 cm y en mujeres mayor o igual a 88 cm. En niños de entre 5 y 19 años la medida de obesidad se considera una desviación estándar mayor o igual que 2 del índice del IMC y el sobrepeso una desviación estándar mayor o igual a 1. Y para bebés y niños de hasta 5 años la obesidad y el sobrepeso se miden como una desviación estándar mayor o igual a 2 ó 1 respectivamente sobre la mediana del Patrón de Crecimiento Infantil de la OMS² (Tabla 1).

Tabla 1. Criterios de clasificación de la obesidad y el sobrepeso según la OMS²

	SOBREPESO	OBESIDAD
ADULTOS	IMC \geq 25	IMC \geq 30
DE 5 A 19 AÑOS	\geq 1 DE del IMC (equivalente al IMC 25 Kg/m ² a los 19 años)	\geq 2 DE del IMC (equivalente al IMC 30 Kg/m ² a los 19 años)
HASTA 5 AÑOS	\geq 2 DE de la mediana del Patrón de Crecimiento Infantil de la OMS	\geq 3 DE de la mediana del Patrón de Crecimiento Infantil de la OMS

Además, dentro de la obesidad puede haber una subdivisión en tres categorías según el incremento del IMC³:

- Obesidad de grado 1: IMC entre 30-35
- Obesidad de grado 2: IMC entre 35-40
- Obesidad de grado 3: IMC de 40 o más, es lo que se considera obesidad severa u obesidad mórbida

1.2. INCIDENCIA

El sobrepeso y la obesidad son el quinto factor principal de riesgo de defunción humana en el mundo. Cada año fallecen por lo menos 2,8 millones de personas adultas como consecuencia del sobrepeso o la obesidad^{4,5}.

En 2016, la revista *The Lancet* publicó un análisis combinado de las tendencias en el IMC de la población adulta de 200 países entre 1975 y 2014. Según ese estudio, había en 1974 en el mundo un total estimado de 105 millones de adultos obesos. Para 2014, ese número se había disparado a 640 millones, una cifra más de seis veces superior⁶. La conclusión general de este análisis es realmente preocupante, y de mantenerse las tendencias imperantes desde el año 2000, las probabilidades de cumplir con el objetivo mundial fijado por los Estados Miembros de la OMS de detener el aumento de la prevalencia de la obesidad en los niveles de 2010 antes del 2025 son prácticamente nulas. Es más, las proyecciones que se han realizado en otros países, por ejemplo Estados Unidos, pintan un panorama aún más oscuro y cifran la tasa de obesidad para 2030 en prácticamente 1 de cada 2 adultos⁷.

Lo que antes aparecía como un problema de países desarrollados, ahora se traslada a países con ingresos medios y bajos^{8,9}. Actualmente, muchos países en vías de desarrollo tienen que hacer frente a la doble carga que supone la obesidad y la malnutrición simultáneamente, lo que tensiona aún más los sistemas de salud y tiene efectos devastadores tanto en el bienestar como en la economía del país¹⁰. De hecho, la OMS alerta de que muere más gente hoy en día de sobrepeso y obesidad que de desnutrición⁵.

Por si fuera poco, la expansión incontrolada a nivel mundial del sobrepeso y la obesidad no se limita únicamente a la población adulta, sino que la prevalencia de obesidad infantil se ha octuplicado desde 1975¹¹. Estos datos continúan aumentando pese a los esfuerzos para introducir comportamientos saludables entre la población más joven, lo que ha despertado una gran preocupación a nivel global para solucionar este problema en un futuro inmediato^{12,13}. La urgencia de atajar este problema surge a raíz de que las principales complicaciones derivadas de la obesidad infantil radican en la alta probabilidad de que los

niños con sobrepeso acaben siendo adultos con sobrepeso, lo que aumenta el riesgo de padecer enfermedades metabólicas y cardiovasculares, y la relación entre el IMC elevado en la adolescencia con el aumento del riesgo de padecer ciertos tipos de cáncer en la edad adulta, como leucemia, cáncer colorrectal o enfermedad de Hodgkin¹⁴.

1.3. CAUSAS

Las causas de la obesidad son diversas y complejas, pero la epidemia de sobrepeso que está sufriendo el mundo actual se debe sobre todo a un estilo de vida sedentario y al consumo irresponsable de alimentos hipercalóricos¹⁵. A nivel individual hay muchos factores que pueden derivar en un desequilibrio entre las calorías ingeridas y las calorías consumidas (Fig. 1), aunque podrían clasificarse en tres grandes grupos: genéticos, sociales y ambientales.

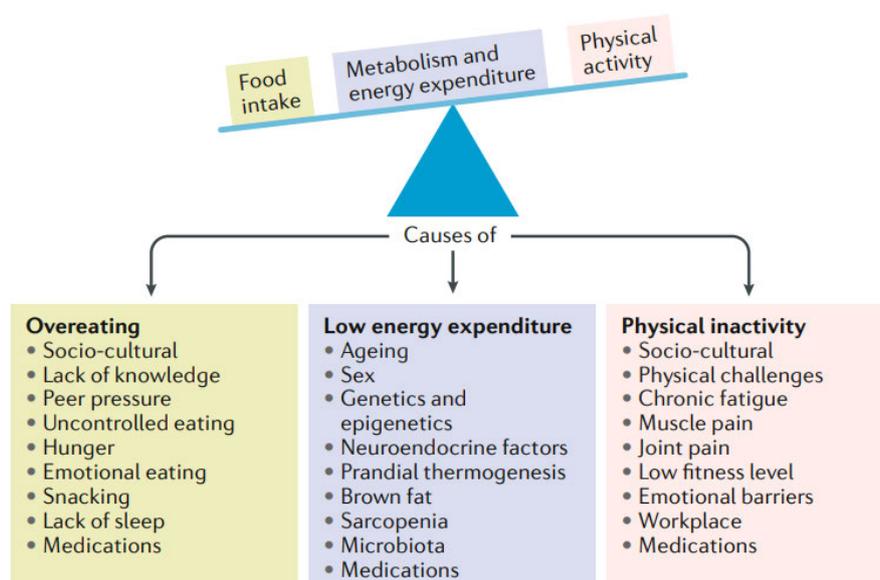


Figura 1. Factores que influyen en el balance de energía y, por tanto, en la obesidad. El aumento de peso es resultado de la combinación entre un exceso de calorías consumidas, poca actividad física y un gasto energético bajo. (Figura obtenida de Blüher¹⁶)

1.3.1. FACTORES GENÉTICOS

Los factores genéticos han sido ampliamente estudiados a lo largo de estos últimos años, y gracias a ello se han identificado múltiples genes implicados en la obesidad no sindrómica (aquella no asociada a síndromes genéticos). Los estudios realizados con gemelos parecen indicar que la obesidad puede ser un trastorno de la homeostasis energética que explicaría la heredabilidad asociada al IMC, estimada en un 40-70%^{17,18}. De hecho, se han descubierto mutaciones en genes específicos, normalmente asociados con la estimulación del apetito y la saciedad, que son los responsables de una forma muy severa y rara de obesidad, la obesidad monogénica. Entre ellos están los de la leptina o su receptor, el de la pro-

opiomelanocortina (POMC) y su prohormona convertasa (PC1)¹⁹, el neuropéptido Y (NPY)²⁰, el receptor de la grelina²¹, o el receptor de melanocortina 4 (MC4R)²². Estos genes, entre otros, han ayudado a entender la importancia de los factores biológicos en la patogénesis de la enfermedad.

La obesidad monogénica por sí sola no puede explicar la magnitud de la pandemia de obesidad actual, ya que la mayoría de los casos de obesidad genética son poligénicos, bien por alteración de las rutas de la familia del receptor adrenérgico²³ o de las proteínas desacopladoras (UCPs)^{24,25} responsables de la termogénesis, entre otras, o bien por polimorfismos de un solo nucleótido (SNP). De hecho, los estudios de asociación de todo el genoma (GWAS) para el IMC, la relación cintura-cadera y otros rasgos de adiposidad, han identificado más de 300 SNP que podrían derivar en un fenotipo obeso²⁶. Sin embargo, excepto la obesidad monogénica, el resto de los factores genéticos implican una predisposición a la obesidad, pero no son una causa directa única para su desarrollo. Cada vez está más claro que la obesidad es el resultado de complejas interacciones entre muchos genes y factores sociales y ambientales.

1.3.2. FACTORES SOCIALES

A nivel individual, las recomendaciones actuales para reducir el balance calórico tienden a ir hacia los cambios en hábitos de vida como la alimentación sana y el deporte, es decir, cambios conductuales que disminuyan la ingesta y aumenten el gasto energético. Pero conseguir estas modificaciones comportamentales y mantenerlas en el tiempo no es fácil. Desde el punto de vista evolutivo el ser humano ha tenido que hacer frente a largos periodos de desnutrición, así que la adaptación ha favorecido conductas de acumulación y ahorro de energía. Además, los individuos capaces de aguantar largos periodos de hambruna y de almacenar y movilizar energía de forma más eficiente serían capaces de reproducirse más que aquellos que no lo fuesen; por tanto, la presión de la selección probablemente contribuyó a favorecer la sobrealimentación, el bajo gasto energético y la inactividad física¹⁶. Desde las sociedades cazadoras-recolectoras hasta hace 50 años, este tipo de conductas eran fundamentales para la supervivencia de gran parte de la población, pero hoy en día el acceso regular a la comida y el sedentarismo ha hecho que este tipo de conductas no solo favorezcan la aparición de la obesidad, si no que dificulten el mantenimiento de los hábitos de vida saludables necesarios para combatirla.

Los factores socioculturales juegan un papel trascendental en la explosión de la obesidad a nivel global. De hecho, la forma en que la sociedad modula las costumbres de los individuos es decisiva en el desarrollo de la enfermedad. Un ejemplo es la percepción del estándar de belleza. Hay regiones donde la obesidad es un símbolo de belleza (como es el caso de

algunas islas del Pacífico²⁷), y a nivel individual esta idea puede condicionar las decisiones personales.

El estatus socioeconómico también parece influir en el aumento de la obesidad, cuya prevalencia se incrementó en la década de los setenta en países de rentas altas, seguidos por la mayoría de los países de renta media y últimamente también varios de renta baja^{28,29}, lo que parece indicar que el aumento de los niveles de obesidad coincide con la mejora económica de la población general. A su vez Wilkinson y Pickett sugieren que la desigualdad económica contribuye a la heterogeneidad en la prevalencia de la obesidad, y que en países con menores diferencias de ingresos (como Japón y los países escandinavos) coinciden con una menor prevalencia de obesidad que en países con sociedades más desiguales como Inglaterra o Portugal³⁰. Estas diferencias de peso según el estrato socioeconómico pueden explicarse por el mayor coste de las dietas saludables frente a dietas hipercalóricas³¹, ricas en azúcares y grasas añadidas, granos refinados y potenciadores del sabor de muy bajo precio³². Todos estos factores pueden convertir la obesidad en uno de los mayores riesgos de la desigualdad.

Con la industrialización y la revolución digital ha habido un cambio de paradigma en el modelo de trabajo que ha trascendido a los hábitos de vida del individuo y que también tiene un papel en la obesidad. La elevada maquinización del sector primario y secundario ha reducido el trabajo físico notablemente y ha disminuido la necesidad de mano de obra en favor del sector terciario, de trabajo mucho más sedentario en general. Cuando se analiza el tiempo que los trabajadores de distintos empleos permanecen sentados a lo largo de una jornada laboral se obtienen cifras de en torno al 70-80% de la jornada para trabajo de oficina, atención al cliente, etc.³³⁻³⁶. Teniendo en cuenta que en muchos países la población adulta pasa al menos un tercio de su jornada en el trabajo, la tendencia al sedentarismo del mundo laboral supone un punto a tener en cuenta en la expansión de la obesidad. Por ejemplo, en los últimos 50 años se estima que el gasto energético diario relacionado con el trabajo ha disminuido en más de 100 calorías, y esta reducción en el gasto energético es responsable de una parte significativa del aumento del peso corporal medio en Estados Unidos, tanto para mujeres como hombres³⁷. Al sedentarismo laboral se le une también las nuevas formas de entretenimiento derivadas del mundo digital (televisión, videojuegos, redes sociales...) que aumentan la propensión al ocio sedentario y que fomentan cada vez más la falta de actividad física. Esto es especialmente preocupante entre la población más joven, ya que la mayoría de los adolescentes (81%) no llegan a cumplir las directrices actuales de actividad física, independientemente del grupo de ingresos del país de origen³⁸.

Por último, la globalización, entendida como la integración financiera de las economías del mundo y la permeabilización fronteriza de personas y desarrollo tecnológico, también es un

punto crítico en la pandemización de la obesidad. Concretamente ha favorecido la expansión de ambientes cada vez más obesogénicos que condicionan profundamente el comportamiento del ser humano y su estilo de vida. El incremento de la prevalencia de la obesidad en los últimos años ha coincidido con una reducción de la cocina casera, mayor dependencia de la comida precocinada y comida rápida, aumento del uso de calefacciones que causan la reducción del gasto energético empleado en mantener la temperatura corporal, reducción de la actividad física, aumento de la informatización del trabajo en la mayoría de las ocupaciones, expansión del entretenimiento no físico (ocio digital y relacionado con las nuevas tecnologías), normalización del consumo de snacks, alcohol y bebidas azucaradas, o campañas de marketing cada vez más estudiadas, entre otras.

1.3.3. FACTORES AMBIENTALES

Los factores sociales se entrelazan con los estímulos ambientales en lo que se refiere a la causalidad del desarrollo de la obesidad. De hecho, es muy difícil establecer la línea entre factor social y factor ambiental. Se ha visto que son moderadores obesogénicos importantes, entre otros, el entorno urbano, la densidad de las cadenas de comida rápida, los sistemas de transporte, la posibilidad de caminar por la zona de residencia, o las oportunidades de recreación activa.

El contexto arquitectónico en el que vive un individuo tiene el potencial de contribuir a su IMC, ya que puede favorecer el movimiento de sus habitantes o limitar su movilidad. El diseño urbano hasta hace 40 años priorizaba un urbanismo disperso, orientado hacia el automóvil que desalienta los desplazamientos a pie. Sin embargo, los vecindarios que favorecen actividades peatonales (barrios con alta densidad de población, gran número de destinos a poca distancia de las áreas residenciales y calles bien conectadas) se caracterizan por una mayor ratio de transporte a pie o alternativos y menor utilización del coche³⁹. Un ejemplo de esto se puede ver en el caso de Ontario (Canadá), donde una mayor transitabilidad de los barrios se asocia con una menor prevalencia de obesidad y sobrepeso, así como una disminución de la incidencia de diabetes⁴⁰.

El entorno alimentario de la zona de residencia también es un factor importante a la hora de favorecer la predisposición a la obesidad. El hecho de tener acceso fácil a comida sana parece relacionarse con una menor probabilidad de obesidad⁴¹. Además, la diferencia de la exposición y comercialización de alimentos hipercalóricos frente a alimentos saludables en los comercios se relaciona positivamente con la obesidad⁴².

Dentro de los factores ambientales, se pueden encontrar también compuestos químicos capaces de favorecer la ganancia de peso. Estos químicos obesógenos actúan como disruptores endocrinos (endocrine-disruptive chemicals o EDCs) que son capaces de

interferir con la regulación de los procesos metabólicos y el control de la función de los adipocitos, dando lugar a desequilibrios en la regulación del peso corporal, lo que puede derivar en obesidad⁴³. Un caso muy conocido de EDC es el relacionado con el tabaquismo materno, cuya exposición prenatal se asocia a un aumento del IMC del hijo⁴⁴. Sin embargo, hay muchos compuestos que actúan como EDCs y que se utilizan ampliamente en la industria, liberándose al medio ambiente como productos derivados de la actividad humana sin conocer los efectos que pueden tener sobre el ecosistema o la salud, y que son mucho menos conocidos para el público general. Cada vez existen más estudios sobre EDCs que revelan que estos compuestos son capaces de alterar los receptores activados por proliferadores peroxisomales (PPAR), de estrógenos y de la hormona tiroidea, entre otras rutas metabólicas, tanto en exposición prenatal como en adultos⁴⁵. Por ejemplo, hay varios estudios que asocian la obesidad infantil con la exposición prenatal a bisfenol A (BPA)^{46,47} y sustancias perfluoroalquiladas (PFAS)^{48,49}. Por su parte, la exposición en la edad adulta a ftalatos⁵⁰, BPA⁵¹ y PFAS^{52,53} parece contribuir a la ganancia de peso, especialmente en mujeres en el caso de los dos primeros EDCs, que a su vez se asocian con diabetes gestacional, deterioro de la tolerancia a la glucosa y obesidad.

Por último, es necesario reconocer la microbiota como un factor importante en el desarrollo de la obesidad y de las enfermedades metabólicas⁵⁴ ya que juega un papel esencial en la obtención de energía y su relación con la composición corporal⁵⁵. Los filos bacterianos dominantes en el intestino del ser humano son los Bacteroidetes (23%), los Firmicutes (64%), las Proteobacteria (8%) y las Fusobacteria, Verrucomicrobia y Actinobacteria que conforman un 3% de la microbiota⁵⁶. Si se da una disbiosis, puede alterarse el funcionamiento de la barrera intestinal facilitando el paso de componentes bacterianos que favorezcan la inflamación, como los lipopolisacáridos, o evitar la producción de péptidos gastrointestinales relacionados con la saciedad favoreciendo la obesidad. De hecho, hay numerosos estudios que asocian un aumento en la ratio Firmicutes/Bacteroidetes con esta patología, manifestando su papel en el mantenimiento de la homeostasis del organismo⁵⁷

En resumen, la obesidad es una consecuencia de la interacción de múltiples factores heterogéneos que abarcan desde la fisiología, la psicología individual, la actividad física, el consumo y la producción alimentaria, la psicología social y las condiciones ambientales y, aunque cada vez hay más concienciación y más políticas que favorecen hábitos de vida saludables, su carácter multifactorial la convierte en una enfermedad extremadamente difícil de controlar.

1.4. CONSECUENCIAS

1.4.1. EN LA SALUD

La obesidad forma parte del síndrome metabólico, y es un factor de riesgo conocido para enfermedades no transmisibles (ENT) como enfermedades cardiovasculares, diabetes mellitus tipo 2, apnea del sueño, ictus y osteoartritis, así como para algunas formas de cáncer, padecimientos dermatológicos y gastrointestinales^{16,58}. Así, por ejemplo, el 44 % de la carga de diabetes, el 23 % de la carga de cardiopatías isquémicas y entre el 7 y el 41 % de la carga de algunos cánceres son atribuibles al sobrepeso y la obesidad⁵. La obesidad induce alteraciones en la respuesta del organismo a la insulina (resistencia a la insulina), un estado proinflamatorio y una tendencia incrementada a la trombosis (estado protrombótico)⁵⁹. Todo ello lleva a que la mortalidad esté incrementada en los obesos⁶⁰, de forma que un IMC mayor de 30 está asociado con una esperanza de vida 4.2 y 3.5 años menor en hombres y mujeres respectivamente⁶¹. De hecho, está comprobado que las medidas enfocadas a la pérdida de peso, como la dieta y el ejercicio, son capaces de reducir la mortalidad prematura en adultos obesos⁶².

Además, se ha visto que en individuos que sufren obesidad hay una pérdida de años libres de enfermedad debido a las principales ENT⁶³. De hecho, al analizar el momento en el que empezaban a aparecer las ENT, la obesidad leve se asoció con la pérdida de uno de cada diez años, y la obesidad grave con la pérdida de uno de cada cuatro años potenciales libres de enfermedad durante la edad media y avanzada. Esta pérdida creciente de años libres de enfermedad a medida que la obesidad se agrava se produjo en ambos sexos, tanto en fumadores y no fumadores, entre los físicamente activos y los inactivos, y en toda la jerarquía socioeconómica, con las implicaciones que conlleva para la salud mundial.

Obesidad y enfermedades cardiovasculares

Respecto a las complicaciones cardíacas, la obesidad afecta a prácticamente todos los factores de riesgo de enfermedad cardiovascular, especialmente a aquellos relacionados con el síndrome metabólico como son la presión sanguínea, concentración lipídica (incremento de triglicéridos y reducción de colesterol de lipoproteínas de alta densidad, HDL), y aumento de los niveles de glucosa en sangre, que podrían derivar en el desarrollo de diabetes tipo 2. Además, dado que los adipocitos liberan citoquinas que aumentan los niveles de proteínas inflamatorias, como la interleucina 1 y 6 y la proteína C reactiva, la obesidad suele asociarse con un aumento de la inflamación. A esto se le suma el efecto adverso que produce la acumulación de grasa en la estructura y funcionalidad de la estructura cardíaca. Por tanto, no es de extrañar que casi todas las enfermedades

cardiovasculares, especialmente la insuficiencia cardíaca, aumenten en el contexto de la obesidad⁶⁴.

Obesidad y cáncer

Desde hace unos años, la obesidad y el sobrepeso han llegado a ser uno de los factores determinantes en el incremento de la incidencia y prevalencia del cáncer. Se estima que el 14% de muertes por cáncer en hombres, y el 20% en mujeres, estarían causados por la obesidad y sobrepeso en Estados Unidos⁶⁵.

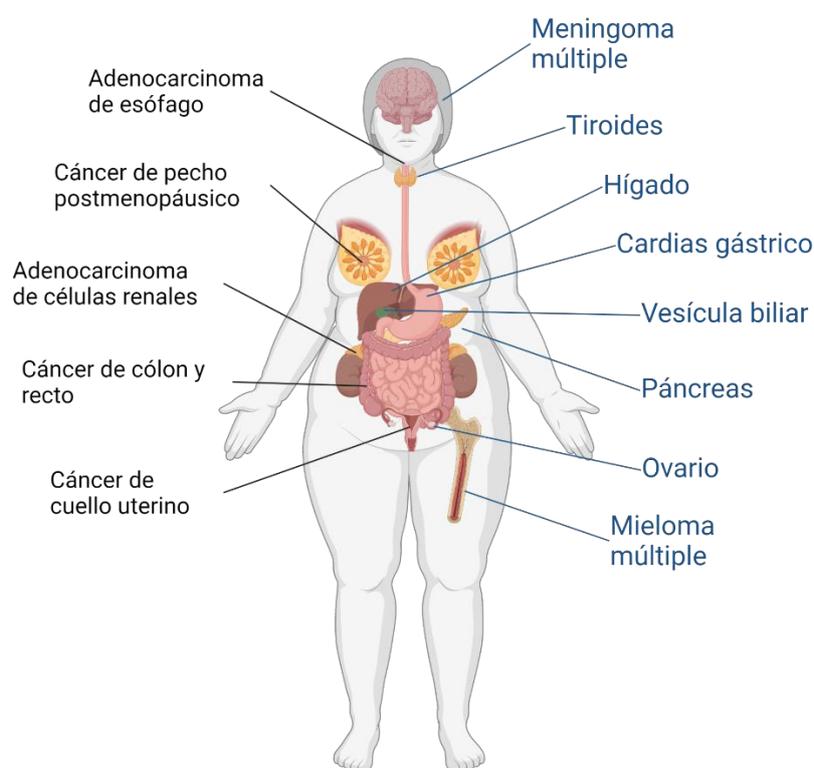


Figura 2. Tipos de cánceres relacionados con la obesidad. La obesidad es un factor de riesgo conocido que favorece el desarrollo de adenocarcinoma de esófago, cáncer de colon y recto, cáncer de pecho postmenopáusico, cáncer de cuerpo uterino, adenocarcinoma de células renales, cánceres de cardias gástrico, hígado, vesícula biliar, páncreas, ovario, tiroides, mieloma y meningioma múltiple. En azul se muestran los cánceres asociados con la obesidad en 2016 tras la revisión de la IARC (Figura creada con BioRender)

En 2016 el Centro Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer (IARC) hizo una revisión de más de 1000 estudios investigando el riesgo de cáncer y el exceso de grasa corporal. Esta relación era conocida ya para 5 tipos de cáncer: adenocarcinoma de esófago, cáncer de colon y recto, cáncer de pecho postmenopáusico, cáncer de cuerpo uterino y adenocarcinoma de células renales. Pero en esta revisión encontraron evidencias que relacionaban un exceso de peso corporal con el aumento de riesgo en 8 tipos de cáncer más, concretamente los cánceres de cardias gástrico, hígado, vesícula biliar, páncreas,

ovario, tiroides, mieloma y meningioma múltiple⁶⁶ (Fig. 2). Además, un metaanálisis (revisión *umbrella*) realizado por el Fondo Mundial de Investigación del Cáncer junto con la Agencia Internacional de Investigación del Cáncer (WCRF/AICR) halló evidencias sólidas de la asociación entre obesidad y cáncer predominantemente de órganos digestivos y cánceres de órganos sensibles a hormonas en mujeres⁶⁷.

Obesidad y patologías metabólicas

De la mano de la obesidad van la diabetes y el síndrome metabólico. El rápido crecimiento paralelo de la obesidad y la diabetes tipo 2 ha llevado a acuñar el término “diabesity”, que subraya la relación entre las dos enfermedades y sirve para describir la combinación de sus efectos adversos. El aumento de tejido adiposo es uno de los factores de riesgo más importantes para el desarrollo de diabetes tipo 2. De hecho, con las previsiones de incremento de obesidad también han aumentado las previsiones de diabetes hasta elevarse a 642 millones de individuos con diabetes en 2040⁶⁸. Por ejemplo, si se tiene en cuenta la incidencia de la diabetes en pacientes sin otros factores de riesgo metabólico aparte del IMC, se ha observado que los nuevos casos diagnosticados en pacientes con sobrepeso son casi el doble que los que tenían normopeso (con una incidencia de 2,1 frente a 1,5 casos por cada 1000 personas/año respectivamente); y en el caso de la obesidad la incidencia se volvía a duplicar (4,3 casos por cada 1000 personas/año) respecto a la del sobrepeso⁶⁹. De todas formas, aún es necesario profundizar en el tema ya que, aunque la relación diabetes y obesidad está establecida, no está claro cuál es la relación de causalidad entre ellas.

Por lo que atañe al síndrome metabólico, se observa un crecimiento similar a la obesidad y la diabetes. El síndrome metabólico está compuesto por la resistencia a la insulina, la hipertensión, la dislipidemia y la obesidad, concretamente la obesidad visceral, que es la manifestación más común y fundamental para el diagnóstico del síndrome metabólico⁷⁰. Los datos más recientes de la Encuesta Nacional de Salud y Examen Nutricional de Estados Unidos de 2011-2018 muestran que en adultos mayores de 20 años la prevalencia se encuentra en un 38,3%⁷¹, y la revisión sistemática realizada por la revista *Lancet* a nivel global y publicada en 2020 revela que el 3% de los niños y el 5% de adolescentes padecen síndrome metabólico⁷². No solo eso, la obesidad cobra especial importancia ya que parece preceder a la aparición de otros factores de riesgo⁷³, lo que permitiría reducir la comorbilidad asociada al síndrome metabólico a través de una detección temprana.

Obesidad y enfermedades digestivas

De la misma manera que se ha ido observando en patologías como el cáncer y la diabetes, se ha visto que la obesidad se relaciona con un incremento del riesgo y la incidencia de enfermedades digestivas no cancerosas como el hígado graso no alcohólico (NAFLD)^{74,75} o

las enfermedades inflamatorias del intestino⁷⁶, el reflujo gastroesofágico, el esófago de Barrett, los pólipos de colon o los cálculos biliares⁷⁷. El caso del NAFLD ejemplifica muy bien este aumento. El NAFLD es una patología que en dos décadas ha pasado de ser apenas conocida a ser la principal causa de enfermedad hepática crónica en el mundo, alcanzando una prevalencia del 25% de la población mundial⁷⁸. De hecho, la obesidad se vincula a la prevalencia y la gravedad del NAFLD, no solo con la esteatosis simple, sino también con formas avanzadas de la enfermedad como la esteatohepatitis no alcohólica, la cirrosis derivada de esteatohepatitis no alcohólica y el carcinoma hepatocelular^{79,80}.

Obesidad y reproducción

Hoy en día, la obesidad en las mujeres de edad reproductiva está aumentando en todo el mundo. Unas de las consecuencias directas son la infertilidad y el aumento en el tiempo necesario para concebir, así como las comorbilidades relacionadas con la obesidad (como la diabetes de tipo 2 y la hipertensión crónica), que aumentan el riesgo de resultados adversos para la madre y el niño si la mujer se queda embarazada. Además, las mujeres embarazadas que son obesas tienen más probabilidades de sufrir pérdidas tempranas del embarazo y un mayor riesgo de malformaciones fetales congénitas, de dar a luz a bebés grandes para la edad gestacional, de sufrir distocia de hombros, de tener un parto prematuro, o de nacimiento sin vida⁸¹.

El aumento de la resistencia a la insulina materna antes del embarazo y la hiperinsulinemia, la inflamación y el estrés oxidativo que la acompañan parecen contribuir a la disfunción placentaria y fetal temprana. Además, metabólicamente, las mujeres obesas tienen un aumento de resistencia a la insulina en los primeros meses de embarazo que se puede manifestar al final del embarazo como intolerancia a la glucosa y sobrecrecimiento fetal. A la hora del parto, aumenta la probabilidad de cesárea y de complicaciones hemorrágicas. En el posparto, las mujeres obesas tienen un mayor riesgo de tromboembolismo venoso, depresión y dificultades para la lactancia. Dado que entre el 50 y el 60% de las mujeres con sobrepeso u obesidad ganan más peso del recomendado, la retención de peso en el posparto aumenta los futuros riesgos cardiometabólicos y la obesidad previa al embarazo en los siguientes embarazos. Por último, los neonatos de mujeres obesas tienen más grasa corporal al nacer, lo que aumenta el riesgo de obesidad infantil⁸².

Todos estos problemas de salud podrían evitarse mediante la prevención de la obesidad entre las mujeres en edad reproductiva, ya que no sólo afecta a su salud, si no que el bienestar de la siguiente generación se ve también comprometido.

Obesidad y patologías respiratorias

La obesidad afecta también a varias enfermedades respiratorias, como el asma, la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), la apnea de sueño o complicaciones perioperatorias como las atelectasias⁸³. De hecho, la obesidad aumenta el riesgo de padecer asma, además de incrementar los síntomas, la frecuencia y la severidad de los brotes, y reduce la respuesta a la medicación del asma y la calidad de vida⁸⁴. La obesidad no es solo un factor de riesgo importante en el desarrollo del asma, sino que varios estudios epidemiológicos muestran que la obesidad, o el incremento de grasa corporal, a menudo precede a la aparición del asma^{85,86}. De hecho, parece haber una relación entre la obesidad materna y el desarrollo de asma de la descendencia, llegando a aumentar un 30% el riesgo de que el hijo desarrolle asma^{87,88}.

La enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) es la tercera causa de muerte en el mundo, solo por detrás de la enfermedad cardíaca isquémica y el accidente cerebrovascular, según la OMS⁸⁹. Y, al contrario de todas las enfermedades descritas hasta ahora, con la EPOC se da en muchos estudios lo que se conoce como la paradoja de la obesidad; es decir, hay situaciones en que parece que un mayor IMC juega un papel protector. Es el caso de pacientes con obstrucción bronquial severa, donde la obesidad leve o moderada se asocia a la mejora de la supervivencia⁹⁰ y la función pulmonar⁹¹, aunque en condiciones de EPOC menos graves⁹² o en no fumadores⁹³ la mortalidad relacionada con el peso se normaliza respecto a la población general

En el caso del síndrome de hipoventilación por obesidad (SHO) y la apnea obstructiva del sueño (AOS), la relación con la obesidad está bien establecida. Por definición, SHO es la combinación de obesidad, hipercapnia diurna y trastornos respiratorios del sueño, y su prevalencia en la población adulta se estima en un 0.4%, aunque se eleva a un 8-20% en pacientes con obesidad⁹⁴. Por su parte, la prevalencia de la AOS ha ido aumentando junto con el incremento de las tasas de obesidad, con una incidencia del 7 al 11% en adultos de mediana edad en los últimos 5 años. El exceso de peso es el responsable del 41% de todos los casos de AOS y el 58% de los casos moderados y severos. Además, estas patologías coexisten a menudo. De hecho, entre el 10-20% de pacientes de AOS sufren SHO, que aumenta los riesgos de complicaciones cardiovasculares como el *cor pulmonale*⁹⁵.

En noviembre de 2019 comenzó el brote de COVID-19 que puso en jaque a los sistemas sanitarios de todo el mundo. 513.384.685 casos confirmados y 6.246.828 defunciones después⁹⁶, el esfuerzo titánico de la comunidad científica ha conseguido ir desentrañando la fisiopatología de la enfermedad causada por el SARS-CoV-2 y, aunque queda mucho trabajo por hacer aún, se han ido dilucidando poco a poco los factores de riesgo que llevan a entender mejor la respuesta diferencial al virus. La obesidad y el exceso de grasa visceral

se han manifestado como unas de las comorbilidades más importantes en casos de covid severo⁹⁷⁻⁹⁹ y se relacionan con una mayor probabilidad de hospitalización¹⁰⁰⁻¹⁰². Las causas del aumento de hospitalización y muerte relacionadas con la obesidad parecen ser la inflamación crónica¹⁰³, la disminución de la respuesta inmune y una menor respuesta al tratamiento¹⁰⁴, y que a su vez son factores que se observan en pacientes de edad más avanzada¹⁰⁵. De hecho, es conocido que el riesgo de COVID-19 grave es elevado en mayores de 65 años, y parece que la obesidad traslada ese mayor riesgo a grupos de menor edad¹⁰⁶⁻¹⁰⁸.

Obesidad y enfermedades mentales

Las enfermedades mentales y la obesidad siempre han tenido una relación que tiende a ser bidireccional. El estrés postraumático¹⁰⁹, la depresión¹¹⁰, la mala calidad del sueño¹¹¹ o la ansiedad^{112,113} son factores que pueden derivar en obesidad, bien por una alimentación emocional o incluso adicción a la comida, y a su vez la obesidad conlleva una carga psicológica tanto en niños y adolescentes¹¹⁴ como en adultos que puede tener consecuencias en la salud mental. De hecho, la depresión y la obesidad parecen compartir mecanismos biológicos que refuerza la relación bidireccional entre las dos patologías¹¹⁵.

Últimamente hay una creciente preocupación por el tratamiento social de la obesidad¹¹⁶, ya que se está generando un estigma que está empezando a ser alarmante para las consecuencias mentales de las personas con obesidad¹¹⁷. Esta estigmatización muchas veces viene de la creencia de que la presión social y la vergüenza estimula a las personas obesas a perder peso pero, en cambio, contribuye a los atracones, el aislamiento social, a prescindir de los servicios sanitarios, la disminución de la actividad física y el aumento de peso, que empeoran la obesidad y crean barreras adicionales para el cambio de comportamiento saludable¹¹⁸. Este estigma tiene un mayor efecto en pacientes pediátricos, que sufren burlas, acoso y victimización en una fase de su vida más vulnerable, teniendo así un mayor riesgo de desarrollar resultados adversos físicos, conductuales y psicológicos¹¹⁹.

1.4.2. ECONÓMICAS

Aunque la obesidad es una condición clínica individual, se ha convertido en un serio problema de salud pública que va en aumento. De hecho, el impacto de la obesidad no se limita a la salud de la población: también tiene importantes consecuencias para la economía. En primer lugar, el tratamiento de la obesidad y de las enfermedades crónicas relacionadas aumenta el gasto sanitario. En segundo lugar, dado que la obesidad y sus consecuencias afectan a la productividad y a la disponibilidad de la mano de obra, tiene un impacto en el mercado laboral. A nivel macroeconómico, esto afecta al PIB de un país y aumenta la presión fiscal, lo que puede repercutir en un incremento de los impuestos por persona.

Por ejemplo, el último informe de la OCDE ahonda en el estudio de la repercusión económica de la obesidad y sobrepeso entre sus 52 países miembros y las proyecciones económicas que obtiene son preocupantes. En este estudio se dividen las consecuencias económicas en tres grupos: según el impacto del IMC elevado en el aumento del gasto en sanidad, según la afectación al mercado laboral y, por último, en la disminución del PIB y aumento de impuestos¹²⁰.

Este impacto del sobrepeso en la salud de la población se traduce en un aumento del gasto sanitario. Se estima que los países de la OCDE gastarán una media de 209 dólares per cápita según la Paridad de Poder Adquisitivo (PPA) al año en el tratamiento de un IMC elevado y sus afecciones relacionadas. Además, gastarán unos 311.000 millones de dólares PPA al año para tratar las enfermedades causadas por el sobrepeso y la obesidad. En total, estas condiciones costarán a los 52 países 425.000 millones de dólares PPA al año, que equivale a un 8,4% del gasto sanitario total¹²⁰.

El sobrepeso y la obesidad también afectan al mercado laboral, reduciendo la tasa de empleo y aumentando las jubilaciones anticipadas, el absentismo y el presentismo. Como resultado, la mano de obra de los 52 países se reducirá en el equivalente a 54 millones de trabajadores a tiempo completo. Traduciéndolo en pérdida de producción del mercado laboral según los salarios medios, los países de la OCDE perderán 863 dólares PPA per cápita al año, por término medio. El coste del presentismo representa casi la mitad de esta cantidad, mientras que el absentismo y las tasas de empleo suponen aproximadamente una cuarta parte cada uno. El impacto de la jubilación anticipada es mínimo¹²⁰.

Además, un IMC por encima de los valores normales supone una disminución del PIB y aumentan la tasa de impuestos global. A través de los efectos combinados del sobrepeso en la esperanza de vida, el gasto sanitario y el mercado laboral, el PIB será un 3,3% inferior de media en los países de la OCDE. En el conjunto de los 46 países incluidos en el análisis, esto equivale a un total de 5,3 billones de dólares PPA en el periodo 2020-50, similar al PIB medio anual de Alemania o Japón. El sobrepeso también aumentará el tipo impositivo global necesario para estabilizar la ratio de deuda pública en 0,62 puntos porcentuales de media en los países de la OCDE, lo que es similar a la media de 23 países de la UE. El aumento del tipo impositivo puede traducirse en un incremento equivalente de los impuestos por persona. Por término, medio en la OCDE, cada persona estaría sujeta a 359 dólares PPA adicionales al año en impuestos debido al sobrepeso¹²⁰.

1.5. SOLUCIONES ACTUALES

La comunidad internacional está cada vez más concienciada de que los factores ambientales y sociales son fundamentales en las estrategias de la lucha contra la obesidad. Cada vez hay más sensibilidad hacia el consumo de alimentos saludables y fomento del deporte, y cada vez más países están implementando políticas de fomento de vida saludable dentro y fuera del trabajo¹²¹⁻¹²³, normativas agrícolas y regulación de la industria alimentaria de acuerdo con las recomendaciones nutricionales^{124,125} y para que las opciones saludables sean más accesibles^{126,127}.

Aun así, debido a la multitud de factores implicados en el sobrepeso y la obesidad, atajar el problema a nivel individual no deja de ser complicado. Normalmente, el primer tratamiento de elección es el cambio de estilo de vida, aumentando el ejercicio y reduciendo la ingesta de calorías. Sin embargo, mantener estos hábitos saludables en el tiempo es muy complicado. Por ejemplo, se sabe que entre el 80 y el 90 % de aquellos que bajan un 10 % o más de su masa corporal a través de una dieta vuelven a recuperar todo el peso en un período de entre dos y cinco años¹²⁸. Por lo tanto, cuando la dieta y el ejercicio fallan^{6,129} es preciso recurrir a intervenciones farmacológicas^{130,131} o incluso quirúrgicas, en el caso de la obesidad mórbida^{132,133}.

Para evitar llegar a la cirugía bariátrica, así como facilitar la pérdida y evitar la recuperación del peso, se está constantemente investigando en alternativas farmacológicas que ayuden frente a la pandemia de la obesidad y sus ENT asociadas. Estos medicamentos buscan minimizar los efectos secundarios y favorecer una mayor pérdida de peso que la derivada del cambio de hábitos únicamente. Actualmente hay varios fármacos anti-obesidad aprobados en Estados Unidos, la Unión Europea, Australia o Japón, que incluyen simpatomiméticos^{134,135}, inhibidores de la lipasa pancreática^{136,137}, activadores del receptor GABAA^{138,139}, agonistas del receptor de serotonina 2C^{140,141}, antagonistas de los opioides^{142,143}, inhibidores de la recaptación de dopamina-norepinefrina¹⁴⁴ y agonistas del receptor del péptido similar al glucagón tipo 1 (GLP-1)^{145,146}. Estos medicamentos varían en cuanto a resultados, efectos secundarios, contraindicaciones y precio¹⁴⁷, así que sigue siendo necesario buscar alternativas efectivas, seguras y asequibles para todo el rango de edad.

Una de las líneas alternativas más novedosas en las que se está investigando actualmente es el trasplante fecal. Gracias a la investigación con ratones libres de gérmenes, se descubrió que la microbiota intestinal juega un papel muy interesante en el equilibrio energético. De hecho, estos ratones estaban protegidos frente a la obesidad y eran significativamente más delgados que los ratones control a pesar de consumir más calorías¹⁴⁸. Por tanto, ya que la

microbiota intestinal puede regular el metabolismo, la adiposidad, la homeostasis y el equilibrio energético, así como la señalización central del apetito y de la recompensa alimentaria, es un objetivo muy interesante para las nuevas terapias frente a la obesidad¹⁴⁹. Hay varios estudios que analizan el efecto del trasplante fecal de donantes delgados en pacientes obesos en adultos^{150,151} y adolescentes¹⁵², pero hasta la fecha solo hay publicados dos ensayos clínicos de fase II^{151,153}. De momento los trasplantes fecales alogénicos más relevantes no han obtenido una mejora en cuanto a la mejora en la sensibilidad a la insulina o a la disminución de peso, aunque sí que han demostrado que el cambio en la microbiota permanece al menos 3 meses y, en el estudio realizado en adolescentes se observó una mejora en el síndrome metabólico y en la reducción de grasa abdominal¹⁵². Sin embargo, cada vez hay más interés en trasplantar la microbiota autóloga de pacientes obtenida en la fase de pérdida máxima de peso durante la fase de recuperación y, aunque falta mucho trabajo, los primeros resultados parecen prometedores^{154,155}. Aunque este tipo de terapia presenta muchas ventajas respecto a los fármacos actuales, sobre todo de cara a los efectos secundarios, tiene el gran inconveniente de que aún falta mucho tiempo y esfuerzo hasta que se pueda aprobar para el uso en la población general, aparte de que es esperable que el precio que podría llegar a tener sea elevado debido al proceso necesario para su obtención y al hecho de ser una terapia personalizada.

Otra aproximación para encontrar un posible tratamiento frente a la obesidad se ha basado en mirar hacia el propio tejido adiposo y su funcionamiento. Desde un punto de vista fisiológico, la ingesta de alimentos viene seguida por un aumento de la glucosa en sangre que, a su vez, induce la secreción de insulina por las células β del páncreas endocrino¹⁵⁶. La insulina, a través de sus receptores, hace que la glucosa sea absorbida por las células musculares, hepáticas o por los adipocitos, regulándose así los niveles de glucosa en sangre. Los adipocitos son las células que componen la grasa, dando lugar a dos tipos básicos: la grasa blanca cuyos adipocitos contienen una sola vacuola lipídica y la grasa parda caracterizada por adipocitos con varias vacuolas lipídicas y un gran número de mitocondrias¹⁵⁷. La grasa blanca es la principal causante de la obesidad ya que no es fácil movilizar los lípidos almacenados en sus células, mientras que la grasa parda tiene la función de generar calor a partir de los lípidos acumulados. Se ha comprobado que, en ciertas condiciones o en respuesta a ciertos tratamientos, algunas células de la grasa blanca pueden pasar a comportarse como la grasa parda originando lo que se ha dado en conocer como grasa beige^{158,159}. Por otro lado, se ha comprobado que la activación de la grasa beige es beneficiosa para reducir la resistencia a la insulina y mejorar el metabolismo glucídico¹⁶⁰. Hoy en día los esfuerzos de buena parte de la comunidad científica que estudia el metabolismo se centran en descubrir nuevas y eficaces técnicas capaces de "oscurecer"

los adipocitos, ya que esta transformación llevaría a la pérdida de peso y la prevención de las consecuencias de la obesidad^{161,162}.

Dentro de este contexto se ha comprobado que la exposición de animales de experimentación a bajas temperaturas hace que estos pierdan peso o que no engorden a pesar de estar expuestos a una dieta rica en grasas^{163,164}. Pero el significado biológico de la grasa parda y beige va mucho más allá de la regulación del gasto energético, ya que desempeñan un papel en la regulación del metabolismo de la glucosa y los lípidos y la sensibilidad a la insulina, así como la homeostasis general del tejido adiposo. Todo esto la convierte en una diana muy atractiva para la terapia frente a la obesidad y las enfermedades metabólicas asociadas como la diabetes¹⁶⁵.

2. TEJIDO ADIPOSO

El almacenamiento de energía en forma de lípidos es un mecanismo muy conservado a lo largo de toda la filogenia evolutiva, desde los organismos unicelulares con los cuerpos lipídicos a los multicelulares, con células especializadas para almacenarlos¹⁶⁶. En mamíferos, este conjunto de células conforma principalmente lo que se conoce como tejido adiposo, un órgano heterogéneo que actúa principalmente como reservorio de energía y órgano endocrino¹⁶⁷. Sin embargo, también se puede encontrar asociado a otras estructuras anatómicas desempeñando funciones específicas como suministrar energía y materiales a las células epiteliales de las glándulas mamarias durante la lactancia o el papel biomecánico de las almohadillas plantares en la distribución del peso y la atenuación de la presión en los pies y las palmas¹⁶⁸.

Los adipocitos componen el tejido adiposo, pudiendo ser blancos o pardos, con una sola vacuola lipídica o varias vacuolas lipídicas y un gran número de mitocondrias respectivamente. Además, los adipocitos blancos presentan la plasticidad de que, en ciertas condiciones o en respuesta a ciertos tratamientos, pueden pasar a comportarse parcialmente como la grasa parda, formando lo que se denominan adipocitos beige¹⁶⁹ (Fig. 3).

2.1. GRASA BLANCA

La grasa blanca es la más abundante, y se puede encontrar en prácticamente cualquier parte del cuerpo de los mamíferos¹⁶⁸. Los depósitos principales de grasa blanca se clasifican, según su localización anatómica, en grasa subcutánea y visceral. La primera se encuentra bajo la piel y es la mayoritaria, suponiendo aproximadamente el 80% de la grasa total en humanos, almacenándose normalmente en el abdomen y en la zona gluteofemoral¹⁷⁰. Por

su parte la grasa visceral se localiza en la cavidad peritoneal, formando principalmente los depósitos omental y mesentérico¹⁷¹.

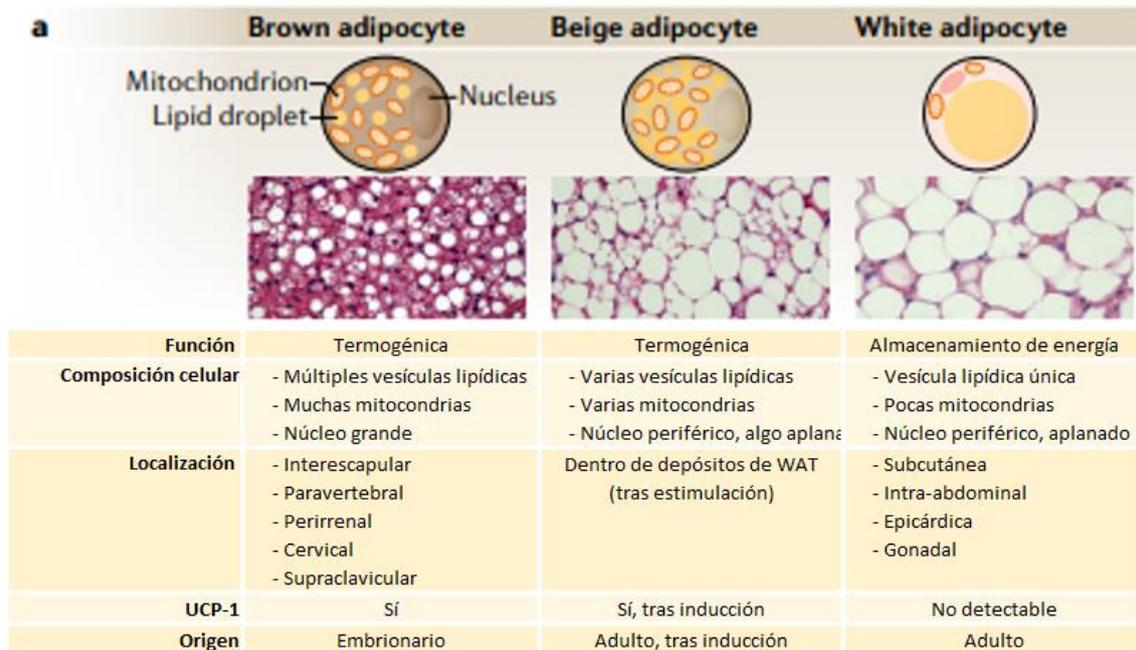


Figura 3. Características de los adipocitos termogénicos. Los distintos adipocitos de mamíferos presentan distinta morfología, localización y desarrollo. (Figura modificada de Cohen et al¹⁶⁵).

Los adipocitos blancos suelen tener una única vesícula lipídica que ocupa la mayor parte del citoplasma y relativamente pocas mitocondrias, siendo su principal función el almacenaje y liberación de energía. Estos procesos suceden como respuesta a los cambios en los niveles energéticos sistémicos y se consiguen desplazando el equilibrio entre la lipólisis (liberación de ácidos grasos) frente a la lipogénesis (captación/síntesis de ácidos grasos), según los requerimientos del organismo¹⁷².

La grasa blanca también actúa como un órgano endocrino con la liberación de adipocinas. Estas hormonas son capaces de actuar a nivel orgánico regulando la inflamación y la sensibilidad o resistencia a la insulina entre otras muchas funciones¹⁷³. Una de las adipocinas más estudiadas es la leptina, encargada de regular la homeostasis energética a través del hipotálamo y otras regiones cerebrales para fomentar la saciedad y aumentar el gasto energético¹⁷⁴.

2.2. GRASA PARDA

La grasa parda es mucho más minoritaria que la anterior, suponiendo alrededor del 4,3% de todo el tejido adiposo humano. Aunque en un principio se pensaba que la grasa parda en humanos desaparecía a lo largo de la infancia, hoy en día se sabe que puede encontrarse en

depósitos cervicales, supraclaviculares, axilares, paraespinales, mediastínicos y abdominales¹⁷⁵ (Fig. 4). Pese a ser una pequeña proporción del tejido adiposo, la grasa parda es capaz de ejercer un impacto metabólico considerable debido a su capacidad termogénica. Cuando está plenamente activo, el tejido adiposo termogénico puede aumentar el gasto energético de todo el cuerpo en más de un 100% en ratones y en un 40-80% en humanos¹⁷².

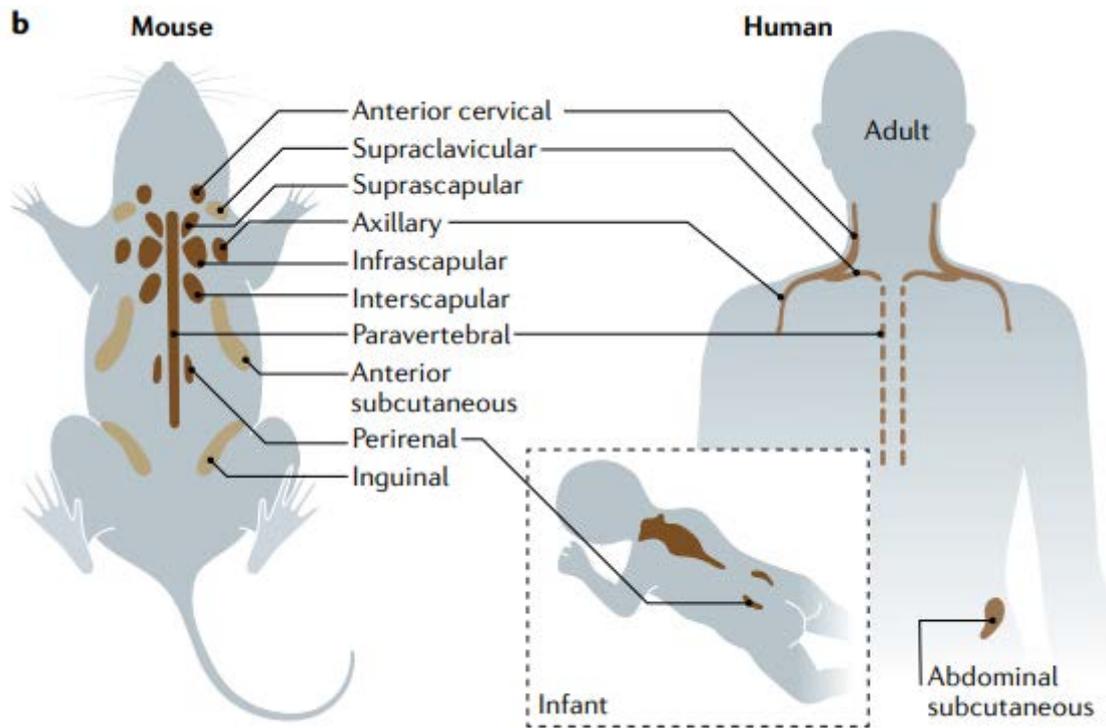


Figura 4. Distribución anatómica de los adipocitos termogénicos. En marrón oscuro se representan los depósitos adiposos pardos y en claro los beige. (Figura modificada de Cohen et al¹⁶⁵).

Los adipocitos pardos se caracterizan por tener muchas vesículas lipídicas de pequeño tamaño y una gran densidad de mitocondrias, además de altos niveles de la proteína desacopladora 1 (UCP1) que les otorga la capacidad termogénica. Cuando esta proteína se activa, separa el catabolismo de nutrientes de la síntesis de ATP, desacoplando el gradiente de protones en la membrana mitocondrial interna, gracias a lo cual se libera energía en forma de calor¹⁷⁶.

2.3. GRASA BEIGE

La grasa beige es un subtipo de grasa blanca que desarrolla cierta capacidad termogénica por activación tras ciertos estímulos, principalmente el frío. Aunque comparte los orígenes con los adipocitos blancos, morfológicamente parece un híbrido entre adipocitos pardos y

blancos, tiene menos vesículas lipídicas que los adipocitos pardos pero bastantes más y de menor tamaño que los adipocitos blancos. Lo mismo sucede con las mitocondrias, cuyo número se encuentra entre los otros dos tipos de adipocitos. Además, posee unos niveles más altos de UCP1 comparado con los adipocitos blancos, pero sin llegar a la cantidad de los adipocitos pardos.

Los adipocitos beige pueden generarse bien por una conversión o “pardificación” de los adipocitos blancos o bien por una síntesis *de novo* (Fig. 5). Según los estudios realizados en ratones parece que la proporción entre una vía u otra depende de las condiciones ambientales previas, por ejemplo, si los animales están albergados a temperaturas entre 20-23°C previamente a la exposición a frío presentan menos síntesis *de novo* (en torno a un 50%) que los albergados en termoneutralidad (30°C) cuya proporción asciende hasta el 88%¹⁷⁷. Sin embargo, esta capacidad de generación de adipocitos beige a partir de células precursoras se va limitando con la edad^{178,179}. La pardificación por su parte es bidireccional, volviendo a un fenotipo de adipocito blanco cuando se acaba el estímulo que había inducido la diferenciación a adipocito beige y quedando en un estado latente. Esto supone que, si hay un estímulo que induzca la pardificación, parte de los adipocitos latentes se vuelven a convertir en adipocitos beige, lo que permite una respuesta rápida ante una situación de necesidad¹⁸⁰.

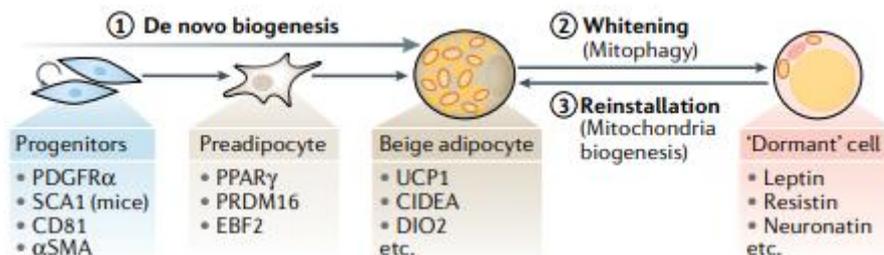


Figura 5. Biogénesis de la grasa beige. La pardificación de la grasa blanca se induce como respuesta a estímulos como el frío o los agonistas adrenérgicos, y puede ser bien por diferenciación *de novo* desde células progenitoras o bien por una conversión de adipocitos blancos o re-activación de los adipocitos beige latentes (Figura obetnida de Cohen et al¹⁶⁵).

La grasa termogénica, tanto adipocitos pardos como beige, es fundamental para la adaptación al frío exterior, pero hoy en día está cobrando más relevancia por su habilidad como disipador metabólico del exceso de nutrientes. Muchos estudios han demostrado que ratones con mayor actividad termogénica en su grasa se ven más protegidos frente a la obesidad y alteraciones metabólicas¹⁶⁴; es más, trasplantes de grasa parda o beige a ratones obesos ha supuesto una mejora en el metabolismo de la glucosa¹⁸¹ y una disminución de la cantidad de grasa¹⁸². Por su parte, en humanos también se ha visto que el aumento de la actividad de la grasa termogénica se asocia con efectos beneficiosos en el metabolismo¹⁸³.

Esta mejora se debe a que los adipocitos termogénicos eliminan del torrente sanguíneo las lipoproteínas ricas en triglicéridos, las acilcarnitinas, la glucosa y otros metabolitos potencialmente tóxicos que se han relacionado estrechamente con las alteraciones metabólicas¹⁷².

2.4. TERMOGÉNESIS

La termogénesis es la generación de calor por el organismo como respuesta a estímulos externos, como el frío, y que permite mantener la temperatura corporal regulada. Tiene un componente facultativo y otro adaptativo, el primero se activa cuando se necesita un extra de temperatura de forma momentánea mientras que la adaptativa se da por necesidad mantenida o repetida de calor¹⁸⁴. Este último sistema ha sido utilizado por los mamíferos desde sus orígenes lo que les ha permitido colonizar ambientes más fríos de los que podrían habitar los animales ectotermos¹⁸⁵.

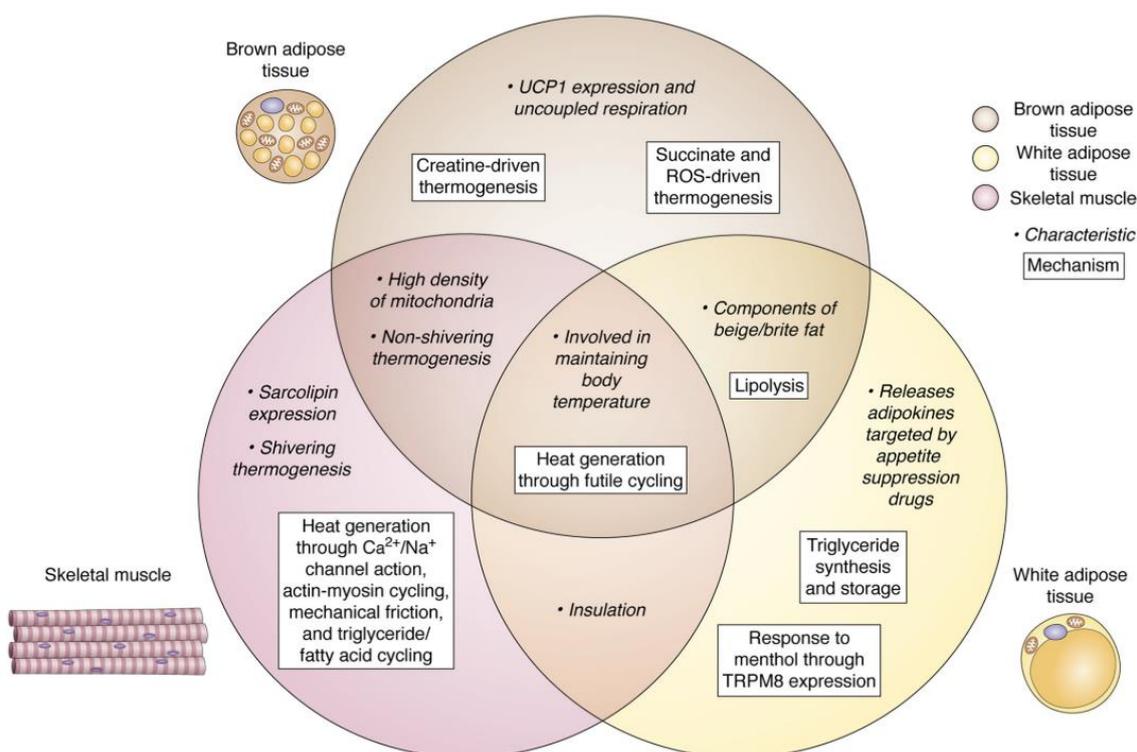


Figura 6. Resumen de las características y mecanismos relacionados con la termogénesis del tejido adiposo pardo (en marrón), blanco (en amarillo), y del músculo esquelético (en rosa). Las características de los tejidos se muestran en cursiva y los mecanismos moleculares en el texto recuadrado (Figura obtenida de Chen et al¹⁸⁶).

La termogénesis también puede dividirse en termogénesis con escalofríos, causados por la contracción involuntaria de músculos que produce calor ante una exposición moderada o

extrema al frío, y termogénesis sin escalofríos, que eleva la temperatura sin necesidad de escalofríos y que puede ser a su vez facultativa o adaptativa¹⁸⁴.

Cuando baja moderadamente la temperatura de la piel, se activa el receptor de potencial transitorio de melastatina 8 (TRPM8) de las neuronas sensoriales, que transmiten la señal al sistema nervioso central. Desde el hipotálamo se libera noradrenalina que provoca la vasoconstricción de los capilares cutáneos, para reducir la pérdida de calor por la piel¹⁸⁷. Si el frío persiste, se produce un aumento de gasto de la energía basal del organismo sin llegar a tener escalofríos como segunda barrera para mantener la temperatura corporal central, que es la fase de la termogénesis sin escalofríos. Si con esto no es suficiente, o el frío es más intenso, entonces se da la fase de la termogénesis con escalofríos. En caso de continuar la exposición a frío durante mucho tiempo o si es una exposición repetitiva, se da una adaptación con la disminución de los escalofríos y el aumento de la termogénesis sin escalofríos¹⁸⁸. Durante la aclimatación al frío, la densidad de fibras noradrenérgicas de la grasa parda y blanca aumenta notablemente, lo que favorece la estimulación noradrenérgica y la inducción de adipocitos beige¹⁸⁹.

Mecanismos de termogénesis

La termogénesis independiente de escalofríos está liderada por la grasa parda a través de UCP1, mientras que la dependiente de escalofríos implica al músculo esquelético mediante la sarcolipina. Ambos mecanismos se apoyan en la hidrólisis del ATP liberando calor a través de una reacción exergónica¹⁸⁴. UCP1 libera energía en forma de calor durante la disipación de la fuerza protón motriz a través de la membrana mitocondrial^{190,191}, y la sarcolipina controla la termogénesis en el músculo esquelético al mediar la producción de calor de la bomba Ca₂-ATPasa del retículo sarco/endoplásmico¹⁹² (Fig. 6).

UCP1

El efector más caracterizado de la termogénesis es UCP1, una proteína que se localiza en el interior de la membrana mitocondrial de los adipocitos pardos y beige. Su papel en la termogénesis adaptativa se puso de manifiesto al ver que en ratones carentes de UCP1 la exposición a frío les hacía caer en hipotermia severa¹⁹³.

Cuando se activa, UCP1 desacopla la cadena transportadora de electrones lo que da lugar a la lipólisis de las reservas intracelulares de triglicéridos que proporcionan ácidos grasos libres como combustible para la cadena de transporte de electrones en la mitocondria (Fig. 7). Además, los ácidos grasos de cadena larga aumentan la conductancia de protones de la UCP1 en la membrana mitocondrial interna, desacoplando así la cadena respiratoria de la regeneración de ATP. El consiguiente aumento de ADP, a su vez, regula la actividad de la

cadena respiratoria, lo que conduce a un mayor consumo de oxígeno y producción de calor. La activación del tejido adiposo pardo absorbe la glucosa con avidéz y esta captación aumenta tras la exposición repetida al frío. Sin embargo, aunque el tejido adiposo pardo es capaz de captar cada vez más ácidos grasos en respuesta a la exposición aguda al frío, la exposición repetida al frío no aumenta la tasa de captación de ácidos grasos en los adipocitos pardos¹⁸⁸. Sin embargo, parece que la fuente de ácidos grasos está derivada de la lipólisis de los adipocitos blancos en lugar de la lipólisis *de novo* en los adipocitos termogénicos, y que estos ácidos grasos son necesarios para activar UCP1¹⁹⁴.

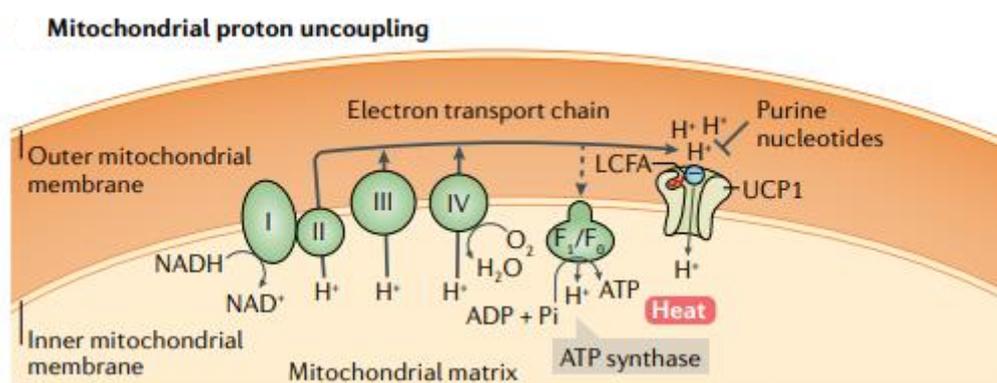


Figura 7. Desacoplamiento de la cadena de electrones por UCP1. UCP1 se encuentra en la membrana mitocondrial interna y desacopla el gradiente de protones de la síntesis de ATP, provocando la liberación de calor

(Figura modificada de Cohen et al¹⁶⁵)

Sarcolipina y el ciclo del Ca^{2+}

El músculo esquelético contribuye a la termogénesis a través de mecanismos independientes de UCP1. El principal mecanismo implica los ciclos de calcio del retículo sarco/endoplásmico Ca^{2+} -ATPasa (por sus siglas en inglés SERCA), que se encuentra en el retículo sarcoplásmico de las células musculares y del tejido adiposo pardo y bombea activamente iones de Ca^{2+} al retículo sarcoplásmico durante la relajación muscular (Fig. 8). La SERCA está regulada por fosfolamban y la sarcolipina, esta última es un pequeño péptido que desacopla la hidrólisis del ATP del transporte de Ca^{2+} y por tanto da lugar a una interrupción del ciclo, lo que produce termogénesis¹⁸⁸.

De hecho, los ratones knockout de sarcolipina aumenta compensatoriamente la expresión de UCP1 en los adipocitos termogénicos, de la misma forma que los de UCP1 elevan los niveles de sarcolipina en el músculo. Sin embargo, los ratones deficientes para ambos factores son incapaces de mantener la temperatura corporal y entran en hipotermia severa si se les expone a bajas temperaturas¹⁹⁵.

Como se puede ver, la termorregulación es un mecanismo importante para el mantenimiento de la homeostasis del organismo y está finamente regulado. Por tanto, existen mecanismos compensatorios que pueden ser activados en caso de no disponer de UCP1. Además de la sarcolipina también contribuyen a la termogénesis en menor medida el ciclo de la creatinina, que aumenta en adipocitos beige tras la exposición al frío en ratones knockout de UCP1¹⁹⁶, el ciclo de lipólisis de triglicéridos o la lanzadera de GDP, aunque de forma menos eficiente (Fig. 9).

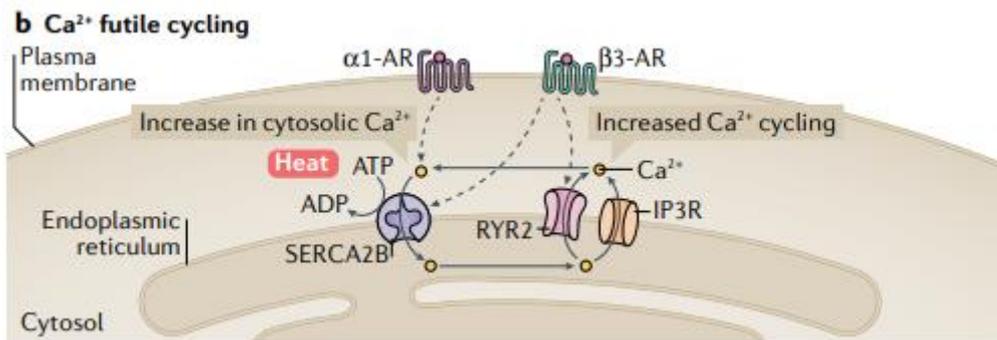


Figura 8. Ciclo infructuoso del Ca²⁺ en el SERCA, que constituye uno de los mecanismos de termogénesis independiente de UCP-1 (Figura modificada de Cohen et al¹⁶⁵)

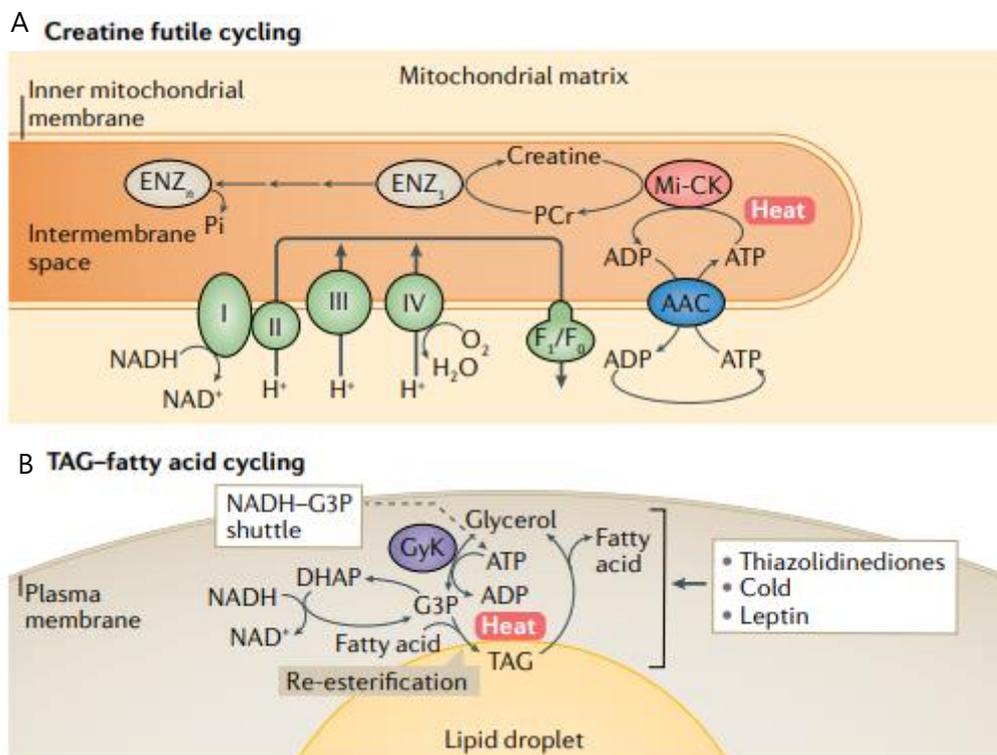


Figura 9. Ciclo infructuoso de la creatinina (A) y de lipólisis de TAG (B) (Figura modificada de Cohen et al¹⁶⁵)

2.5. HIPOTERMIA TERAPÉUTICA COMO TERAPIA FRENTE A LA OBESIDAD

Como se ha explicado en el apartado anterior, en condiciones de estrés por frío, la temperatura corporal central se mantiene inicialmente en niveles normales a expensas de un gran coste energético, pero si el organismo pierde la capacidad para mantener su temperatura corporal normal, cae en hipotermia.

La hipotermia en el ser humano es definida como el descenso de la temperatura corporal por debajo de los 36°C. Sus efectos son por lo general negativos, con síntomas que incluyen desde escalofríos y torpeza en los casos de hipotermia ligera (35-33°C) hasta falta de consciencia, descenso de la tensión arterial e incluso la muerte en los casos más graves si se da una disminución de la temperatura por debajo de 30°C.

Aparte de los posibles efectos negativos de la hipotermia, numerosas investigaciones han demostrado que es una herramienta terapéutica potencialmente muy útil frente a los daños ocasionados por complicaciones cardiacas o neurológicas, tales como el infarto¹⁹⁷, la reanimación cardiopulmonar¹⁹⁸, la encefalopatía isquémica neonatal¹⁹⁹ e incluso para evitar la pérdida de audición residual en implantes cocleares²⁰⁰. Esto es debido a que, en condiciones de hipotermia, la célula pasa de estar en un estado activo de crecimiento a un estado de preservación celular. En esta nueva situación se observa una disminución de la actividad metabólica y el consumo de oxígeno, tiene lugar una modificación de los patrones de expresión génica normales e incluso se produce una alteración de la morfología celular con importantes cambios en el citoesqueleto. Además, estudios recientes han demostrado que la hipotermia terapéutica no solo puede reducir y prevenir daños en la isquemia aguda²⁰¹ y en lesiones de la médula espinal²⁰², sino que, además, parece retrasar el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas crónicas como la esclerosis lateral amiotrófica²⁰³. Esto pone de manifiesto el elevado potencial de aplicación terapéutica de la hipotermia.

Respecto a la obesidad, se ha estudiado mucho la relación entre la hipotermia y la termorregulación como posible mecanismo para reducir la grasa. El tejido adiposo pardo, como centro principal de la termogénesis adaptativa, parece tener un papel protector frente a la obesidad y las enfermedades metabólicas, tanto por su capacidad de utilizar la glucosa y movilizar lípidos para la termogénesis como por su papel endocrino²⁰⁴. Si además se aumenta la cantidad de adipocitos beige, como sucede en situaciones de hipotermia, aún se potenciaría más el efecto termogénico.

Sin embargo, el simple descenso de la temperatura, aunque sea de forma controlada, conlleva posibles efectos secundarios adversos que pueden resultar peligrosos como la

diminución de la respuesta inmune o el fallo renal^{205,206}. En este sentido, en las últimas décadas ha cobrado relevancia el estudio de moléculas que puedan simular el papel protector de la hipotermia pero que actúen a temperatura normal (37°C), de manera que se puedan desarrollar estrategias terapéuticas para controlar y optimizar el tratamiento.

3. MOLÉCULAS DE RESPUESTA A FRÍO: CIRP Y RBM3

Al disminuir la temperatura corporal, no solo se produce una reducción del metabolismo corporal, sino también una disminución generalizada de la síntesis de proteínas a nivel celular. Sin embargo, un pequeño grupo de proteínas (cold-shock proteins), entre las que se encuentra la proteína de unión al RNA inducibles por frío (CIRP) o la proteína con motivo de unión al RNA (RBM3), ve su síntesis estimulada por la baja temperatura.

3.1. ESTRUCTURA

CIRP, también conocido como CIRBP o ribonucleoproteína nuclear heterogénea A18 (hnRNP A18), es una proteína de 19 kDa compuesta por 172 aminoácidos (Fig. 10), cuyo gen en humanos se encuentra en el cromosoma 19 región p13.3. Al igual que otros miembros de la familia de las hnRNP, CIRP se une al RNA mensajero y ribosomal presente en la célula y regula su vida media, la expresión potencial de múltiples genes y, por tanto, su función.

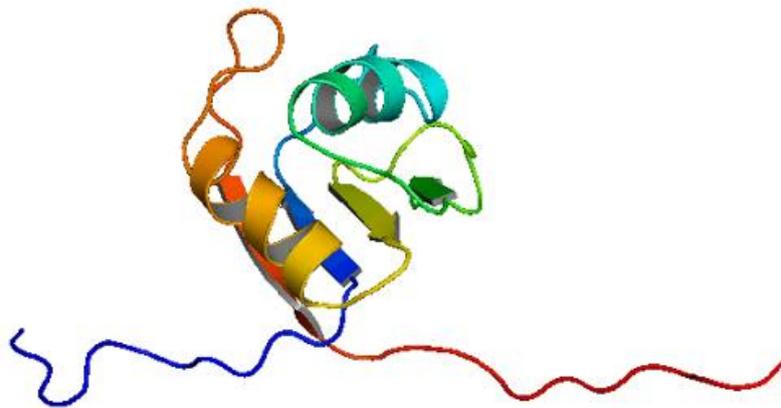


Figura 10. Estructura tridimensional de CIRBP (PDB: 1X55). El dominio N-terminal está representado en azul y el C-terminal en rojo.

Al igual que muchos mRNA que son regulados como respuesta al frío, el mRNA que codifica para CIRP contiene en la región 5' -UTR secuencias tipo IRES (Internal Ribosome Entry Site o Sitio Interno de entrada al ribosoma), que se definen como secuencias nucleotídicas que favorecen la iniciación de la síntesis proteica permitiendo el reclutamiento directo de los ribosomas sobre ellos. Se ha demostrado que esta región es un punto de regulación en los

niveles de CIRP a nivel transcripcional, ya que su actividad IRES se modifica por la temperatura, activándose con el frío²⁰⁷. Además, también está regulado a nivel de la secuencia codificante del mRNA, donde según las condiciones ambientales se pueden producir diferentes transcritos. Por ejemplo, en animales en hibernación es más frecuente el transcrito corto, que tiene el marco abierto de lectura (open reading frame, ORF) completo, mientras que en los animales que no hibernan predomina el transcrito más largo, que contiene un codón de parada y da lugar a una proteína truncada y por lo tanto inactiva^{208,209}.

En la región amino-terminal, CIRP tiene un motivo de reconocimiento de RNA (RRM) altamente conservado, que contiene dos dominios ribonucleoproteína, RNP1 y RNP2 (Fig. 11). Por su parte, el dominio carboxi-terminal contiene varios motivos, no tan conservados, ricos en arginina y glicina (RGG), los cuales han sido asociados al control de la distribución nucleocitoplasmática de la proteína dentro de la célula, tal y como ocurre en otras hnRNP²¹⁰. De manera general, se considera que es una proteína con localización nuclear, pero bajo condiciones de estrés se transloca al citoplasma y se acumula en los gránulos de estrés citoplasmáticos²¹¹. Concretamente, algunos autores sugieren que es la metilación de los residuos de arginina en los dominios RGG la responsable de la acumulación de CIRP en el citoplasma en situación de estrés celular^{211,212}.

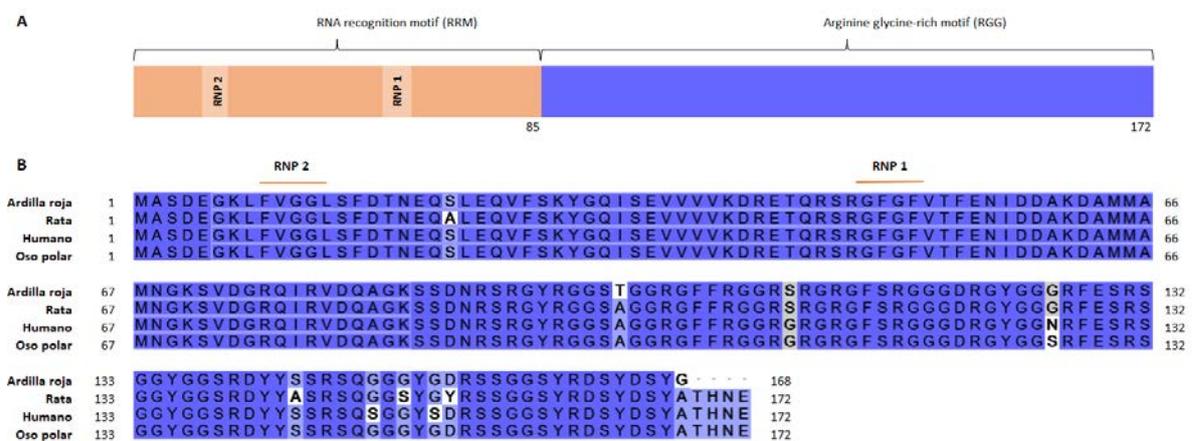


Figura 11. Estructura simplificada de los dominios de CIRP (A). Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de CIRP en diferentes especies de mamíferos (B).

3.2. FUNCIÓN

Los niveles de CIRP varían entre especies, tipos celulares y el estado de desarrollo. Por ejemplo, en humanos se expresa abundantemente en el tiroides y el corazón. En ratas, sin embargo, se expresa predominantemente en cerebro, corazón, musculo, hígado, riñón y endometrio, así como en macrófagos y neutrófilos²¹³.

Aunque ha quedado claramente demostrada la relación existente entre la hipotermia y los incrementos en los niveles de CIRP, el mecanismo molecular por el cual el frío y otros factores modulan la transcripción y la traducción de CIRP no es del todo conocido. De hecho, pese a que se ha caracterizado a CIRP precisamente por su sobreexpresión ante un choque térmico con frío, se ha visto que también puede aumentar sus niveles celulares ante otros estímulos endógenos²¹⁴ y medioambientales independientes de la temperatura, como por ejemplo la radiación UV²¹⁵ o la hipoxia²¹⁶.

Tras la exposición a radiación UV tiene lugar la unión de CIRP a la región 3' -UTR de la proteína de replicación A (RPA) y de la tioredoxina (TRX), dos transcritos de respuesta a estrés, estabilizando estos RNAs y favoreciendo su traducción²¹⁷. Curiosamente, se ha visto que la exposición a la radiación en vuelos espaciales favorece la producción de CIRP, así como de otras hnRNPs, con el fin de promover la reparación de los daños generados en el DNA²¹⁸.

También se ha demostrado la existencia de una regulación de los niveles de CIRP por la hipoxia, si bien la comprensión de esta relación es complicada ya que, cuando la hipoxia es leve, parece que se favorece la expresión de la proteína, pero cuando esta es severa lo que se aprecia es una supresión de la expresión de CIRP²¹⁹. Lo cierto es que parece que otros factores tales como la vulnerabilidad celular, la carcinogénesis o la inflamación, pueden influir considerablemente junto con la hipoxia en los niveles de CIRP presentes en las células.

Al igual que sucede en el caso de otras proteínas de unión a RNA, se ha visto que CIRP es capaz de modular la apoptosis jugando un papel anti-apoptótico en situaciones de hipotermia^{220,221}. Por ejemplo, en células neuronales de rata este efecto parece darse a través de la ruta de apoptosis de la mitocondria ya que, en estudios al respecto, se muestra una disminución de la expresión de moléculas pro-apoptóticas (Bax, Bad, Bak, Cyts, Apaf-1, Caspasa-9 y Caspasa-3)²²⁰. Algo similar se puede observar en modelos de rata al aplicar hipotermia tras un paro cardíaco, donde disminuye la expresión de Bax, Caspasa-3 y -9 y se estabiliza la expresión de Bcl-2, que tiene papel anti-apoptótico²²¹. A la luz de estos datos, parece que este puede ser el origen de los efectos positivos de la hipotermia terapéutica en los distintos tipos de patologías que responden a la hipotermia.

Estudios recientes han puesto de manifiesto que CIRP está implicado en otras rutas de señalización celular. Por ejemplo, se ha demostrado que, tanto a temperatura normal como en condiciones de hipotermia, CIRP ejerce un papel modulando el envejecimiento celular, ya que se ha podido asociar su actuación con una preservación de la actividad telomerasa (Fig. 12) presente en las células²²².

Además, recientemente se ha observado que CIRP puede favorecer la proliferación celular, induciendo el paso de una fase del ciclo celular al siguiente²²³. A nivel reproductivo, coincidiendo con el hecho de que las células germinales de los testículos de mamíferos necesitan desarrollarse a una temperatura ligeramente inferior al resto del organismo, se ha comprobado que una mayor expresión de CIRP favorece la espermatogénesis (Fig. 12). Estudios de medicina reproductiva han revelado además que, en ovocitos, la expresión de CIRP durante la criopreservación supone la protección frente a la cristalización y el estrés por frío en la congelación rápida²²⁴.

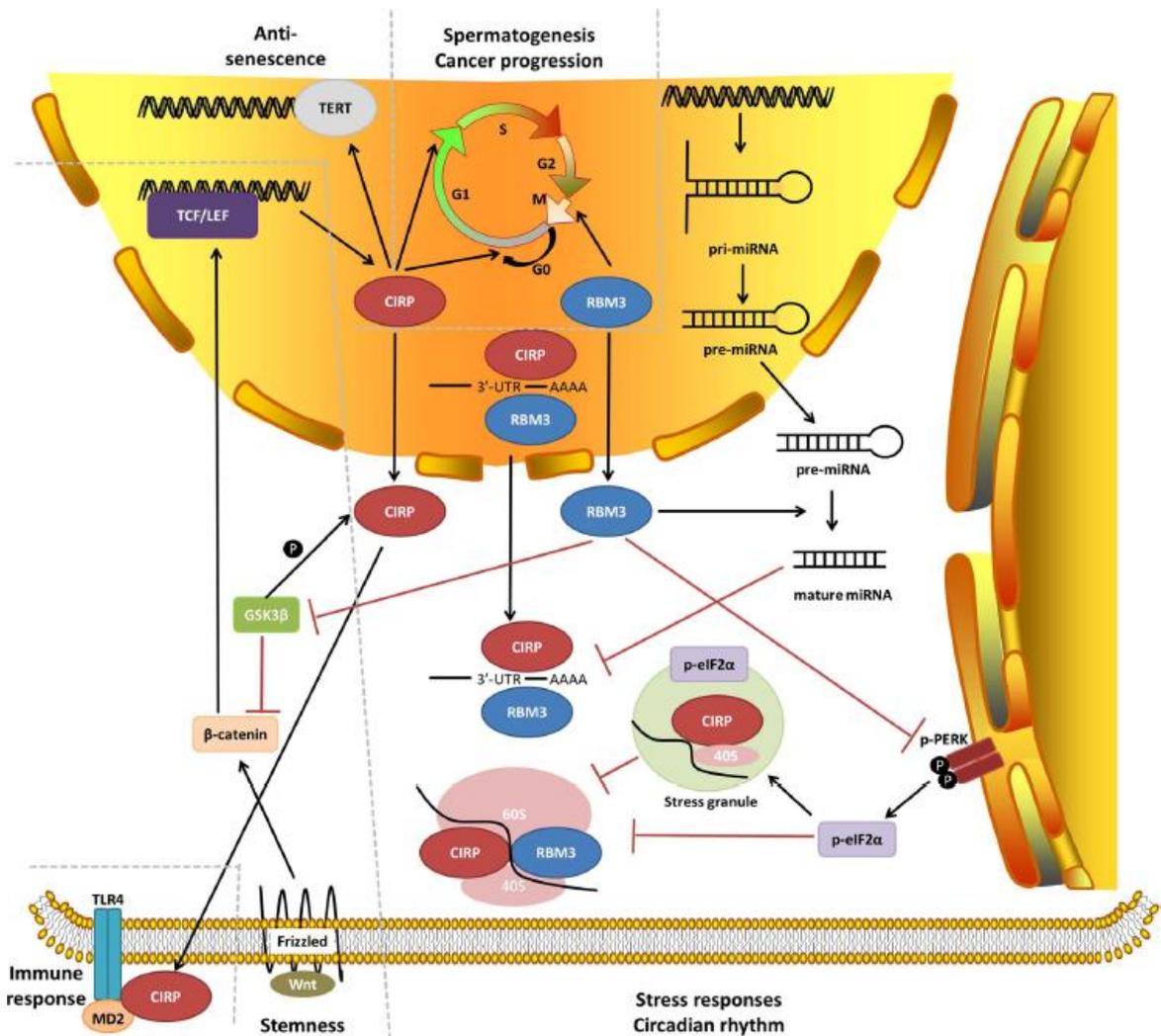


Figura 12. Redes moleculares de CIRP y su implicación en funciones fisiológicas y patológicas
(Imagen obtenida de Zhu X. et al²²⁵)

Como se puede ver, la actuación de CIRP a nivel celular tiene muchas más implicaciones biológicas que las inicialmente esperadas. De hecho, al ahondar en el estudio de esta proteína, ha resultado que no solo juega un papel importante en la hipotermia, sino también en el ritmo circadiano, en la respuesta inmune, en el cáncer e incluso en la regulación de la glucemia (Fig. 12). Por ejemplo, forma parte de las variaciones circadianas en mamíferos,

que están influidas tanto por la luz como por la temperatura corporal, y además regula la expresión de genes circadianos²²⁶. Por otra parte, se ha visto que CIRP puede ser secretado por el hígado y el corazón y actuar como mediador de la inflamación en situación de shock hemorrágico y sepsis por estimulación de la secreción de $TNF\alpha$ y $TGF\beta$ ²²⁷.

Recientemente se ha visto que CIRP interacciona con la ruta de señalización AKT²²⁸, que entre otros procesos regula la resistencia a insulina transitoria de animales en hibernación y cuyo mal funcionamiento es responsable de la resistencia a la insulina en la diabetes mellitus tipo 2²²⁹. Con este hecho se pone de manifiesto la plasticidad funcional de CIRP y, además, puede abrir la puerta a una diana terapéutica muy interesante frente a la diabetes.

3.3. INCONVENIENTES

Pese a los efectos positivos que se han descrito para CIRP, también se ha visto que, en circunstancias similares, su implicación puede resultar perjudicial. Uno de estos casos paradójicos es la liberación en el corazón e hígado de CIRP a la circulación (lo que se conoce como CIRP extracelular o eCIRP), ya que provoca daño celular al inducir la respuesta inflamatoria al estimular la producción de $TNF\alpha$ y HMGB1 de macrófagos a través del TLR4/MD-2²²⁷. Pero, a su vez, la inflamación permite la regeneración posterior. Esta dualidad se puede observar también en daños isquémicos cerebrales, donde si CIRP permanece intracelular tiene un efecto protector de la apoptosis en neuronas, pero si se libera provoca daños severos debido a la estimulación de la neuroinflamación.

Respecto a su papel en cáncer, se ha visto que actúa como proto-oncogen, promoviendo la proliferación celular debido a su papel regulador del ciclo celular. Además, no solo se expresa en mayor nivel en células malignas de ciertos cánceres, sino que también se asocia con un peor pronóstico al disminuir la quimiosensibilidad de las células tumorales²³⁰ y con un mayor riesgo de recurrencia en hepatocarcinomas (Tabla 2). Esta relación viene determinada precisamente por la capacidad inflamatoria y proliferativa antes mencionada, donde la acción extracelular de CIRP genera la activación de citoquinas que se cree que favorecen tanto la progresión tumoral como la malignidad del tumor.

Tabla 2. Papel de CIRP en el cáncer (Tabla obtenida de Lujan et al. ²¹⁴)

Roles of CIRP as a Tumor Suppressor

Role	Possible Mechanisms/Conclusions	Experimental Model(s)	References
Slows cell growth via prolonging G1 phase	Possible interaction with G1 regulators	Mouse Fibroblasts (BALB/3T3 Cells)	(Nishiyama et al., 1997)
Inhibits proliferation through its function as a stress-induced RBP	Binds and increases translational efficiency of DNA damage response	Human Rectal carcinoma cells (RKO cells)	(R. Yang et al., 2006; R. Yang et al., 2010)

	genes ATR, Trx-1, RPA2 via 3' UTR binding		
Inversely correlates with proliferation/reduced in endometrial cancer compared to normal endometrium	Maintains normal endometrial function, aside from its role as a stress response protein	Human Normal Endometrium and Endometrial Carcinoma Tissues	(Hamid et al., 2003)
Slows doubling time in ovarian cancer cells/reduced in malignant compared to benign ovarian tumors	Prevents malignancy in ovarian tumors	Human Malignant and Benign Ovarian Tumors, Ovarian Cancer Cells	(Biade et al., 2006)
Decreases proliferation during mammary gland development	Halts proliferation when it is no longer needed during development	Transgenic mice expressing hCIRP in mammary glands	(Lujan et al., 2016)
Part of transcriptomic signature for parity	Breast differentiation leads to transcriptomic changes that decrease the lifetime risk for breast cancer in parous women	Human breast biopsies	(Suraj Peri et al., 2012)

Roles of CIRP as a Tumor Promoter

Role	Possible Mechanisms/Conclusions	Model	References
Bypasses replicative senescence <i>in vitro</i> ; overexpressed in breast, prostate, colon and pituitary cancers	Enhances translation via ribosomal protein S6 and 4E-BP1 interactions; increases ERK activation, cyclin D1 and proliferation; decreases p27 via Erk1/2 signaling pathway	Mouse Embryo Fibroblasts and Human Tumors	(Artero-Castro et al., 2009; Jian et al., 2016)
Downregulation impairs prostate cancer cell survival	Downregulation mimics heat stress and impairs cancer cell survival	Human Prostate Cancer Cell Lines (PC3 and LNCaP Cells)	(Zeng et al., 2009)
Upregulates HIF-1 α in breast cancer and melanoma xenografts, cyclin E1 in breast cancer cells, and is part of autoantibody signature in breast cancer	Stabilizes HIF-1 α and cyclin E1 mRNAs, increasing their translation	Human Breast Cancer cells (MCF7 Cells), Human Melanoma Cells (HEMa-LP) and Human Breast Tumors	(Chang et al., 2016; Guo et al., 2010; Mangé et al., 2012)
Knockdown results in decreased telomerase activity <i>in vitro</i>	Stabilizes TERC mRNA, increasing its translation; stabilizes telomerase complex assembly in Cajal bodies	Cancer Cell Lines (HTC75, HeLa, U2OS, HEK293)	(Zhang et al., 2015)
Upregulation decreases p53 levels and activity, decreasing apoptosis; induced EMT markers	Unknown mechanism of p53 regulation; function in EMT relies on its RRM motif	Lung Carcinoma Cells (A549); Hepatoma cells (HepG2, SK-HEP-1)	(Lee, Ahn, & Jang, 2015, 2016; Sakurai et al., 2006)

3.4. MECANISMO

Como ya se ha mencionado previamente, los mecanismos moleculares que controlan los cambios en los niveles de CIRP como consecuencia de la hipotermia están poco claros. Generalmente, la elevación de los niveles de una proteína presente en una célula se puede deber a dos factores: o bien tiene lugar un incremento en la expresión génica que eleva los niveles de su mRNA y, por tanto, los de la proteína; o bien tiene lugar una inhibición de los

mecanismos de degradación de la proteína que hacen que esta no desaparezca a la misma velocidad. En el caso de CIRP, al ser una proteína de respuesta rápida a múltiples estreses, cabría pensar que su acumulación se debe a la sinergia entre ambos factores. Sin embargo, aún es necesario profundizar más en el estudio de los mecanismos de respuesta a frío para lograr entender los procesos que tienen lugar en la célula en las primeras etapas de la hipotermia.

4. CILIO PRIMARIO

Con el fin de ahondar en los mecanismos de captación del frío es necesario comprender cómo se relacionan las células con su ambiente. Estas necesitan poder percibir distintos tipos de señales extracelulares, como estímulos químicos y mecánicos, procedentes del entorno extracelular para poder funcionar correctamente, y una de las principales estructuras celulares que permite transmitir los cambios en el ambiente al interior de la célula es el cilio primario.

4.1. ¿QUÉ ES?

El cilio primario es un cilio único e inmóvil con forma de antena que está presente en la mayoría de los tipos celulares de los mamíferos. Esta estructura es capaz de actuar como un sensor ante múltiples estímulos extracelulares gracias a una composición única de lípidos y receptores en su membrana que, junto con su citoesqueleto, le permite detectar cambios en el entorno y transmitirlos al resto de la célula²³¹. Cuando el cilio primario se describió en la década de los 60²³², se pensó que era una estructura vestigial pero hoy en día se sabe que tiene un papel importante en múltiples rutas de señalización como Hedgehog (Hh), Wingless (WNT) y receptores acoplados a proteína G (GPCRs), entre otras²³³. De hecho, los defectos en el desarrollo del cilio primario dan lugar a una amplia variedad de enfermedades conocidas como ciliopatías, que afectan a multitud de órganos²³⁴. Por todo ello se puede considerar al cilio primario como una antena celular y centro de señalización para la morfogénesis y la homeostasis de los tejidos²³⁵.

4.2. ESTRUCTURA

El cilio primario tiene habitualmente entre 250-300 nm de diámetro y 1-10 μm de longitud²³⁶. Está constituido por el cuerpo basal, que se origina a partir del centriolo madre, desde el que se prolonga una columna de microtúbulos recubierta de membrana que conforma el axonema²³⁷ (Fig. 13.A). A diferencia de los cilios móviles, cuyas proteínas asumen unas posiciones específicas formando una estructura conservada incluso entre

especies, los cilios primarios tienen una arquitectura y una composición proteica mucho más heterogénea y, potencialmente, específica para cada función²³⁸.

La membrana ciliar es continua con la membrana basal y ambas comparten el mismo origen bioquímico, sin embargo, tienen una composición proteica y lipídica diferente²³⁹. En concreto, la membrana ciliar está enriquecida en receptores de señalización específicos, como RTKs, GPCRs o receptores TGFβ/proteína morfogénica ósea (BMP) y también canales iónicos²³¹ (Fig. 13.A)

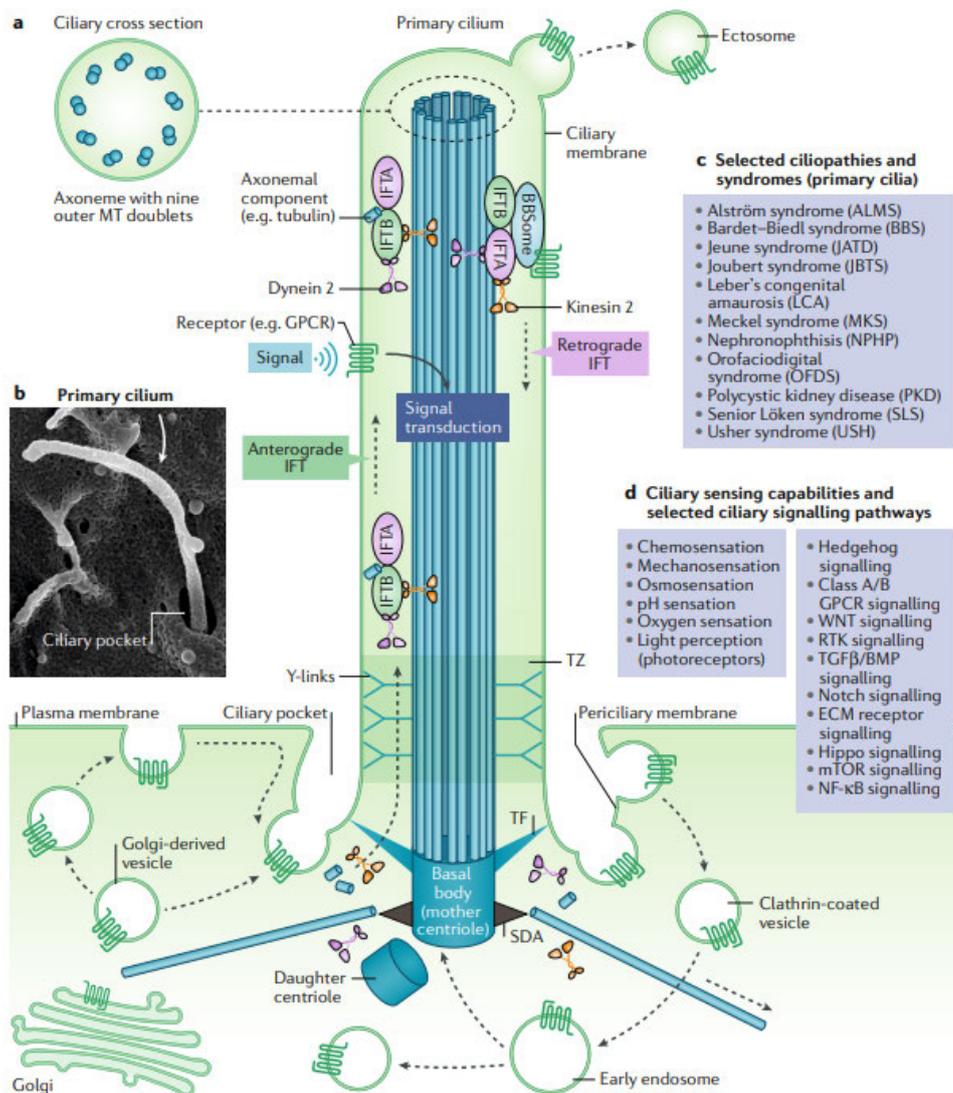


Figura 13. Resumen de la estructura y señalización del cilio primario (a), con una imagen del cilio primario de un fibroblasto embrionario de ratón obtenida por microscopía electrónica de barrido (b), las ciliopatías asociadas al cilio primario (c) y la capacidad sensorial junto con las rutas de señalización en las que está implicada esta estructura (d). (Figura obtenida de Anvarian et al.²³¹)

Por su parte, el axonema sigue una estructura canónica de microtúbulos de 9+0 (9 dobletes de microtúbulos sin par central), a diferencia de los cilios móviles que tienen axonemas con

doblete central, 9+2, que facilita la motilidad ciliar (Fig. 13.A). Sin embargo, a medida que se ha profundizado en el estudio del cilio primario se ha visto que no siempre siguen el patrón 9+0, si no que pueden tener un doblote central^{240,241} o, como se ha visto por criotomografía electrónica en células MDCK-II, el anillo periférico de dobletes de microtúbulos se interrumpe a pocos micrómetros de la zona de transición al migrar algunos dobletes hacia el centro del axonema²⁴².

El cuerpo basal es un centriolo modificado que procede del centriolo madre del centrosoma. Contiene estructuras especializadas en su extremo distal, que regulan aspectos críticos de la biogénesis ciliar y de la función, por ejemplo, el anclaje del cuerpo basal a la membrana plasmática o las vesículas durante las primeras etapas de la ciliogénesis²⁴³. Entre el cuerpo basal y el axonema se encuentra la zona de transición (TZ que, junto con las fibras de transición del cuerpo basal, controlan la entrada y la salida de las proteínas ciliares, contribuyendo así a la compartimentalización del cilio²³¹ (Fig. 13.A). Ambas estructuras tienen una gran importancia fisiológica, de hecho, las mutaciones en los genes que codifican los componentes del módulo proteico de TZ y de las fibras de transición del cuerpo basal dan lugar a ciliopatías graves como el síndrome de Joubert, el síndrome de Meckel-Gruber o la nefronoptosis²⁴⁴ (Fig. 13.C).

4.2.1. TRANSPORTE INTRAFLAGELAR

Independientemente de su función, arquitectura y origen específicos, ninguna de las numerosas proteínas ciliares se sintetiza en el cilio. Todas las proteínas que lo componen se producen en el cuerpo celular y se transportan a la zona de transición y a la base ciliar. Ahí se da un proceso selectivo que solo permite la entrada al compartimento ciliar a las proteínas cuyo destino es el cilio. Una vez dentro, únicamente las proteínas y moléculas muy pequeñas pueden desplazarse eficazmente por simple difusión hasta su ubicación final. Por lo tanto, la mayoría de los componentes del cilio tienen que ser transportados activamente dentro, fuera y a lo largo del cilio, lo que se consigue gracias al sistema de transporte intraflagelar (IFT, por sus siglas de "intraflagellar transport")²³⁸. El IFT supone un punto de regulación de la composición y función ciliar junto con las fibras de transición de la TZ y el cuerpo basal, siendo necesario para aportar los componentes básicos para la biogénesis y mantenimiento del cilio, como se vio por primera vez en *C. reinhardtii*²⁴⁵.

El sistema de IFT mueve las distintas cargas hacia el ápice (transporte anterógrado) o hacia la zona basal (transporte retrógrado) por los microtúbulos del axonema. Por ejemplo, los distintos receptores se mueven hacia dentro o fuera del orgánulo, donde son degradados o reciclados. Este transporte está mediado por complejos proteicos que pueden disociarse en los complejos IFT-A e IFT-B 1 y 2, que contienen 6, 10 y 6 subunidades, respectivamente²⁴⁶⁻

²⁴⁸. Los complejos IFT se alinean formando “trenes” que se transportan desde la base hasta la punta del cilio en el IFT anterógrado, impulsado por el motor kinesina-2²⁴⁹, y luego regresan a la base ciliar en el IFT retrógrado, impulsado por la dineína-2 citoplasmática²⁵⁰. Otro complejo multiproteico, el BBSome, actúa como un adaptador que conecta los complejos IFT con las moléculas de señalización y es necesario para la exportación ciliar de los receptores de señalización activados^{251,252} (Fig. 13.A)

4.3. BIOGÉNESIS DEL CILIO PRIMARIO

La biogénesis del cilio primario es un proceso complejo en el que intervienen múltiples maquinarias y vías de señalización celulares. La formación del cilio primario está íntimamente ligada al control del ciclo celular y comienza cuando la célula entra en la fase G0 o G1 temprana hasta su reabsorción antes de que la célula entre en mitosis. La ciliogénesis comienza con la migración del centrosoma hacia la superficie celular para convertirse en el cuerpo basal, seguido de la extensión de los microtúbulos del axonema, la formación de la TZ y el crecimiento del cilio a través de mecanismos de tráfico ciliar como el IFT. El cilio persiste normalmente durante toda la fase G1 y, el momento de la reabsorción difiere entre los distintos linajes celulares, siendo más común en la fase S o G2. Tras la reabsorción, el centriolo es liberado y se somete a un proceso de diferenciación para servir como centro organizador de microtúbulos hasta que la célula entra de nuevo en quiescencia y se reanuda la ciliogénesis²⁵³.

Dependiendo de si la elongación se inicia en la superficie de la célula o en el citoplasma, el proceso de biogénesis de los cilios primarios puede clasificarse como una ruta extracelular o intracelular. La ruta extracelular se da en células epiteliales polarizadas del riñón o del pulmón²⁵⁴, mientras que el ensamblaje intracelular es el más habitual y se da en la mayoría de las células²⁵⁵. En esta última se da la maduración del centriolo madre, el reclutamiento de vesículas pre-ciliares por el centriolo madre tras lo cual se forma la TZ compartimentalizando el cilio; una vez generado el compartimento ciliar se procede a la elongación del axonema por medio del IFT y, finalmente, se ancla el cuerpo basal y se fusiona la vesícula pre-ciliar con la membrana celular quedando así el cilio expuesto al exterior²⁵⁶ (Fig. 14).

A la hora de determinar la elongación del axonema, se ha visto que el cilio primario tiene una largura que varía según el tipo celular, y que puede ser necesaria para su funcionamiento óptimo²³⁶. De hecho, dentro de las ciliopatías pueden verse defectos en la señalización y diferencias en la longitud de los cilios^{257,258}. Además, en enfermedades complejas no causadas por una lesión genética en los cilios primarios, por ejemplo, en la obesidad^{259,260}, la diabetes tipo 2²⁶¹ y en lesiones renales²⁶², se han observado cambios en la largura del cilio en las células afectadas. Esta largura viene determinada por el equilibrio

entre ensamblaje y desensamblaje del citoesqueleto ciliar en el que las proteínas del transporte flagelar juegan un papel principal²³⁶.

H.Y. Chen et al.

Seminars in Cell and Developmental Biology 110 (2021) 70–88

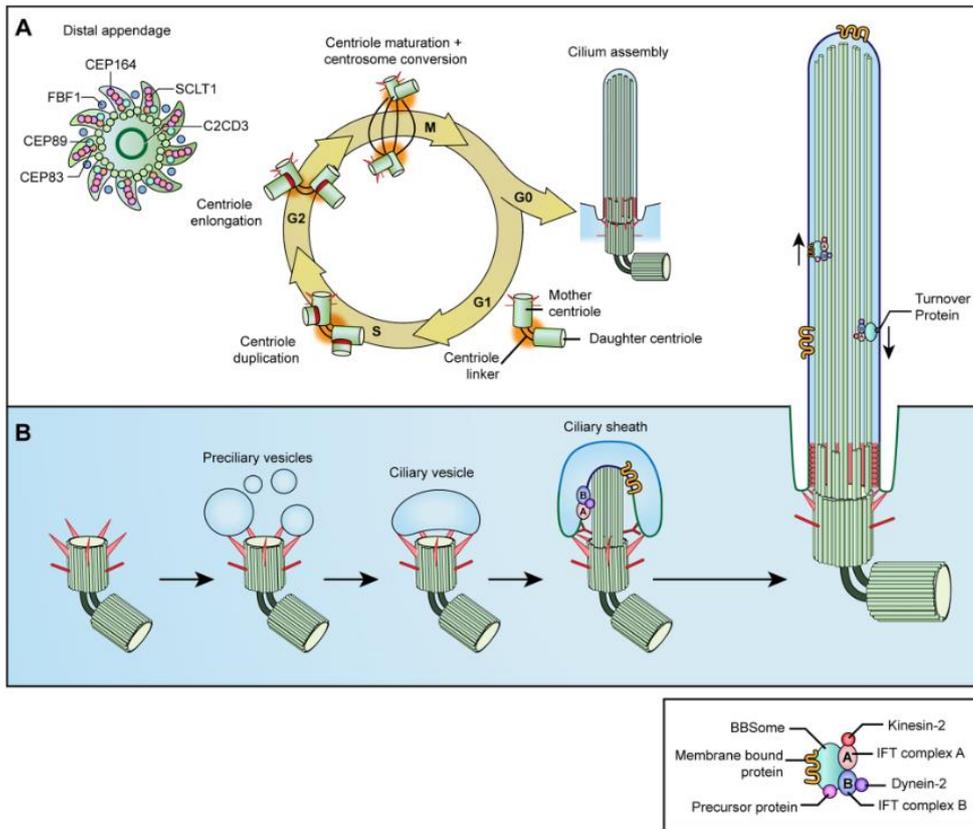


Figura 14. Biogénesis del cilio primario. Formación y desensamblaje durante el ciclo celular (A), con el detalle de la biogénesis intracelular (B). Figura obtenida de Chen et al.²³⁷

Además, los cilios también pueden liberar ectosomas desprendiéndose del material que contiene la membrana de la superficie del orgánulo. La función de estas vesículas extracelulares se ha relacionado con el mantenimiento de la integridad ciliar, el equilibrio de los eventos de señalización intraciliar y/o la transmisión de señales a otras células^{263,264}

4.3.1. FUNCIÓN

Aunque el cilio primario, en cierta manera, al secuestrar el centriolo tiene un efecto en la división celular, su función principal reside en la señalización celular. A través de diversas rutas son capaces de coordinar y controlar procesos del desarrollo, plasticidad de los tejidos y función de múltiples órganos (Fig. 13.D).

Cilio primario durante el desarrollo

El cilio primario tiene un papel muy importante en numerosas rutas de señalización, gracias a su composición rica en receptores y su capacidad de transmitir las señales extracelulares al interior de la célula. El conjunto de componentes de señalización dentro del cilio es dinámico y está estrechamente relacionado con el estado de diferenciación y microentorno de la célula²⁶⁵, lo que podría explicar cómo tipos celulares específicos son capaces de recibir y convertir elementos de señalización en distintos momentos del desarrollo y en condiciones fisiológicas diferentes. Los cilios primarios regulan las interacciones de las rutas de señalización y organizan redes espacio-temporales de señalización durante el desarrollo; además tienen un papel en el mantenimiento de la homeostasis tisular. Todo esto a través de las principales vías de señalización relacionadas con el desarrollo, incluidas las reguladas por Hedgehog, GPCRs, WNT, RTKs, TGFβ/BMP, Notch, Hippo o mTOR^{231,233,266}

Principales rutas de señalización

La asociación entre la ruta Hedgehog y los cilios primarios está bien establecida. De hecho, los cilios primarios son necesarios para esta señalización²⁶⁷. Esta ruta es capaz de regular muchos destinos celulares y su importancia en el desarrollo embrionario, la biología de las células madre y la homeostasis de los tejidos se puso de manifiesto al verse implicada en varios cánceres y síndromes congénitos²⁶⁸. Por ejemplo, su principal ligando, la proteína Sonic hedgehog (Shh), media en la actividad de dos centros de organización embrionaria clásicos de los vertebrados²⁶⁹, y fallos en el IFT interrumpen la señalización de Shh dando lugar a anomalías congénitas^{270,271}. En concreto, las alteraciones de la ruta Shh por mutaciones en alguno de sus genes produce defectos de cierre del tubo neural, hidrocefalia, y otros defectos de la línea media como el encefalocele occipital, defectos del cuerpo calloso y holoprosencefalia²⁷². Lo mismo sucede con la proteína Indian hedgehog (Ihh), molécula clave en la señalización para la osificación endocondral, responsable de la mayoría de los componentes del esqueleto, incluidas las costillas y los huesos largos, a través de la regulación de la maduración de los condrocitos durante los procesos de osificación²⁷³.

El cilio primario también es un punto importante para la señalización por GPCR, la mayor superfamilia de receptores de señalización del genoma humano²⁷⁴. Muchos GPCRs y sus moléculas efectoras secundarias se localizan en los cilios de diversos tipos de células de mamíferos. Por ejemplo, la relación GPCR y cilio primario se puede ver en el desarrollo de la conectividad interneuronal, ya que la interrupción condicional de ARL13B, una GTPasa necesaria para la correcta señalización ciliar altera el desarrollo de los circuitos en las interneuronas post-migratorias en el núcleo estriado del ratón²⁷⁵. Otro ejemplo se da en las primeras etapas del embarazo durante la implantación embrionaria, ya que una alteración de la ciliogénesis en los trofoblastos favorece la activación de ERK1/2, la elevación de las

metaloproteinasas de matriz (MMP) y la invasión celular vía EG-VEGF cuyo receptor, receptor 1 de prokineticina (PKR1), está en el cilio primario²⁷⁶.

La señalización WNT comprende una serie de rutas evolutivamente conservadas que coordinan muchos procesos celulares a lo largo de la vida de la célula. Dentro de WNT hay dos vías de señalización principales conocidas como WNT- β -catenina (vía canónica) y WNT-polaridad celular planar (vía no canónica). Para esta última está aceptado que la ciliogénesis normal es esencial, ya que las proteínas ciliares vinculan la polarización del cuerpo basal con la regulación de la polaridad celular planar²⁷⁷. Sin embargo, el papel del cilio en la vía canónica está sujeto a algo más de controversia²³³.

Cilio primario en tejidos adultos

La señalización mediada por el cilio primario es fundamental durante el desarrollo, y seguramente lo siga siendo en las poblaciones de células madre de los tejidos. Si bien la alteración del cilio primario en la vida adulta no presenta la letalidad de las aberraciones que se aprecian durante la fase embrionaria, estos orgánulos tienen un papel fundamental para el funcionamiento correcto de los tejidos. Es más, en el organismo adulto, muchas de las células ya diferenciadas tienen cilios primarios y las alteraciones en su función o biogénesis se asocian con obesidad, enfermedad poliquística del riñón (PKD), degeneración de retina, problemas en la función hepática, deformidades esqueléticas, defectos cardíacos congénitos y anomalías del desarrollo cerebral^{278,279}.

Por ejemplo, en el riñón los cilios primarios sobresalen de la superficie apical de las células epiteliales que recubren los túbulos y conductos de las nefronas²⁸⁰. Ahí el cilio primario actúa como sensor que responde a las modificaciones del flujo, la composición y la osmolalidad de la orina, modulando importantes vías de señalización intracelular como WNT²⁸¹ o Hippo²⁸². Una alteración en estos cilios provoca el desarrollo de la PKD ya que la largura del cilio está relacionada con la sensibilidad al flujo e inhibición de la formación de quistes²⁸³.

Otro caso se da con los cilios primarios de los colangiocitos, que son las células epiteliales que revisten los conductos biliares. Al igual que en el riñón, los cilios primarios de los colangiocitos tienen un papel como mecano-, quimio- y osmorreceptores que permiten detectar el flujo, composición y osmolaridad en el canal biliar, transduciendo estas señales a través de la modulación del calcio intracelular y del cAMP²⁸⁴. De hecho, algunas mutaciones en las proteínas ciliares dan lugar a una malformación de la placa ductal del hígado con formación anormal de los conductos biliares²⁸⁵.

Los conos y bastones de los fotorreceptores de la retina de los vertebrados contienen un cilio primario modificado que se conoce como segmento externo y que es donde se inicia la

fototransducción²³⁷. Estos cilios modificados están estructural y funcionalmente adaptados a la captura eficiente de fotones y, aunque tienen una morfología y una composición proteica similar, se diferencian en detalles que les da una funcionalidad distinta²⁸⁶. Por ejemplo, los conos son los responsables de la visión en color de alta resolución que funciona con luz brillante, mientras que los bastones son los encargados de la captura de fotones de alta sensibilidad en condiciones de luz tenue²⁸⁷. Como consecuencia, ciertas mutaciones de las proteínas fotorreceptoras implican un defecto en el desarrollo, mantenimiento o función del cilio que da lugar a un fenotipo de distrofia de retina que aparece frecuentemente en las ciliopatías²⁸⁸.

También ha quedado de manifiesto la importancia de los cilios primarios neuronales debido a que muchas ciliopatías están asociadas con enfermedades neuropatológicas, que pueden ir desde alteraciones anatómicas hasta enfermedades neuropsiquiátricas^{289,290}. De hecho, los cilios primarios de las neuronas están enriquecidos en ciertos GPCRs y proteínas efectoras que aparecen alterados en modelos murinos de síndrome de Bardet-Biedl (BBS)²⁹¹. Tanto este como el síndrome de Alström (ALMS) están asociados con la obesidad²⁹², sugiriendo la implicación del cilio primario con la gestión de la energía y la ingesta de alimentos; algo que se ha confirmado con estudios en ratones adultos donde la alteración condicional del cilio provoca hiperfagia y obesidad^{293,294}. Un ejemplo de su relevancia en el sistema nervioso central y en la obesidad se puede ver en la alteración de la localización del receptor MC4R, que normalmente se encuentra en el cilio de las neuronas del núcleo paraventricular del hipotálamo en los ratones²⁹⁵ y cuyo gen es el responsable de la obesidad monogénica más común en humanos²⁹⁶. Este receptor se asocia con obesidad en humanos y la inhibición en el cilio primario de la señalización de cAMP en las neuronas que expresan MC4R del núcleo paraventricular causa un aumento de la ingesta y una ganancia de peso en los ratones²⁹⁵. Todo esto lleva a pensar que la alteración de la señalización de MC4R en el cilio primario podría ser una causa común de la obesidad, tanto sindrómica como no sindrómica en humanos. Algo similar ocurre con NPY y su receptor, NPY2R, que se localiza en los cilios primarios de las neuronas hipotalámicas del ratón y que actúan en la regulación de la ingesta y el gasto energético²⁹¹. Para que este receptor funcione es necesaria su localización en el cilio primario, en concreto en la punta del axonema. Además, se ha comprobado que se libera en ectosomas al medio extracelular, lo que podría sugerir que la señalización a través de este receptor se podría transmitir entre células²⁶³.

El cilio primario no solo está implicado con la obesidad a través de la regulación neurológica, también interviene en la diferenciación adiposa que, junto con la acumulación de grasa, se asocia con la formación transitoria del cilio primario²⁹⁷. Este hecho se ha visto en adipocitos cultivados a partir de fibroblastos dérmicos de pacientes con BBS, donde únicamente

aparecían cilios primarios en los preadipocitos en diferenciación y mostraban una mayor predisposición a la acumulación de grasa y un mayor nivel de leptina secretada que las células control²⁹⁸. Además, los cilios primarios también pueden estar implicados en el síndrome metabólico y la diabetes tipo 2 a través de la señalización RTK. De hecho, el receptor de la insulina (IR) y el receptor del factor de crecimiento 1 similar a la insulina (IGF1R) actúan en este orgánulo^{299,300}. Estos receptores tienen un papel importante en el procesamiento y almacenamiento de la glucosa, en la síntesis proteica y lipídica, así como en la diferenciación celular y la respuesta mitogénica²³¹. Todo esto se traduce en la aparición de diabetes como complicación frecuente en pacientes con BBS y uno de los síntomas principales en ALMS³⁰¹. Además, se ha comprobado que la disfunción ciliar en los islotes pancreáticos supone el desarrollo de diabetes tipo 2 en ratones³⁰².

Por último, el papel de transductor de señales hace que el cilio primario esté implicado en la regulación de rutas de señalización asociadas al cáncer. En un principio, dado que las células cancerosas muestran un nivel de proliferación elevado comparado con las normales y en algunos tipos de cáncer (como el carcinoma renal de células claras³⁰³, el cáncer de epitelio del ovario³⁰⁴, el colangiocarcinoma³⁰⁵ o el adenocarcinoma ductal pancreático³⁰⁶) el número de cilios primarios era significativamente más reducido que en las células normales³⁰⁷, se pensaba que los cilios se perdían en las células cancerosas. Sin embargo, se ha visto que el cilio primario también puede estar incrementado³⁰⁸ y favorecer la progresión tumoral en otros tumores, por ejemplo, en algunos tipos de meduloblastomas³⁰⁹, el cáncer de piel de células basales y el cáncer de mama de tipo basal^{307,310} que, además, coinciden en que los tres presentan alteraciones en la ruta Hh³¹¹. Es necesario profundizar más en la investigación en este campo para llegar a entender la relevancia del cilio primario en la oncogénesis, ya que si se puede asociar su presencia o ausencia a variantes específicas, como en el caso del meduloblastoma³⁰⁹, podría suponer una herramienta muy útil para el diagnóstico y la estrategia de tratamiento del cáncer, así como proporcionar nuevos conocimientos sobre el mecanismo de la formación de tumores y su relación con el microambiente tumoral²⁵³.

Debido a que el estudio del cilio primario es un campo de investigación relativamente nuevo, se siguen descubriendo nuevas funcionalidades e implicaciones en multitud de órganos. Las descritas sobre estas líneas son solo unos ejemplos, quizás los más conocidos, pero recientemente se ha puesto el foco en muchos otros como su papel en la modulación de las células inmunitarias³¹² o su implicación en las enfermedades cardíacas y su recuperación³¹³, y pueden ser solo la punta del iceberg.

4.3.2. ALTERACIONES EN EL CILIO PRIMARIO (CILIOPATÍAS)

Como ya ha ido apareciendo a lo largo de este texto, las alteraciones en la biogénesis del cilio primario dan lugar a un conjunto de patologías conocidas como ciliopatías. Debido a la presencia del cilio primario en muchos tipos celulares, las anomalías genéticas que afectan al desarrollo o a la función ciliar tienen una repercusión a nivel multiorgánico (Tabla 3), bien por ser genes que codifican proteínas que se localizan y actúan en el cilio o bien porque tienen un papel en la biogénesis del mismo²⁷⁹.

Las ciliopatías son enfermedades complejas de diagnosticar, ya que tienen una amplia heterogeneidad genética y clínica, con altos niveles de letalidad. Aunque sus manifestaciones son variadas, algunas de ellas suelen aparecer de forma habitual en prácticamente todas las ciliopatías, siendo la característica más común el *situs inversus* (la inversión de la lateralidad de los órganos). Otras manifestaciones pueden asociarse frecuentemente entre ellas, como la polidactilia, la agenesia del cuerpo calloso y el retraso mental, que son una tríada que tiende a manifestarse simultáneamente, seguramente por una señalización común en la que el cilio actúa como nexo³⁰¹.

Tabla 3. Tabla de los rasgos más comunes de las ciliopatías y los síndromes que los comparten (Obtenida de Tobin J, et al.³⁰¹)

Common clinical features of the ciliopathies										
Feature	BBS	MKS	JBTS	NPHP	SLSN	JATD	OFD1	EVC	ALMS	PKD
Renal cysts	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓			✓
Hepatobiliary disease	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓		✓	✓
Laterality defect	✓	✓		✓		✓				
Polydactyly	✓	✓	✓			✓	✓	✓		
Agenesis of corpus callosum	✓	✓	✓			✓	✓			
Cognitive impairment	✓	✓	✓			✓	✓	✓		
Retinal degeneration	✓	✓	✓		✓	✓			✓	
Posterior fossa defects/encephalocoele	✓	✓	✓			✓		✓		
Skeletal bone defects						✓	✓	✓		
Obesity	✓								✓	

BBS, Bardet-Biedl syndrome; MKS, Meckel syndrome; JBTS, Joubert syndrome; NPHP, Nephrophthisis; SLSN, Senior-Loken syndrome; JATD, Jeune syndrome; OFD1, Oro-facial-digital syndrome type 1; EVC, Ellis van Creveld syndrome; ALMS, Alström Syndrome; PKD, polycystic kidney disease.

Las primeras ciliopatías identificadas fueron las relacionadas con los trastornos renales quísticos, entre los que destacan la PKD y la nefronoptosis (NPH). La primera se caracteriza por generar un riñón agrandado y con múltiples quistes y presenta dos variantes: la recesiva, causada principalmente por mutaciones en el gen PKHD1 que codifica la proteína fibrocistina/poliductina y de inicio prenatal, y la dominante, provocada por mutaciones en PKD1 y PKD2 que codifican la policistina 1 y 2 respectivamente y con inicio en la edad adulta³¹⁴. Por su parte, la NPH es la causa genética más frecuente de la insuficiencia renal terminal infantil, y está causada por mutaciones en los genes recesivos NPHP. Se manifiesta como una de las ciliopatías conocidas más leves. Sin embargo, la NPH puede presentarse

con distrofia de retina en lo que se conoce como síndrome de Senior-Löken (SLS)³¹⁵ o asociarse con otros trastornos de mayor gravedad como el síndrome de Joubert (JBTS)³⁰¹.

De las ciliopatías no letales, las más conocidas son el BBS y el JBTS. El BBS es el modelo tradicional de ciliopatía, ya que es la primera enfermedad cuya etiología radica en un trastorno ciliar primario³¹⁶, y está causada por mutaciones en cualquiera de los 24 genes conocidos relacionados con BBSome (adaptador que conecta la mercancía ciliar al IFT), bien porque codifican alguna de las 8 proteínas que forman el complejo de transporte o para aquellas que ayudan a la función o ensamblaje del mismo³¹⁷. Los pacientes con BBS presentan muchas de las características comunes de las ciliopatías, como polidactilia, riñones quísticos, retinitis pigmentosa y *situs inversus*, además de una alta tasa de obesidad desde edades tempranas³¹⁸. Por otra parte, el JBTS es una ataxia cerebelosa congénita que se caracteriza por el “signo del diente molar” y que suele presentarse con NPH, retraso mental, coloboma retinal e irregularidades en el patrón respiratorio durante el periodo neonatal²⁸⁸. Es una ciliopatía más severa que la anterior, causada por la mutación recesiva en genes NPHP3, NPHP6/CEP290, AHI1 y/o MKS3, entre otros²³⁴.

A lo largo del estudio de las ciliopatías se han ido caracterizando muchas más aparte de las expuestas aquí, como el síndrome de Meckel³¹⁹, una ciliopatía letal caracterizada por riñones quísticos agrandados, polidactilia, encefalocele occipital y frecuentemente fibrosis hepática congénita, o los síndromes orofaciodigitales y las ciliopatías esqueléticas (Síndrome de Jeune o distrofia torácica asfixiante, síndrome de Mainzer-Saladino o síndrome de Ellis van Creveld), ambos con un amplio rango de severidad que puede acabar siendo letal²⁸⁸.

Por suerte, las ciliopatías son relativamente raras, siendo la más frecuente el PKD autosómico dominante con una incidencia de 1 en 1000. Esta enfermedad provoca una baja calidad de vida y la muerte prematura en muchos pacientes. Sin embargo, muchas de las características de las ciliopatías sí que son comunes en la población general, como la obesidad, los quistes renales, la degeneración de la retina, defectos en el tubo neural o la hendidura orofacial. Por tanto, profundizar en su estudio ayudaría a entender mejor estas enfermedades³⁰¹. Por ejemplo, el BBS presenta obesidad asociada a diabetes tipo 2, hipertensión y enfermedad cardiovascular, lo que proporciona un buen modelo de estudio para el síndrome metabólico que tiene una incidencia mucho mayor a nivel mundial, o el síndrome de Alström para la diabetes tipo 2³²⁰. Por tanto, entender la patogenia de las ciliopatías podría abrir la puerta a nuevos modelos y enfoques terapéuticos para otras muchas enfermedades que conforman sus síndromes.

4.3.3. CILIO PRIMARIO Y FLUJO

Como ya se ha visto, los cilios primarios desempeñan un papel fundamental en la transducción de señales químicas y mecánicas. La fuerza mecánica puede dar lugar a una serie de estímulos fisicoquímicos, como cambios en la osmolaridad, presión hidrostática y pH, que pueden ser percibidos por el cilio primario. La teoría predominante es que la estimulación mecánica, como el flujo de fluidos o la deformación de los tejidos, provoca la inclinación de los cilios primarios, que a su vez inician las cascadas de señalización de mecanotransducción³²¹.

El cilio primario juega un papel muy importante en la mecanotransducción de muchos tipos celulares en función del papel del tejido. Muchas proteínas que se localizan en el cilio, como PC1³¹⁴, PC2³²², TRPV4³²³ o AC6³²⁴ han sido descritas como críticas para este proceso, y su alteración modifica significativamente la capacidad mecanotransductora de la célula³²¹. De hecho, un fallo en la detección de flujo de los cilios primarios de las células colindantes al nodo embrionario en ratones supondría la incapacidad de detección del flujo generado por los cilios móviles del nodo que impediría la diferenciación izquierda-derecha necesaria para la continuación de la embriogénesis³²⁵

Sin embargo, el cilio primario no solo tiene una función como mecanosensor, sino que también es capaz de modularse ante estímulos mecánicos. Por ejemplo, es capaz de modificar el citoesqueleto probablemente para soportar mejor la tensión de cizalla del flujo³²⁶, la acetilación de sus microtúbulos y la rigidez de la flexión ciliar³²⁷, así como la rotación y la largura del orgánulo³²¹. Todas estas modificaciones suponen un mecanismo a través del cual la célula puede regular su aparato mecanosensor y adaptarse al medio.

Hipótesis

La obesidad y el sobrepeso son un problema de salud mundial extremadamente difícil de combatir. Por ello, son necesarias nuevas estrategias que sirvan como herramientas para hacerle frente, y una de ellas es el desarrollo de nuevas terapias antiobesidad. Una de las dianas principales de estas nuevas terapias es la termogénesis, que es la capacidad de un organismo de generar calor a través de reacciones metabólicas, muchas veces a partir de los lípidos de la grasa. Este mecanismo se produce de forma natural en el organismo de los animales homeotermos como respuesta a distintos estímulos, siendo el principal la exposición al frío. Por tanto, desarrollar un tratamiento capaz de simular el efecto de la hipotermia moderada, sin las incomodidades y los perjuicios derivados de la exposición al frío, sería una herramienta muy útil para frenar y reducir la obesidad mundial.

En el laboratorio se desarrollaron una serie de moléculas capaces de actuar como miméticos de la hipotermia, por tanto, en este trabajo proponemos que:

El tratamiento con la molécula zr17-2, u otras de las diseñadas e identificadas como miméticos de la hipotermia, es capaz de modular beneficiosamente el metabolismo de la glucosa y el del tejido adiposo. Y que, por lo tanto, estas moléculas pueden constituir la base para un nuevo tratamiento de enfermedades relacionadas con la obesidad y el síndrome metabólico.

Objetivos

El objetivo principal de esta tesis es estudiar la eficacia de SMs que simulan hipotermia en la modulación del metabolismo glucídico y lipídico.

Para ello se han establecido varios objetivos parciales que consisten en:

1. Terminar de caracterizar las SMs en líneas celulares y modelos animales.
2. Investigar el efecto de los miméticos de la hipotermia en la respuesta a la glucosa y la insulina en modelos animales.
3. Documentar molecularmente los cambios de grasa blanca a beige en un modelo animal tras la inyección de los miméticos.
4. Investigar los posibles efectos tóxicos en un modelo animal tras inyecciones periódicas de los compuestos.
5. Investigar el efecto de los miméticos de la hipotermia en la diferenciación de cultivos de células madre de adipocitos.
6. Estudiar la expresión de proteínas de respuesta a frío en el cilio primario.

Material y Métodos

La metodología empleada para alcanzar los distintos objetivos de la tesis ha sido muy variada así que, con el fin de exponerla de forma clara, se presentará agrupada según el origen de obtención de las muestras (de líneas celulares, de modelos animales o de cultivos primarios humanos), tras lo cual se describirán las técnicas generales de análisis de muestras (Western-Blot, extracción de RNA, PCR cuantitativa e inmunofluorescencia) y, finalmente, el tratamiento estadístico de los datos.

1. ENSAYOS CON LÍNEAS CELULARES

1.1. LÍNEA CELULAR R28

La línea celular empleada para realizar los ensayos *in vitro* fue la R28, una línea de células precursoras de retina de rata inmortalizadas que responde a la hipotermia moderada³²⁸.

Para el crecimiento de las células se utilizó el medio de cultivo DMEM/F-12 suplementado al 5% con suero bovino fetal (FBS), 1% de aminoácidos no esenciales, 1% de penicilina/estreptomicina y 1,5% de piruvato sódico 100 mM (HyClone, ref. 16SH30239.01). Las células se incubaron en una atmósfera con 5% CO₂, humedad del 85%, y a dos temperaturas: a 37°C para las células en normotermia y a 32°C para las sometidas a hipotermia moderada.

1.1.1. TRATAMIENTO CON DISTINTAS MOLÉCULAS DE PEQUEÑO TAMAÑO PARA SIMULAR HIPOTERMIA.

Para determinar el papel de las moléculas sobre los niveles de CIRP presentes en las células, se sembraron 750.000 células/placa para el crecimiento a 37°C y de 1,5 x10⁶ células/placa para el crecimiento a 32°C (control positivo de hipotermia moderada), de forma que alcanzasen una confluencia similar al final del experimento. Las moléculas de pequeño tamaño empleadas para simular hipotermia (Fig. 15), que fueron identificadas en un trabajo anterior³²⁹, se disolvieron en 10 mL de medio de cultivo a una concentración final de 10 µM y se añadieron a las placas con células en condiciones de normotermia durante 4 días. Como controles del tratamiento se añadió la cantidad equivalente de vehículo (DMSO, Sigma-Aldrich, ref. 472301-100ML), o agua miliQ autoclavada según las necesidades de cada molécula. Por último, las células se procesaron para Western Blot, PCR cuantitativa (qPCR) o

inmunofluorescencia como se describe más adelante en los apartados de técnicas generales.

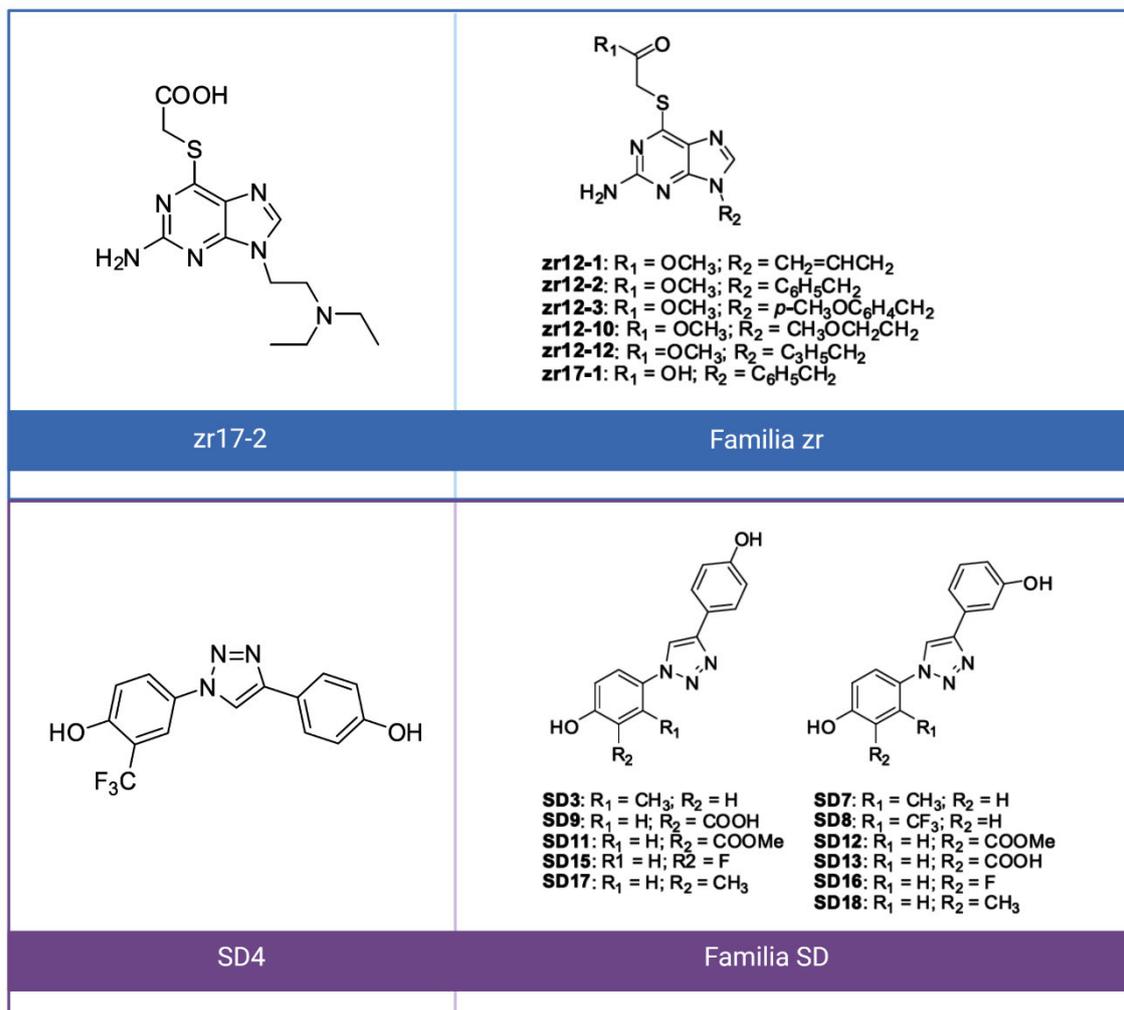


Figura 15. Estructura molecular de las moléculas zr17-2 y SD4 junto con la de sus respectivas familias

1.1.2. EXPERIMENTOS DE FLUJO

Flujo laminar

Los experimentos de flujo laminar se realizaron en colaboración con el laboratorio de Microentorno Tisular del i3A de la Universidad de Zaragoza, liderado por el Dr. Ignacio Ochoa y con la supervisión de la Dra. Sara Oliván.

En ellos se sometieron células R28 a un flujo laminar continuo dentro de unos chips de forma que las células estuvieran expuestas a una presión controlada y mantenida en el tiempo. Los experimentos de flujo laminar se emplearon para i) determinar la localización de CIRP y RBM3 en la célula a distintas presiones, y ii) establecer la cinética de expresión de ambos genes en el tiempo (Fig. 16.A).

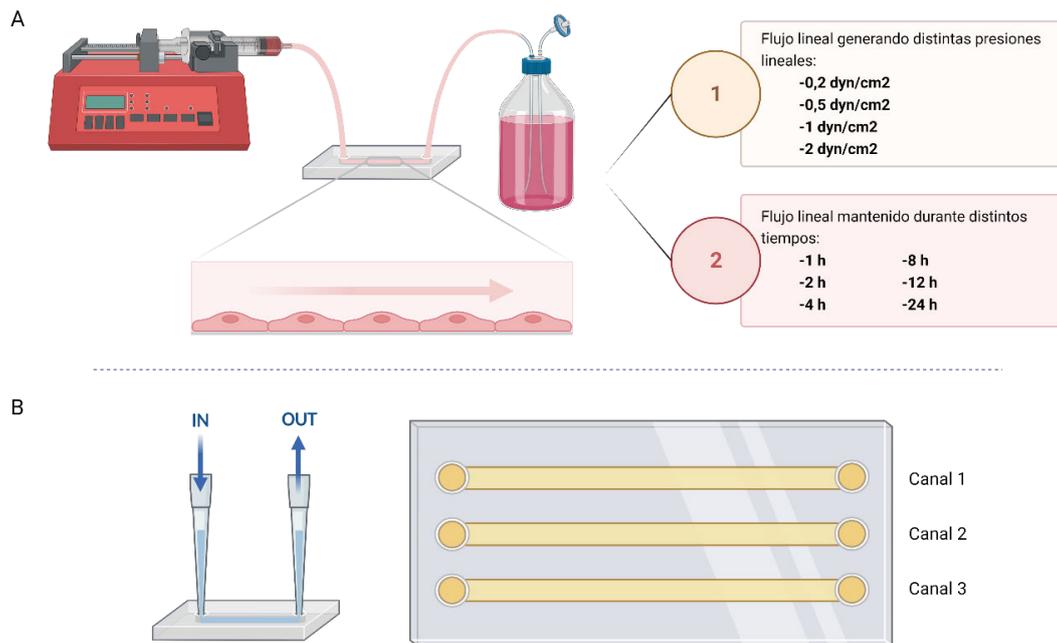


Figura 16. Esquema del sistema de flujo empleado para someter a las células a las distintas presiones lineales con los dos tipos de ensayos realizados y sus análisis posteriores (A). Detalle del sistema de trabajo en los canales de los chips de flujo (B), con 3 conductos independientes que se pueden utilizar para réplica de condiciones o bien para probar distintas condiciones sobre las mismas células. (Creada con BioRender).

Las células se cultivaron dentro de los canales hasta obtener una confluencia del 100%, ya que de lo contrario se levanta la monocapa por la presión lineal del flujo. Gracias a un sistema de bomba de jeringa conectado al chip se estableció el flujo deseado que atravesaba el canal hasta desecharse en una botella estéril (Fig. 16.A). Transcurrido el tiempo establecido se cesó el flujo e inmediatamente se procedió a recoger o fijar las células en los canales para su procesamiento posterior (Fig. 16.B).

Tabla 4. Presión lineal ejercida por caudal

Presión lineal (dinas/cm ²)	Flujo (μL/min)
0	0
0,2	15,5
0,5	31
1,0	62
2,0	124

En el primer ensayo se sometieron las células a distintas presiones lineales de 0,2, 0,5, 1,0 y 2,0 dinas/cm², más un control negativo de células sin flujo (Tabla 4), durante 6 horas en condiciones estándar de incubación.

Para las células estudiadas por inmunofluorescencia, una vez finalizadas las 6 horas, se fijaron con formaldehído al 3,4% directamente sobre el chip y se conservaron a 4°C hasta su análisis posterior.

Para el segundo ensayo, de qPCR, se escogieron dos flujos distintos: un flujo bajo de 31 µL/min y uno alto de 62 µL/min y se expusieron las células a distintos tiempos de 1, 2, 4, 8, 12 y 24 horas (Fig. 16). En este caso, cada canal se recogió de manera individual en Trizol (Life Tech, ref. A315596018) y se conservó congelado a -80°C hasta su procesamiento posterior.

Flujo oscilante en placas de Petri de 100 mm (p100)

También se quiso estudiar el efecto del flujo oscilante en la expresión de las proteínas de respuesta al frío. Para ello se cultivaron células R28 sobre portaobjetos de adhesión SuperFrost Plus (Thermo Scientific, ref. J1800AMNZ) en placas de Petri de 150 mm hasta alcanzar una confluencia del 100%, momento en el que se individualizaron en placas de 100 mm (Falcon, ref. 353003) con medio de cultivo fresco. Se les sometió a flujo oscilante generado por un balancín Rocking Shaker (Ohaus, SHRK04DG), configurado con una inclinación de 5° y una frecuencia de 10 rpm, en el interior de un incubador, manteniendo durante todo el experimento las condiciones habituales de temperatura y humedad de las células (Fig. 17).

En cada oscilación del balancín el medio discurría por gravedad por encima de las células generando estrés de cizalla de una media de 0,81 dinas/cm² (Fig. 17). Los portaobjetos se fijaron a un lateral de la placa dejando espacio por encima y por debajo de forma que el efecto de las turbulencias del medio contra la pared de la placa se minimizase al máximo, para intentar que las condiciones de flujo dentro del porta fuesen las más homogéneas posibles.

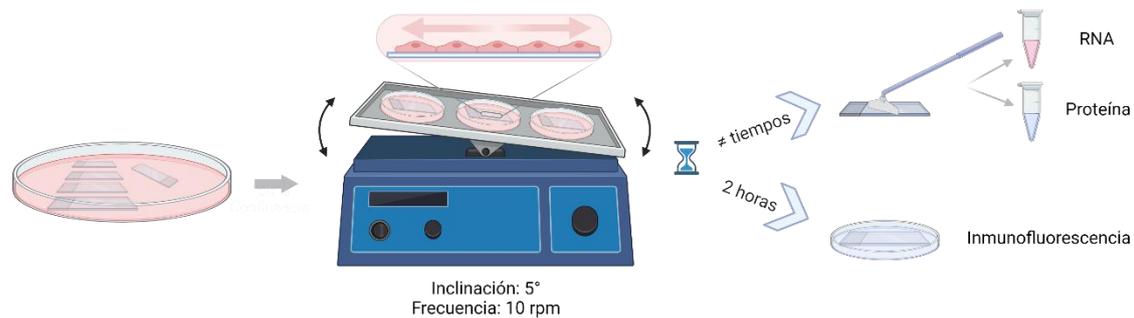


Figura 17. Esquema del desarrollo del experimento de flujo oscilante en células R28. Las células se crecieron sobre portaobjetos en placas de 150 mm, que posteriormente se individualizaron y se sometieron a un flujo generado por un balancín (inclinación de 5° y frecuencia de 10 rpm). Tras el tiempo de exposición a flujo, que fue variable, se recogieron o fijaron las células según su destino final. (Creada con BioRender).

Con el fin de analizar el efecto del flujo oscilante en la respuesta de CIRP y RBM3 en el transcurso del tiempo, se realizaron varios experimentos sometiendo a las células R28 a flujo oscilante durante distintos tiempos. Las muestras destinadas para analizar la expresión de proteínas se recogieron a las 2, 6 y 24 horas en condiciones de medio normales. Este mismo experimento también se realizó en condiciones de privación de suero, es decir, tras alcanzar la confluencia del 100% se hizo un cambio a medio sin suero durante 24 horas antes de exponer a las células a flujo durante los tres tiempos. Finalmente, las células se recogieron en el buffer de lisis M-PER (Thermo Scientific- Rockford, EEUU), con inhibidores de proteasas cComplete ULTRA, EDTA-free (Roche, ref. 05892791001), levantándolas con un *cell scraper* (Fig. 17), tras lo cual se congelaron a -20°C. Todas las condiciones se realizaron por triplicado y con su correspondiente control estático para cada tiempo.

Las células destinadas para analizar la expresión génica de CIRP y RBM3 en el transcurso del tiempo se trataron de forma similar a lo descrito anteriormente. Los tiempos de mantenimiento del flujo escogidos para estos experimentos fueron de 1, 2 y 6 horas, en condiciones de medio con suero. Una vez que transcurrió el tiempo, las células se recogieron en 300 µL de Trizol ayudándose del *cell scraper* y se congelaron a -80°C.

Por último, se prepararon las muestras para estudiar la colocalización de las proteínas de respuesta al frío, CIRP y RBM3, que sería analizada por inmunofluorescencia (Fig. 17). De la misma manera que está descrito en los párrafos anteriores, se sometió a las células a flujo oscilante durante 2 horas. Inmediatamente después se fijaron con formaldehído 3,4 % durante 10 minutos y, tras tres lavados de 5 minutos en PBS, se guardaron bien selladas a 4°C en PBS.

Diseño de un dispositivo de cultivo para obtener un flujo oscilante reproducible

Con el fin de reducir la variabilidad procedente de las turbulencias y los movimientos aleatorios del propio portaobjetos, y/o el medio de cultivo en la placa, se ideó un dispositivo que permitiese obtener unas condiciones estables de flujo lineal oscilante sobre una superficie de cultivo. Se diseñó con el programa FreeCAD³³⁰ un sistema de contenedor estanco que permite crear mediante balanceo un flujo oscilante controlado sobre una superficie de cultivo celular extraíble. El contenedor consta de dos piezas: un recipiente preparado para la colocación exacta de un portaobjetos quedando este fijado en el fondo y una cubierta a modo de cierre que sella el recipiente y el portaobjetos creando un canal delimitado sobre el mismo y dos cavidades en los extremos que permiten el almacenamiento del medio de cultivo (Fig. 18). El movimiento de balanceo oscilante permite la circulación del medio creando un flujo dirigido en dirección longitudinal a lo largo del canal, sometiendo así a la superficie de cultivo a un flujo bien definido.

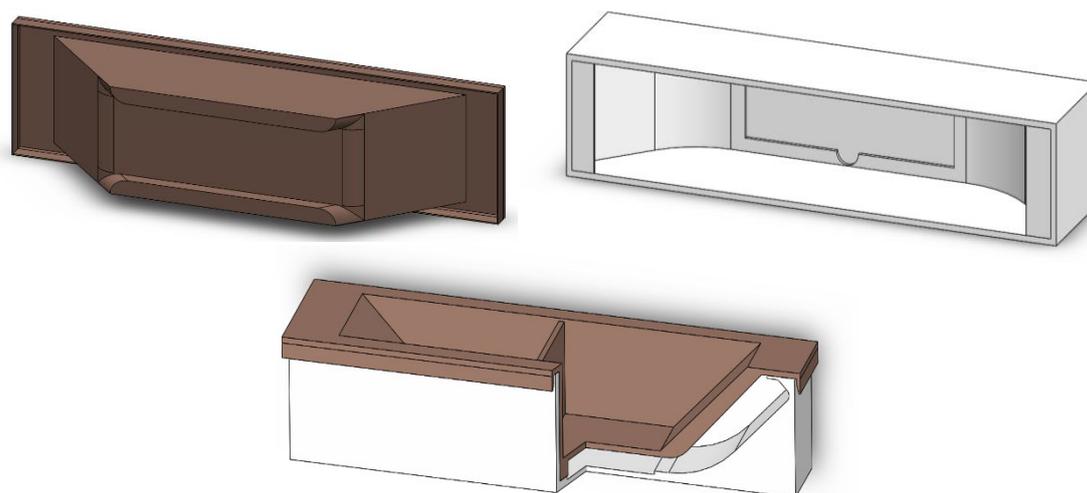


Figura 18. Esquema del dispositivo de cultivo para establecer un flujo oscilante controlado. Vista lateral de los dos componentes (arriba) y aspecto del dispositivo completo listo para comenzar el experimento (abajo).

En la Fig. 19 se puede apreciar en plano de sección el canal de flujo y reservorios (marcados en rosa) y el emplazamiento del portaobjetos sobre el que se realiza el cultivo celular (marcado en morado). La geometría de la pieza dirige el medio para crear un flujo lineal y no turbulento a lo largo del canal inferior de 25mm de anchura x 5 mm de altura. A su vez se establece un volumen máximo de medio de 30 ml y un mínimo de 25 ml para evitar el vaciado del canal. Este dispositivo permite un ángulo máximo de inclinación de 13 grados.

El dispositivo permite obtener un grado de flujo (q) variable en función del ángulo de inclinación y la velocidad de balanceo cuya aproximación se obtiene a partir de la siguiente fórmula:

$$q \text{ (Pa)} = 0.0417 * \sin(\alpha) T$$

$$T = \text{Velocidad de balanceo (rpm)} \quad \alpha = \text{Ángulo de inclinación máxima}$$

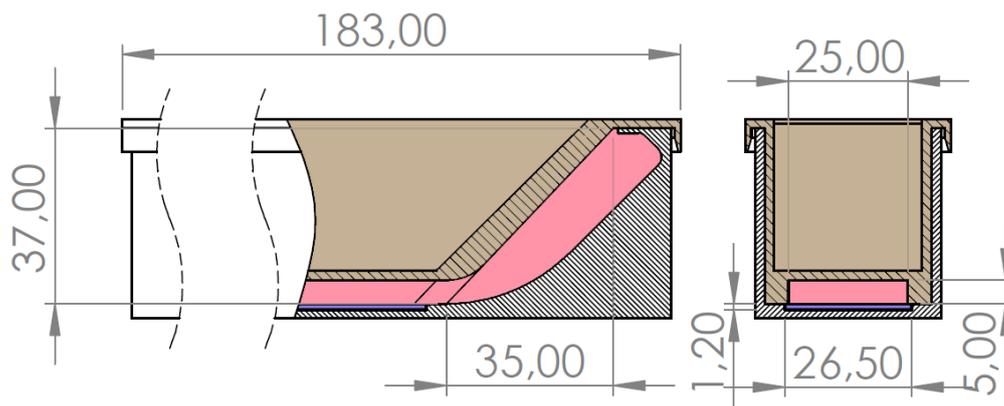


Figura 19. Secciones laterales y frontales del dispositivo de cultivo para control del flujo oscilante donde se observa el canal de flujo y los reservorios de medio marcados en rosa, y el rebaje para fijar el portaobjetos en morado

Después de varias pruebas empíricas, se establece un balanceo óptimo de 5 grados de inclinación a 10 rpm para la obtención de un estrés de cizalla con un flujo medio de 0,363 dyn/cm².

Caracterización de la toxicidad de los plásticos empleados para construir el dispositivo

El dispositivo de flujo oscilante se construyó mediante impresión 3D en una impresora Raise3D (UP3D, Brasil), utilizando distintos plásticos de impresión de modelado por deposición fundida (FDM), que incluían: PET-G (Polietileno-glicol), PLA (Acido poli láctico), ABS (Acetil Buteno Estireno) y ABS de grado médico. Para comprobar la idoneidad de estos materiales se realizó un ensayo de citotoxicidad en células R28 con los diferentes materiales de impresión. Cada prueba tuvo lugar mediante la exposición de un cultivo celular en confluencia sobre un portaobjetos una probeta impresa inmersa en el medio. La exposición se realizó en placas de 100 mm con una probeta que asegura su inmersión en el medio sin contacto con el cultivo alojando el portaobjetos en su parte central (Fig. 20).

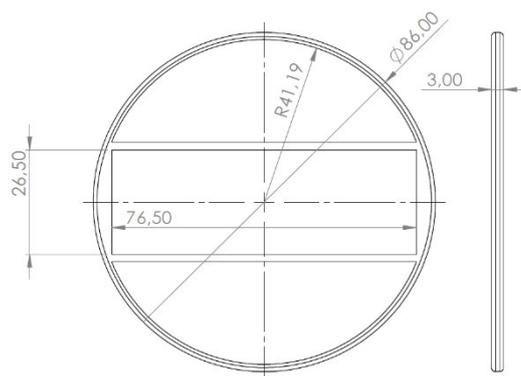


Figura 20: Croquis de probeta para ensayo de citotoxicidad

Experimentos de flujo en el dispositivo de flujo oscilante

Para evaluar la funcionalidad del dispositivo, se crecieron células R28 en portaobjetos de la manera ya descrita y se comenzó a evaluar su respuesta a flujo oscilante dentro del dispositivo. En primer lugar, fue necesario realizar un lavado del dispositivo con agua y jabón y una esterilización con etanol 70% seguida de 20 minutos bajo luz ultravioleta por cada lado en la campana de cultivo celular para minimizar el riesgo de contaminaciones. Posteriormente se realizaron tres lavados en PBS para arrastrar posibles residuos que quedasen como consecuencia de la impresión y se llenó el dispositivo con 25 mL del medio de crecimiento de las células. Se colocó cuidadosamente el portaobjetos en su emplazamiento asegurando su fijación y se puso la tapa desde un lateral hacia el otro de forma que no quedasen burbujas que perturbasen o levantasen la monocapa.

Una vez montado el dispositivo se instaló en el balancín, que se configuró como se ha descrito en los apartados anteriores y se dejó oscilando durante 1 hora, momento en el que se recogieron las células en Trizol y se congelaron a -80°C hasta su procesamiento. Se realizaron duplicados del experimento dejando 2 dispositivos en el balancín y otros 2 estáticos que sirviesen como control sin flujo.

1.2. LÍNEA CELULAR 3T3-L1

Las células 3T3-L1 son preadipocitos de ratón, que se obtuvieron de la ATCC (Manassas, VA, USA). Estas células se utilizaron para probar la respuesta *in vitro* de los adipocitos a la molécula zr17-2. Como los adipocitos no tienen la capacidad de amplificarse, las células 3T3-L1 se encuentran en un estado de preadipocito que, a través de la inducción con insulina, 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX) y dexametasona (entre otros componentes), se diferencian hasta adipocitos maduros³³¹.

Mientras se encontraban como preadipocitos, las células se crecieron en el medio de crecimiento de preadipocitos 3T3-L1 (Zen-Bio, ref. PM-1-L1), en una atmósfera con 5% CO₂, humedad del 85% y a 37°C; y nunca se dejaba superar el 80% de confluencia del cultivo.

1.2.1. DIFERENCIACIÓN DE LOS PREADIPOCITOS A ADIPOCITOS MADUROS

Se continuó con las mismas condiciones de crecimiento descritas anteriormente hasta conseguir el número de células adecuado para el experimento. En ese momento se distribuyeron en placas de 35 mm con densidades de 80.000 células por placa u 8.500 células por pocillo para su crecimiento y posterior diferenciación (Fig. 21.A). Una vez que las células alcanzaron el 100% de confluencia, se mantuvieron 48 horas, tras las que se indujo la diferenciación siguiendo el protocolo de diferenciación recomendado por la compañía Zen-Bio (Fig. 21.B), es decir 3 días en presencia de medio de diferenciación (medio de cultivo DM-2, Zen-Bio) tras los que se empezaba a sustituir con medio de adipocitos (medio de cultivo AM-1-L1, Zen-Bio). En el medio de diferenciación y de adipocitos de las placas tratadas con la SM, se añadió zr17-2 para alcanzar una concentración final de 10 µM, que se mantuvo durante el resto del experimento.

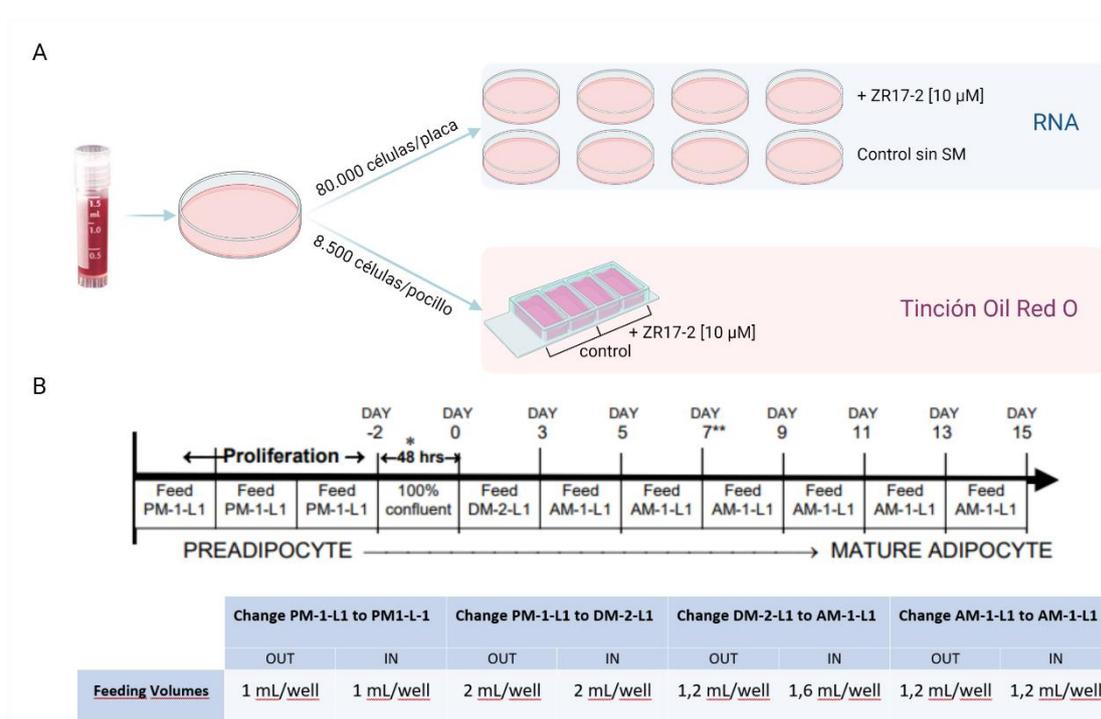


Figura 21. Flujo de trabajo para el crecimiento (A) y la diferenciación (B) de preadipocitos hasta adipocitos maduros con los volúmenes de cambio de medio correspondientes (creada con BioRender).

Finalmente, trascurrido el tiempo recomendado por la casa comercial, se consideró que el proceso de diferenciación a adipocitos maduros había concluido, y se procesaron las células

bien para su tinción con Oil Red O, o bien fueron recogidas en Trizol y congeladas a -80°C para su conservación hasta el momento de extraer el RNA.

2. EXPERIMENTOS IN VIVO

Todos los procedimientos que involucraron animales se llevaron a cabo de acuerdo con la Directiva del Consejo de la Unión Europea (2010/63/UE), y legislación española (RD53/2013) sobre experimentación con animales, y con la aprobación del comité de uso ético de animales del CIBIR (Órgano Encargado del Bienestar Animal del Centro de Investigación Biomédica de La Rioja, OEBA-CIBIR).

2.1. PRUEBA PILOTO EN RATAS

Para comprobar que zr17-2 era capaz de modular la expresión de CIRP en un organismo complejo se realizó una pequeña prueba piloto en dos ratas macho. A la rata tratada se le inyectaron 20 nmol/Kg de la SM mientras que al control se le inyectó el mismo volumen de suero fisiológico. A los 4 días se sacrificaron los animales y se extrajeron muestras de multitud de órganos, entre los que se incluyen pulmón, riñón, retina, corteza, cerebelo, grasa, testículo, hígado, corazón, músculo, colon y páncreas. Las muestras se conservaron a -80°C hasta su posterior utilización.

2.2. MODELO ANIMAL

2.2.1. RATONES EXPERIMENTALES

Los experimentos con modelos animales se comenzaron a realizar en ratones C57BL/6, mantenidos en las condiciones estándar del animalario del Centro de Investigaciones Biomédicas de La Rioja (CIBIR) en cuanto a humedad, luz, temperatura, dieta y estabularización hasta el momento del sacrificio. Posteriormente, dado que la temperatura habitual del animalario estaba por debajo de la normotermia murina (22°C frente a los 30°C que se considera la óptima para ratones), se realizó un ensayo piloto modificando este parámetro como está explicado más adelante.

Tratamiento con zr17-2 y evaluación del efecto a distintos tiempos.

La respuesta ante un tratamiento en un organismo complejo puede verse modificada respecto a lo observado en líneas celulares, que es un sistema mucho más simple. Por tanto, lo primero que se hizo fue un ensayo piloto para evaluar el efecto de la molécula zr17-2 (20

nmol/Kg) disuelta en suero fisiológico en los ratones a 1, 2, 3 y 4 días tras tratarlos con la SM y comparándolos con los ratones control (tratados con vehículo).

Para ello se utilizaron 15 ratones macho C57BL/6 de 9 semanas obtenidos de Charles River que se dividieron en grupos de 3 animales y 5 condiciones experimentales:

- 1) Grupo 1: sacrificados 1 día tras inoculación de SM
- 2) Grupo 2: sacrificados 2 días tras inoculación de SM
- 3) Grupo 3: sacrificados 3 días tras inoculación de SM
- 4) Grupo 4: sacrificados 4 días tras inoculación de SM
- 5) Grupo control: sin SM, inoculación de vehículo (suero fisiológico)

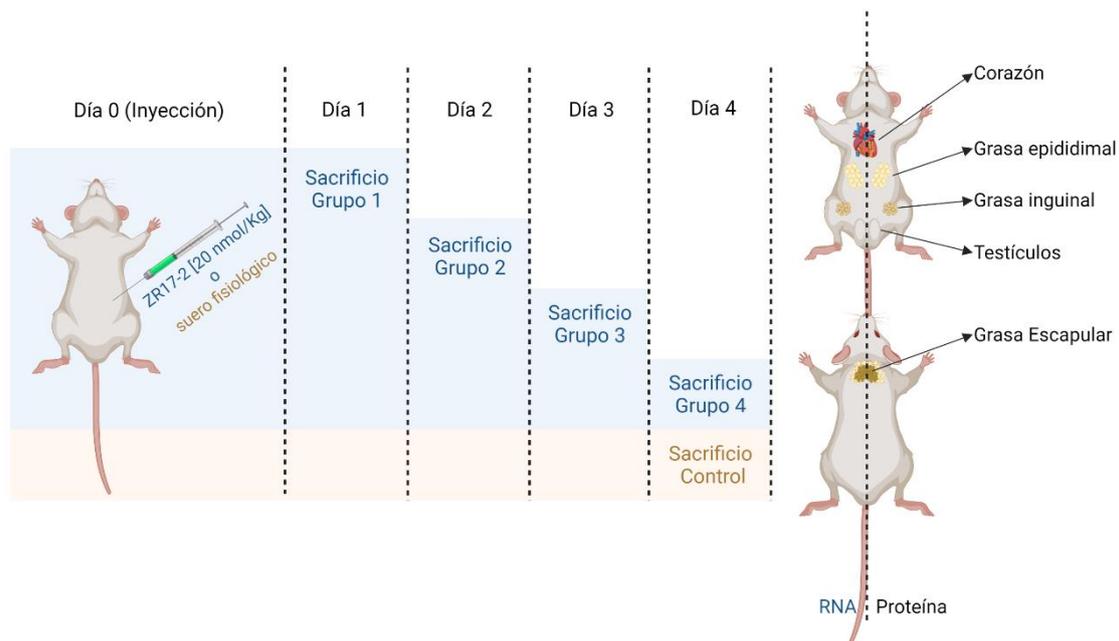


Figura 22. Esquema del tratamiento y obtención de muestras de ratones a distintos tiempos desde la inoculación de zr17-2 (Imagen creada con BioRender)

El día 0 se inyectó intraperitonealmente 20 nmol/Kg de zr17-2, con suero fisiológico como vehículo, a todos los grupos de animales menos al control, al cual se inyectó el volumen correspondiente de suero fisiológico. Tras 24 horas se sacrificaron los 3 primeros ratones con anestesia letal y se les extrajo el corazón, los testículos, la grasa escapular, la inguinal y la epididimal. Todas las muestras se dividieron en dos tubos, que posteriormente se procesarían para extraer el RNA y las proteínas, y se congelaron *in situ* en nitrógeno líquido antes de guardarlas hasta el momento del procesamiento a -80°C . El mismo procedimiento se realizó a los 2, 3 y 4 días, momento en el que se sacrificaron también los ratones del grupo control (Fig. 22).

Tratamiento con zr17-2 en termoneutralidad.

Ya que los ratones mantenidos a 22°C (la temperatura estándar de los animalarios) se encuentran en un estado de hipotermia regulada³³², se decidió realizar otro ensayo piloto en condiciones de termoneutralidad murina (30°C).

Se obtuvieron 12 ratones macho C57BL/6 de Charles River que se distribuyeron en 4 grupos:

- 1) Control de temperatura normal del animalario (22°C), sin SM
- 2) Control de termoneutralidad (30°C), sin SM
- 3) Dosis única de SM en termoneutralidad (30°C)
- 4) Dosis repetida (dos dosis) de SM en termoneutralidad (30°C)

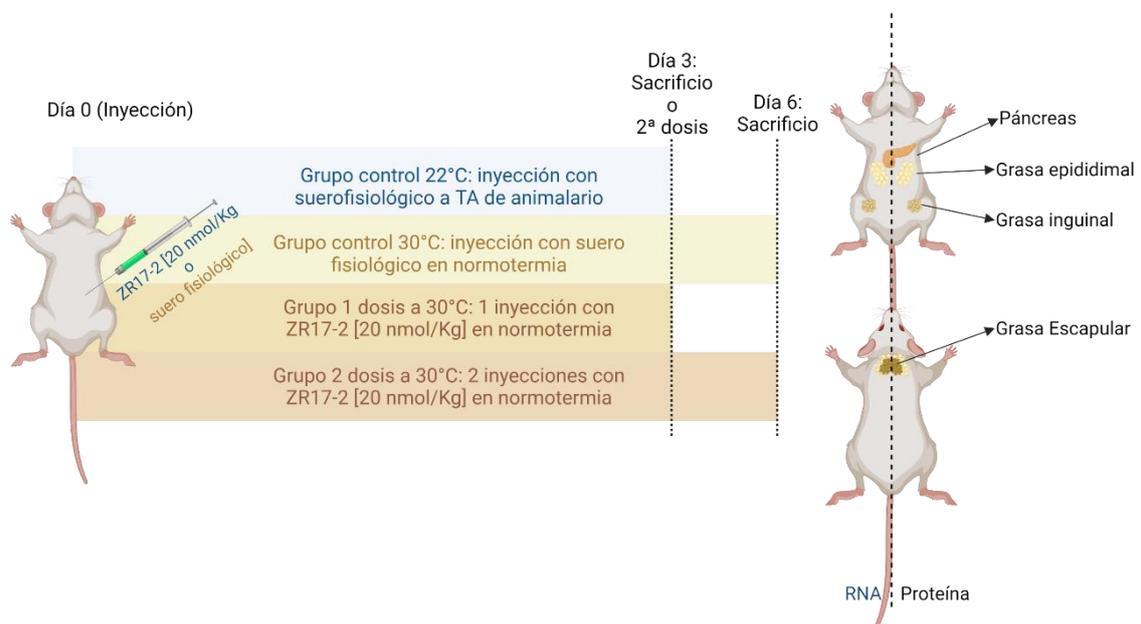


Figura 23. Esquema del experimento de ratones en termoneutralidad (Imagen grada con BioRender)

De la misma forma que en el ensayo anterior, se inyectó zr17-2 el día 0 en los grupos 3 y 4, y el volumen correspondiente de vehículo para los grupos 1 y 2. A los 3 días se sacrificaron los animales del grupo 1 y 3 y se inyectó de nuevo suero fisiológico o SM a los grupos 2 y 4 respectivamente, que esperarían otros 3 días antes de ser sacrificados. Se recogieron muestras de grasa inguinal, epididimal, escapular y páncreas, que se dividieron en dos y se congelaron siguiendo el procedimiento ya descrito en el apartado anterior (Fig. 23).

2.2.2. RATAS EXPERIMENTALES

Ensayo piloto con distintas cepas de rata

Una vez que se decidió que el modelo animal más adecuado para continuar los experimentos de obesidad inducida por dieta alta en grasas (DIO, por sus siglas en inglés "diet induced obesity") era la rata, se procedió a realizar un ensayo piloto. En él se evaluaron 12 ratas de 6 semanas de edad y de 3 cepas distintas, Wistar-Hanover IGS, Long-Evans y Fischer F344, para averiguar cuál se adecuaba mejor a nuestras condiciones experimentales.

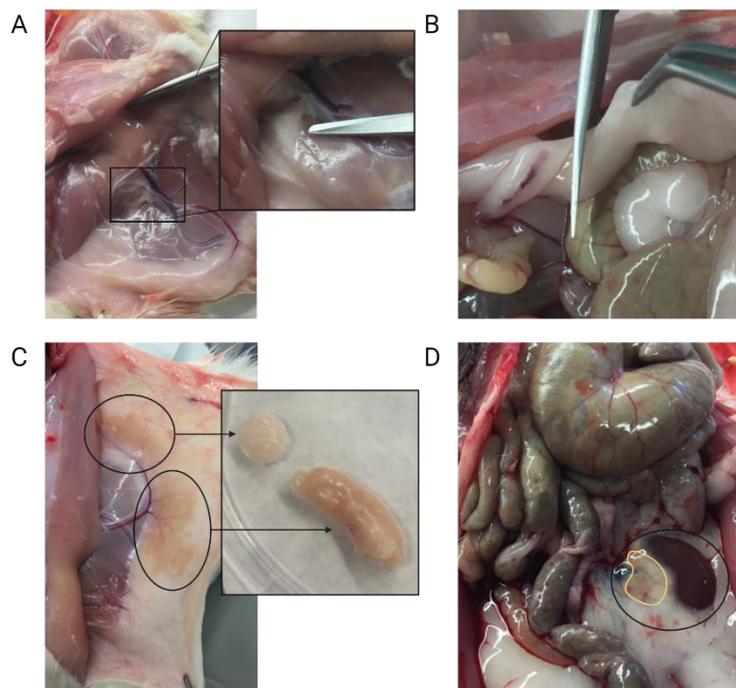


Figura 24. Criterio de obtención de tejidos de grasa. La grasa femoral (A) se identificó como el pequeño depósito de tejido adiposo que aparece entre la inserción de la cabeza del fémur y el peritoneo abdominal. La grasa epididimal se seccionó por encima del vaso sanguíneo espermático (B). La grasa inguinal de la zona de la rodilla presentaba dos depósitos de tejido adiposo más pardificado (C), que se individualizaron según se muestra en la figura. Por último, se observó que la grasa perirrenal presentaba una zona cerca del hilio renal más pardificada pero que no era fácilmente divisible de la grasa blanca, por tanto, se extrajo todo el conjunto.

A su llegada desde Envigo, se procedió a distribuir las ratas por parejas y por cepas, y 4 semanas antes de empezar el tratamiento se realizaron 2 sesiones semanales de aclimatación al procedimiento para disminuir el posible estrés derivado de la manipulación de los animales. El tratamiento se inició cuando las ratas tenían 12 semanas y, de forma similar a lo descrito en los ratones, se inyectaron intraperitonealmente 40 nmol/Kg de zr17-2 a una de las dos ratas de cada cubeta mientras que a la otra se le administró el equivalente de suero fisiológico.

El sacrificio de los animales se realizó 4 días después, tomando muestras de páncreas, hígado, grasa inguinal femoral, grasa inguinal de la zona de la rodilla, grasa epididimal, grasa escapular que se dividió en parda y blanca y, por último, páncreas (Fig. 24). Todas las muestras se congelaron siguiendo el protocolo habitual excepto el páncreas, del que se congeló la parte destinada a la extracción de RNA pero la parte de proteína se homogenizó en fresco en 1 mL de buffer de lisis RIPA de Pierce (Themos Scientific, ref. 89901) para evitar la proteólisis.

2.2.3. EXPERIMENTO PILOTO DE TRATAMIENTO A MEDIO PLAZO Y SU EFECTO EN LOS NIVELES DE GLUCOSA E INSULINA

La cepa seleccionada para realizar los experimentos posteriores fue finalmente la cepa Wistar-Hanover. Sin embargo, antes de continuar con el experimento de la DIO, se quiso estudiar el efecto a medio plazo de la molécula descartar toxicidad antes del experimento final de larga duración. Para ello se dividieron 12 ratas Wistar Hanover de 12 semanas en 2 grupos experimentales: uno tratado con 40 nmoles/Kg de zr17-2 y otro control al que se administró la misma cantidad de vehículo. El tratamiento se administró dos veces por semana durante 11 semanas (Fig. 25).

Tras 8 semanas de tratamiento se realizó un test de resistencia (IRT) a la insulina a los animales (Fig. 25). El día de la prueba se retiró el alimento de los animales 6 horas antes y se inyectó 1 U/Kg de insulina ultrarrápida Humulina (Lilly, ref. 710008.9). Los niveles de glucosa se determinaron con las tiras FreeStyle Optium (Abbot, ref. 252346.3) antes de la inyección de insulina y a los 15, 30, 45, 60, 90 y 120 minutos después. A los animales cuyos niveles de glucosa no comenzaron a mostrar señales de recuperación a los 120 minutos se les administró una inyección de suero glucosado al 5% como medida paliativa para reducir, evitar y aliviar sufrimiento.

A las 10 semanas de ensayo se realizó un test de tolerancia a la glucosa intraperitoneal (IPGTT) a las ratas (Fig. 25). Al igual que en el IRT, se mantuvieron a los animales en ayuno durante 6 horas antes de determinar los niveles de glucosa basales con las tiras FreeStyle Optium (Abbot, ref. 252346.3). Posteriormente se les administró una inyección intraperitoneal de 2 g/Kg de glucosa y se midieron de nuevo los niveles de glucosa a los 15, 30, 45 y 90 minutos.

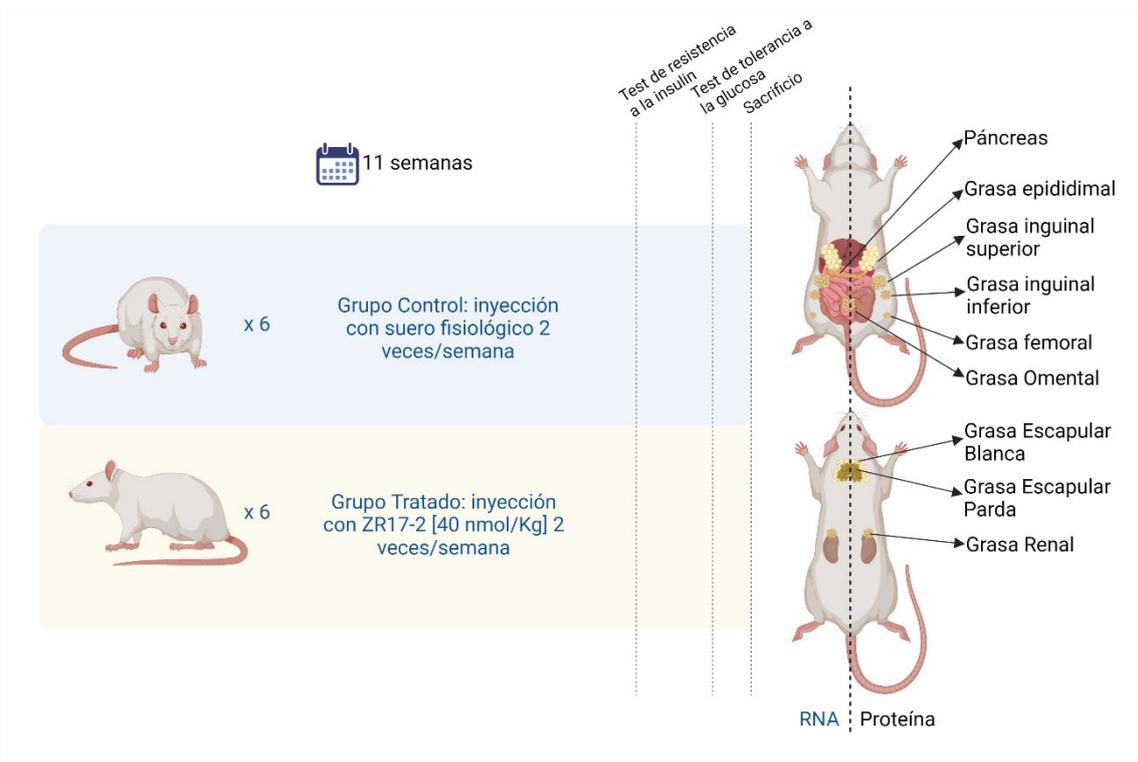


Figura 25. Esquema del experimento piloto de tratamiento a medio plazo y su efecto en los niveles de glucosa e insulina.

Finalmente, a las 23 semanas se sacrificaron los 12 animales y se les extrajo el páncreas, la grasa inguinal dividida en zona superior (hacia la ingle) y zona inferior (hacia la rodilla), la grasa escapular distinguiendo entre escapular blanca y escapular parda, la grasa epididimal, la grasa omental y la grasa renal. Las muestras se congelaron inmediatamente en N(l) para conservarse posteriormente a -80°C hasta el momento de su procesamiento.

Experimentos de obesidad inducida por dieta alta en grasas (DIO)

Para el experimento de obesidad inducida por dieta se adquirieron 34 ratas Wistar Hanover de 35-41 días de edad desde Envigo. Tras una semana de aclimatación, se procedió a realizar el cambio de pienso normal del animalario por un pienso alto en grasa (Research Diets, ref. D12451) en los grupos DIO durante otra semana, de forma que se pudiesen identificar y eliminar del ensayo a las ratas resistentes a DIO^{333,334}. Una vez establecidos los 4 grupos experimentales con 6 animales cada uno, se comenzó el procedimiento (Fig. 26).

Se inocularon dos inyecciones semanales a cada animal por vía intraperitoneal, bien con suero fisiológico o bien con zr17-2 a una concentración de 40 nmoles/Kg, según se muestra en la Fig. 26. Además, los grupos DIO recibían el pienso alto en grasas mientras que los grupos control fueron alimentados con el pienso control (Research Diets, ref. D12450H), con

menos grasa, pero con el mismo aporte calórico de sacarosa (17%). Los animales disponían del alimento libremente, condición que se mantuvo durante el resto del experimento a excepción del momento de la realización del test de tolerancia a la glucosa. Se realizó un registro del peso de los animales dos veces por semana, justo antes de administrar el tratamiento.

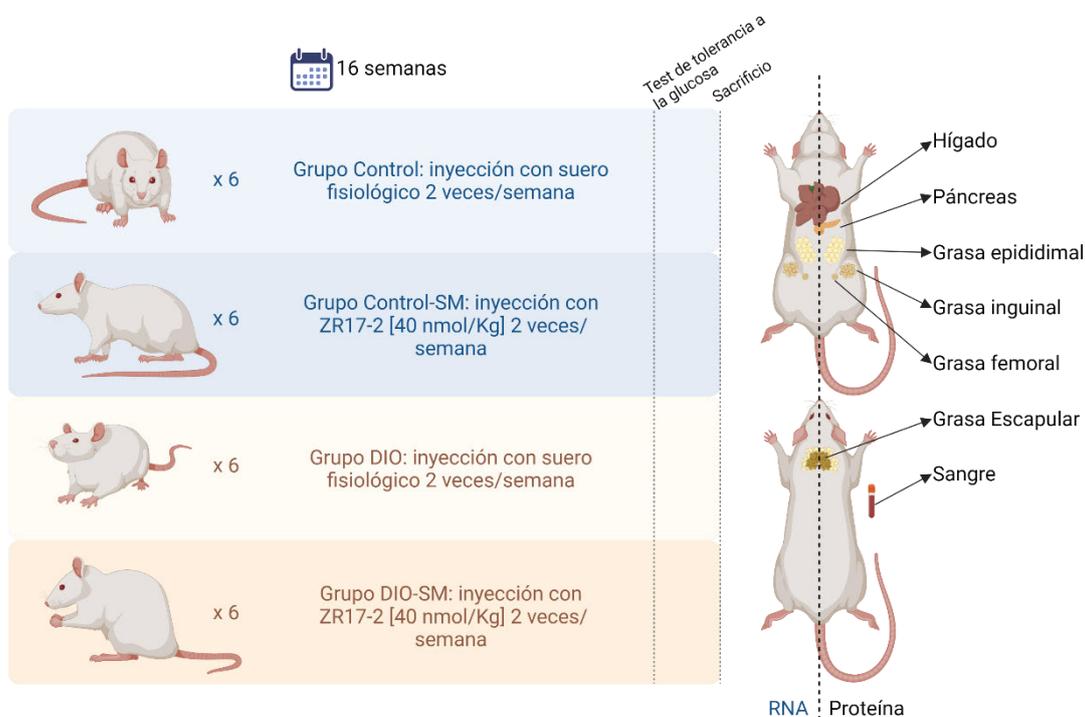


Figura 26. Planificación del ensayo DIO y obtención de muestras (Creado con BioRender).

A las 14 semanas desde el cambio de dieta se realizó un test de tolerancia a la glucosa a todos los grupos. Los animales se sometieron a ayuno durante 6 horas. Durante el ensayo, los niveles de glucosa se determinaron con las tiras FreeStyle Optium (Abbot, ref. 252346.3), antes y a los 15, 30, 60 y 120 minutos después de una inyección intraperitoneal de glucosa de 2 g/Kg.

Los animales se sacrificaron en la semana 16, siguiendo el mismo procedimiento descrito anteriormente. Como se muestra en la Fig. 26, se tomaron muestras de sangre, hígado, páncreas, grasa epididimal, inguinal, femoral y escapular, que se congelaron *in situ* en nitrógeno líquido para su posterior procesamiento.

3. ENSAYOS CON CULTIVOS PRIMARIOS HUMANOS

3.1.1. AISLAMIENTO Y CULTIVO DE PREADIPOCITOS

La molécula zr17-2 está diseñada frente a la proteína CIRP humana y, pese a ser una proteína muy conservada entre especies, se quiso probar también los efectos de la SM en tejido humano. Para ello se aislaron preadipocitos de la fracción del estroma vascular (FEV) de grasas viscerales procedentes de cirugías renales (Tabla 5), obtenidas gracias a la colaboración del Dr. Carlos Sancho Serrano, del Departamento de Cirugía del Hospital San Pedro. Todas las muestras se obtuvieron mediante consentimiento informado y siguiendo todos los principios de los acuerdos de Helsinki. El estudio fue aprobado por el Comité de Ética de Investigación con medicamentos de La Rioja (CEImLAR, expediente P.I. 488)

Tabla 5. Datos de obtención de las muestras de grasa humana de las que se obtuvieron las células de la FEV

	SEXO	EDAD	CAUSA DE INTERVENCIÓN	TIPO DE INTERVENCIÓN	TIPO DE MUESTRAS
Paciente 1	♀	61	Masa renal derecha (posible Hipernefroma)		grasa perirrenal
Paciente 2	♂	55	Insuficiencia renal terminal, en hemodiálisis por poliquistosis renal.	Nefrectomía simple por atrofia renal por poliquistosis	grasa perirrenal + grasa hilio renal
Paciente 3	♀	68	Riñón izquierdo atrófico por obstrucción por TM vesical.	Nefroureterectomía Izquierda	grasa perirrenal + grasa hilio renal

Tras la recepción de la muestra recién extraída, se procedió a triturar el tejido minuciosamente con tijeras y bisturí en la campana de cultivo celular. Inmediatamente se realizó el aislamiento con el kit de Aislamiento de Preadipocitos (Abcam, ref. ab196988) siguiendo el protocolo establecido en el mismo. Los preadipocitos humanos (hPA) obtenidos se incubaron en el mismo medio de crecimiento de preadipocitos descrito anteriormente y en las mismas condiciones. Por último, se amplificaron hasta un máximo de

3 pases antes de empezar la diferenciación, sin dejar que superasen el 80% de confluencia, y cambiando la mitad del medio cada dos días con medio fresco.

3.1.2. TRATAMIENTO Y DIFERENCIACIÓN A ADIPOCITOS MADUROS

En el tercer pase desde el aislamiento de los preadipocitos, se realizó el cultivo de las células en placas individualizadas de 35 mm tratadas para favorecer la adhesión celular (Corning, ref. 15430165). Para cada tejido se cultivaron 18 placas, que se distribuyeron en un grupo control y otro con tratamiento, con triplicados para cada análisis según fuese de RNA, de proteína o de imagen (Fig. 27).

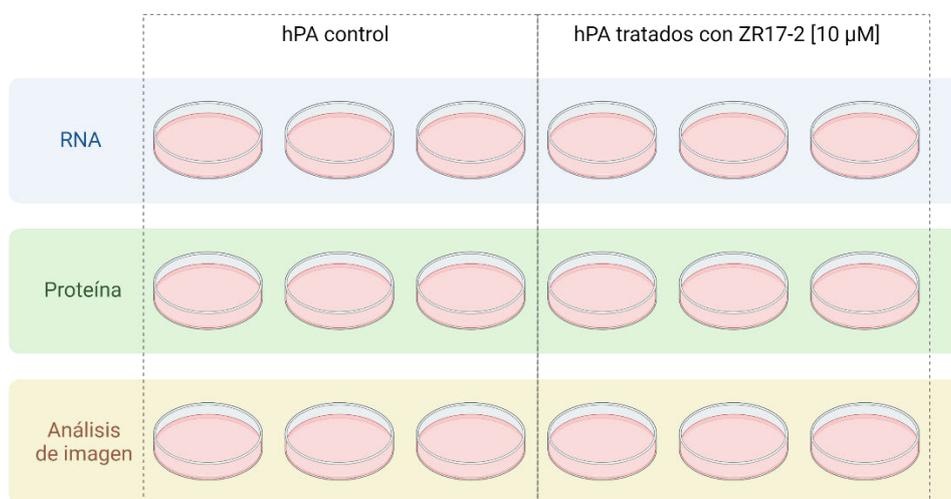


Figura 27. Esquema de la distribución de placas de hPA para cada paciente y tejido (Creada con BioRender)

Se continuó con las mismas condiciones de crecimiento descritas anteriormente hasta que las células alcanzaron el 100% de confluencia, momento en el que se comenzó la diferenciación siguiendo el mismo protocolo de diferenciación de las células 3T3-L1 recomendado por Zen-Bio (Fig. 21.B).

Tras 48 horas con una confluencia 100% se retiró todo el medio de preadipocitos y se sustituyó por 2 mL de medio de diferenciación (DM-2), en el que se disolvió la molécula zr17-2 a una concentración final de 10 µM en el caso de las placas destinadas al tratamiento. Se mantuvo el cultivo en medio de diferenciación durante 3 días, momento en el que comenzó el cambio progresivo del medio de diferenciación al de adipocitos (AM-1-L1). Además, en cada cambio de medio se añadía nuevamente la SM para mantener una concentración de 10 µM.

Finalmente, 15 días después del cambio al medio de diferenciación, se consideró que el proceso de diferenciación a adipocitos maduros había concluido y se procesaron las células

bien para imagen, o bien por fijación o recogidas en distintos buffers para aplicar las técnicas descritas en los apartados posteriores.

4. TÉCNICAS GENERALES

4.1. WESTERN BLOTTING

4.1.1. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS

La extracción de proteínas de las distintas muestras se realizó con el buffer de lisis celular M-Per en el caso de los cultivos celulares, o con RIPA (Thermo Scientific, ref. 89901) y el dispositivo dispersor Ultra-Turrax de IKA (Staufen, Alemania) en el caso de los tejidos animales. En ambos buffers se añadieron inhibidores de proteasas cOmplete y se trabajó en hielo picado para evitar la degradación de las proteínas en las muestras.

Tras la lisis, se centrifugaron las muestras a 12.000 xg durante 10 minutos en la ultracentrífuga (Eppendorf SE, ref. 5418) previamente enfriada a 4°C. Se recuperó el sobrenadante y se alicuotaron las muestras para evitar ciclos de congelación y descongelación que pudiesen degradar las proteínas. Por último, se realizó la cuantificación mediante el kit BCA Protein Assay de Thermo Scientific (Rockford, EEUU) utilizando una curva estándar de seroalbúmina bovina (BSA).

4.1.2. ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA EN CONDICIONES DESNATURALIZANTES

Para la electroforesis se tomaron 30 µg de proteína total de cada extracto de líneas celulares y tejidos o 20 µg de las muestras de hPA. A cada muestra se le añadió el agente reductor de NuPAGE 10x (Thermo Fischer Scientific, ref. NP0009) que contiene ditioneol (DTT), buffer de carga 4x (Invitrogen, ref. NP0007), y agua hasta completar el volumen de carga. Posteriormente se finalizó la desnaturalización de las proteínas calentando la mezcla a 70°C durante 10 minutos.

La electroforesis se realizó en el buffer ácido 3-(mofolin-4-il) propano-1-sulfónico (MOPS) durante 1,5 horas a 120 V, en un gel de poliacrilamida NuPAGE 4-12% Bis-Tris (Life Technologies, ref. NP0321BOX) y utilizando como marcador de peso molecular Seebblue plus 2 Prestained Standards (Invitrogen, ref. LC5925). Las proteínas, una vez separadas en el gel, se transfirieron a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) por transferencia seca con el equipo iBlot 2 de ThermoFisher Scientific y el kit iBlot Gel transfer Stacks PVDF Mini (Invitrogen, ref. IB24002), con un voltaje de 20 V durante 6 minutos.

Una vez transferidas las proteínas a la membrana se realizó el bloqueo con leche desnatada en polvo (Central Lechera Asturiana) al 5% en TBS durante 1 hora en agitación. Posteriormente, las membranas se incubaron durante 16h en agitación a 4°C con el anticuerpo primario (Tabla 4) diluido en leche al 5% en TBS con Tween20 al 0,1% (TBS-T).

Tabla 6. Anticuerpos primarios utilizados en Western-blot

	Casa comercial	Referencia	Dilución
CIRP (m)	Proteintech	60025-2-Ig	1/500
CIRP (r)	Proteintech	10209-2-AP	1/10.000
CIRP (r)	Ribonomics	RN032P	1/1.000
CIRP (g)	Abcam	Ab106230	1/1.000
CIRP recombinante (r)	Abcam	Ab246510	1/2.000
CIRP recombinante humano (r)	Abcam	Ab191885	1/1.000
RBM3 recombinante (r)	Abcam	Ab134946	1/1.000
β -actina (m)	Sigma-Aldrich	A5441	1/15.000
GAPDH (m)	Santa Cruz Biotechnology	Sc-32233	1/10.000
AKT total (r)	Cell Signaling	4691	1/2.000
β -tubulina (m)	Sigma	T4026	1/10.000

Anticuerpo producido en ratón (m), conejo (r), o cabra (g).

Tras el anticuerpo primario se realizaron 3 lavados de 10 minutos en TBS-T en agitación antes de añadir el anticuerpo secundario conjugado con HRP de cabra anti- IgG de conejo (Cell signaling, ref. 7074) diluido 1/10.000, o el de burro anti- IgG de ratón (Jackson Immunoresearch, ref. 715-035-151) diluido 1/30.000. Se incubaron 1 hora en agitación a temperatura ambiente (TA) tras lo cual se realizaron otros 3 lavados más un último lavado en TBS de 10 minutos.

Detección y revelado

A continuación, se añadió el líquido quimioluminiscente Amersham ECL Prime (GE Healthcare, ref. RPN2236) que se incubó durante 5 minutos a TA en agitación y se procedió al revelado, bien por exposición en las películas Amersham Hyperfilm ECL (GE Healthcare, ref. 28906837) o con ayuda del sistema de imagen ChemiDoc MP de Bio-Rad.

Cuando fue necesario, se utilizó el tampón de lavado de inmunotransferencia Restore Plus (Thermo Fisher Scientific, ref. 46430) durante 10 minutos en agitación a TA, se lavó en TBS-T y se bloqueó de nuevo según las condiciones ya descritas. Después se añadió el anticuerpo primario de la proteína control de carga (*housekeeping*) que, según la muestra, podía ser β -actina, GAPDH, AKT o β -tubulina (Tabla 6).

Los resultados se analizaron mediante densitometría con el programa Fiji³³⁵ (ImageJ) en el caso de las películas radiográficas o con el software Image Lab de Bio-Rad en el caso de las imágenes obtenidas en el ChemiDoc MP.

4.2. EXPRESIÓN GÉNICA MEDIANTE QPCR

Extracción de RNA

Antes de poder analizar la expresión de los genes se extrajo y purificó el RNA de las muestras congeladas y conservadas en Trizol. Siempre que fue posible, y mientras el protocolo no indicase lo contrario, se trabajó a 4°C o en hielo picado. En el caso de los tejidos fue necesario añadir previamente 1 mL de Trizol, triturar con el dispositivo dispersor Ultra-Turrax para homogenizar la muestra y centrifugar 10 minutos a 4.000 xg antes de continuar (Fig. 28).

Para retirar restos celulares del Trizol se realizó una centrifugación de 10 minutos a 12.000 xg y se recuperó el sobrenadante que se pasó a un tubo nuevo. En el caso de los tejidos grasos, se extrajo el sobrenadante con una jeringuilla de insulina, intentando no perturbar la capa de lípidos que se formaba encima. A continuación, se añadieron 200 μ L de cloroformo por cada mL de Trizol, se agitó el tubo durante 15 segundos y se incubó durante 3 minutos a TA. Para terminar de separar la fase orgánica del mRNA, se realizó una centrifugación de 15 minutos a 12.000 xg. La fase acuosa, que contiene el RNA, se pasó a un nuevo tubo al que se le añadió el mismo volumen de etanol 100%, de forma que alcanzase un volumen de etanol de al menos un 35%, necesario para la precipitación del mRNA. Inmediatamente después, la fase acuosa se transfirió a las columnas de purificación del kit RNeasy Micro (Qiagen, ref. 74004), en el caso de las muestras de flujo y hPA, o Mini (Qiagen, ref. 74104) para todas las demás muestras, y se siguió el protocolo recomendado por el fabricante (Fig. 28).

La elución del RNA de la columna se hizo en 30 μ L o 14 μ L, según fuese el kit Mini o Micro respectivamente, de agua libre de RNAsas facilitada en el kit. Finalmente, el RNA purificado se cuantificó espectrofotométricamente con el nanodrop ND-1000 midiendo su absorbancia a 260 nm y 280 nm.

Retrotranscripción (RT)

Para la RT se utilizó el kit Superscript Vilo (Life Technologies, ref. 11754050) y se retrotranscribió la máxima cantidad de RNA por experimento siguiendo las instrucciones del fabricante. El programa utilizado consistió en 10 minutos a 25°C, seguido de 120 minutos a 42°C, 5 minutos a 85°C y un último paso a 4°C y se aplicó en un termociclador GeneAmp PCR system 9700 (Applied Biosystems). El cDNA obtenido se guardó a -20°C (Fig. 28).

qPCR

La reacción de PCR en tiempo real para cada muestra se preparó en un volumen final de 20 µl con una mezcla de reacción que contenía 2 µl de cDNA, 0,5 µL de la premezcla de primers (a una concentración de 10 µM) listados en la Tabla 7, 10 µl de Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, ref. 436808) y 7,5 µl de agua (Fig. 28). En cada experimento se incluyó un control negativo, que contenía todos los componentes de la reacción excepto el cDNA, y cada muestra fue analizada por triplicado.

Tabla 7. Lista de primers utilizados en experimentos de qPCR

	Especie	Primer Forward	Primer Reverse	Banda (pb)
PRDM16	Humano	GATGCCGACTTTTGGGAAGG	GTGTGGAGAGGAGTGTCTTCG	180
PRDM16	Rata, ratón	CCACACAGAAGAGCGTGAGTACAA	TGTGAACACCTTGACGCAGTTT	136
CIRP	Rata	AGACTACTATGCCAGCCGGA	AGCTGTCTCTGTAGGACCCA	74
CIRP	Humano	TCAGACAACCGATCCCGTG	CACTCCTGGACTCGAACCG	142
CIDEA	Humano	AGACCTTGGGAGACAACACG	GACTCTCGCTATTCCCGACC	77
CIDEA	Ratón	TGCTCTTCTGTATCGCCAGT	GCCGTGTTAAGGAATCTGCTG	113
CIDEA	Rata	GCAGACGAAAAAGGTCCTGC	GTGACCAGGCCAGTTGTGAT	162
PPAR γ	Humano	AGGATGCAAGGGTTTCTCCG	CATCCGCCCAAACCTGATGG	169
DIO2	Humano	TGGAAGAGCTTCTCCTCGAT	TGCACCACACTGGAATTGGG	74
UCP1	Humano	GCGGATGAAACTCTACAGCG	CTTGCTTCTAAACTAGGTGCT	139
UCP1	Ratón	ACTGCCACACCTCCAGTCATT	CTTGCCTCACTCAGGATTGG	123
UCP1	Rata	AGACAGAAGGATTGCCGAAACT	TGCCCAATGAATACCGCCA	196
TBP	Humano	TGCCCGAAACGCCGAATATAA	CGTGGTTCGTGGCTCTCTT	73

PGC-1 α	Humano	GGCCCAGGTATGACAGCTAC	CTGTCCGTGTTGTGTCAGGT	183
PGC-1 α	Rata, ratón	CCCTGCCATTGTTAAGACC ³³⁶	TGCTGCTGTTCTGTTTTTC ³³⁶	161
RBM3	Humano	CATCACCTTCACCAACCCAGA	ACCATCCAGAGACTCTCCGTTTC	70
RBM3	Rata	TGGAGAGTCCCTGGATGGG	TGGTCCCCTGGCAGACTT	65
GAPDH	Rata, ratón	ATGGTGAAGGTCGGTGTGAAC	TCTCAGCCTTGACTGTGCC	184
36B4	Rata, ratón, humano	CGACCTGGAAGTCCAACACTAC	ATCTGCTGCATCTGCTTG	109
ELOVL3	Ratón	GGACCTGATGCAACCCTATGA ³³⁷	TCCGCGTTCTCATGTAGGTCT ³³⁷	140

Las amplificaciones del cDNA tuvieron lugar en los termocicladores 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) y QuantStudio 5 qPCR (Applied Biosystems). En ambos aparatos el proceso consistió en un paso de desnaturalización de la doble hebra a 95°C de 10 min, seguido de un segundo paso de emparejamiento de 15 segundos a 95°C y de un tercer paso de extensión de 1 minuto a 60°C donde se capturaba la señal emitida. Ambos pasos de emparejamiento y extensión se repitieron durante 40 ciclos. Por último, la cantidad de mRNA del gen de interés fue normalizada respecto a la expresión de GAPDH, TBP o 36B4, que se emplearon como controles endógenos, y se analizaron los datos con el programa 7300 System SDS Software (Applied Biosystems) y QuantStudio Design & Analysis Software (Applied Biosystems), correspondientes a cada termociclador.

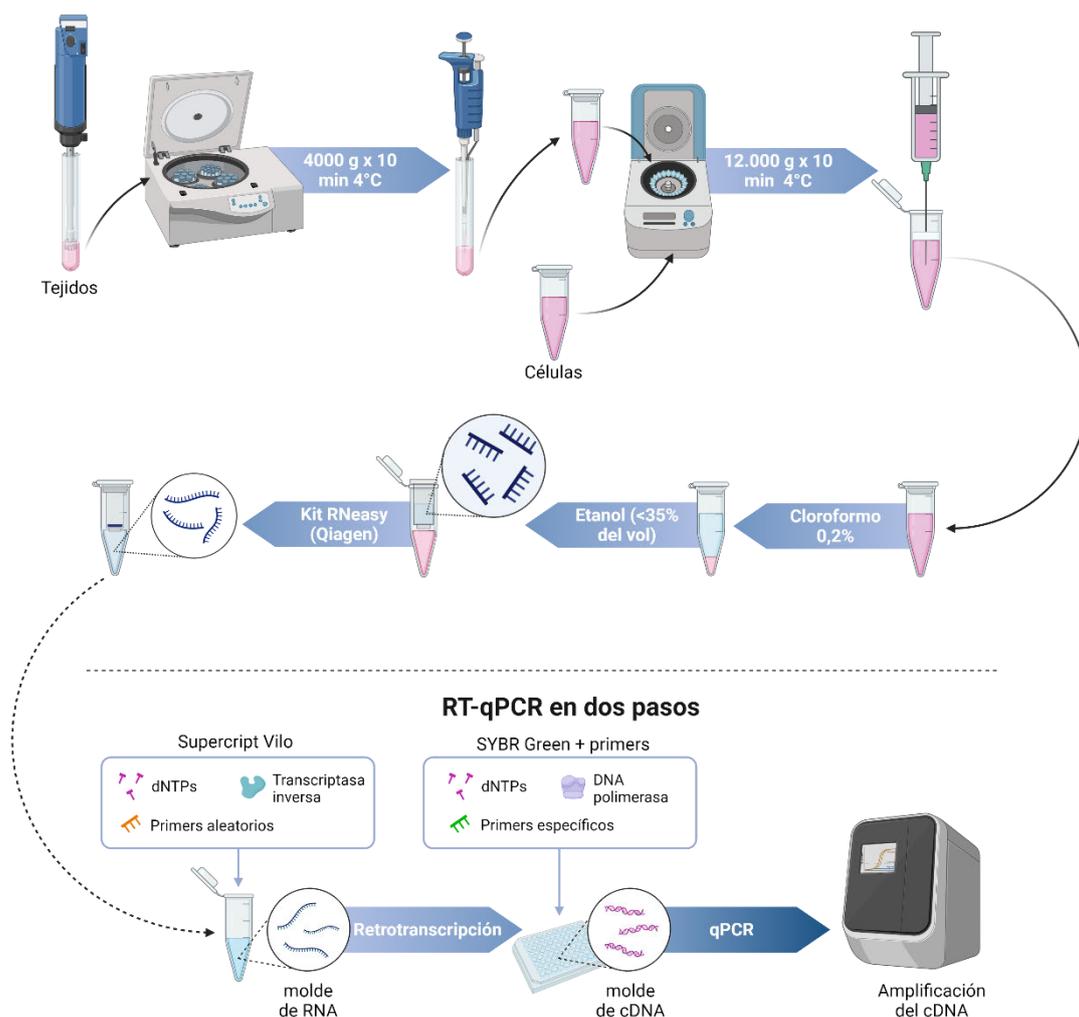


Figura 28. Esquema ilustrativo del procesamiento de las muestras destinadas al análisis de la expresión de mRNA por qPCR (Imagen creada con BioRender)

4.3. INMUNOFLUORESCENCIA EN TEJIDOS

Las muestras de tejidos destinadas para inmunofluorescencia fueron incluidas en parafina, por tanto, se realizó el proceso habitual de desparafinado y rehidratación por gradiente decreciente de alcoholes. Posteriormente fue necesario aplicar un tratamiento de recuperación antigénica con citrato pH 6.0 en ebullición durante 20 minutos con el fin de desenmascarar los epítopos para ser reconocidos por los anticuerpos empleados.

Tras lavar 2 veces en PBS para retirar los restos de citrato, se permeabilizó la muestra con el buffer de permeabilización (1x PBS/0,2% Triton X-100–100 mM glicina) durante 30 minutos. Después se bloqueó la muestra durante otros 30 minutos con suero normal de burro, diluido 1:10 en PBS/0,2% Triton X-100. En los casos de tejido de ratón que fuesen a ser marcados con un anticuerpo primario hecho en ratón, como el caso del anticuerpo anti-CIRP de

Proteintech con referencia 60025-2-Ig, fue necesario realizar otro bloqueo de la región variable de las IgG endógenas con fragmentos Fab de burro contra las IgG de ratón (Jackson ImmunoResearch, ref. JAC-715-007-003), diluido 1/10 en PBS/0,2% Triton X-100 durante 2 horas a TA. Una vez que la muestra estaba bien bloqueada, se procedió a añadir el anticuerpo primario (Tabla 8), diluido en la solución de bloqueo correspondiente, y se incubó durante 16 horas a 4°C.

Tabla 8. Anticuerpos primarios utilizados en inmunofluorescencia

	Casa comercial	Referencia	Dilución
CIRP (m)	Proteintech	60025-2-Ig	1/250
Insulina (gp)	Dako	A0564	1/500
Glucagón (r)	Novocastra	NCL-GLUCp	1/500
Polipéptido pancreático (g)	Abcam	Ab77192	1/500
Somatostatina (r)	Dako	A0566	1/500

Anticuerpo producido en ratón (m), conejo (r), cabra (g), o conejo de indias (gp)

El anticuerpo primario se eliminó realizando 3 lavados de 5 minutos en PBS antes de añadir los anticuerpos secundarios fluorescentes (Tabla 9) diluidos en PBS e incubados 1 hora a TA. Posteriormente se hicieron 3 lavados de 5 minutos en PBS y se procedió al montaje de las preparaciones con el líquido de montaje ProLong Gold Antifade con DAPI (Life Technologies, ref. P36931). En todos los experimentos se incluyó un control negativo de tejido que únicamente se incubó con anticuerpo secundario con el fin de descartar uniones inespecíficas. Finalmente, los resultados se observaron y fotografiaron en el confocal de Leica SP5.

Tabla 9. Anticuerpos secundarios utilizados en inmunofluorescencia

	Marcaje	Dilución
IgM de ratón	Alexa Fluor 488	1/500
IgG de conejo de indias	TRITC	1/500
IgG de conejo	CF488	1/500
IgG de cabra	Alexa Fluor 633	1/500

4.4. INMUNOFLUORESCENCIA EN CÉLULAS

Las células, tanto cultivadas en cámaras de cultivo (*slide chambers*), como en cubres o en portas se fijaron en 3,4% de formaldehído durante 10 minutos, se lavaron en PBS según el protocolo habitual y se conservaron a 4°C hasta el momento de realizar la inmunofluorescencia.

Se aplicó una solución de permeabilización (1x PBS/0.2% Triton X-100) durante 10 minutos, tras los que se procedió a bloquear con suero normal de burro o cabra diluído 1/10 en PBS, según la especie de origen del anticuerpo secundario, durante otros 30 minutos. Una vez transcurrido el tiempo, se añadió el anticuerpo primario no marcado (Tabla 10) diluido en solución de bloqueo y se incubó 16 horas a 4°C.

Al día siguiente, se realizaron 3 lavados de 5 minutos en PBS y después se incubó 1 hora a TA con el anticuerpo secundario contra IgG de conejo marcado con CF633 (Biotium, ref. 20125) o contra IgG de ratón marcado con CF543 (Biotium, ref. 20305) más una dilución 1/2.000 de Hoechst 33342 (Sigma, ref. B2261). Posteriormente se realizaron 3 lavados de 5 minutos y, excepto en el caso de las inmunofluorescencias triples, se montaron las muestras con ProLong Gold Antifade Reagent (Invitrogen, ref. P36930) y se visualizaron en el confocal Leica SP5.

En el caso de las inmunofluorescencias triples de CIRP/RBM3 con tubulina acetilada y γ -tubulina, después de los lavados tras el anticuerpo secundario, se bloqueó de nuevo durante 2 horas a TA con suero normal de conejo (Abcam, ref. Ab166640). Este bloqueo evita que el primario marcado hecho en conejo contra la γ -tubulina se una al secundario contra IgG de conejo. Posteriormente se añadieron los anticuerpos primarios marcados (Tabla 10) diluidos en PBS y, tras tres lavados de 5 minutos, se procedió al montaje y la visualización de la misma manera que está descrita en el párrafo anterior.

Tabla 10. Anticuerpos primarios utilizados en las inmunofluorescencias de células.

	Casa comercial	Referencia	Dilución	Marcaje
CIRP (m)	Proteintech	60025-2-Ig	1/250	-
CIRP (r)	Proteintech	10209-2-AP	1/500	-
CIRP recombinante (r)	Abcam	Ab246510	1/250	-

RBM3 recombinante (r)	Abcam	Ab134946	1/250	-
α -Tubulina acetilada (m)	Santa Cruz Biotechnology	Sc-23950	1/500	-
α -Tubulina acetilada (m)	Santa Cruz Biotechnology	Sc-23959 AF546	1/250	Alexa Fluor 546
γ -Tubulina humana recombinante (r)	Abcam	Ab205475	1/500	Alexa Fluor 488

Anticuerpo producido en ratón (m), o en conejo (r)

4.5. TINCIÓN CON OIL RED O

Preparación de Oil Red O

La solución stock y la tinción de Oil Red O (OrO) se prepararon y se realizaron siguiendo las recomendaciones del fabricante. Es decir, se diluyeron 150 mg de OrO (Merck, ref. 01391-250ML) en 50 mL de isopropanol para preparar la solución stock. La solución de trabajo se preparó mezclando 3 mL del stock con 2 mL de agua desionizada (escalable según la necesidad). Tras 10 minutos reposando a TA, se pasó la solución por un papel de filtro antes de proceder a la tinción de la muestra.

Tinción de adipocitos

Las células cultivadas en *slide chambers* se fijaron según el protocolo habitual y, tras los lavados, se añadió isopropanol al 60% hasta cubrir el fondo de cada pocillo y se dejó reposar durante 10 minutos. Una vez transcurrido el tiempo se eliminó el isopropanol y se añadió la solución de trabajo por la pared de cada pocillo hasta que todas las células estuviesen completamente cubiertas y se dejó incubando durante 10 minutos a TA. Cuando finalizó la incubación se lavaron los pocillos varias veces con agua destilada hasta que esta quedó transparente.

La preparación se montó con medio de montaje ProLong Gold Antifade con DAPI y se visualizó al confocal, ya que el OrO tiene autofluorescencia y se puede observar y capturar con cualquier láser visible o UV. Para realizar las imágenes se ajustó la configuración del láser para capturar en la zona del rojo (600-700 nm) y excluir el rango de captura del DAPI, y no

captar así el OrO en el canal azul. Las imágenes se analizaron con un módulo de analizado de partículas ajustado de Image J³³⁵

5. MINERÍA DE DATOS

Como primera aproximación al estudio de la relación de CIRP con la respuesta al flujo se realizó un trabajo de minería de datos. En él se buscaron estudios de RNASeq en PubMed y GEO dataset en los que:

- a) sometiesen a células a distintas condiciones de flujo, bien laminar u oscilante
- b) tuviesen entre sus datos, pero no centrasen su estudio, en CIRP o RBM3
- c) los datos de la secuenciación fuesen de acceso abierto

Posteriormente se hizo un análisis de los datos de secuenciación de los estudios encontrados para evaluar preliminarmente la respuesta de CIRP y RBM3 al flujo.

6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico de los resultados se realizó con el programa Graph Pad Prism 9 en el caso de las pruebas moleculares. Todos los grupos de datos se analizaron para comprobar su normalidad (test de Shapiro-Wilk) y homocedasticidad (test de Levene). Para contrastes de significación entre grupos se usaron T-test, U Mann-Whithney y Kolmogrov-smirnof según las poblaciones tuviesen una distribución normal o no. En contrastes múltiples se usaron las pruebas ANOVA unifactorial y bifactorial, en caso de incluir un segundo factor de interacción. Para comparaciones múltiples en contrastes multifactoriales se usó la corrección de Tukey y Holm-Sidak en función de la adecuación de las poblaciones.

Por último, para el análisis de los resultados del procesado de imágenes se utilizó el paquete estadístico R¹¹ para estructurar, modificar y analizar estadísticamente estos conjuntos de datos masivos

Para todos los análisis estadísticos realizados se situó la significación estadística cuando la probabilidad de error fue menor de 0,05 ($P < 0,05$).

Resultados

1. CARACTERIZACIÓN DE MOLÉCULAS DE PEQUEÑO TAMAÑO PARA SIMULAR HIPOTERMIA

1.1. CONTEXTO

Teniendo en cuenta el papel de la termorregulación en la obesidad y los pros y contras ya mencionados del uso de la hipotermia terapéutica para su tratamiento, junto con la importancia de CIRP en distintos procesos biológicos y terapéuticos, el hecho de disponer de una molécula de pequeño tamaño (SM por sus siglas en inglés de “small molecule”) capaz de producir los efectos de la hipotermia pero a la temperatura corporal normal (37°C) podría suponer una ventaja fundamental en la lucha contra la pandemia de la obesidad actual.

Las SMs que se han analizado fueron seleccionadas previamente mediante una búsqueda *in silico* gracias a la colaboración establecida con el grupo de investigación de la Universidad San Pablo CEU (Madrid), dirigido por Beatriz de Pascual-Teresa Fernández. Esta búsqueda fue recogida en el trabajo fin de máster de Lydia de Salazar Sánchez-Ferragut, de la Universidad San Pablo CEU, titulado “Hipotermia en el tratamiento de lesiones en la retina: Cribado Virtual de Alto Rendimiento para la búsqueda de nuevos agentes moduladores de CIRBP” . En él analizaron la estructura de la proteína CIRP unida a RNA a partir de la cual realizaron un cribado de alto rendimiento (HTVS) de posibles ligandos entre 25 compuestos de su colección interna y 1596 estructuras de la base de datos Diversity Set IV del National Cancer Institute (NCI, Bethesda). Se utilizaron tres criterios como diana del HTVS, una proteína homóloga estructural y funcional (CUGBP1), un modelo teórico generado para CIRP-RNA y el modelo de CIRP en su forma apo. Tras el cribado, los complejos obtenidos se sometieron a simulaciones de dinámica molecular, que permitieron evaluar la unión de los ligandos y la estabilidad del complejo teórico resultante.

Las moléculas resultantes de ese trabajo fueron evaluadas biológicamente en células R28³³⁸, que es una línea inmortalizada de neuroblastos de retina de rata posnatal. Se escogió esta línea celular ya que este estudio se situaba dentro del contexto de un proyecto financiado por el Departamento de Defensa de Estados Unidos (ref. DoD MR130239), que surgió de la necesidad creciente de encontrar una terapia alternativa, económica y eficaz para frenar los daños oculares de origen traumático causados en los campos de batalla. Como resultado de ese estudio se identificaron varias moléculas capaces de elevar la expresión de CIRP en

R28, como se recogió en el trabajo de fin de máster de la doctoranda “Caracterización de moléculas de pequeño tamaño que modulan la expresión de CIRP” disponible en el repositorio de la Universidad de La Rioja.

En este contexto surgió la idea de emplear una molécula activadora que simule la exposición prolongada al frío y que active las propiedades adelgazantes y saludables del mismo, de forma que se viesan reducidas las consecuencias del tratamiento con frío relacionadas con la pérdida de bienestar humano y/o animal. En el campo del metabolismo, la aplicación de estas moléculas podría inducir al organismo a actuar como si se encontrase a bajas temperaturas y promover la transformación de la grasa blanca en grasa beige para así obtener calor de los lípidos almacenados. Como consecuencia se podría conseguir un mejor control del metabolismo glucídico y del peso corporal.

1.2. CARACTERIZACIÓN DE SMs QUE MODULAN LA EXPRESIÓN DE CIRP

En las primeras etapas de este trabajo se terminó la caracterización de las moléculas que modulan la expresión de CIRP. En los experimentos anteriores, recogidos en el trabajo fin de máster ya citado, se determinó que los compuestos con mayor actividad, en cuanto al aumento de los niveles de CIRP, fueron SD4 y zr17-2 (Fig. 29).

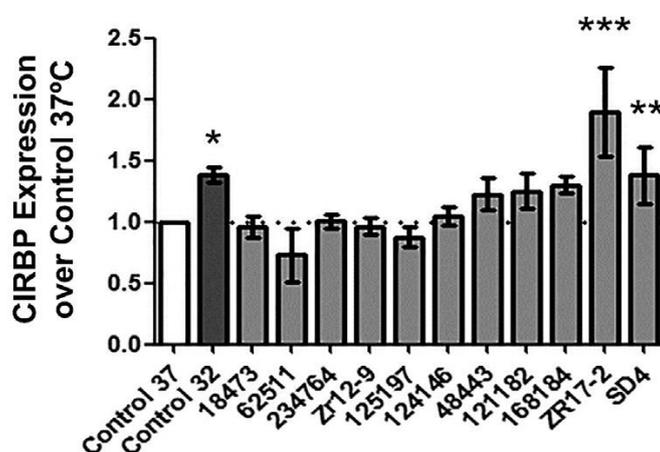


Figura 29. Representación de las densitometrías de las bandas obtenidas por Western blot de las SMs analizadas en el contexto del trabajo fin de máster de la doctoranda³³⁹. Las barras representan la media \pm desviación estándar de todas las muestras. **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$

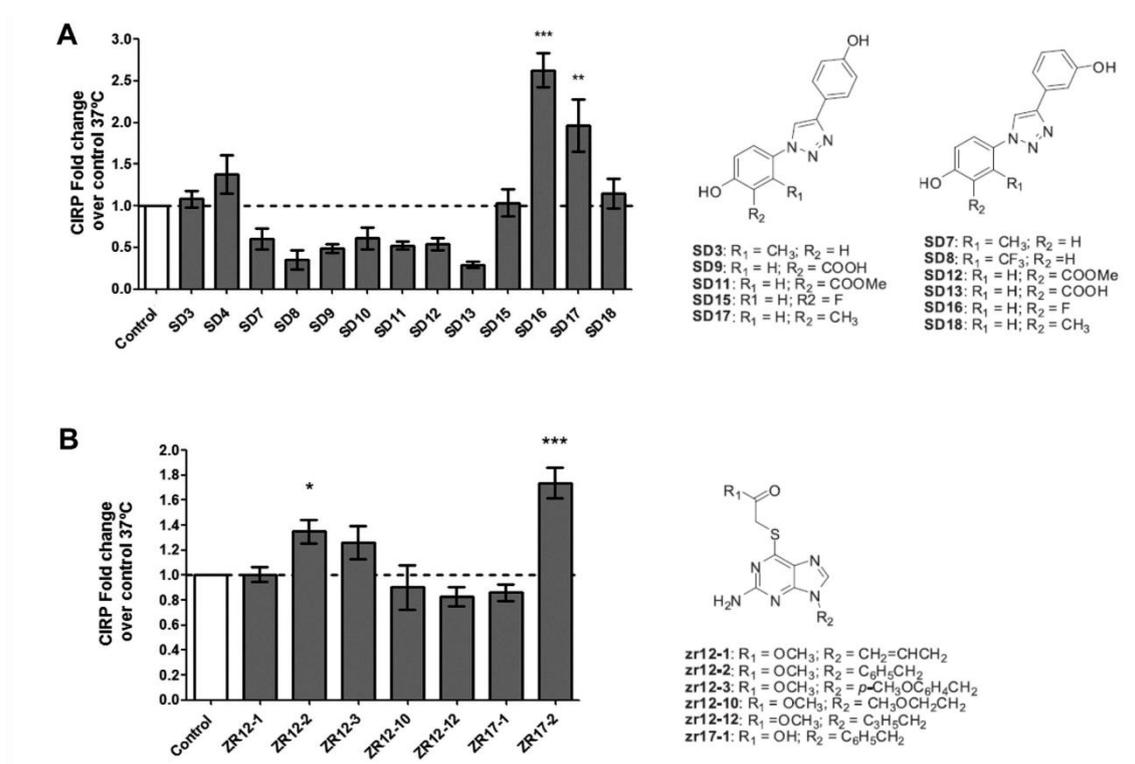


Figura 30. Resultados de Western blotting de CIRP en células R28 expuestas a moléculas de las familias SD y zr a una concentración de 10 μM durante 4 días. A la derecha de cada gráfica se muestra la estructura química de los compuestos de la familia correspondiente³³⁹. Las barras representan la media ± desviación estándar de todas las muestras. *: p<0.05; **:p<0.01; ***:p<0.001.

A la luz de estos datos, se continuó con el estudio de los compuestos químicamente relacionados con ellos, es decir, la familia de compuestos SD y zr cuya composición está resumida en la Fig. 30. En estos experimentos, realizados por triplicado para cada SM, se observó un aumento en los niveles de CIRP para las moléculas SD16, SD17, zr12-2 y zr17-2.

Haga clic o pulse aquí para escribir texto. De estas 4 moléculas se escogió seguir trabajando con zr17-2 ya que, además de su capacidad de aumentar los niveles de CIRP, presentaba la ventaja de poder ser disuelta en agua o suero fisiológico en vez de DMSO.

Todos los resultados de la caracterización de las moléculas, así como los primeros resultados de la inoculación de zr-17-2 en animales de experimentación, que se presentan más adelante (Fig. 35), están recogidos en el artículo "In silico identification and in vivo characterization of small molecule therapeutic hypothermia mimetics" que se adjunta al final de esta memoria.

Este estudio dio origen, también, a la concesión de una patente nacional (ES-2680418_A2), que fue publicada el 06-09-2018

1.3. EFECTO DE LA CONFLUENCIA EN CÉLULAS R28 TRATADAS CON ZR17-2 (10 μ M)

A la hora de realizar los tratamientos con la molécula zr17-2 en las células R28, se quiso estudiar si su efecto se veía modulado por la confluencia de las células. Para ello se realizó un ensayo con dos concentraciones de células de partida, 0.5×10^6 células y 1.0×10^6 células por pocillo, tratadas con zr17-2 (o no) con una concentración final de 10μ M durante 4 días. Al final de ese tiempo, el cultivo con menos densidad de células alcanzó una confluencia aproximada de un 85%, mientras que el cultivo más denso alcanzó el 100%. Tras analizar los niveles de CIRP de los extractos de proteína se pudo observar que una mayor confluencia no solo aumentaba la proteína ($p = 0,038$), sino que potenciaba el efecto de la SM, llegando a doblar los niveles alcanzados en las mismas condiciones en las células sin el tratamiento (Fig. 31)

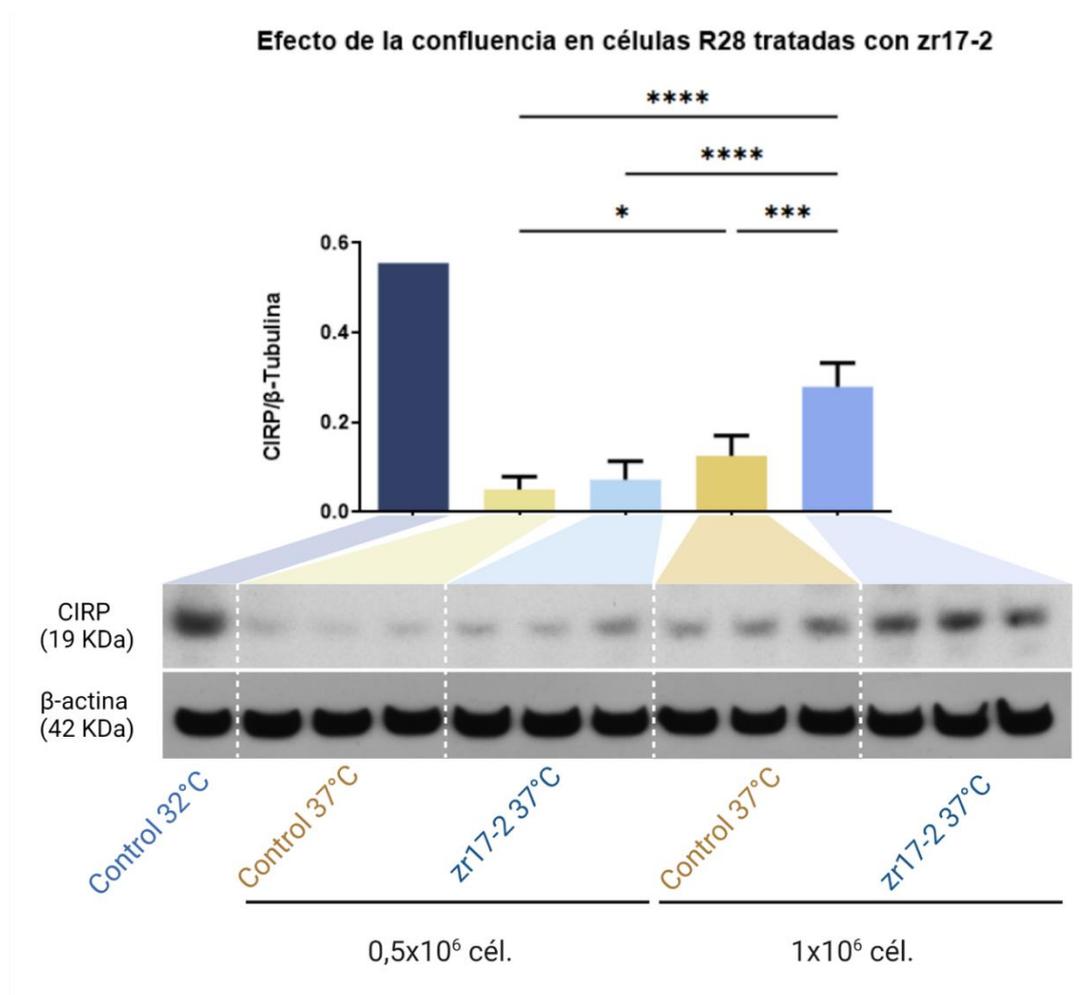
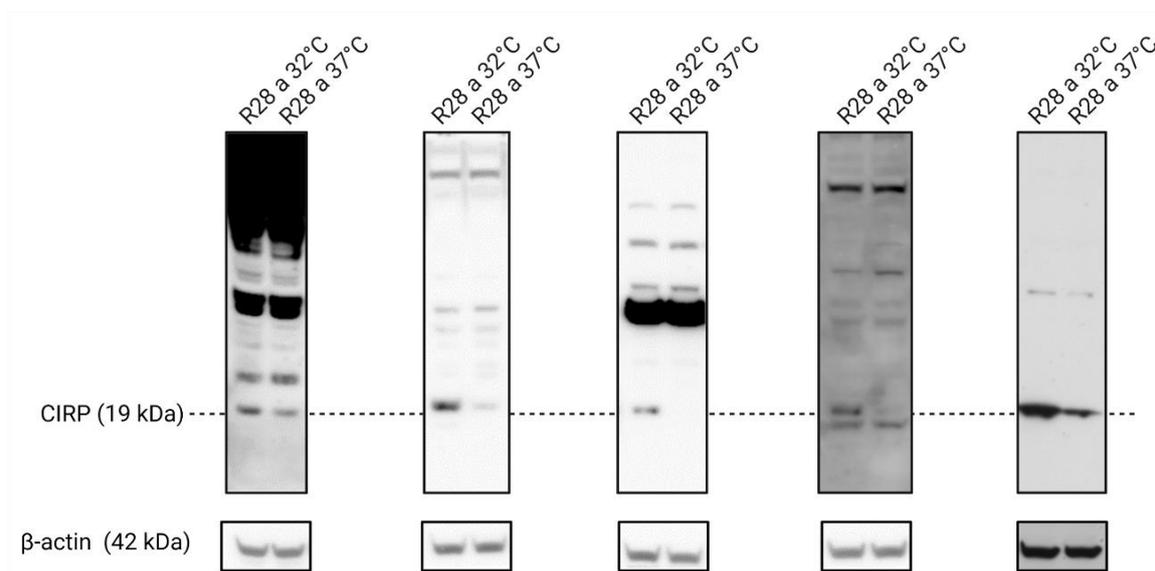


Figura 31. Efecto de la confluencia en los niveles de CIRP en células R28 tratadas con zr17-2 a una concentración de 10μ M durante 4 días. En la gráfica se muestran los resultados del análisis de densitometría del Western-blotting de las bandas que se exponen en la figura. Las primeras corresponden a CIRP, con una banda que corresponde a 19 kDa y las segundas a la β-actina, con una banda esperada a 42 kDa. Las barras representan la media \pm desviación estándar de todas las muestras. *: $p < 0.05$; ***: $p < 0.001$; ****: $p < 0.0001$.

1.4. COMPARACIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-CIRP

Durante el desarrollo de este trabajo, por causas ajenas al laboratorio, se dejó de disponer del anticuerpo primario que se utilizaba habitualmente para la identificación de CIRP tanto en Western-blot como en inmunofluorescencia: el anticuerpo de Proteintech con referencia 60025-2-Ig. Por tanto, se estableció como prioritario el hacerse con una herramienta de identificación adecuada para evaluar los niveles de CIRP en estas técnicas antes de poder avanzar en las siguientes fases de la investigación.

Con este fin, se hizo una búsqueda de anticuerpos alternativos capaces de detectar los niveles de CIRP, y se probaron en extractos de células R28 crecidas en normotermia (37°C) o en hipotermia (32°C) durante 4 días para evaluar su calidad (Fig. 32)



	CIRP (m)	CIRP (r)	CIRP (r)	CIRP (g)	CIRP recombinante (r)
Casa comercial	Proteintech	Proteintech	Ribonomics	Abcam	Abcam
Referencia	60025-2-Ig	10209-2-AP	RN032P	Ab106230	Ab246510
Dilución	1/500	1/10.000	1/1.000	1/1.000	1/2.000

Anticuerpo producido en ratón (m), conejo (r), o cabra

Figura 32. Comparación de anticuerpos anti-CIRP por Western blot en células R28 tras 4 días de crecimiento a 32°C o 37°C. En la parte superior de la imagen se muestra el resultado del revelado de las membranas incubadas con cada anticuerpo, cuyos datos se referencian en la tabla inferior. La línea punteada indica la altura aproximada de 19 kDa, predicha para CIRP, y en el recuadro inmediatamente debajo se muestran las bandas correspondientes a la beta-actina, aproximadamente a 42 kDa.

Lo primero que se evaluó es la capacidad de los anticuerpos de detectar el aumento de CIRP como respuesta al frío. En este sentido, los 5 anticuerpos cumplen con el requisito, sin embargo, la especificidad de las bandas parece ser un poco más heterogénea entre ellos. Aparte de la banda de 19 kDa que correspondería a CIRP, en todos aparece una banda común a una altura aproximada de entre 38-42 kDa que se marca con distinta intensidad según el anticuerpo. Con todos estos datos se estableció que el anticuerpo que mejor funcionaba en Western-blotting en cuanto a detección de CIRP, limpieza de la señal y menor marcaje de bandas inespecíficas, fue el anticuerpo de CIRP recombinante (Ab246510).

2. zr17-2 COMO MOLÉCULA MODULADORA DEL METABOLISMO RELACIONADO CON LA OBESIDAD

2.1. EXPERIMENTOS *IN VITRO*:

2.1.1. EXPRESIÓN DE GENES DE PARDIFICACIÓN EN LA LÍNEA CELULAR 3T3-L1

Para evaluar los efectos de zr17-2 en el metabolismo lipídico y el tejido adiposo se diferenciaron preadipocitos de la línea celular 3T3-L1 a adipocitos maduros en presencia de la SM. Posteriormente se analizaron genes de pardificación de adipocitos, en concreto CIDEA³⁴⁰, ELOVL3³⁴¹, y PGC1 α ³⁴², un coactivador transcripcional de PPAR γ que modula la expresión de UCP1 y la termogénesis de la grasa parda y beige.

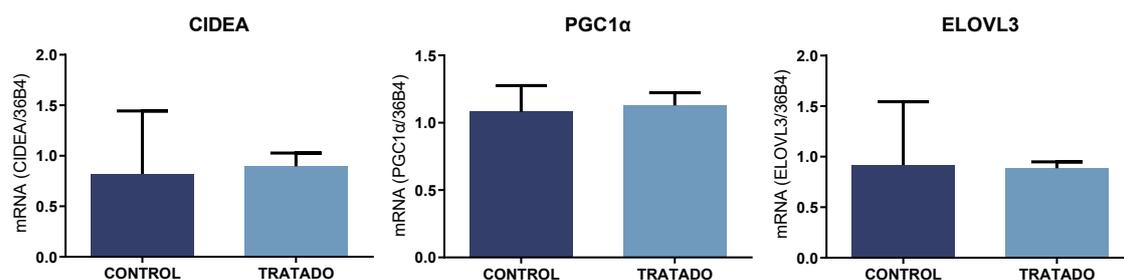


Figura 33. Expresión de CIDEA, PGC1 α y ELOVL3 en adipocitos maduros 3T3-L1. Se refiere como control a las células a las que se le añadió únicamente vehículo y como tratado a las que se diferenciaron en presencia de zr17-2 a una concentración de 10 μ M. Las barras representan la media \pm desviación estándar de todas las muestras.

En la Fig. 33 se puede observar el resumen de dicho análisis, donde no hay diferencias significativas en la expresión de estos tres genes entre las células controles y las tratadas con zr17-2, tras todo el proceso de diferenciación. Esto puede ser debido bien a que ha

transcurrido un tiempo suficientemente largo desde la exposición a la molécula y el aumento de la expresión ya haya caído, o bien porque CIRP no module la expresión de estos tres genes en concreto y actúe en otro punto de la regulación del metabolismo lipídico.

2.1.2. OIL RED O (ORO) DE ADIPOCITOS MADUROS DE LA LÍNEA CELULAR 3T3-L1

Si bien no se vio un cambio en los genes estudiados a nivel de mRNA, cuando se hizo un análisis de las imágenes de microscopía de las vesículas teñidas con OrO (Fig. 34.A) sí que se vieron diferencias en el área de estas (Fig. 34.B).

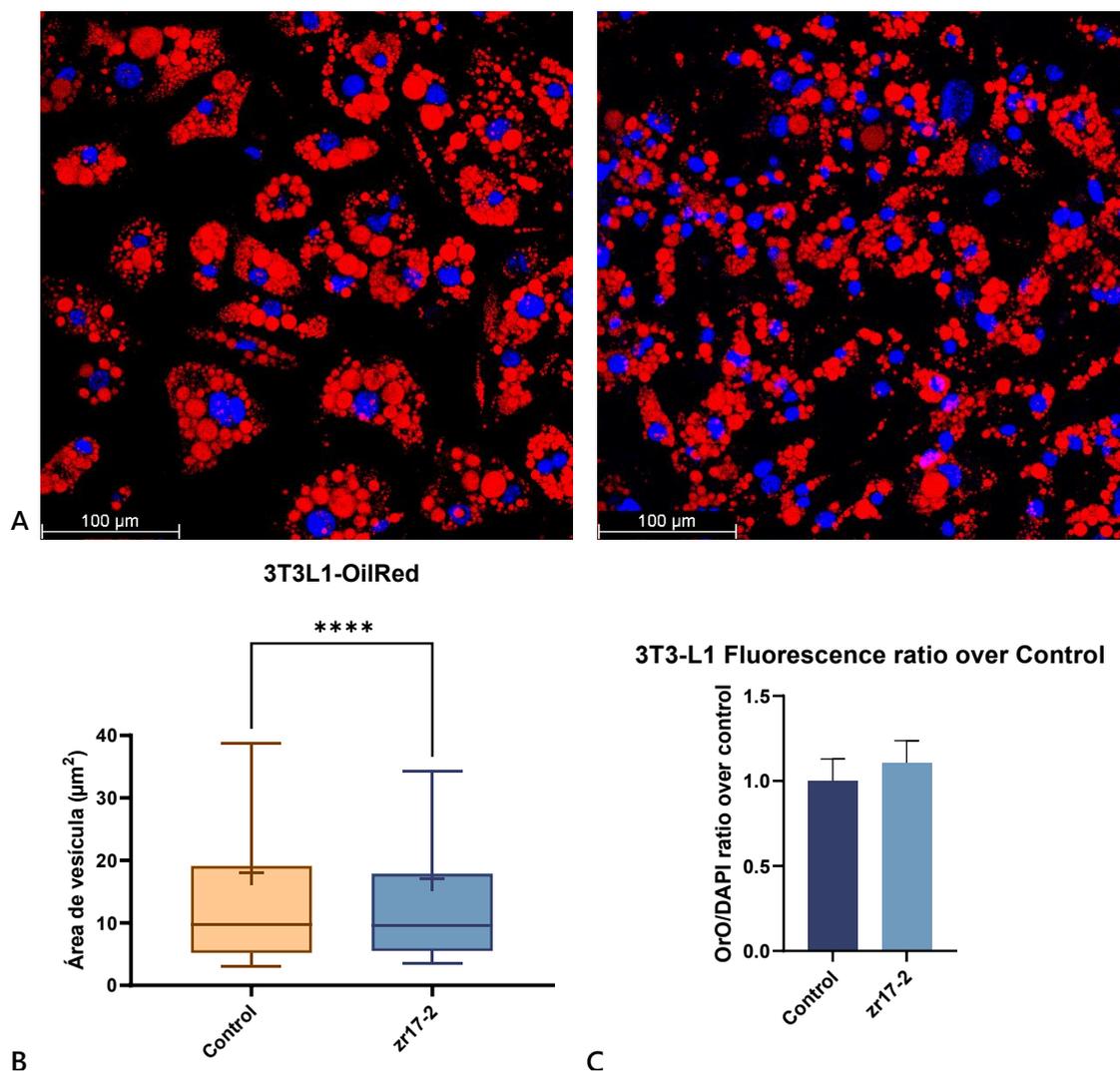


Figura 34. (A) Detalle de las imágenes de la tinción OrO de adipocitos maduros 3T3-L1 y fotografiados en el microscopio confocal para la cuantificación de vesículas, en rojo se muestran las vesículas teñidas con OrO y en azul los núcleos marcados con DAPI. La imagen de la izquierda corresponde a las células control y la de la derecha a las células tratadas con zr17-2 a una concentración de 10 µM. (B) Representación gráfica de los datos analizados del área de las vesículas, medida en µm², de adipocitos maduros diferenciados en ausencia o presencia de zr17-2. (C) Análisis de los niveles de fluorescencia de OrO respecto a los de DAPI normalizados

*frente a los datos de las células control. Las barras representan la media \pm desviación estándar de todas las muestras. ****: $p < 0.0001$.*

De hecho, de las más de 10.000 vesículas analizadas por grupo, se vio que el tamaño medio de las vesículas de los adipocitos tratados con zr17-2 a una concentración de 10 μ M durante toda su diferenciación era 5,3% menor que las de las células no tratadas ($p < 0,0001$).

En cuanto a la acumulación de lípidos en células diferenciadas a adipocitos, se analizó el coeficiente entre la fluorescencia de las vesículas teñidas con OrO frente a la fluorescencia de los núcleos (DAPI) y se pudo comprobar que no había diferencias significativas entre las células tratadas y no tratadas (Fig. 34.C). Los niveles de fluorescencia de los núcleos eran estables entre ambas condiciones experimentales.

Esta respuesta fisiológica parece indicar que zr17-2 es capaz de actuar durante la diferenciación de los adipocitos 3T3-L1, dando lugar a vesículas de menor tamaño sin afectar a la acumulación global de lípidos. Además, teniendo en cuenta el diseño de zr17-2 y su efecto en la concentración celular de CIRP, probablemente este empequeñecimiento de las vesículas esté relacionado con un aumento de los niveles de CIRP.

2.2. EXPERIMENTOS *IN VIVO*

La primera aproximación que se realizó para estudiar el efecto de zr17-2 en organismos complejos fue un pequeño ensayo en ratas macho a las que se les inyectó una dosis de 20 nmoles/Kg de SM mientras que a los controles se les inyectó el mismo volumen de vehículo. Después de 4 días se sacrificaron y se extrajeron muestras de grasa subcutánea, páncreas, colon, testículo, pulmón, retina, corteza cerebral y corazón, cuyos niveles de CIRP se analizaron posteriormente mediante Western blotting (Fig. 35). Estos resultados se publicaron en el artículo de Coderch et al.³³⁹ donde la doctoranda figura como segunda autora y que se adjunta como anexo al final de este manuscrito.

Al evaluar los niveles de CIRP por Western blotting en los distintos órganos se observó que la respuesta era dependiente del tejido. En pulmón, testículo, colon, páncreas, grasa subcutánea y corazón, la expresión de los tejidos de animales tratados con zr17-2 era mayor que la de los tejidos control y, sin embargo, en corteza cerebral y retina no se apreciaban diferencias (Fig. 35). Estos dos últimos tejidos se encuentran protegidos por la barrera hematoencefálica y hematoocular respectivamente, así que es posible que la SM no llegase a alcanzar esos tejidos o, al menos, no en una cantidad suficiente como para ver su efecto.

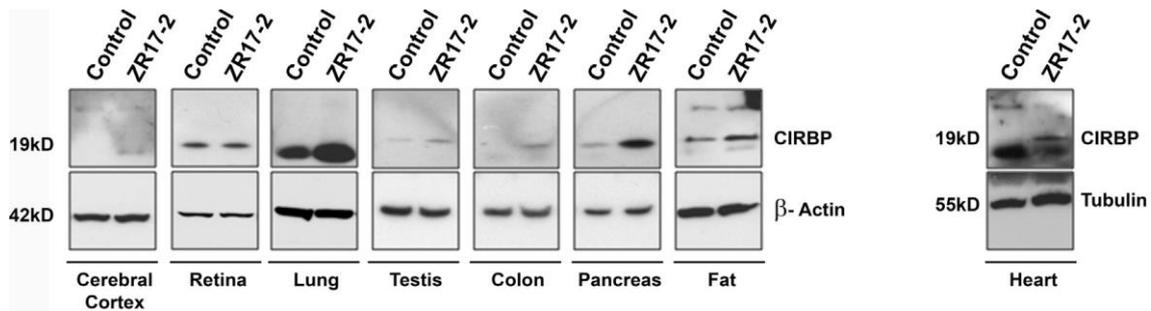


Figura 35. Análisis de los niveles de CIRP en distintos tejidos de rata. Los animales tratados recibieron una inyección intraperitoneal de 20 nmoles/Kg de la molécula zr17-2, mientras que los controles recibieron el mismo volumen de suero fisiológico. Debajo de las bandas correspondientes a CIRP (19 kDa) se muestran las bandas de β -actina (42 kDa) o tubulina (55 kDa) que tienen la función de control de carga de cada muestra.

Cabe resaltar el resultado obtenido en el análisis del Western blotting del corazón, donde se aprecia una banda difusa inferior a los 19 kDa en el animal control que desaparece a favor de la banda de 19 kDa esperada para CIRP en el animal tratado. Este patrón parece indicar que la unión de zr17-2 a CIRP bloquea la degradación de la proteína por proteasas en el corazón, lo que permitiría mantener la proteína funcional durante más tiempo y, por tanto, sus efectos.

2.2.1. RATONES EXPERIMENTALES

Tratamiento con zr17-2 y evaluación del efecto a distintos tiempos

Para estudiar el efecto de la SM en el tiempo, se trataron ratones C57BL/6 de 9 semanas que se sacrificaron 1, 2, 3 y 4 días tras una inyección intraperitoneal de 20 nmoles/Kg de zr17-2. Posteriormente se analizó la expresión de CIRP y genes relacionados con la termogénesis y el "oscurecimiento" de los adipocitos blancos en las grasas epididimal e inguinal, y de genes relacionados con el metabolismo de la glucosa en el páncreas (Fig. 36). Se escogieron estos depósitos de grasa ya que la grasa epididimal es una muestra de grasa visceral y la grasa inguinal de grasa subcutánea, con más potencial de desarrollar adipocitos beige que la primera³⁴³.

Los análisis de la expresión en la grasa epididimal de CIRP, así como de UCP-1, PRDM16 y CIDEA se muestran representados en la Fig. 36.A. No se observaron diferencias significativas en los niveles de mRNA de ninguno de ellos respecto a las muestras control.

En el caso de los genes analizados en la grasa inguinal (Fig. 36.B), se aprecia una disminución de la expresión de CIRP al día siguiente de la inoculación, que vuelve a sus niveles normales para el segundo día. Por su parte, UCP1 se reduce el día 3 tras la inoculación y, sin embargo, en el caso de CIDEA no se aprecian cambios en su expresión.

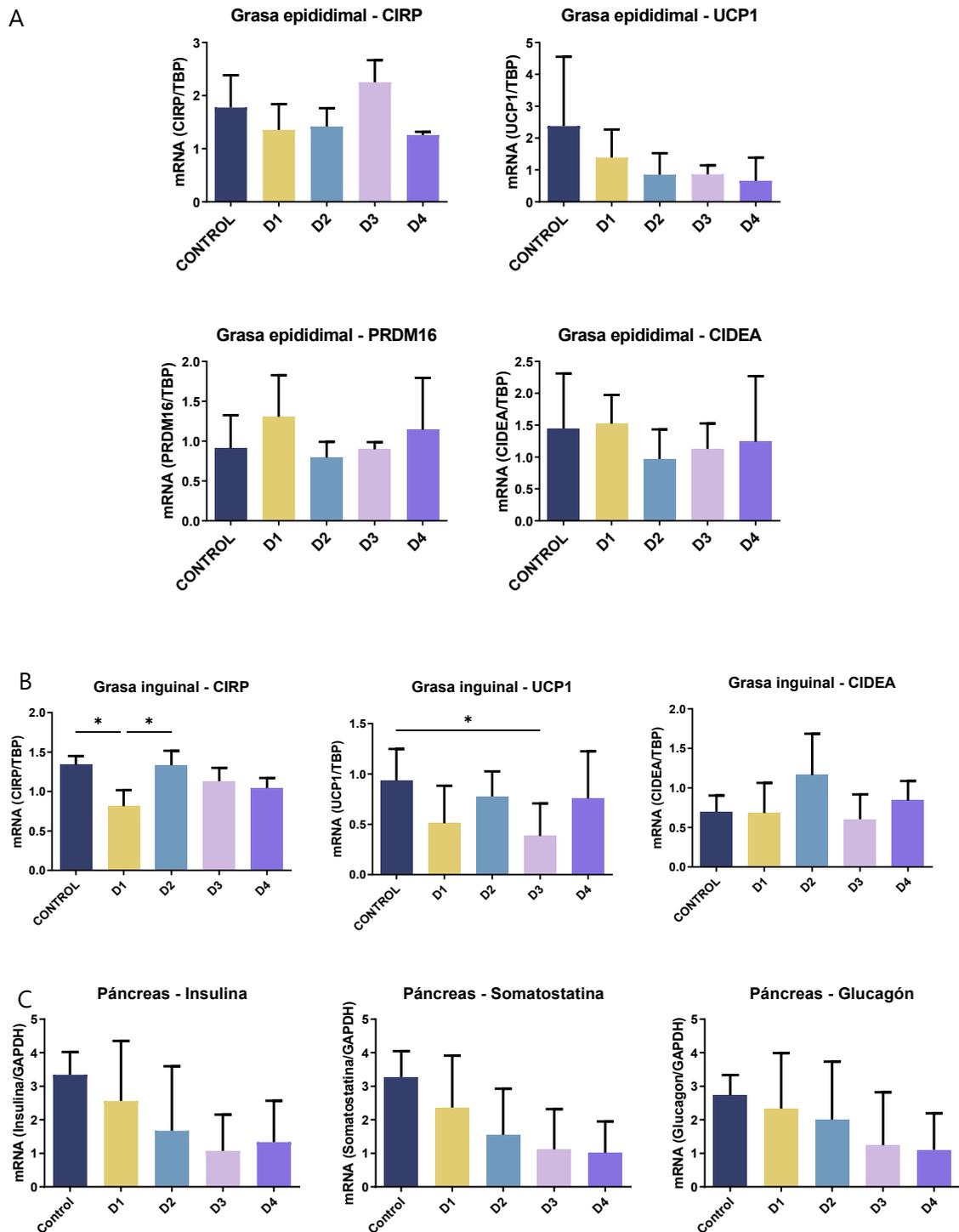


Figura 36. Expresión de CIRP y los correspondientes genes relacionados con la termogénesis en grasa epididimal (A) y grasa inguinal (B) en ratones tratados con 20 nmoles/Kg de α 17-2 o el volumen equivalente de vehículo (controles) y sacrificados a los 1, 2, 3 y 4 días. (C) Expresión de las hormonas pancreáticas nombradas en cada gráfica en muestras de páncreas de esos mismos ratones. Las barras representan la media \pm desviación estándar de todas las muestras. *: $p < 0.05$.

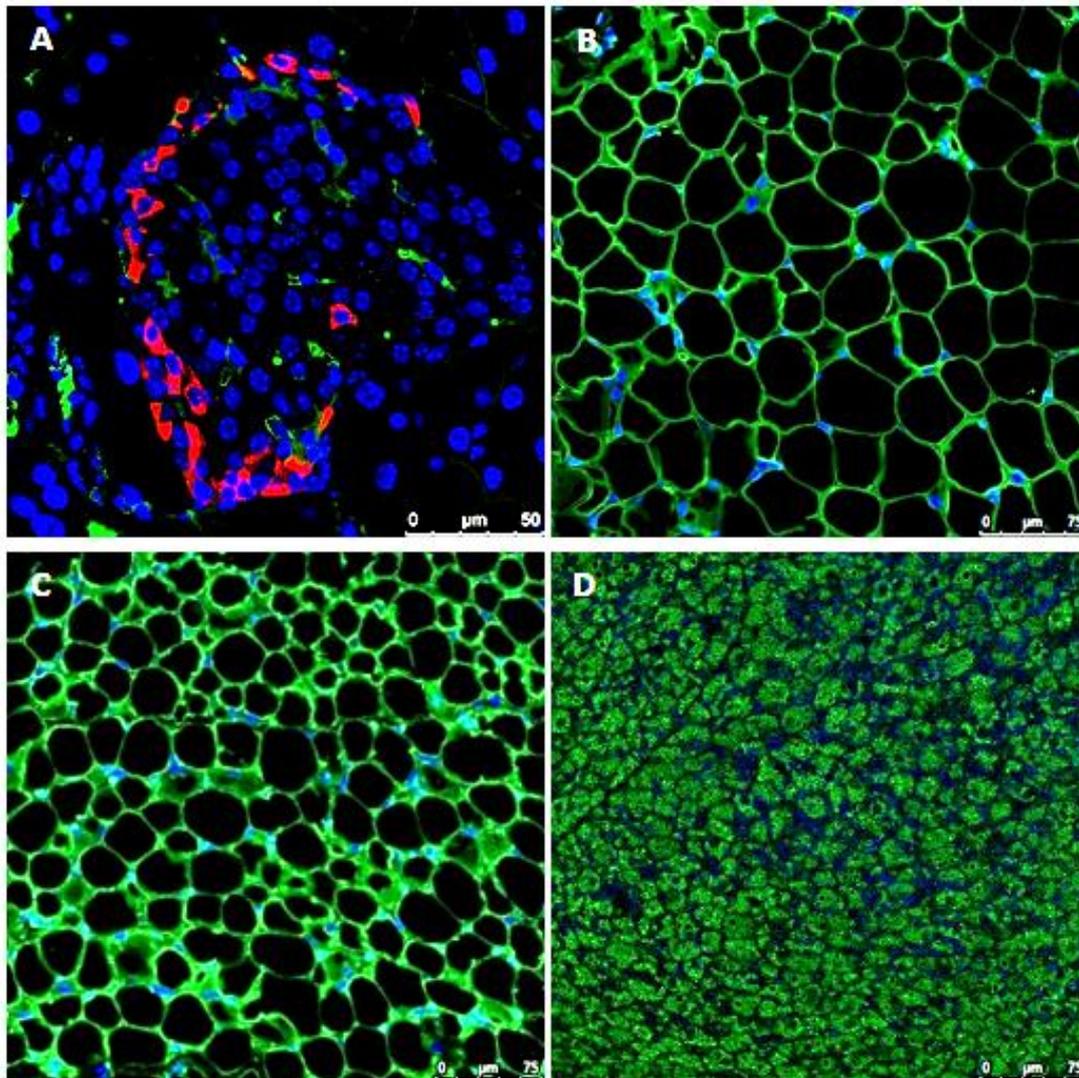


Figura 37. Imágenes de microscopía confocal representativas de las inmunofluorescencias de tejidos de ratones de 9 semanas a los tres días de ser tratados con 20 nmoles/Kg de zr17-2. En todas ellas CIRP está marcado en verde y el DAPI que señala los núcleos aparece en azul; además, en la imagen de un islote pancreático (A) se muestra la somatostatina marcada en rojo. Por último, la distribución de CIRP en los distintos tipos de grasas se puede apreciar en la grasa epididimal (B), la inguinal (C) y la escapular (D)

En un principio, dado el patrón de expresión de CIRP en la grasa y el páncreas, se pensó que podría estar implicado en el metabolismo de la glucosa a través de alguna de las hormonas pancreáticas relacionadas. Sin embargo, en el estudio de los niveles de mRNA de la insulina, la somatostatina o el glucagón, no se han visto cambios en la expresión de ninguna de ellas en los tiempos analizados (Fig 36.C). El motivo de la ausencia de cambio en estos genes podría ser que la expresión ya se habría estabilizado para el momento del muestreo. Sin embargo, al hacer la inmunofluorescencia de los tejidos y estudiar la colocalización de CIRP con las tres hormonas, se vio que las células que expresaban CIRP no eran las mismas que expresaban ninguna de ellas, ejemplo que se representan en la Fig. 37.A con la

somatostatina, en rojo, frente a CIRP, en verde. La expresión de CIRP parece estar restringida a las células vasculares o del estroma del páncreas. Ambos resultados disminuyen la probabilidad de que CIRP esté implicado directamente en el metabolismo de la glucosa a través de estas hormonas.

En cuanto a la distribución de CIRP en las grasas, los estudios de inmunofluorescencia revelaron un patrón principalmente citoplasmático en todas ellas, permitiendo apreciar las diferencias morfológicas en cuanto a número y tamaño de las vesículas entre la grasa epididimal (Fig. 37.B), inguinal (Fig. 37.C) y escapular (Fig. 37.D), que representaría a la grasa parda.

Tratamiento con zr17-2 en termoneutralidad.

La temperatura normal para los ratones se encuentra en torno a los 30°C³³², y en las condiciones de estabularización normal de los animalarios está establecida una temperatura ambiente de 22°C. Esto supone que los ratones estén en un estado constante de hipotermia moderada que podría modificar o enmascarar los efectos de zr17-2, de CIRP y del estado termogénico general del animal. Por ello se planteó un ensayo piloto en el que se aclimataron 12 ratones a 30°C tras lo que se les inyectaron 20 nmoles/Kg de zr17-2 una única vez (una dosis), dos veces (dos dosis), o el volumen correspondiente de suero fisiológico (control). Además, el grupo control se dividió entre ratones mantenidos en termoneutralidad (control negativo) y ratones a los que se les volvió a estabular a 22°C (control positivo).

Haga clic o pulse aquí para escribir texto. Para estudiar el efecto de la SM y la temperatura en la termogénesis y la pardificación de los adipocitos de la grasa inguinal (Fig. 38.A), se analizaron los genes UCP1, Tbx1, que es un marcador genético de tejido adiposo beige³⁴⁴, y Fndc5 o irisina, que juega un papel fundamental en la pardificación de la grasa blanca mediada por el ejercicio³⁴⁵. La expresión de UCP1 se vio claramente aumentada en los controles positivos respecto a los animales mantenidos en termoneutralidad (de izquierda a derecha del gráfico: $p = 0,002$ para todos ellos), sin embargo, no se vieron diferencias entre los grupos ni en la expresión de Tbx1 ni en la de Fndc5.

Además, se estudió la expresión de UCP1 en la grasa escapular (Fig. 38.B) que, conformada principalmente por tejido adiposo pardo, constituye un depósito termogénico ejemplar. En este caso la diferencia de UCP1 entre los animales mantenidos a 22°C respecto a los mantenidos a 30°C era aún más clara si cabe ($p < 0,0001$), independientemente del tratamiento recibido. Estos resultados indican que, en las condiciones habituales de temperatura del animalario, la maquinaria termogénica ya está activada

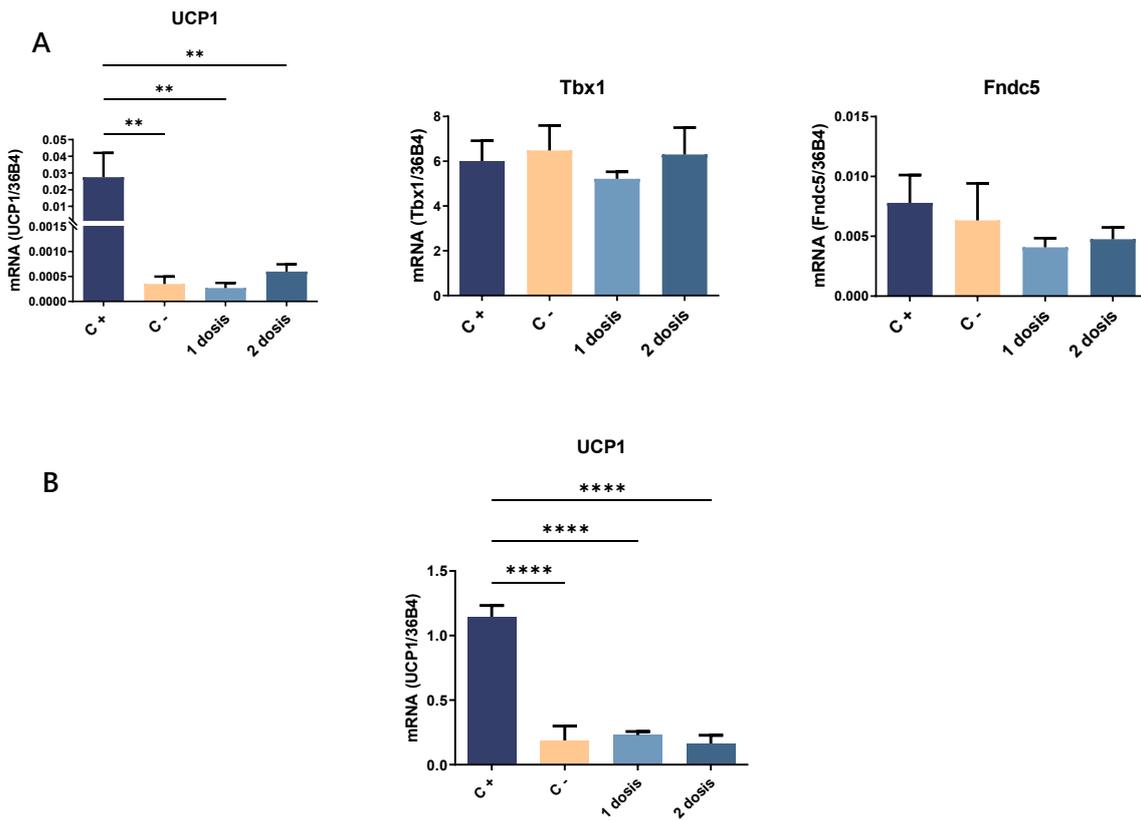


Figura 38. Expresión génica de ratones mantenidos a 30°C inoculados intraperitonealmente con 20 nmoles/Kg de zr17-2 en una dosis, dos dosis espaciadas tres días o suero fisiológico frente a ratones establecidos a 22°C inoculados con el volumen correspondiente de vehículo. (A) Muestras de grasa inguinal en las que se analizaron los genes correspondientes a cada gráfica. (B) Muestras de grasa escapular en las que se estudió la expresión de UCP1. Las barras representan la media \pm desviación estándar de todas las muestras. **: $p < 0.01$; ****: $p < 0.0001$

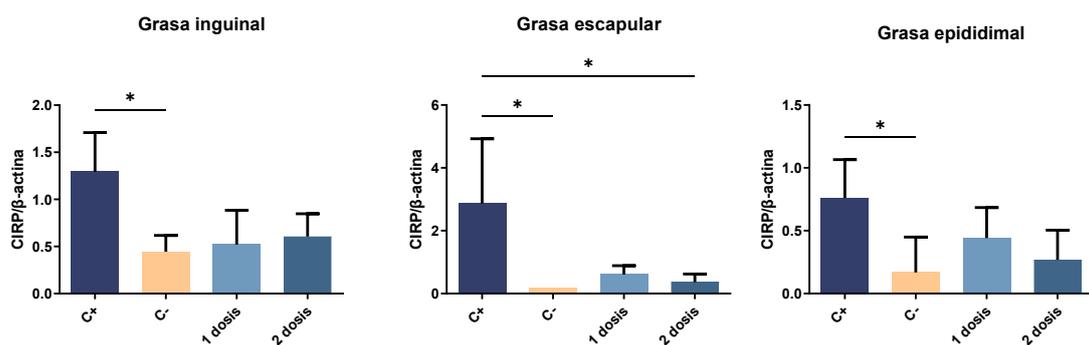


Figura 39. Western blotting de ratones mantenidos a 30°C inoculados intraperitonealmente con 20 nmoles/Kg de zr17-2 en una dosis, dos dosis espaciadas tres días o suero fisiológico frente a ratones establecidos a 22°C inoculados con el volumen correspondiente de vehículo, en muestras de las grasas citadas en cada gráfica. Las barras representan la media \pm desviación estándar de todas las muestras. *: $p < 0.05$.

En cuanto a los niveles de CIRP obtenidos por Western blotting, se pudo apreciar un patrón similar al análisis genético. En cualquiera de los tres tipos de grasas analizados, inguinal (p

= 0,024), escapular ($p = 0,020$) o epididimal ($p = 0,023$), había un aumento de CIRP en las muestras de animales controles hospedados a 22°C frente a los controles en termoneutralidad (Fig. 39).

Tanto el análisis genético como el de proteínas indican que los animales mantenidos en las condiciones estándar de temperatura del animalario tienen una respuesta basal al frío que puede suponer un problema a la hora de estudiar proteínas de respuesta al frío, como CIRP o RBM3, y su relación con la termogénesis.

2.2.2. RATAS EXPERIMENTALES

Ensayo piloto con distintas cepas de rata

A la hora de establecer un nuevo modelo animal para los experimentos posteriores, se quiso analizar la idoneidad de distintas cepas de ratas a nuestras condiciones experimentales. Para ello se estudiaron distintas estirpes de uso habitual en modelos de obesidad, de las cuales se seleccionaron tres cepas, Long Evans, Wistar Hanover y Fischer F344, para compararlas en un ensayo piloto. Las ventajas y los inconvenientes sopesados de cada cepa se resumen en la Tabla 11

Tabla 11. Tabla con las ventajas e inconvenientes de cada estirpe de rata

	Ventajas	Inconvenientes
Long Evans	<ul style="list-style-type: none"> • Tienen mucha grasa parda • Son buen modelo de DIO • Heterogeneidad genética: comportamiento similar a una población 	<ul style="list-style-type: none"> • Alcanzan un gran tamaño: necesario equipamiento adecuado para su mantenimiento • Heterogeneidad genética: mayor dispersión de datos
Wistar Hanover	<ul style="list-style-type: none"> • Muy bien caracterizadas para obesidad • Con dietas grasas derivan a diabetes (similar a humanos) • Heterogeneidad genética: comportamiento similar a una población 	<ul style="list-style-type: none"> • Individuos resistentes a DIO, hay que descartarlos previamente al estudio • Heterogeneidad genética: mayor dispersión de datos

Fischer
344

- Estirpe consanguínea: menos heterogeneidad genética → modelo más homogéneo

- Estirpe consanguínea: a partir de la semana 26 empiezan a desarrollar patologías derivadas de la consanguinidad
- Tienen activos los mecanismos de termogénesis.

Además de evaluar la conveniencia teórica, se quiso estudiar qué estirpe era la más adecuada para alcanzar los objetivos establecidos. Para ello se analizaron los niveles de CIRP de los distintos grupos de ratas a los 4 días de haberles inyectado intraperitonealmente 40 nmoles/Kg de zr17-2 o su volumen equivalente de suero fisiológico. Los datos obtenidos por Western blotting se resumen en la Fig. 40, donde se puede comprobar que no hay diferencias en los niveles de CIRP entre los animales tratados con zr17-2 y los controles en ninguna de las cepas.

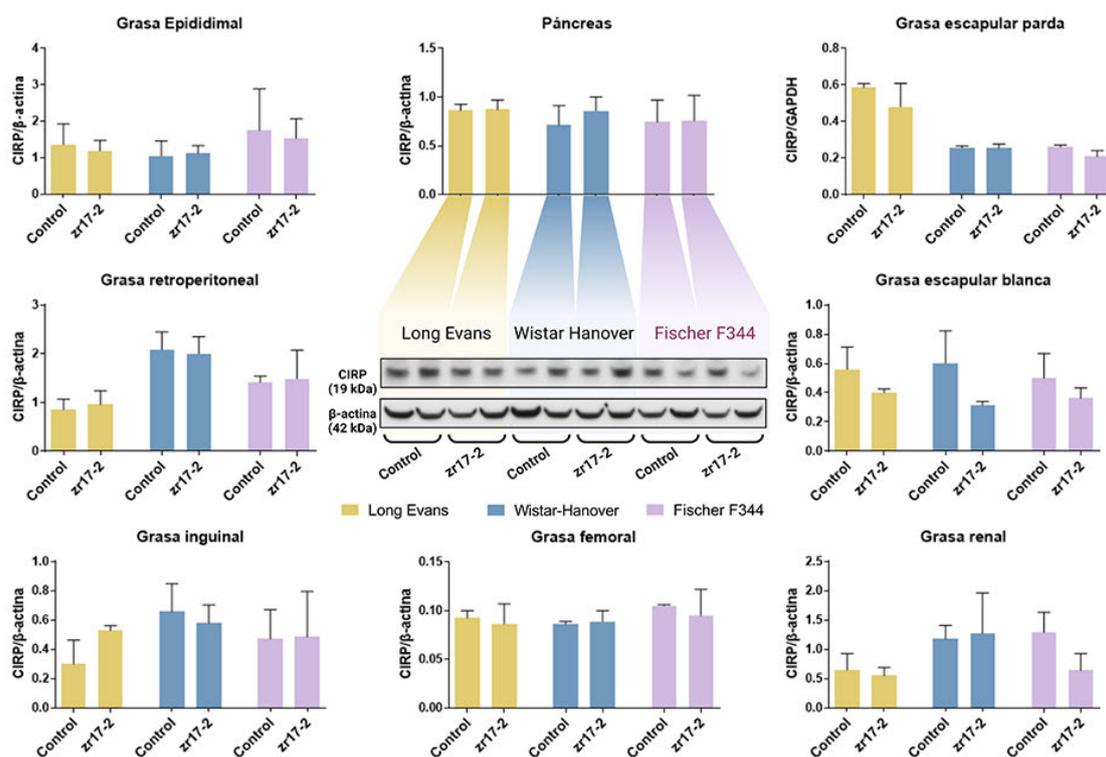


Figura 40. Western blotting de ratas Long Evans, Wistar Hanover y Fischer F344 trascurridos 4 días desde la inyección de 40 nmoles/Kg de zr17-2 o el volumen correspondiente de vehículo. Cada gráfica representa los niveles de CIRP obtenidos en el tejido citado, y en el centro se muestran las bandas de CIRP (19 kDa) y β-actina (42 kDa) de las muestras de páncreas como ejemplo representativo. Las barras representan la media ± desviación estándar de todas las muestras.

Evaluando las ventajas e inconvenientes de cada cepa, junto con la facilidad del manejo de los animales se decidió que la estirpe más adecuada para el estudio de DIO eran las ratas Wistar Hanover.

Experimento piloto de tratamiento a medio plazo y su efecto en los niveles de glucosa e insulina

Hasta este momento todos los ensayos relacionados con zr17-2 se habían realizado en periodos cortos de tiempo, así que se consideró oportuno hacer un estudio más largo con el fin de poder evaluar posibles efectos adversos de la SM y poder atajarlos desde el diseño del experimento DIO. Además, este estudio presentaba la oportunidad de poner a punto el protocolo de realización de la prueba de tolerancia a la glucosa que se emplearía en el ensayo final.

En este experimento piloto se mantuvieron 12 ratas durante 11 semanas, con dos inyecciones semanales de 40 nmoles/Kg de zr17-2 o su correspondiente volumen de vehículo. Tres semanas antes del sacrificio, en la semana 8, se les realizó un test de resistencia a la insulina (Fig. 41.A) sin que hubiese diferencias entre el grupo control y el tratado. Además, a las 10 semanas se realizó a los animales una prueba intraperitoneal de tolerancia a la glucosa (IPGTT), en el que se observó diferencias significativas en el pico de la curva de tolerancia a la glucosa entre ratas tratadas con la molécula y controles (Fig. 41.B).

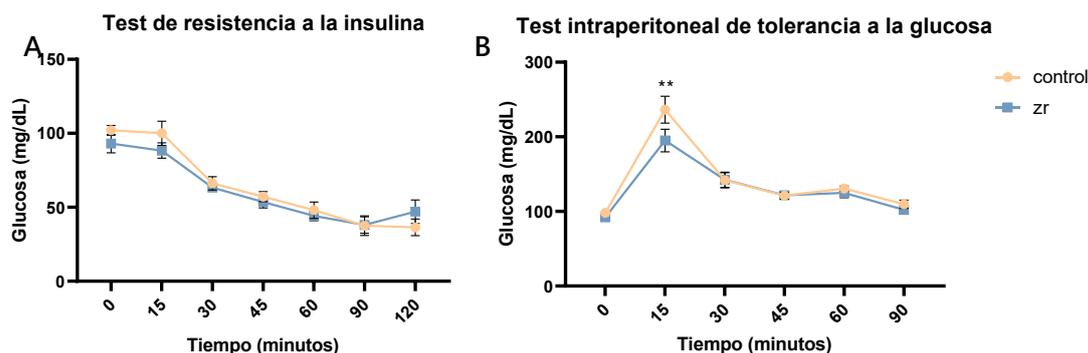


Figura 41. (A) Test de resistencia a la insulina en ratas macho de 20 semanas tras 4 días de la inyección de ZR17-2 o de vehículo (control). La medida de la glucosa correspondiente al tiempo 0 se realizó tras 6h de ayuno y antes de la inyección i.p. de 1 U/Kg de insulina, y se corresponde con los niveles de glucosa basal. Las medidas se realizaron hasta el comienzo de la recuperación de los niveles basales de glucosa en sangre. (B) Dos semanas más tarde se realizó la curva de tolerancia a la glucosa. En las condiciones de ayuno ya descritas antes de la inyección i.p. de glucosa (2,0 g/Kg). Los niveles de glucosa en sangre se midieron a los 15, 30, 45, 60 y se finalizó a los 90 minutos, cuando se había alcanzado de nuevo el nivel basal. Los puntos representan la media \pm desviación estándar de todas las muestras. **: $p < 0.01$.

Tras el sacrificio, se quisieron caracterizar los niveles de CIRP en tejido adiposo más en profundidad así que se analizó dicha proteína por Western blotting en grasa subcutánea, representada por los dos depósitos de grasa inguinal (superior e inferior), en grasa escapular blanca y parda y, por último, en grasa visceral con muestras de grasa epididimal, omental y renal, que son las más frecuentes en obesidad asociada al síndrome metabólico. De todas las muestras analizadas, únicamente se apreciaron diferencias significativas en los niveles

de CIRP correspondientes al depósito superior de grasa inguinal ($p= 0,016$), que disminuyeron en comparación con las de los animales control (Fig. 42).

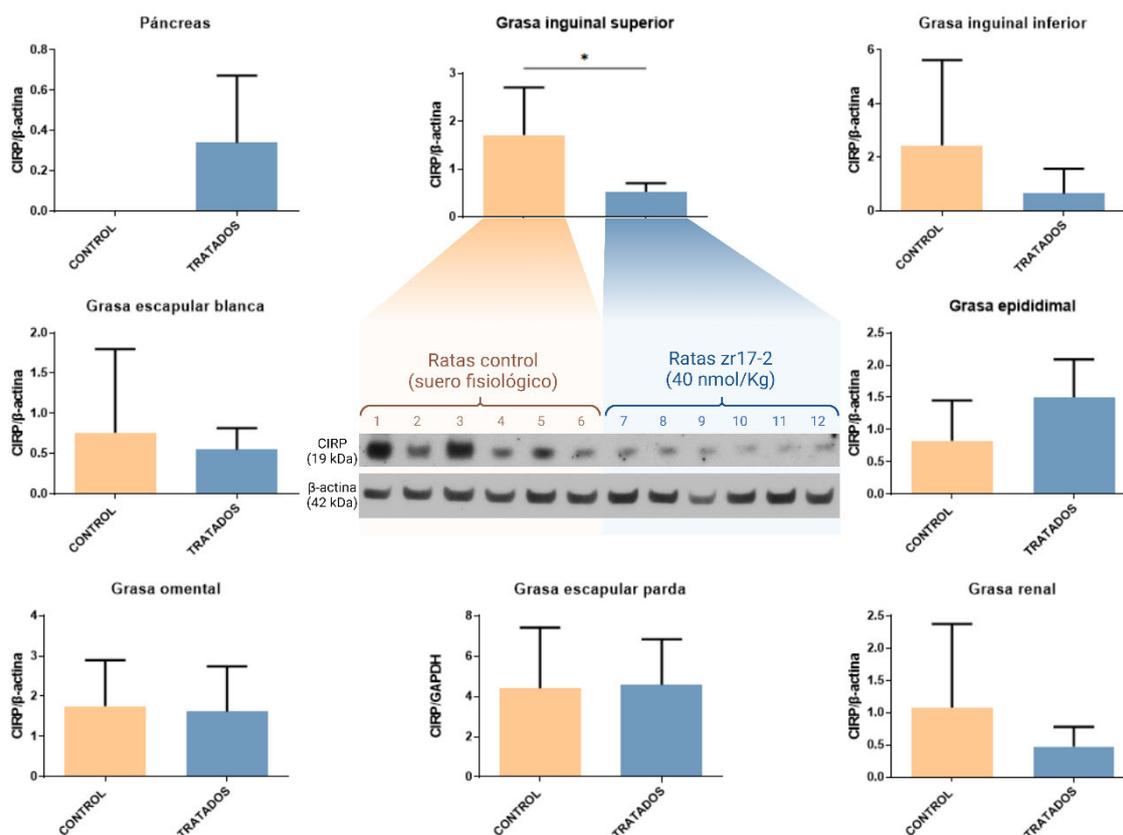
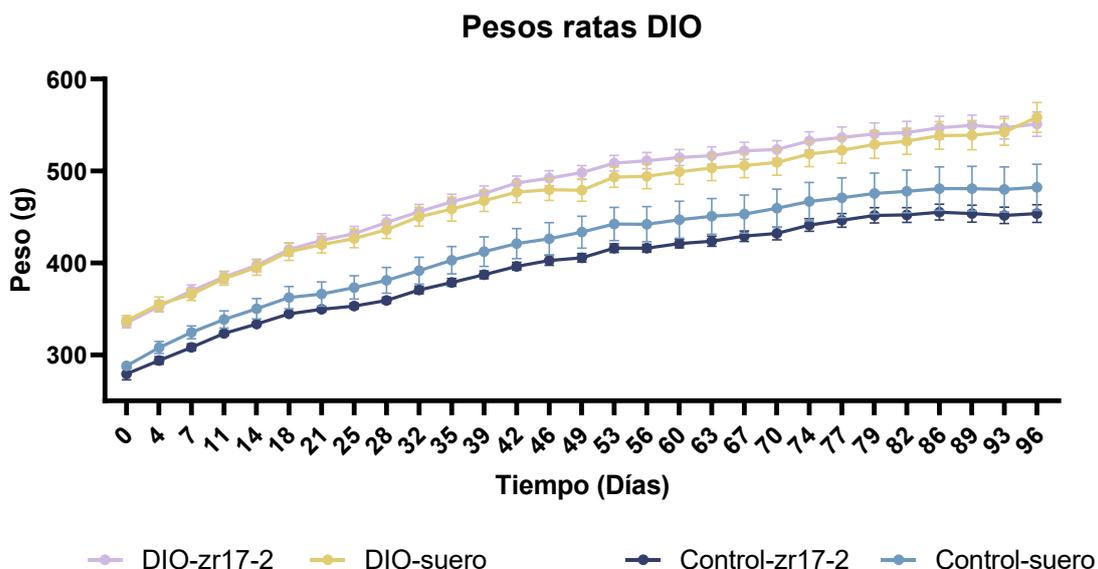


Figura 42. Western blotting de ratas de 23 semanas tratadas dos veces por semana con una inyección intraperitoneal de 40 nmoles/Kg de zr17-2 o el volumen correspondiente de vehículo durante 11 semanas. Cada gráfica representa los niveles de CIRP obtenidos en el tejido correspondiente, y en el centro se muestran las bandas de CIRP (19 kDa) y β -actina (42 kDa) del revelado del depósito superior de la grasa inguinal. Las barras representan la media \pm desviación estándar de todas las muestras. *: $p < 0.05$.

Experimentos de obesidad inducida por dieta alta en grasas (DIO)

En este experimento se mantuvieron 24 animales, inicialmente de 8 semanas, alimentados bien con pienso control (10% de las Kcal provenientes de grasa) o bien con pienso rico en grasas (45% de las Kcal provenientes de grasa) para fomentar la ganancia de peso. Además, a la mitad del grupo con cada dieta se les inoculó bisemanalmente 40 nmoles/Kg de zr17-2 o su correspondiente volumen de suero fisiológico. El tratamiento se realizó durante 16 semanas, en las que se registró el peso antes de cada inyección, que se resume en la Fig. 43. Tal y como se puede apreciar en dicha figura, el efecto de la dieta influye significativamente en la ganancia de peso de los animales, independientemente del tratamiento recibido.

Como la dieta rica en grasa es diabietogénica, a las 14 semanas del tratamiento se realizó un IPGTT a todos los animales con el fin de ver si había diferencias en la respuesta bien por la dieta o bien por el tratamiento con la SM. Las curvas de la glucosa están representadas en la Fig. 44, sin que se vean diferencias en la modulación de la curva ni por el efecto de la dieta ni por el del tratamiento.



Contraste	Significación	P-valor
Control-suero vs. Control-zr17-2	No ns	0,9519
Control-suero vs. DIO-suero	Yes *	0,0219
Control-zr17-2 vs. DIO-zr17-2	Yes **	0,0062
DIO-suero vs. DIO-zr17-2	No ns	0,9993

Figura 43. Evolución de los pesos de las ratas alimentadas con dieta rica en grasa (DIO) o con dieta normal (Control) a las que se inyectó zr17-2 a una concentración de 40 nmoles/Kg (zr17-2) o el volumen correspondiente de suero fisiológico (suero). En la tabla inferior se muestra el resumen del análisis estadístico de los datos con la significación asociada a cada comparación entre grupos. Los puntos representan la media ± desviación estándar de todas las muestras.

En el momento del sacrificio, se extrajo una muestra de sangre que se envió a analizar a un laboratorio externo. Los resultados resumidos se muestran en la Fig. 45. Como se puede ver, no hay modificaciones más allá de los patrones esperados propios de la dieta hipercalórica como es el aumento en las transaminasas, disminución del HDL-colesterol y aumento del LDL-colesterol. Sin embargo, llama la atención la bajada que se observa en los triglicéridos.

Test de tolerancia a la glucosa

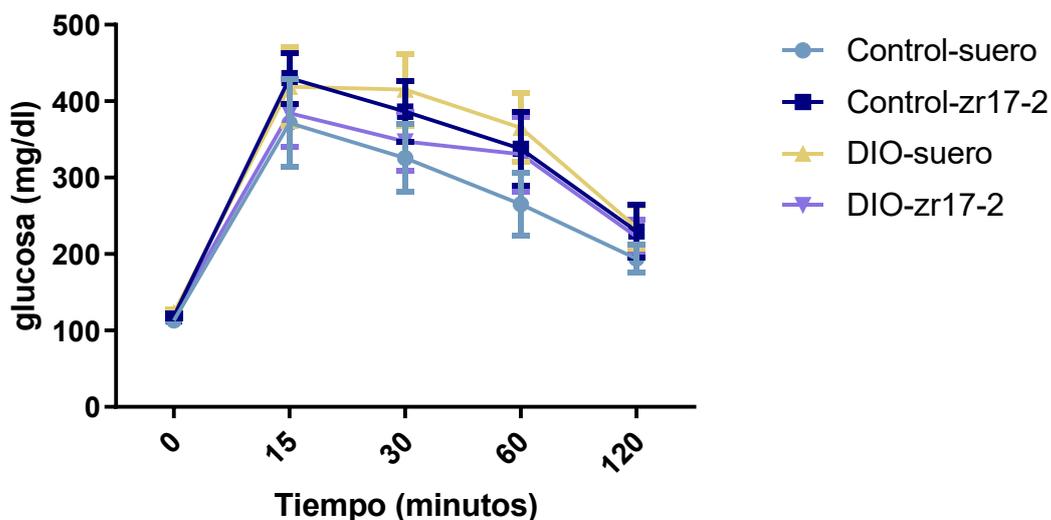


Figura 44. Test de tolerancia a la glucosa en ratas tras 14 semanas con dieta rica en grasa (grupo DIO) o dieta control (grupo control) junto con inyecciones bisemanales de 40 nmoles/Kg de zr17-2 (grupo zr17-2) o de suero fisiológico (grupo suero). La medida de la glucosa correspondiente al tiempo 0 se realizó tras 6h de ayuno y antes de la inyección i.p. de glucosa (1,0 g/Kg), y se corresponde con los niveles de glucosa basal. Las medidas de los niveles de glucosa en sangre se realizaron a los 15, 30, 45, 60 y se finalizó a los 120 minutos. Los puntos representan la media \pm desviación estándar de todas las muestras.

Posteriormente se estudiaron los niveles de CIRP en la grasa inguinal, escapular y epididimal (Fig. 46). Aunque no se observaron diferencias entre las ratas tratadas con zr17-2 respecto a los controles en la banda de CIRP de 19 KDa, nos llamó la atención una banda superior inmunorreactiva que otros autores describen como CIRP de 28 KDa³⁴⁶. Al analizar esta banda comprobamos que la dieta grasa aumentaba muy significativamente ($p < 0,0001$) los niveles del CIRP detectado a la altura de 28 KDa.

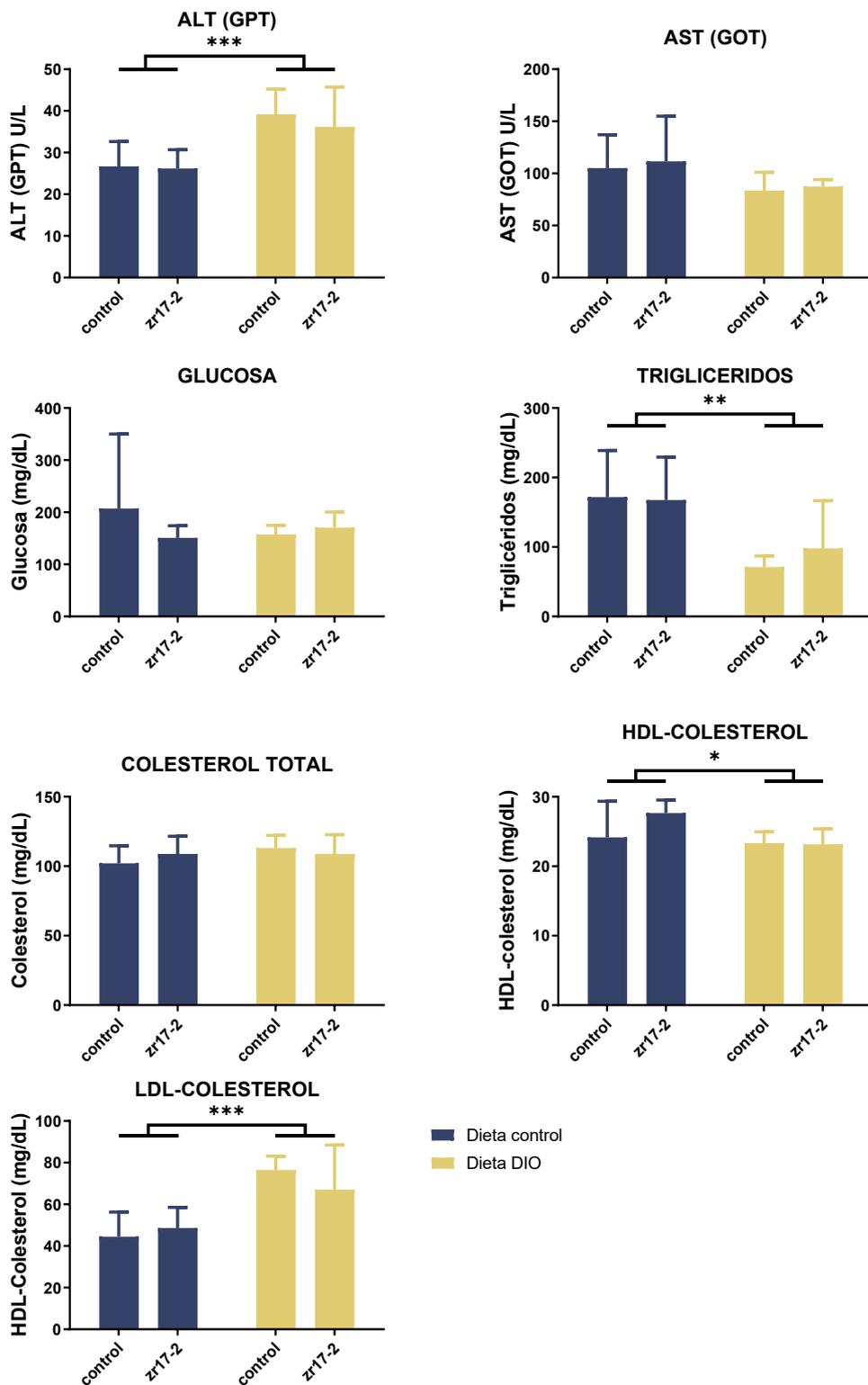


Figura 45. Resumen del análisis bioquímico de las ratas mantenidas con dieta rica en grasa (grupo DIO) o dieta control, tratadas dos veces por semana con 40 nmoles/Kg de zr17-2 (grupo zr17-2) o de suero fisiológico (grupo suero). Las siglas ALT (GPT) y AST (GOT) se refieren a las transaminasas alanina aminotransferasa (glutámico pirúvico transaminasa) y a la aspartato aminotransferasa (transaminasa glutámico-oxalacética) respectivamente, y los colesteroles HDL y LDL a los de alta y baja densidad, en ese orden. Las barras representan la media \pm desviación estándar de todas las muestras. *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$.

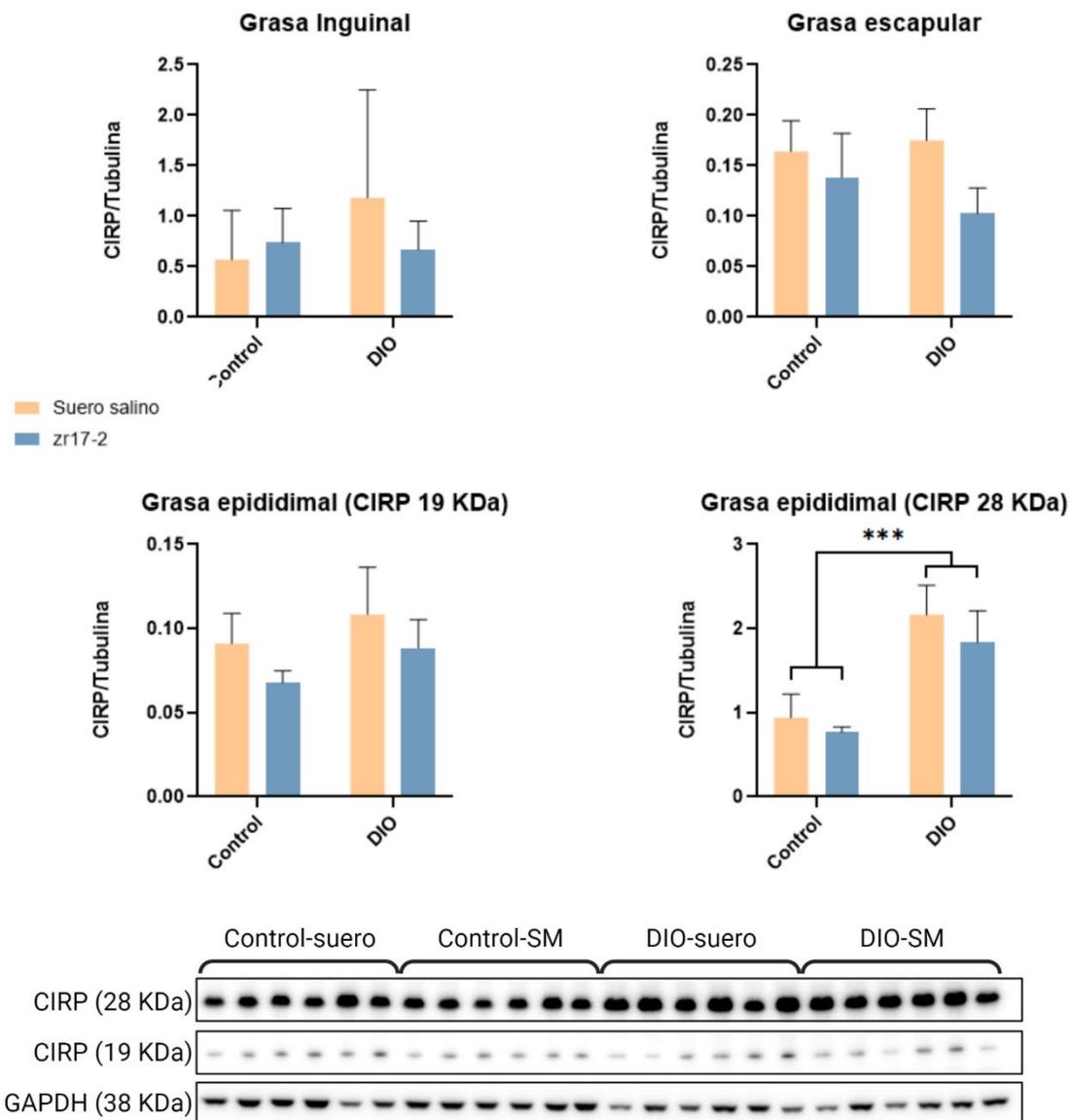


Figura 46. Western blotting de distintos depósitos de grasa de ratas mantenidas con dieta grasa (DIO) o dieta control (control) durante 3 meses, con inyecciones bisemanales de 40 nmoles/Kg de zr17-2 o el volumen correspondiente de suero. Cada gráfica representa los niveles de CIRP obtenidos en el tejido citado. Las barras representan la media \pm desviación estándar de todas las muestras. Las barras representan la media \pm desviación estándar de todas las muestras. ***: $p < 0.001$.

2.3. EXPERIMENTOS EX VIVO

Otro de los objetivos de esta tesis era estudiar el efecto de la SM en adipocitos humanos, para ello se estableció una colaboración con el equipo de Cirugía del hospital San Pedro con la que se obtuvo grasa perirrenal y del hilio renal de nefrectomías de tres pacientes (hPA 1, 2 y 3). De ahí se extrajeron células madre mesenquimales que se diferenciaron hasta

adipocitos maduros en presencia de zr17-2 en una concentración de 10 μ M o del mismo volumen de vehículo.

Tras 15 días desde el comienzo de la diferenciación, se recogieron las muestras de los adipocitos y se analizaron a través de una batería de genes relacionados con la adipogénesis (PGC1 α , PPAR γ , CIDEA y PRDM16), y la termogénesis (UCP1 y DIO2), así como RBM3 y CIRP (Fig. 47). Y, de forma similar a lo que se vio en adipocitos 3T3-L1, no se apreciaron diferencias significativas de ninguno de los genes estudiados.

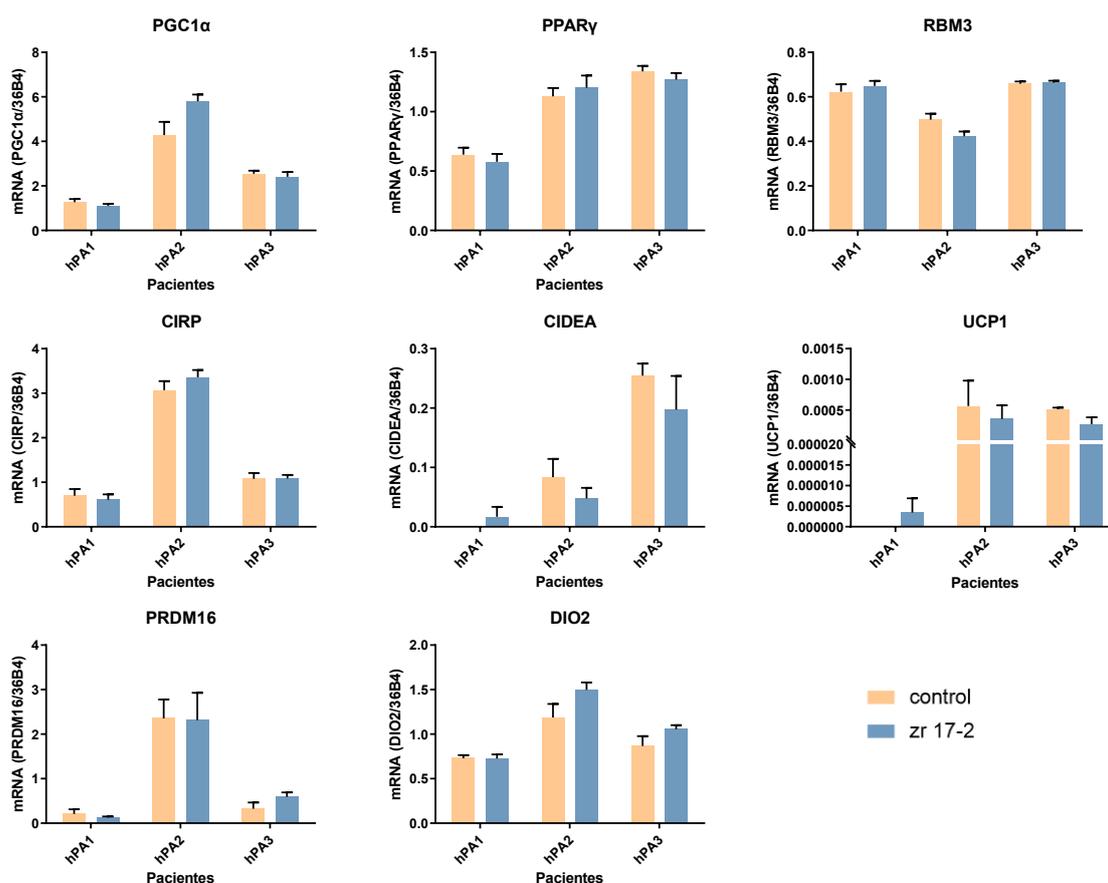


Figura 47. Expresión de los genes citados en cada gráfica en adipocitos maduros diferenciados de cultivos primarios humanos de tres pacientes (hPA1, 2 y 3). Desde el momento que se inició la diferenciación se comenzó a añadir zr17-2 en una concentración de 10 μ M en cada cambio de medio en las células tratadas, o su equivalente de vehículo en el caso de las células control. Las células se recogieron 15 días tras el inicio de la diferenciación, momento en el que se consideran adipocitos maduros. Las barras representan la media \pm desviación estándar de todas las muestras

Además de la expresión génica, se pudieron analizar los niveles de CIRP en los adipocitos a través de Western blotting. Ni en el caso de las muestras de grasa perirrenal, ni en las de la grasa del hilio renal se pudieron apreciar diferencias en los niveles de la proteína (Fig. 48). Esto puede ser debido a una aclimatación o a que en un ensayo tan largo se haya

normalizado el efecto en el momento de la toma de muestras. Aunque vista la capacidad celular de aclimatarse a la hipotermia moderada, y teniendo en cuenta la velocidad de respuesta de la célula y de recuperación del estado basal que se ha visto en otros experimentos, lo más probable es que sea un poco de ambas.

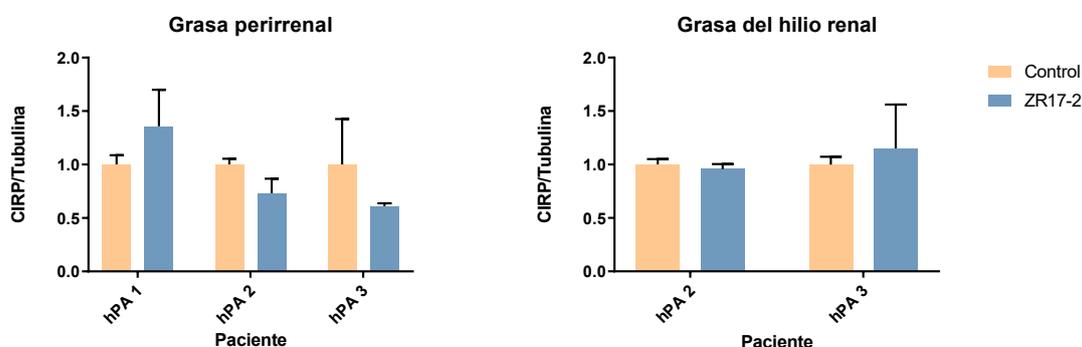


Figura 48. Wester blotting de muestras derivadas de cultivo primario de adipocitos humanos (hPA1, 2 y 3) tratadas con zr17-2 (10 μ M) o tratadas con vehículo, en grasa perirrenal y grasa del hilio renal. Las barras representan la media \pm desviación estándar de todas las muestras.

Finalmente, se quiso estudiar el efecto en la morfología de las vesículas analizando imágenes de microscopía de los adipocitos maduros para cuantificar el número y tamaño de las vesículas por cada célula (Fig. 49.A). Como se puede observar en la gráfica, en todos los pacientes disminuyó muy significativamente el tamaño de las vesículas tanto en los adipocitos diferenciados a partir de grasa perirrenal como del hilio renal (Fig. 49.B). Además, si se analiza la densidad de vesículas por célula, se ve que en el paciente 1 esta se ha incrementado significativamente ($p=0.037$) en las muestras derivadas de grasa perirrenal, y lo mismo sucede en las de hilio renal en el caso del paciente 3 (Fig. 49.C). El conjunto de ambos resultados podría indicar una pardificación de los adipocitos humanos por el efecto de zr17-2. Y, de nuevo, tal como había sucedido con los adipocitos 3T3-L1, parece haber una respuesta fisiológica pese a que no se ha llegado a ver aún la respuesta molecular.

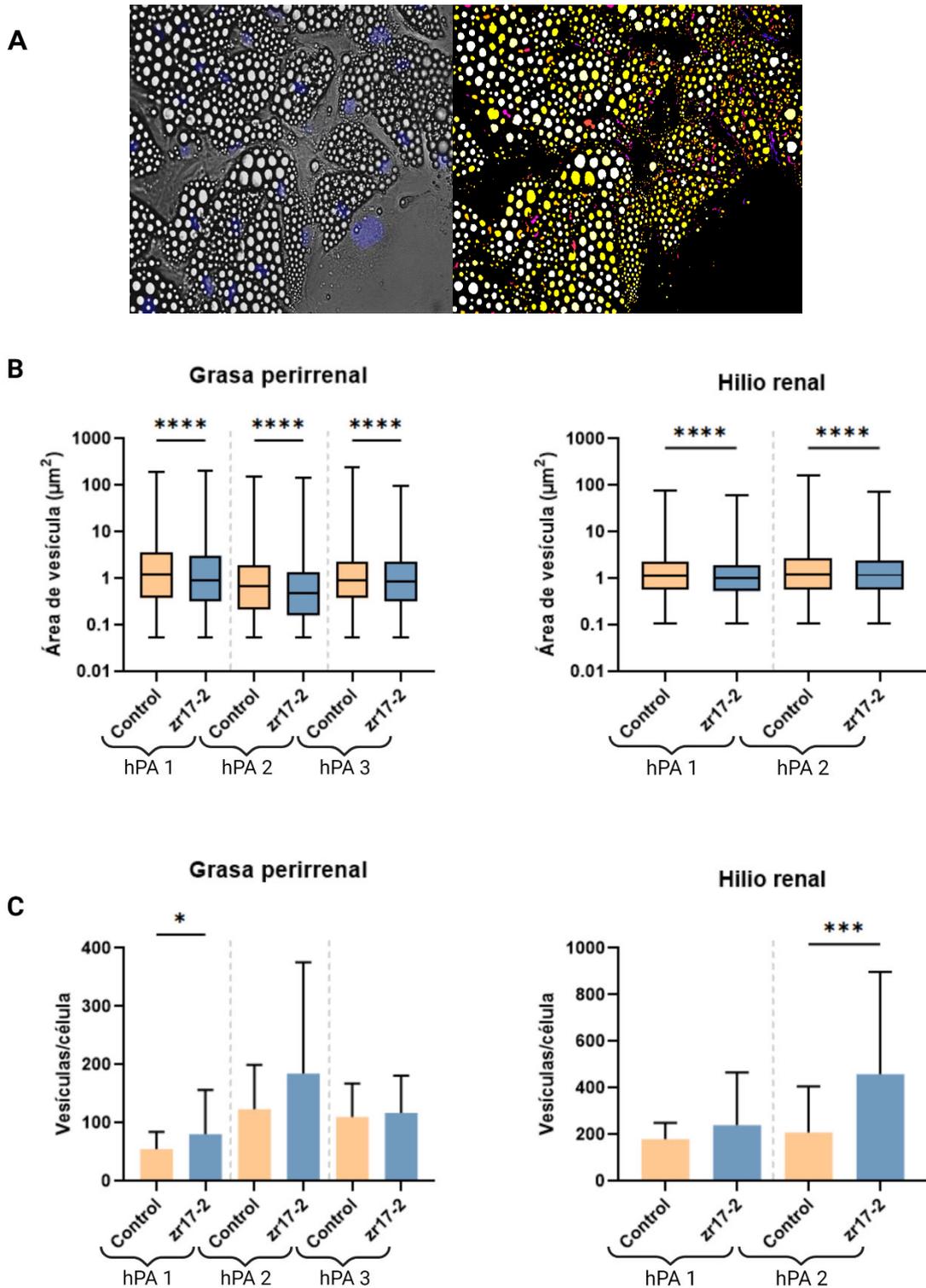


Figura 49. (A) Imagen de las vesículas lipídicas de los adipocitos en contraste de fases, con los núcleos marcados en azul. A la derecha se muestra un ejemplo de la máscara del módulo de análisis de partículas que selecciona las vesículas en función de criterios de área y circularidad que correspondería a la imagen (A). (B) Gráficas que muestran el área por vesículas y (C) la densidad de las vesículas de los adipocitos derivados de la grasa perirrenal y del hilio renal según el tratamiento con zr17-2 o vehículo para cada uno de los tres pacientes, codificados como hPA 1, 2 y 3. Las barras representan la media \pm desviación estándar de todas las muestras. *: $p < 0.05$; ***: $p < 0.001$; ****: $p < 0.0001$.

3. CILIO PRIMARIO

3.1. CILIO PRIMARIO E HIPOTERMIA

Para investigar los posibles mecanismos de captación del frío, se estudiaron diversos sensores celulares, entre ellos los cilios primarios. Cuando se evaluó la localización de las proteínas de respuesta a frío por inmunofluorescencia se observó que, tanto en normotermia (37°C) como en hipotermia (32°C), CIRP (Fig. 51) y RBM3 (Fig. 52) colocalizaban con el cuerpo basal de los cilios primarios. Sin embargo, a 32°C había una reducción significativa ($p=0,047$) en el porcentaje de células ciliadas (Fig. 50), así como un acortamiento de la longitud del cilio primario ($p<0,0001$).

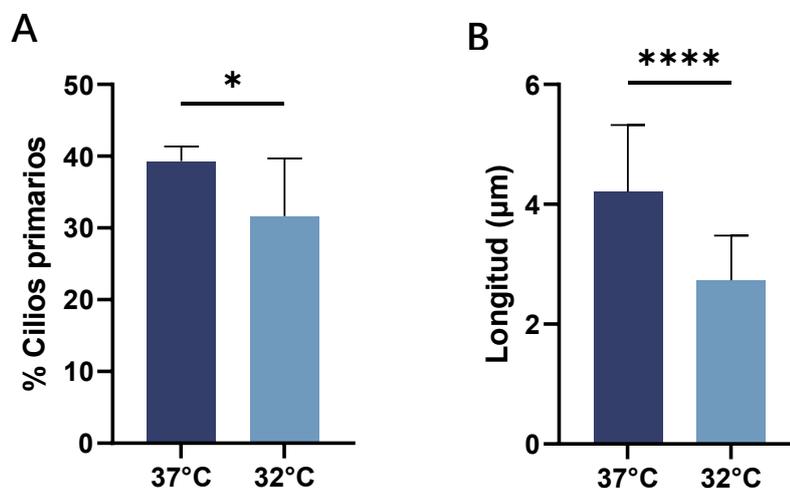


Figura 50. Representación gráfica del porcentaje de células ciliadas (A) y de la largura de los cilios primarios (B) según la temperatura. Las barras representan la media \pm desviación estándar de todas las muestras. *: $p<0.05$; ****: $p<0.0001$.

Además, se pudo comprobar que, durante las distintas fases de la mitosis, la señal de CIRP (Fig. 53) y RBM3 (Fig. 54) seguía colocalizando con el centrosoma.

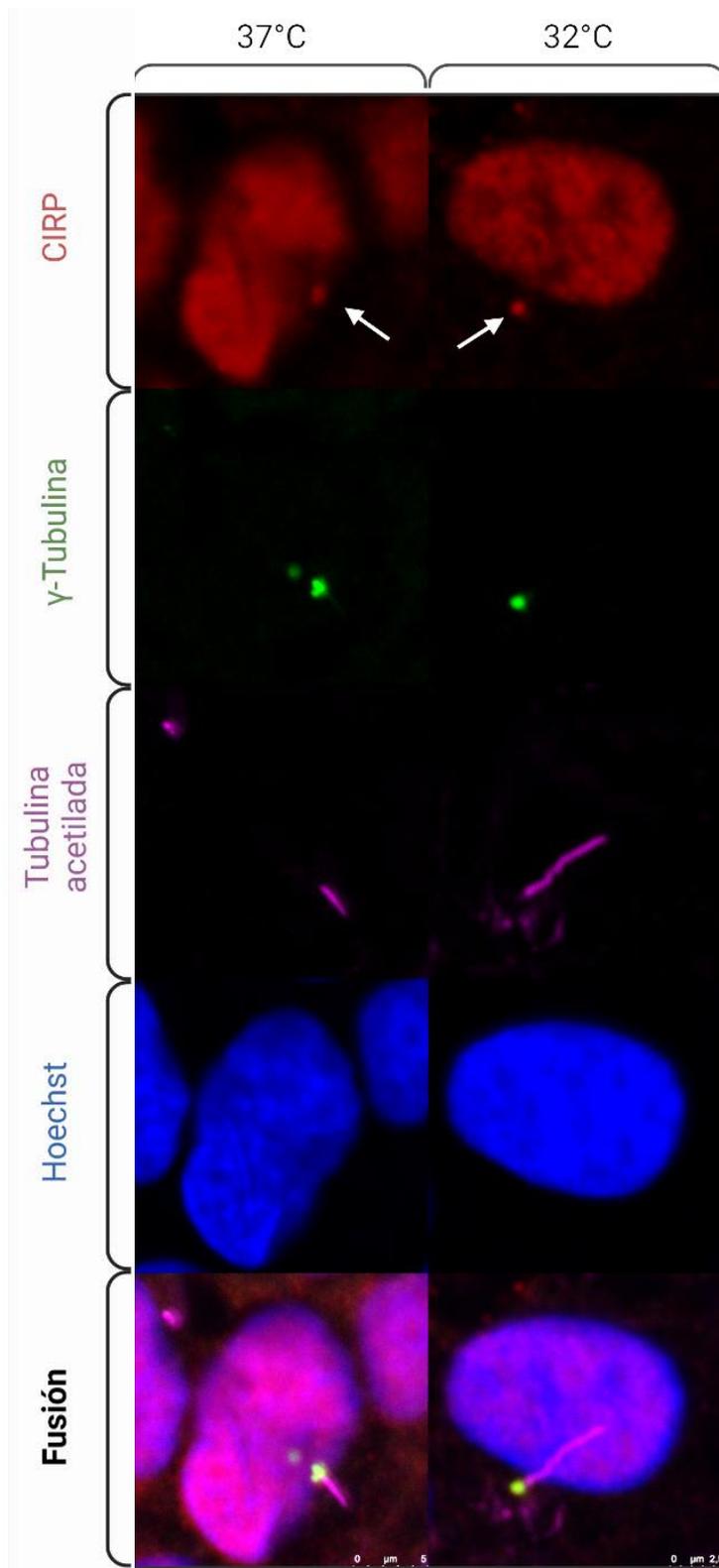


Figura 51. Imagen de microscopía confocal de la inmunofluorescencia de CIRC de células en normotermia (37°C) y en hipotermia (32°C). El cuerpo basal del centriolo se marca en verde con el anticuerpo de γ -tubulina, mientras que el axonema, con la tubulina acetilada, está representado en morado, y el núcleo en azul con Hoechst. Las flechas blancas señalan la colocalización de CIRC con el cuerpo basal.

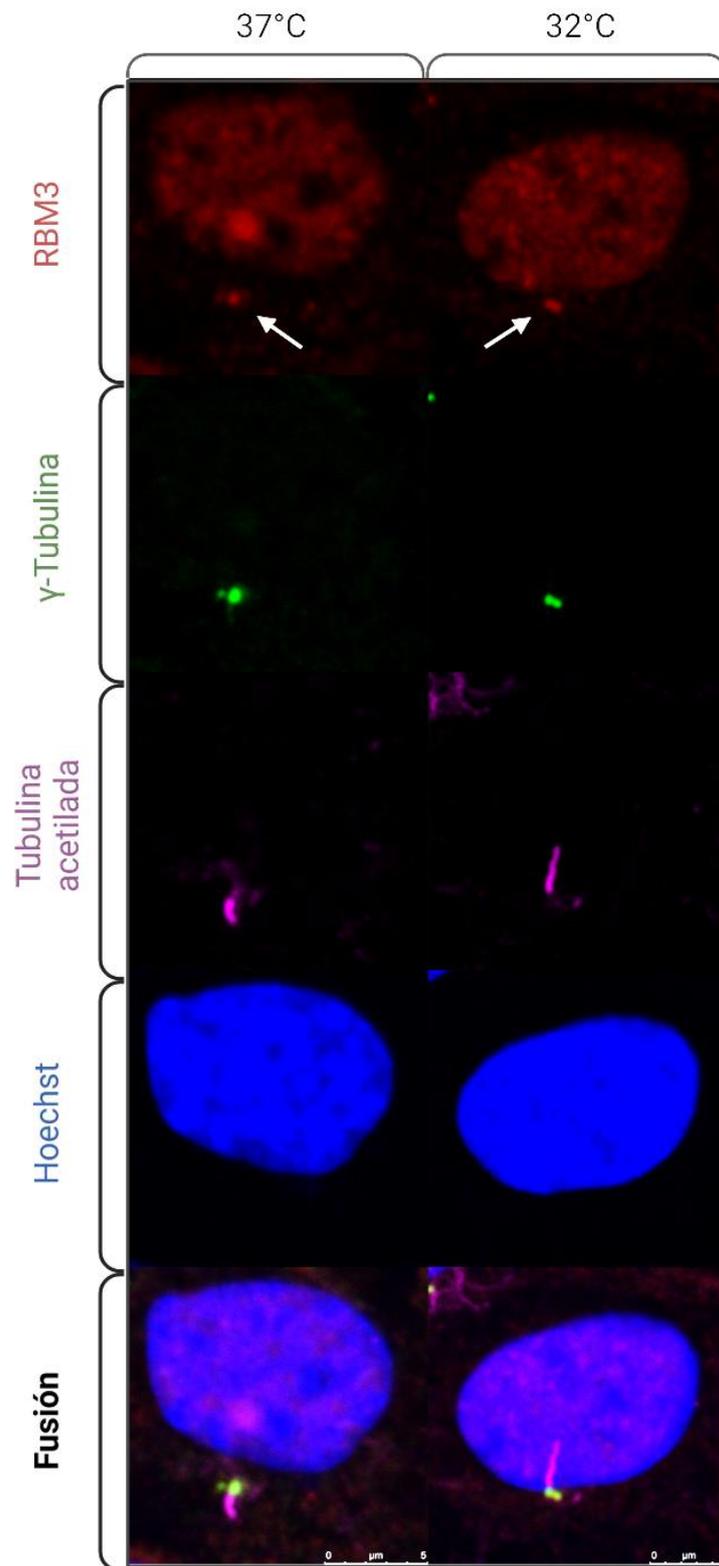


Figura 52. Imagen de microscopía confocal de la inmunofluorescencia de RBM3 de células en normotermia (37°C) y en hipotermia (32°C). El cuerpo basal del centriolo se marca en verde con el anticuerpo de γ -tubulina, mientras que el axonema, con la tubulina acetilada, está representado en morado, y el núcleo en azul con Hoechst. Las flechas blancas señalan la colocalización RBM3 con el cuerpo basal.

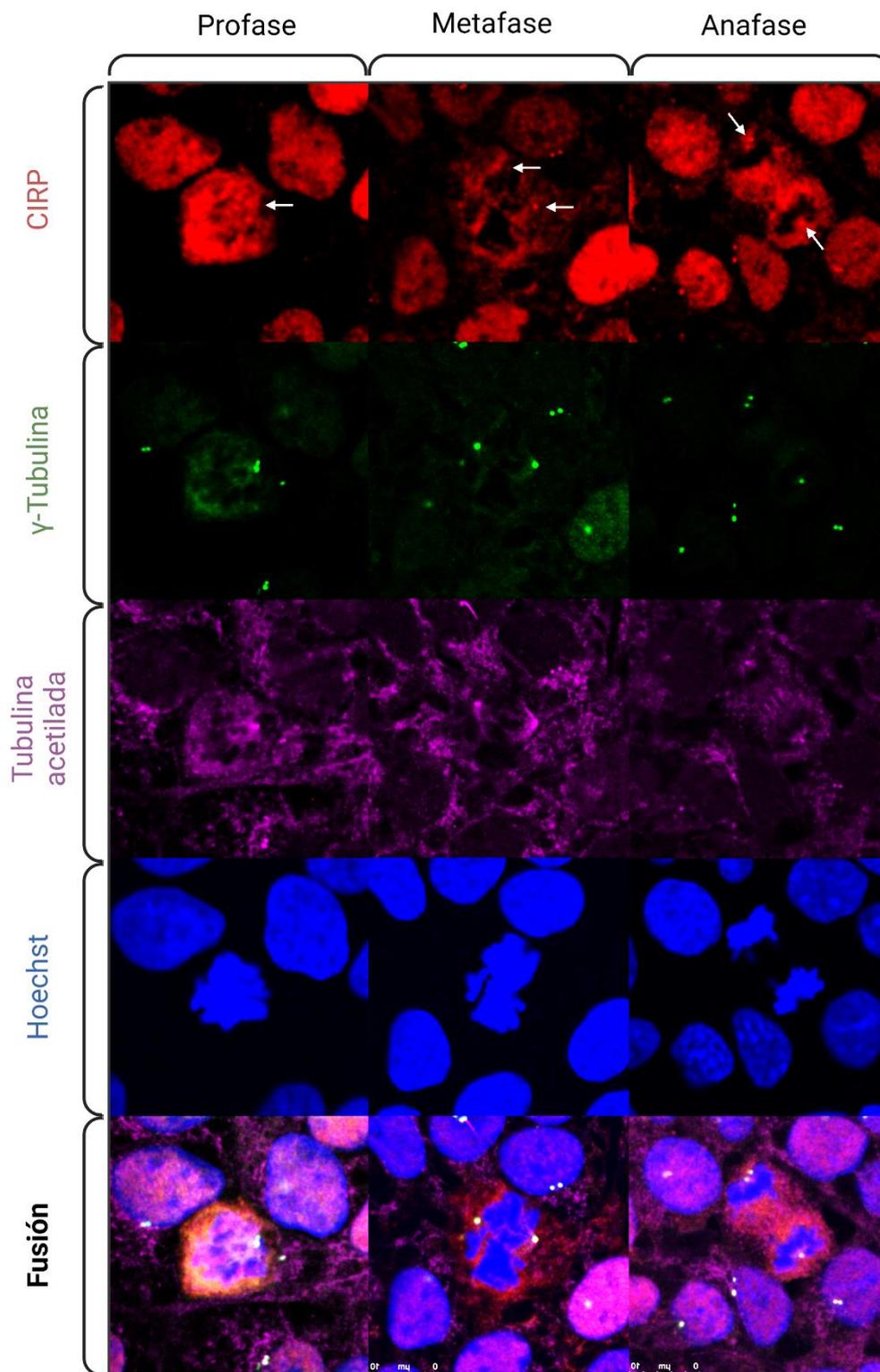


Figura 53. Localización de CIRP durante las fases de la mitosis obtenida con microscopia confocal. En verde se marca el centrosoma, el axonema en morado y el núcleo en azul. Las flechas marcan la colocalización de CIRP con el cuerpo basal

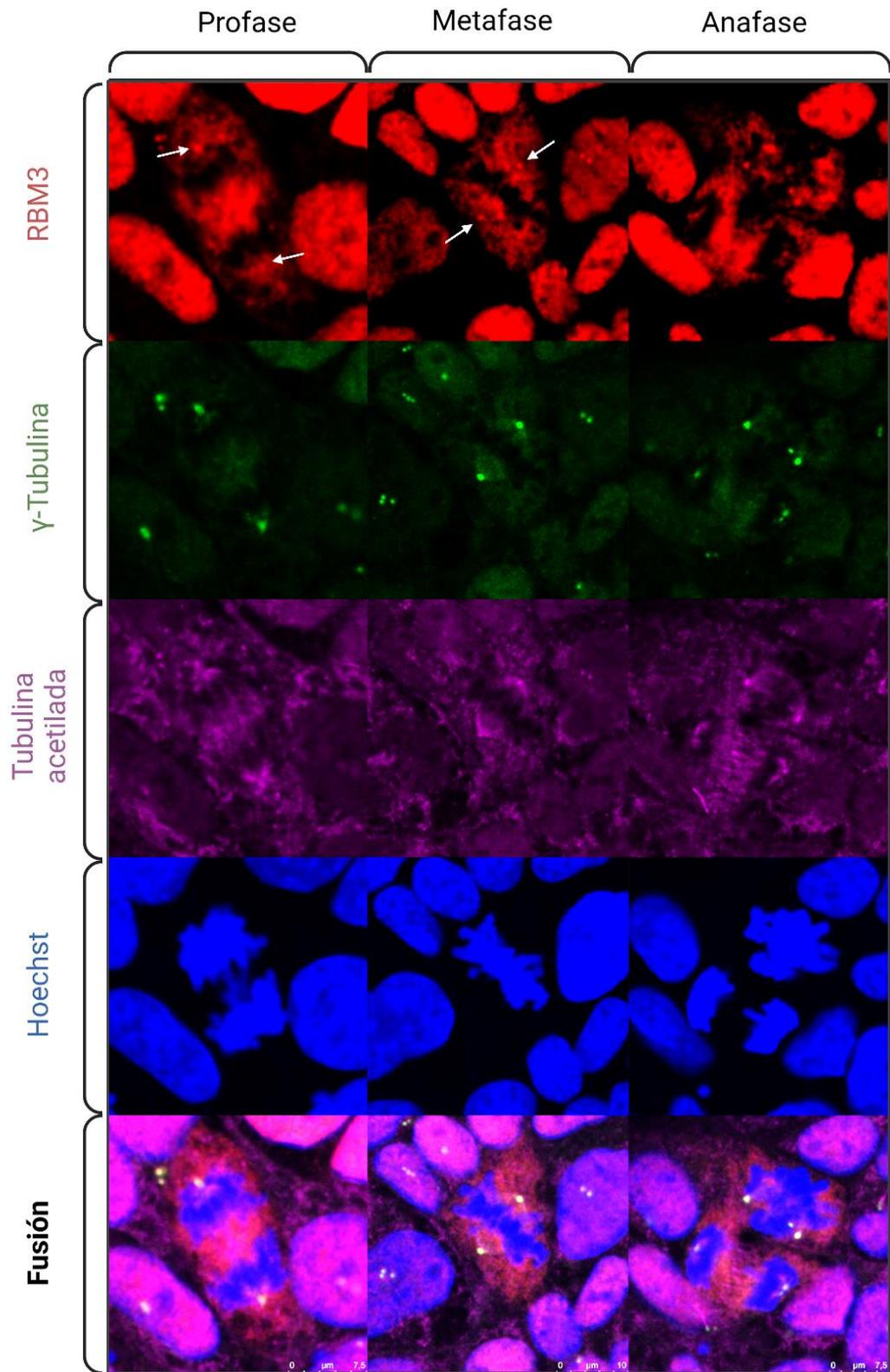
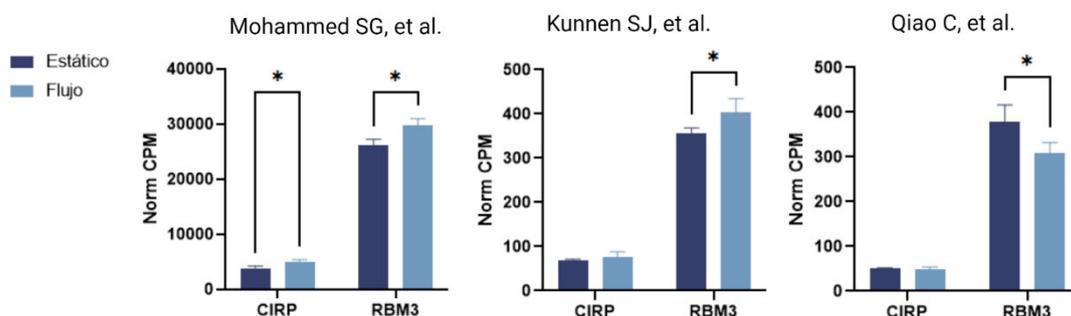


Figura 54. Localización de CIRP durante las fases de la mitosis obtenida con microscopia confocal. En verde se marca el centrosoma, el axonema en morado y el núcleo en azul. Las flechas marcan la colocalización de RBM3 con el cuerpo basal

3.2. EXPERIMENTOS DE FLUJO

Minería de datos

Uno de los papeles más estudiados del cilio primario está ligado a la respuesta al flujo, por su capacidad de actuar como mecanosensor³⁴⁷. Dado que no había estudios específicos referidos al papel de CIRP en el cilio primario en situaciones de flujo, se hizo un trabajo previo de minería de datos. En él se analizaron datos de secuenciación de RNA de trabajos que tuvieran células sometidas a flujo, ya fuera laminar u oscilante, que contuvieran CIRP y RBM3 entre sus datos, que estuvieran disponibles para su acceso y que no hubiesen sido analizados por sus autores. Hubo tres artículos que cumplían estos requisitos y que están resumidos en la Figura 55.



Tipo de flujo	Flujo laminar	Flujo laminar	Flujo oscilante
Presión	0,6 dyn/cm ²	1,9 dyn/cm ²	5 dyn/cm ²
Tiempo	3 h	6 h	24 h
Tipo celular	Células del tubo colector renal (IMCD3)	Células del epitelio tubular proximal (PTEC)	Células del epitelio tubular proximal (PTEC)
Trabajo	Mohammed SG, et al ³⁴⁸	Kunnen SJ, et al ³⁴⁹	Qiao C, et al ³⁵⁰

Figura 55. Análisis de la expresión de CIRP y RBM3 a partir de datos publicados de RNAseq. En la gráfica de cada trabajo se resume el resultado de la comparación entre la expresión de CIRP y RBM3 de células estáticas frente a las sometidas a flujo, mientras que en cada columna se resume las condiciones del experimento de flujo de cada ensayo. Las barras representan la media ± desviación estándar de todas las muestras. *: p<0.05

El análisis de los distintos trabajos de secuenciación de células expuestas al flujo muestra que la expresión de CIRP y RBM3 se puede ver modificada con esta condición experimental. En el trabajo de Kunnen y colaboradores sometieron a las células PTEC a un flujo laminar

durante 6 horas que se tradujo en una presión lineal bastante elevada, 1,9 dyn/cm², que aumentó la expresión de RBM3 ($p = 0,031$) pero no de CIRP. Ese mismo tipo celular fue utilizado también en el trabajo de Qiao y colaboradores, donde una presión lineal elevada (5 dyn/cm²) durante 24 horas generada por un flujo oscilante provocó el efecto contrario en la expresión de RBM3 ($p = 0,022$), aunque CIRP se mantuvo estable. No sucedió lo mismo en el caso del trabajo de Mohammed y colaboradores, donde un menor tiempo de exposición y una presión lineal más suave, 3 horas y 0,6 dyn/cm², sí que se tradujo en un aumento de la expresión tanto de CIRP ($p = 0,015$) como de RBM3 ($p = 0,016$) en células IMCD3.

En resumen, parece haber una relación entre el tipo de flujo y la respuesta de la expresión de las dos proteínas de respuesta a frío. En el caso de CIRP parece responder únicamente en flujo laminar suave (0,6 dyn/cm²) y cuando se analiza tras un tiempo de exposición más corto (3 horas). Sin embargo, RBM3 aumenta con flujo laminar y disminuye con flujo oscilante y, además, no parece haber variaciones según el tipo celular o el tiempo.

Flujo Laminar

Los ensayos analizados por minería de datos eran muy heterogéneos entre ellos, pero sí que se veía movimiento en los niveles de CIRP y RBM3 en al menos una condición para el primer gen y en todas para el segundo. Por tanto, se decidió profundizar en el estudio de la respuesta de CIRP y RBM3 ante el estrés de cizalla producido por el flujo.

Primero, se quiso determinar la localización de CIRP y RBM3 en las células R28 sometidas a distintos flujos laminares dentro de los chips, que se analizaron por inmunofluorescencia. Para averiguar si su localización se correlacionaba con el cilio primario, se marcaron simultáneamente la γ -tubulina del cuerpo basal en verde y la tubulina acetilada del axonema en rosa. En la Fig. 56 se muestra un ejemplo representativo de la inmunofluorescencia del chip sometido a un flujo de 62 μ L/min frente al chip estático, en ella se puede observar una acumulación de CIRP colocalizando con el centrosoma en células sometidas a flujo que no se aprecia en las células estáticas. En esas mismas condiciones RBM3 parece acumularse también en el centrosoma tanto de las células estáticas como de las sometidas a flujo, aunque el marcaje parecía más intenso en estas últimas (Fig. 57).

Además, en la cuantificación de la cantidad de células ciliadas en todas las muestras, estáticas y con los distintos flujos, y se observó que había una disminución del porcentaje en todas las muestras con flujo excepto en la de 124 μ L/min (Fig. 58). En este flujo, equivalente a una presión lineal de 2 dinas/cm², parece que había una recuperación del porcentaje de cilios primarios que se asemejaba al control estático.

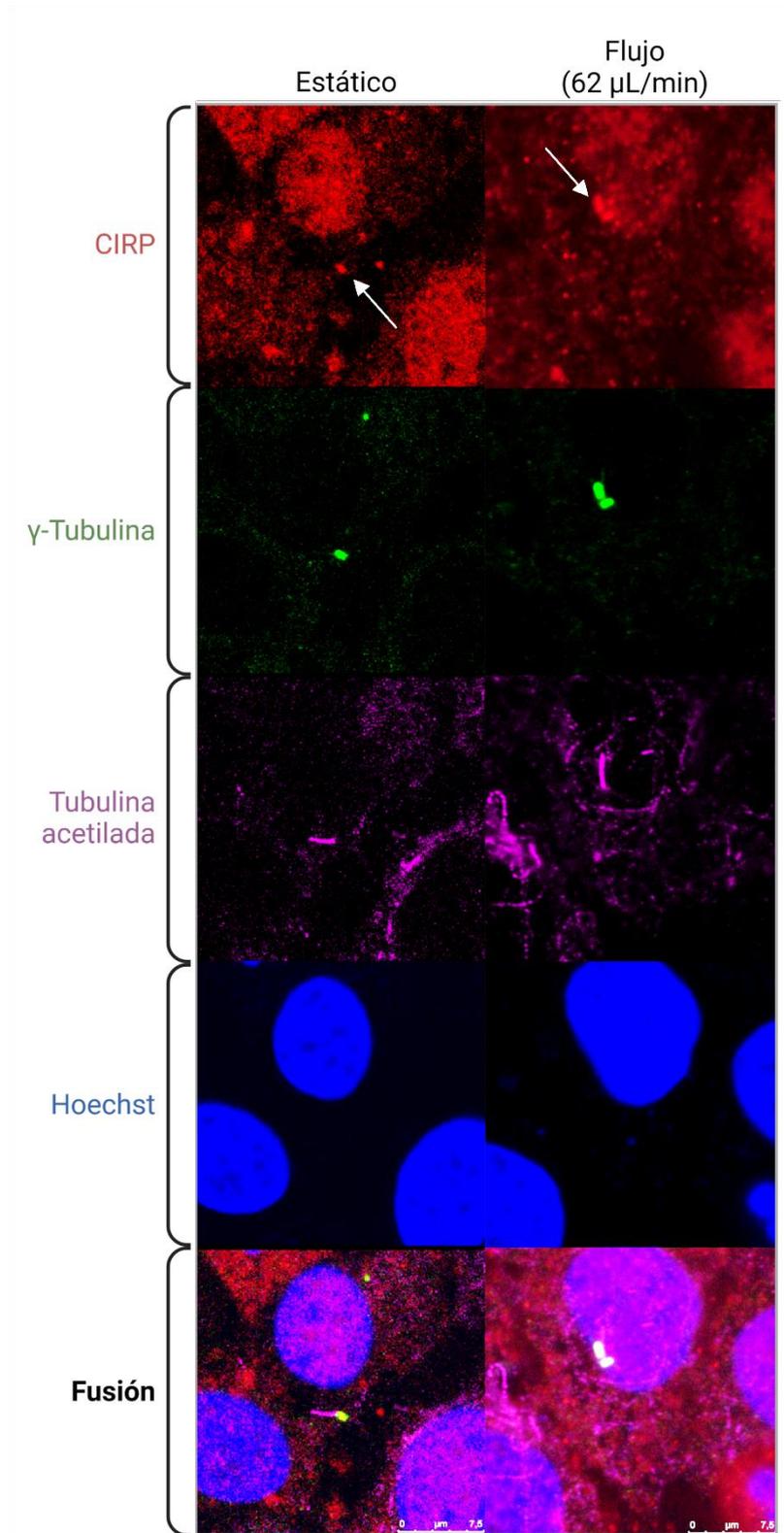


Figura 56. Imagen representativa de fluorescencia de células R28 sometidas a un flujo laminar de 62 $\mu\text{L}/\text{min}$ durante 8 horas o estáticas, donde está marcado el núcleo en azul, el centrosoma en verde, CIRP 10209-2-AP de Proteintech en rojo y el axonema en morado. Las flechas señalan la presencia de CIRP en el centriolo.

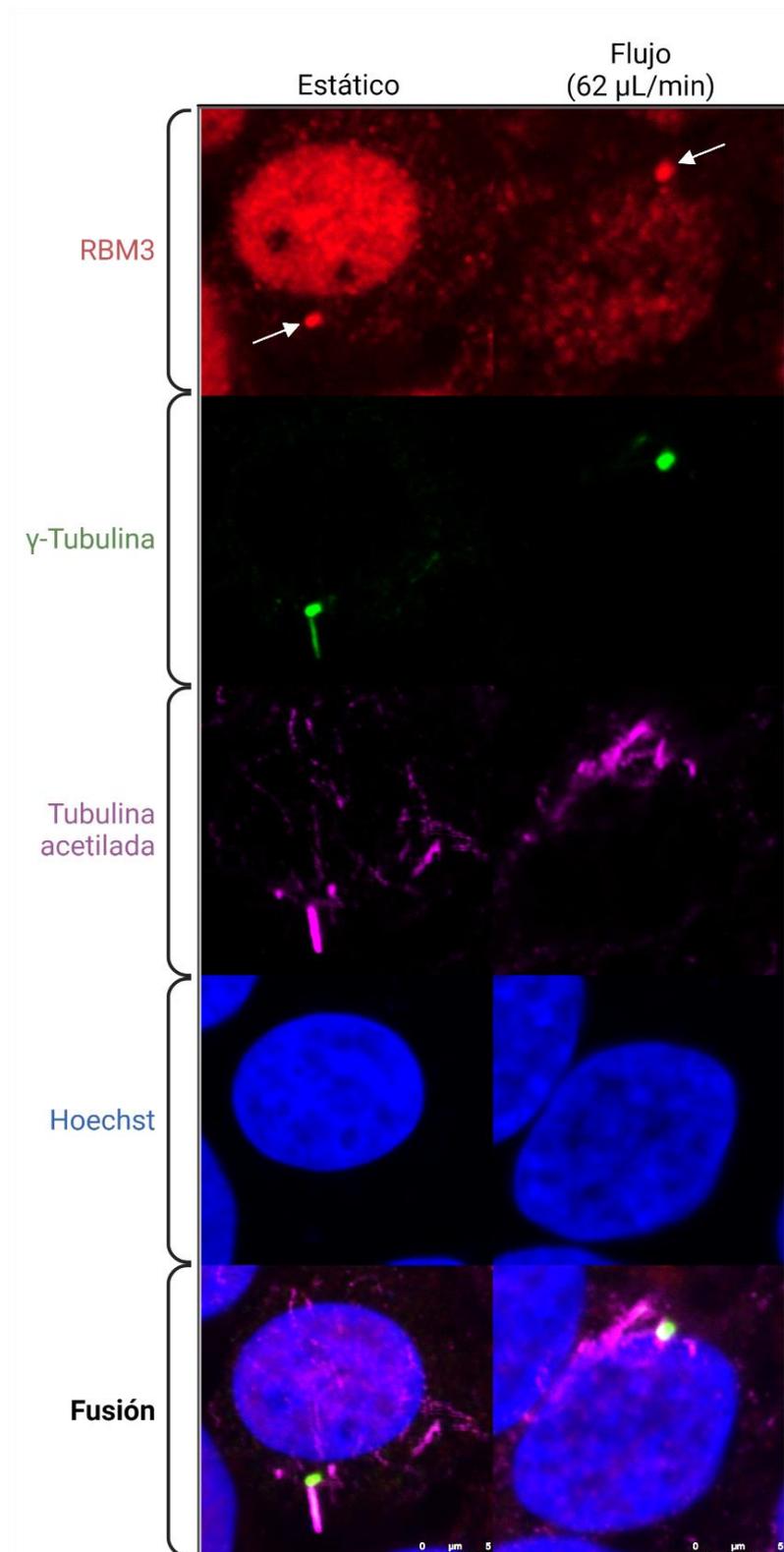


Figura 57. Imagen representativa de fluorescencia de células R28 sometidas a un flujo laminar de 62 $\mu\text{L}/\text{min}$ durante 8 horas o estáticas, donde está marcado el núcleo en azul, el centrosoma en verde, RBM3 en rojo y el axonema en morado. Las flechas señalan la presencia de RBM3 en el centriolo.

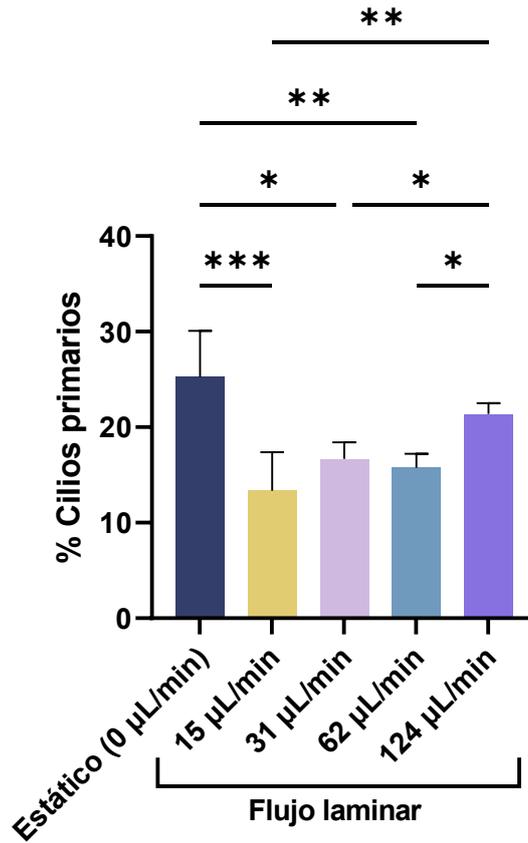


Figura 58. Porcentaje de células ciliadas en las condiciones de flujo laminar o estáticas descritas. Las barras representan la media \pm desviación estándar de todas las muestras. *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.0001$

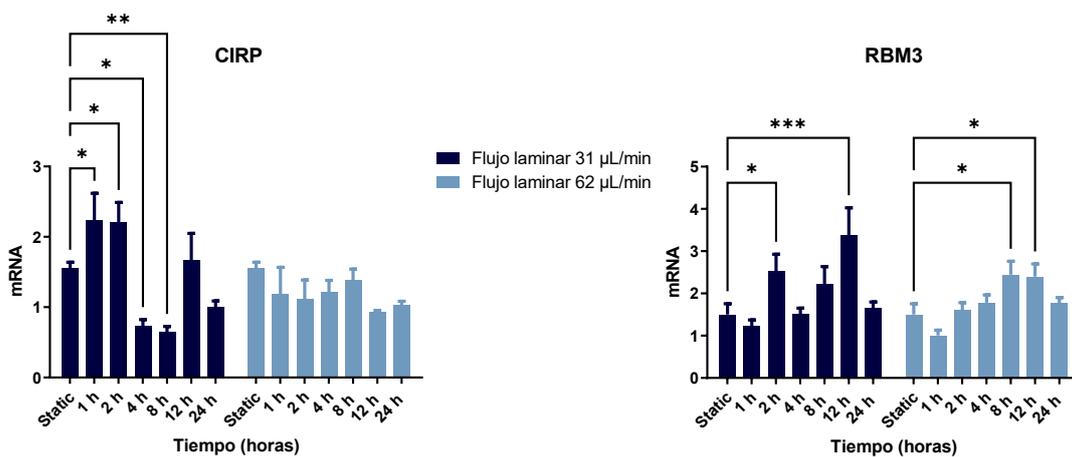


Figura 59. Expresión de mRNA de CIRP y RBM3 en células R28 expuestas (o no) a flujo laminar a lo largo del tiempo. Las barras representan la media \pm desviación estándar de todas las muestras. *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$

En segundo lugar, se quiso profundizar en la cinética de expresión de mRNA de ambos genes en el tiempo, analizando la expresión de CIRP y RBM3 en células R28 estáticas y sometidas a flujo lineal de 31 $\mu\text{L}/\text{min}$ o 62 $\mu\text{L}/\text{min}$ durante 1, 2, 4, 8 y 12 horas por RT-qPCR (Fig 59).

La expresión de mRNA de CIRP y RBM3 en los chips de flujo laminar muestran una respuesta tanto de CIRP como de RBM3 ante el flujo de 31 $\mu\text{L}/\text{min}$ con un pico a 1h para CIRP y a las 12h para RBM3. Además, RBM3 responde también ante el flujo de 62 $\mu\text{L}/\text{min}$ con un pico de expresión a las 8-12h que, sin embargo, en la expresión de CIRP no tiene efecto (Fig 58).

Flujo oscilante en placas de Petri de 100 mm

Una vez que se vio una modulación de la expresión de mRNA de CIRP y RBM3 por el flujo laminar, la siguiente pregunta se dirigió hacia el flujo oscilante, ¿sucedería lo mismo ante otro tipo de flujo? Para responder a esta cuestión se analizó la expresión de ambos genes tras 1, 2 y 6 horas de flujo oscilante, que sometía a las células a una presión lineal aproximada de 0,81 dinas/cm², y se comparó con células que se habían mantenido estáticas. Los datos obtenidos mediante RT-qPCR de cada gen, tras normalizarlo con el gen GAPDH, se relativizaron frente al control estático y se muestran resumidos en la Fig. 60.

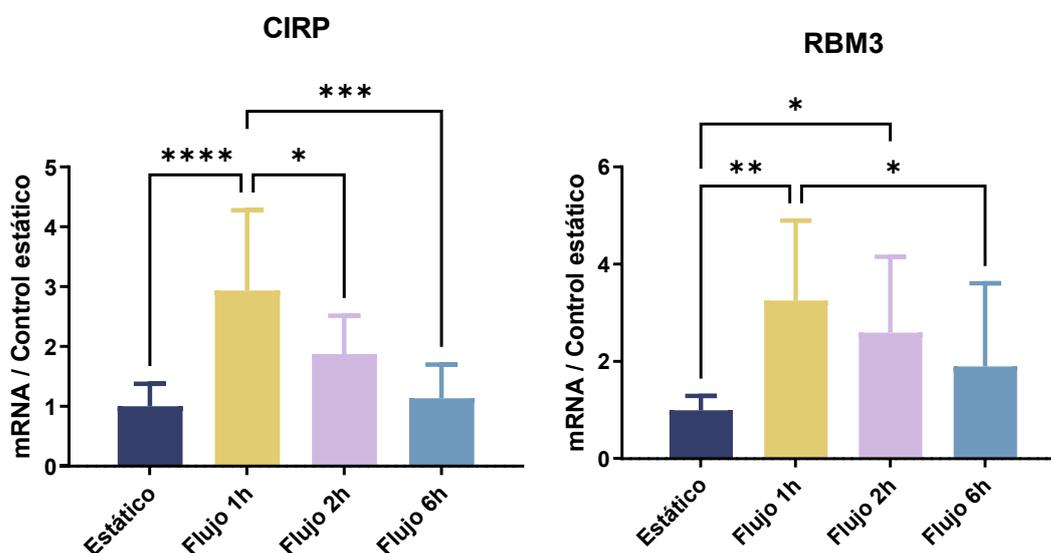


Figura 60. Expresión de CIRP y RBM3 en células R28 sometidas a flujo oscilante a distintos tiempos. Las barras representan la media \pm desviación estándar de todas las muestras. *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$.

Como se puede observar, la expresión de CIRP en células R28 sometidas a flujo oscilante en estas condiciones aumenta muy significativamente a 1h y va disminuyendo paulatinamente. Lo mismo ocurre con RBM3, donde su expresión a 1h y a 2h aumenta significativamente respecto al control estático para tender a valores normales después.

Además, se quiso estudiar si este aumento de expresión de CIRP y RBM3 se traducían en un aumento de dichas proteínas tras la exposición al flujo oscilante en el tiempo. Al mismo tiempo, como la privación de suero estimula la biogénesis del cilio primario, se decidió evaluar el efecto del suero en condiciones de flujo oscilante. Para ello se recogieron extractos de proteínas de células R28 tras 2, 6 y 24 horas en flujo oscilante en medio con o sin suero, con una presión lineal aproximada de 0,81 dinas/cm², que se relativizaron frente a sus respectivos controles estáticos.

Posteriormente estos extractos se analizaron mediante Western-blotting (Fig. 61) y se observó que los niveles de CIRP aumentan tras 2h de exposición a un flujo oscilante de 0,81 dyn/cm² en las células con suero. Asimismo, como se puede apreciar en la figura, la privación de suero supone un aumento de CIRP en las células tanto a las 2 horas como a las 24 horas de estar en flujo. Respecto a RBM3, no hay diferencias en los niveles de proteína como respuesta a flujo, sin embargo, se observa una disminución notable de RBM3 en las células sin suero, al contrario de lo que sucedía en el caso de CIRP.

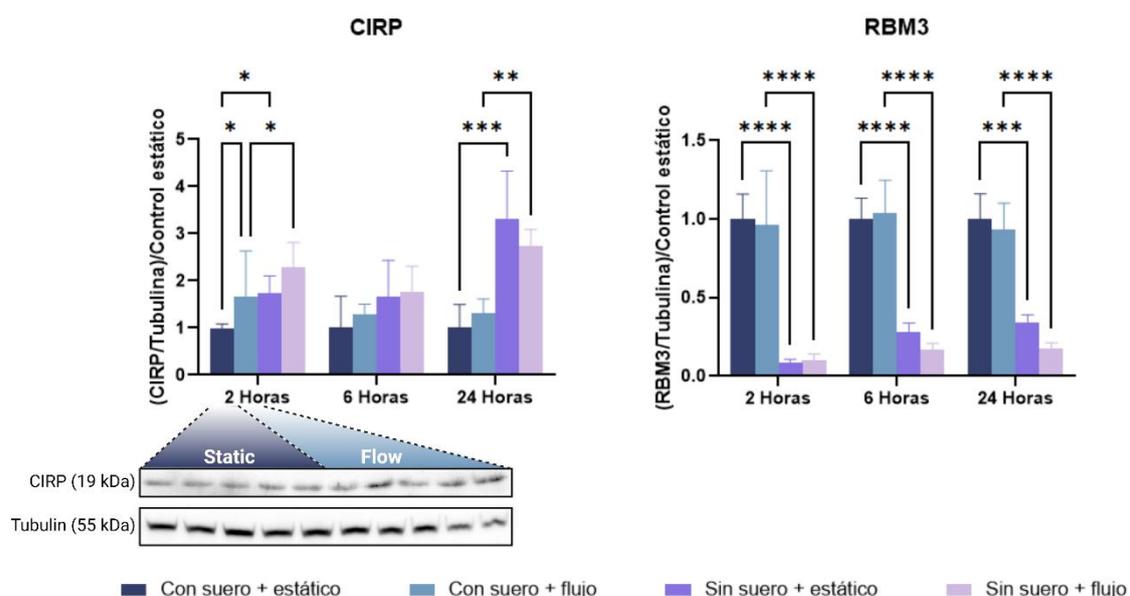


Figura 61. Niveles de expresión de proteína de CIRP y RBM3 en células R28 sometidas a flujo oscilante durante 2, 6 y 24 horas. Para cada tiempo se representan 4 condiciones experimentales: con suero estático, con suero en flujo oscilante, sin suero estático y sin suero con flujo oscilante. Cada punto está relativizado a su control de células con suero y estáticas. Las barras representan la media \pm desviación estándar de todas las muestras. *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$; ****: $p < 0.0001$.

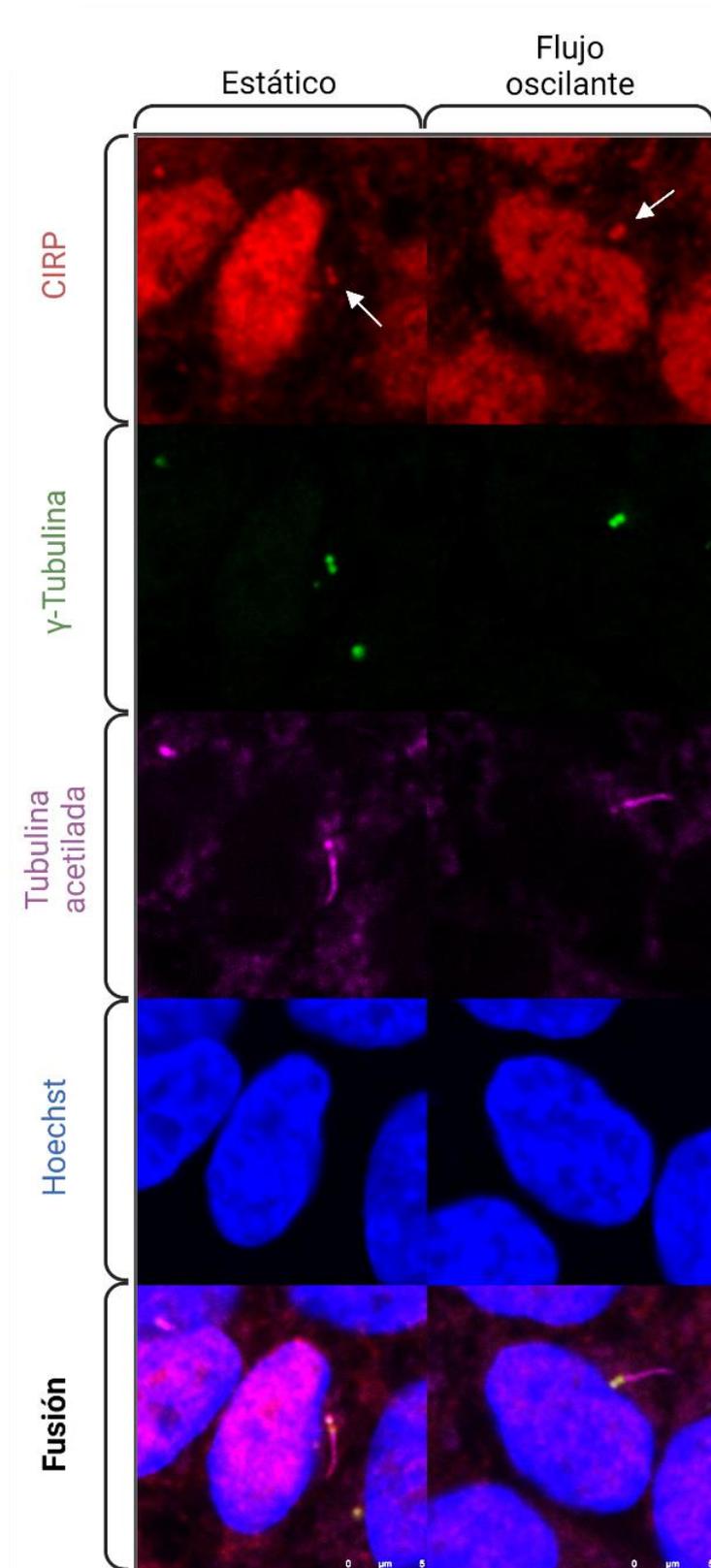


Figura 62. Imagen de microscopía de confocal de células R28 estáticas o expuestas a flujo oscilante de $0,81 \text{ dinas/cm}^2$. En rojo se puede ver CIRP, en verde el centrosoma y en morado el axonema del cilio primario, y en azul el núcleo. Las flechas blancas indican la colocalización con el centrosoma.

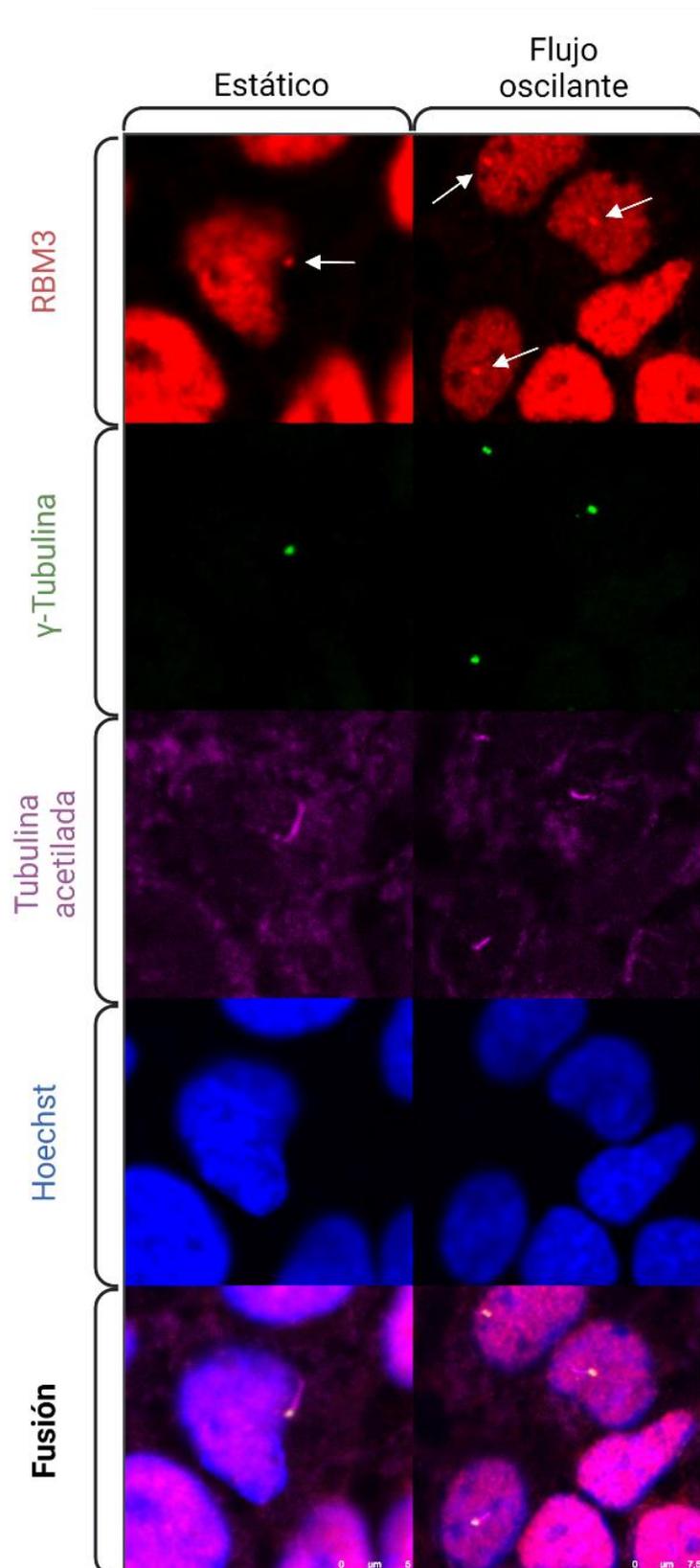


Figura 63. Imagen de microscopía de confocal de células R28 estáticas o expuestas a flujo oscilante de 0,81 dinas/cm². En rojo se muestra RBM3, en verde el centrosoma y en morado el axonema del cilio primario, y en azul el núcleo. Las flechas blancas indican la colocalización con el centrosoma

También se estudió la localización de CIRP (Fig. 62) y RBM3 (Fig. 63) por inmunofluorescencia en las células R28 estáticas y expuestas a un flujo oscilante de $0,81 \text{ dyn/cm}^2$. En ambas condiciones las dos proteínas de respuesta al frío colocalizan con el cuerpo basal del cilio primario. Además, al analizar el porcentaje de cilios primarios en cada condición se observó una disminución significativa ($p=0,014$) en las células con flujo respecto a las estáticas (Fig. 64.A), así como una menor longitud de los mismos ($p<0,0001$) (Fig. 64.B)

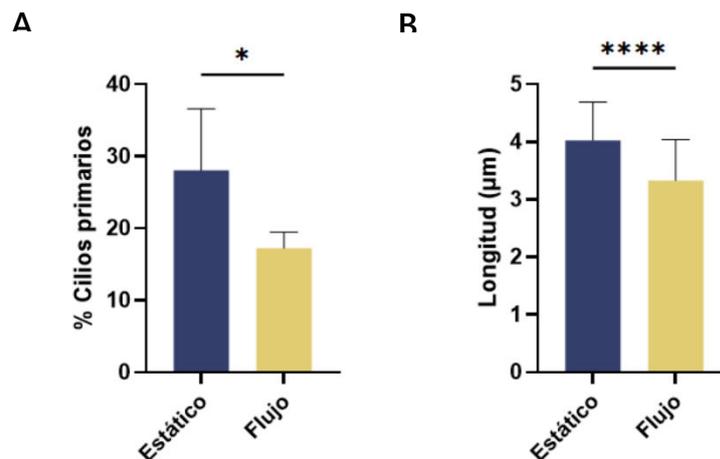


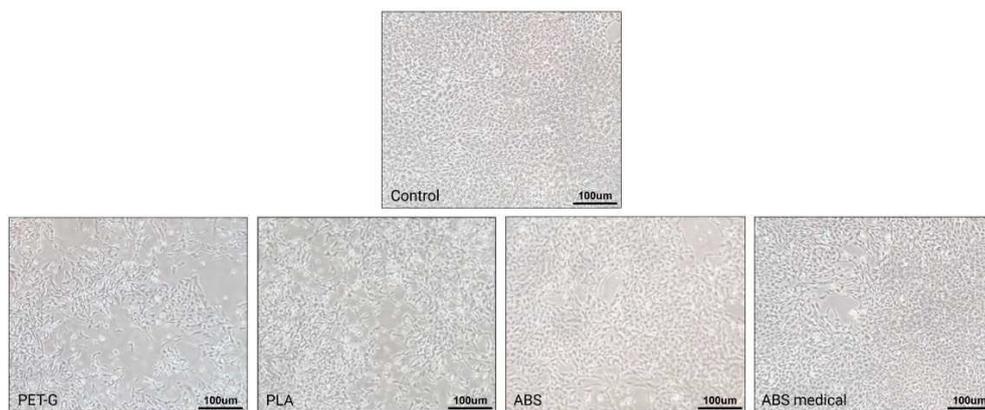
Figura 64. Representaciones gráficas que muestran el porcentaje de células ciliadas (A) y la longitud de los cilios (B) en las dos condiciones. Las barras representan la media \pm desviación estándar de todas las muestras.

*: $p < 0.05$; ****: $p < 0.0001$

Experimentos de flujo en el dispositivo de flujo oscilante

Caracterización de toxicidad

Para tener un mejor control del flujo oscilante, decidimos diseñar un dispositivo específico, que fue construido mediante impresión 3D con diferentes materiales plásticos. Antes de empezar a usarlo experimentalmente, fue necesario comprobar la idoneidad del material de impresión para el cultivo celular. Por ello se imprimieron unas probetas de distintos plásticos de impresión, PET-G, PLA, ABS y ABS de grado médico, donde se ajustaba el portaobjetos dentro de una placa de Petri de 100 mm. Se sembró la misma cantidad de células R28 en cada placa y diariamente se evaluó la citotoxicidad presentada respecto a la placa control. En la Fig. 65 se muestran imágenes representativas del estado de las células al 4^o día de crecimiento con los distintos plásticos, así como el efecto de los mismos sobre el crecimiento y viabilidad celular .



		PET-G	PLA	ABS	ABS medical
Citotoxicidad	D1	10%	20%	3%	No se aprecia
	D2	20%	30%	5%	2%
	D3	35%	38%	10%	5%
	D4	50%	45%	20%	10%

Figura 65. Evaluación de la citotoxicidad de células R28 expuestas a distintos plásticos de impresión 3D. En las imágenes se muestra el estado de las células tras 4 días de crecimiento en presencia de PET-G, PLA, ABS y ABS de grado médico, así como del control sin plástico. En la gráfica se resume la evaluación de la citotoxicidad en cada condición comparándola con el control a lo largo de los 4 días que duró la exposición (D1, 2, 3 y 4)

Tras 4 días de exposición a los plásticos, todos muestran cierto grado de citotoxicidad en mayor o menor medida. El PET-G y el PLA mostraban ya un mayor nivel de muerte celular que el control desde el día 1, que se fue incrementando notablemente a medida que pasaba el tiempo. Cabe destacar que, pese a que en el caso del PET-G cada vez se apreciaba un mayor efecto citotóxico, en el caso del PLA daba la sensación de que este se iba estabilizando en el tiempo. Por su parte, el ABS de grado médico fue el plástico que más se asemejó al control en cuanto a niveles de crecimiento y viabilidad; de hecho, en las primeras 24 horas no había diferencias perceptibles entre ambas placas. Por lo que respecta al ABS, tuvo mejores resultados que el PET-G y el PLA en cuanto a una menor citotoxicidad, pero sin llegar a los niveles de su homólogo de grado médico.

Validación del dispositivo de flujo oscilante

Tras poner a punto el diseño y el protocolo de limpieza y desinfección del dispositivo de flujo oscilante se comenzó con las pruebas de validación del mismo. De momento, disponemos de datos preliminares sobre la expresión de CIRP y RBM3 de células R28 tras 1 hora en el dispositivo de flujo, sometidas a una presión lineal de 0,363 dinas/cm², que están resumidos en la Fig. 66.

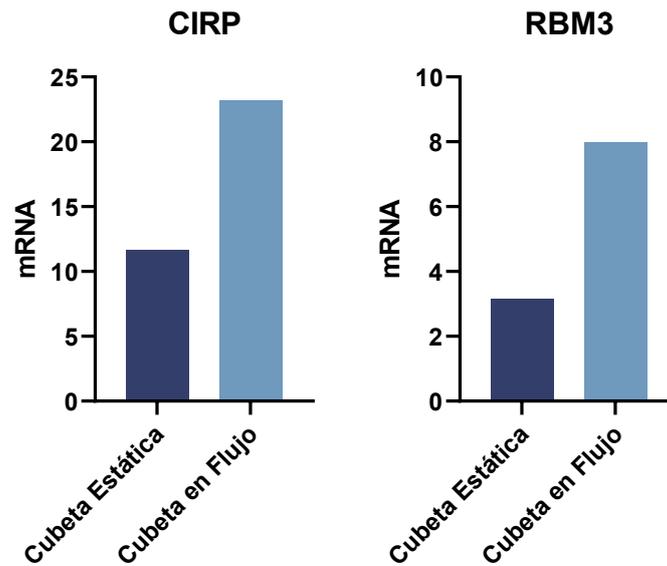


Figura 66. Datos preliminares de la expresión de CIRP y RBM3 en el dispositivo de flujo oscilante tras 1 hora de exposición de células R28 a flujo (cubeta en flujo) frente a las células estáticas (cubeta estática). Las barras representan la media de las muestras.

Realizar más repeticiones de este experimento nos indicará si realmente hay diferencias de expresión de CIRP y RBM3 sometidas a flujo dentro del dispositivo, como sucedía en las placas de Petri. Además, nos dará información tanto de la reproducibilidad de las condiciones como de la estabilidad de las variables controlables con el dispositivo de flujo.

Discusión

1. CONTEXTO Y RESUMEN DEL TRABAJO

La obesidad supone un problema mundial de salud que afecta a casi 2000 millones de personas de todas las edades, orígenes y estatus socioeconómico³⁵¹. Las implicaciones de esta enfermedad en el desarrollo y gravedad de otras patologías, así como en la repercusión económica a nivel mundial, hacen que sea de vital importancia encontrar una solución efectiva ante esta creciente situación.

La principal complicación en la lucha contra la obesidad la constituye su origen multifactorial, con componentes genéticos, ambientales y sociales que dificultan enormemente su control¹⁶. Por ello, a nivel mundial se están realizando esfuerzos en todos los niveles, tanto institucionales como educativos y sociales, para que se alcance una relación con la comida más saludable y fomentar hábitos de vida beneficiosos adaptados a las nuevas necesidades de la sociedad actual^{121,123,126}. Todas estas estrategias parece que han conseguido ralentizar el crecimiento desenfrenado de la obesidad de las últimas décadas, aunque no están siendo suficientes para revertir la tendencia ascendente en el aumento de peso general de la población mundial⁶. Por ello, es importante disponer de terapias que potencien los efectos de los hábitos saludables en personas con sobrepeso y obesidad y que, además, favorezcan el mantenimiento a largo plazo de la pérdida de peso en estos casos.

Una de las aproximaciones que ha cobrado importancia en los últimos años consiste en potenciar la pardificación de la grasa blanca, de forma que se movilicen los lípidos de su interior y se deriven hacia la generación de calor en vez de almacenarse^{161,352}. La termogénesis es el mecanismo natural que tiene el organismo para responder ante el frío, sin embargo, la hipotermia, aún moderada, conlleva una serie de efectos adversos potencialmente peligrosos para aplicarla como tratamiento frente a la obesidad^{205,206}.

Teniendo esto en mente, se diseñaron unas SMs que pudiesen actuar como miméticos de la hipotermia de forma de que se pudiese disponer de los efectos beneficiosos de esta terapia sin las incomodidades que implica someter a una persona al frío. En el trabajo fin de master "Caracterización de moléculas de pequeño tamaño que modulan la expresión de CIRP" se evaluaron sus efectos *in vitro* y se comprobó que estas moléculas eran capaces de aumentar los niveles de la proteína de respuesta a frío CIRP, algunas de ellas incluso superando los obtenidos en células sometidas a hipotermia moderada (32°C)³³⁹. Una de

estas moléculas es zr17-2, cuyo comportamiento pasó a estudiarse en distintos tejidos y modelos animales. Además, durante el transcurso de la investigación, se decidió profundizar en los posibles mecanismos de captación del frío a través de sensores celulares, entre los que destaca el cilio primario. Esta estructura es capaz de detectar y transmitir cambios en el ambiente al interior de la célula y, como se ha visto en este trabajo, implica a las proteínas de respuesta al frío CIRP y RBM3.

2. CARACTERIZACIÓN DE LAS SMs QUE SIMULAN LA HIPOTERMIA

De las SMs que se probaron durante la etapa del trabajo de fin de máster hubo dos, zr17-2 y SD4, que mostraron un mayor aumento de CIRP en las células R28 en condiciones de normotermia. Por tanto, se decidió estudiar el efecto de sus respectivas familias de moléculas, SD y zr, cuyas diferencias residían en la sustitución de los radicales de la cadena de hidrocarburos. Aunque hubo varios compuestos que demostraron aumentar significativamente los niveles de CIRP en células R28, zr17-2 no solo obtenía uno de los mejores rendimientos en la expresión de la proteína, sino que, además, era la única soluble en agua o suero fisiológico en vez de en DMSO. El DMSO es ampliamente utilizado para disolver compuestos no polares o polares con poca solubilidad en agua; sin embargo, se ha visto que no es inerte y puede tener efectos sobre la proliferación³⁵³, la expresión de genes³⁵⁴ e incluso efectos citotóxicos³⁵⁵, que suponen una desventaja frente al agua, el disolvente universal. Estos motivos nos llevaron a escoger la molécula zr17-2 como un tratamiento potencial para simular la hipotermia en los experimentos posteriores.

3. ZR17-2 COMO MOLÉCULA MODULADORA DEL METABOLISMO RELACIONADO CON LA OBESIDAD

3.1. EXPERIMENTOS *IN VITRO*

Tras el tratamiento con la SM durante la diferenciación y maduración de adipocitos de la línea celular 3T3-L1 no se observaron cambios a nivel molecular en los genes seleccionados, aunque sí hubo modificaciones significativas en el tamaño medio de las vesículas de las células tratadas con zr17-2. Este cambio indica que zr17-2 actúa de alguna manera sobre la fisiología de las vesículas lipídicas en los adipocitos 3T3-L1. Sin embargo, no se aprecian diferencias en la expresión de Elovl3, un gen que regula el metabolismo de lípidos y parece tener un papel en la remodelación de las vesículas lipídicas³⁵⁶, ni en CIDEA, una proteína de las vesículas lipídicas que también se relaciona con la sensibilidad a la insulina³⁵⁷. Y tampoco

en PGC1 α , que es un factor de transcripción que actúa como coactivador de genes relacionados con la pardificación y que, además, está implicado en la formación de mitocondrias³⁵⁶.

Lo más probable es que esto sea debido al momento en que se tomaron las muestras, al final del proceso de maduración. Esto pudo originar una recuperación de los niveles basales de mRNA de estos genes bien por aclimatamiento, como se ha visto en el caso de CIDEA en cerdos expuestos a frío durante 2 semanas³⁵⁸, bien por el tiempo transcurrido tras el último tratamiento (48h desde la última inoculación de la molécula), o la combinación de ambas. Si bien la cinética del mRNA de muchos de los genes implicados en la termogénesis no está caracterizada, se puede tomar como referencia el comportamiento de otros genes a lo largo del tiempo. Un ejemplo serían los genes que actúan en la respuesta inflamatoria, mucho más estudiada, donde se pueden encontrar genes de expresión rápida, intermedia o tardía. Tras la exposición a TNF se ha visto que la expresión de genes relacionados con la inflamación aumenta y disminuye siguiendo 3 cinéticas distintas, con un pico de expresión a las 0,5, 2 o 12 horas³⁵⁹, tras lo que disminuye paulatinamente o más abruptamente si se suprime el estímulo del TNF. De forma similar, los 2 transcritos de CIRP que aumentan en hipotermia moderada tienen un pico de expresión a las 6 horas que va disminuyendo hasta alcanzar la normalidad hacia las 24 horas³⁶⁰. En resumen, muchos de los genes tienden a aproximarse a los niveles basales de expresión dentro de las primeras 24 horas, por lo que sería de esperar que, en las 48 horas que trascurrieron desde la última exposición a la molécula hasta la recogida de las células, la expresión de los genes estudiados haya vuelto a la normalidad. De todas formas, si se hubiese dado una diferenciación profunda hacia adipocitos beige, habría sido esperable que esta fuese acompañada de una programación genética acorde a como se ha visto en otros trabajos, por ejemplo, con la diferenciación producida por CBD³⁶¹ o por la combinación de capsaicina-capsiato³⁶².

Además, aunque se pudieron apreciar diferencias significativas de 1 μm en el tamaño de las vesículas de las células tratadas, que sugieren cierto grado de pardificación, estas no se tradujeron en cambios en la acumulación de lípidos ni en diferencias perceptibles macroscópicamente en el grado de diferenciación de los adipocitos 3T3-L1, como sí se ha visto en otros estudios³⁶³⁻³⁶⁵. Sin embargo, pese a no ser significativo estadísticamente, sí que se apreció una tendencia al aumento en la acumulación de lípidos en las células tratadas que, quizás aumentando el número de muestras, se podría confirmar. Este dato es interesante porque se correlacionaría con que la exposición intermitente al frío parece estimular la acumulación de grasa aumentando la lipogénesis *de novo* en ratones³⁶⁶.

Estos resultados abren la puerta a numerosas incógnitas que animan a profundizar en la caracterización de zr17-2 en 3T3-L1 en un futuro, su efecto en la diferenciación, sobre

adipocitos ya maduros o sobre la restauración del fenotipo beige desde adipocitos blancos. Está claro que el tratamiento con zr17-2 disminuye el tamaño de las vesículas, pero en estas condiciones experimentales no apreciamos más efecto, ¿es porque realmente no lo tiene o quizás aumentando la dosis, la frecuencia o el momento de exposición se verían otros resultados? ¿Necesita de adyuvantes? ¿O qué sucedería si, tras el aumento de CIRP, se sometiesen las células a un nuevo estrés térmico, por ejemplo?, ¿pardificarían antes que las tratadas con zr17-2?³⁴³ ¿El frío es capaz de inducir pardificación en los adipocitos de forma directa o lo hace mediado por otras células? Con tiempo y trabajo se podrán responder estas cuestiones y, quizás, las respuestas nos ayudarían también a entender un poco mejor cómo responde la grasa ante un aumento de CIRP y desarrollar herramientas cada vez más adecuadas para enfrentarnos a la pandemia de obesidad que vivimos actualmente.

3.2. EXPERIMENTOS *IN VIVO*

A lo largo de los experimentos con modelos animales se fue depurando y caracterizando el comportamiento de zr17-2. Si bien zr17-2 es capaz de aumentar los niveles de CIRP en células, en un organismo complejo como son los animales de experimentación, el mantenimiento de la homeostasis y la heterogeneidad individual dificultan la respuesta y, por tanto, la detección y los efectos derivados del tratamiento.

En el primer ensayo, en ratas, se observó que el impacto del tratamiento con zr17-2 dependía de los tejidos. Por ejemplo, la mayoría de los tejidos estudiados respondieron al tratamiento con un aumento de los niveles de CIRP, especialmente en el caso del pulmón y el páncreas, seguidos del colon, la grasa y el corazón. En el testículo también se percibía un ligero aumento de CIRP, pero mucho más sutil que en los tejidos antes mencionados. Este órgano tiene la peculiaridad de encontrarse entre 8,3 y 8,5°C por debajo de la temperatura corporal normal de la rata³⁶⁷, lo que podría afectar a los niveles basales de CIRP y su capacidad de respuesta. Los aumentos en los niveles de CIRP tras el tratamiento con zr17-2 se han visto corroborados por otros grupos, que han utilizado la SM en un modelo de rata donde se relacionaba el aumento de CIRP con una protección de la función y estructura cardíaca en trasplantes de corazón³⁶⁸, y una mejor respuesta fisiológica y menor muerte celular tras un aplastamiento del nervio óptico³⁶⁹. Respecto a la retina, la molécula no parece ser capaz de traspasar la barrera hematoocular, requiriendo de una inyección intravítrea para poder tener efectos en el ojo³⁶⁹. Nuestros datos también sugieren que puede pasar lo mismo con la barrera hematoencefálica, al igual que sucede en el caso de muchos medicamentos³⁷⁰, ya que tampoco se apreciaron modificaciones en la corteza cerebral ni en el cerebelo después del tratamiento sistémico. Habría que ver si las inyecciones

intracerebrales de zr17-2 son capaces de modular los niveles de CIRBP en el cerebro para profundizar en su estudio.

De todos los tejidos analizados en este ensayo, el corazón merece una mención especial ya que da una pista del posible mecanismo de acción de zr17-2. En el patrón de CIRP que se observa en los Western blots, aparece una mancha inmunorreactiva con un peso molecular inferior al esperado para CIRP en el caso del control. Sin embargo, tras el tratamiento con zr17-2, esta mancha se redujo y apareció la banda esperada a 19 kDa. Esta observación sugiere que CIRP es degradado rápidamente en el corazón y que la molécula bloquea esta degradación, preservando así la proteína activa y sus funciones durante más tiempo³³⁹.

Por último, el aumento de los niveles de CIRP en el páncreas y la grasa nos llevaron a pensar que el tratamiento con zr17-2 podría ser útil para la regulación de la glicemia y el metabolismo de las grasas, ya que se ha demostrado que los animales de experimentación expuestos al frío no ganan peso ni siquiera cuando se les alimenta con una dieta hipercalórica^{165,352}.

Tratamiento de ratones con zr17-2 y evaluación del efecto sobre los marcadores de pardificación a distintos tiempos

Una vez que se estudió el efecto de zr17-2 en los distintos órganos, se decidió cambiar de modelo animal de rata a ratón. Esta decisión se tomó por las ventajas que suponían estos últimos en cuanto a manipulación, estabulación y procesamiento, y en ellos se analizó la expresión de CIRP y de distintos marcadores de pardificación, tanto en grasa epididimal como en inguinal. La primera es un ejemplo de grasa visceral, utilizada como modelo de grasa blanca, mientras que la inguinal representa la grasa subcutánea con más capacidad de pardificarse³⁴³. No hemos encontrado estudios previos que nos indicasen el comportamiento de CIRP en el tejido adiposo ni que empleasen hipotermia moderada para estimular la termogénesis, pero sí que se ha empleado la estimulación adrenérgica, bien por exposición a frío agudo (4°C)^{371,372} o bien farmacológicamente^{373,374}, como mecanismo para inducir la termogénesis. En estos estudios se detectaron incrementos en el mRNA de UCP1 y de otros genes implicados en la termogénesis, como CIDEA, en al menos uno de los dos tipos de grasa que analizamos aquí. Sin embargo, en nuestro ensayo, no vimos ningún tipo de aumento significativo en los genes estudiados de los ratones tratados con zr17-2 respecto a los controles.

Es más, en el caso de la grasa inguinal, detectamos una caída de la expresión de CIRP en el día 1 que se recuperaba para el día 2 y, similarmente, los niveles de mRNA de UCP1 caían a día 3 para recuperarse en el día 4. La falta de incremento de CIRP puede ser debida al propio mecanismo de acción de zr17-2, ya que parece ir vinculado a una estabilización de la

proteína que evita su degradación, y no tendría por qué darse un aumento de mRNA. Sin embargo, si CIRP se autorregulase (feedback negativo) esto explicaría la disminución que se ve al día siguiente de la administración de la SM. Quizás el aumento de los niveles de la proteína tras la inoculación, sin más señales de estrés real, implique una reducción de la expresión de CIRP de forma que se mantuviese la homeostasis del sistema.

Respecto a la expresión de hormonas pancreáticas, no se apreciaron diferencias en sus niveles de mRNA tras el tratamiento con zr17-2. Por otra parte, la localización de CIRP en los islotes pancreáticos no se correspondía con las células productoras de hormonas, sino que estaba restringida a las células vasculares o del estroma del páncreas. Estos resultados disminuyen la probabilidad de que CIRP esté implicado en el metabolismo de la glucosa a través de estas hormonas, al menos de forma directa.

3.3. TRATAMIENTO DE RATONES CON zr17-2 EN TERMONEUTRALIDAD

En el estudio de Kalinovich et al³⁷¹ se describe cómo la temperatura de estabulación de los ratones afecta significativamente a la respuesta termogénica de los distintos tipos de grasa. La temperatura de normotermia para los ratones sería de 30°C. Sin embargo, la temperatura habitual de los animalarios se sitúa en torno a los 22°C. Esto implica que los ratones estabulados se encuentran constantemente en una situación de estrés térmico. Por ello, diversos estudios alertan de los posibles problemas de utilizar al ratón como modelo animal en experimentos que puedan verse modificados por la temperatura, como aquellos destinados a investigar la termogénesis o el metabolismo³⁷⁵⁻³⁷⁷.

Sin embargo, numerosos estudios son capaces de detectar modificaciones en la respuesta termogénica en ratones expuestos a frío (4°C) que previamente habían sido criados a 22°C. En el artículo de Kalinovich et al³⁷⁸ se muestra un buen ejemplo; el frío, al fin y al cabo, es un estímulo intenso que provoca una respuesta sistémica conjunta para conseguir mantener la homeostasis del organismo. El problema puede aparecer cuando se quieren investigar posibles agentes capaces de pardificar la grasa blanca y que no tengan un efecto tan radical como la hipotermia profunda (un descenso de 18°C).

En nuestro caso, al estudiar el efecto de zr17-2 en condiciones de normotermia, vimos que, efectivamente, los ratones mantenidos a la temperatura habitual del animalario (22°C) expresaban una cantidad notablemente mayor de mRNA de UCP1 que los que se encontraban en normotermia (30°C). Sin embargo, el tratamiento con zr17-2 cada 3 días no alteraba los niveles basales de este gen, independientemente del número de dosis. Por las mismas razones ya expuestas al hablar de los adipocitos 3T3-L1, en este caso pensamos que,

tras el tiempo transcurrido desde la inoculación, los niveles basales de los genes estudiados habrían vuelto a su estado basal. Sin embargo, tampoco había transcurrido tanto tiempo como para ver un resultado macroscópico permanente como genotipo de adipocitos beige y, por tanto, modificaciones en la expresión de *Tbx1*³⁴⁴. Además, en el análisis incluimos a *Fndc5* o *irisina*³⁴⁵, un gen fundamental en la pardificación de la grasa a través del ejercicio. De haber habido diferencias en la expresión de este gen nos habría permitido detectar si los cambios en la actividad física asociados a las diferentes temperaturas de estabulación³⁷⁹ interferían con nuestro estudio.

Lo mismo sucedió al analizar los niveles de proteína CIRP en los distintos tipos de grasa. Debido al estrés térmico basal que sufrían los animales a 22°C, estos presentaban niveles elevados de la proteína en los tres tipos de grasa. Cabe destacar que en las grasas epididimal y escapular sí que se apreció una tendencia al aumento en los niveles de CIRP en los animales tratados con zr17-2 respecto a los controles tratados con vehículo, aunque no llegaron a ser significativos por la alta heterogeneidad individual de las muestras.

3.4. ENSAYO PILOTO CON DISTINTAS CEPAS DE RATA

A la luz de los resultados obtenidos en los experimentos realizados en ratones, decidimos volver a utilizar como modelo animal la rata, ya que su termoneutralidad ($\approx 25^\circ\text{C}$ en condiciones gregarias y con material para anidar) se encuentra en torno a la temperatura habitual de estabulación del animalario (22°C)^{380,381}.

Está claro que genéticamente hay diferencias entre cepas distintas de ratas. Incluso se ha visto que, conductualmente, las ratas presentan grandes discrepancias en su comportamiento social, dependiendo de las distintas estirpes³⁸². Si se evalúan los factores genéticos y los de comportamiento, no hay lugar a dudas de que las variaciones entre cepas de ratas pueden determinar su idoneidad para cierto tipo de ensayos más que para otro^{383,384}. Por ello se procedió a evaluar 3 estirpes de ratas distintas bajo nuestras condiciones experimentales, de forma que se pudiese escoger la más adecuada.

Las ratas Long Evans y Wistar Hanover son ratas no consanguíneas que están ampliamente caracterizadas para obesidad y que se emplean de forma habitual como modelos de DIO^{385,386}. Ambas presentan la ventaja de ser más heterogéneas genéticamente que las cepas consanguíneas lo que representa un comportamiento más cercano al de una población general. Sin embargo, esto supone que también presenten una mayor dispersión de los datos obtenidos que, junto con la variabilidad individual de cada animal de percibir la sensación de frío, puede suponer un gran inconveniente en el diseño del experimento.

Por ello se añadió al estudio una estirpe consanguínea, Fischer 344, que es un modelo genético más homogéneo y que también responde a DIO³⁸⁷.

Incluso mantenidas con pienso normal del animalario, las ratas Long Evans se hicieron notablemente más grandes que las Wistar Hanover y las Fischer (555,5 g frente a los 372,5 y 365 g de media respectivamente), lo que complicaba su manipulación y mantenimiento. Por otra parte, la estirpe de rata Wistar Hanover presenta dos subpoblaciones diferentes en la respuesta a la obesidad inducida por dieta, una sensible y otra resistente, incapaz de engordar con las dietas hipercalóricas^{333,334}, lo que suponía un inconveniente de cara al estudio de DIO. Respecto a las ratas Fischer 344, como estirpe consanguínea está más predispuesta a desarrollar patologías derivadas de la consanguinidad conforme avanza en edad, por lo que habría que acotar muy bien los tiempos del estudio. Además, esta cepa se caracteriza por una hiperreactividad del eje hipotalámico-pituitario-adrenal ante estímulos estresantes, lo que favorece la movilización de energía almacenada y otros efectos derivados de la activación adrenérgica^{388,389}. Dicha activación podría interferir en los resultados del estudio, así que se hace crucial aclimatar adecuadamente a los animales antes de comenzar el procedimiento, de forma que se minimice el estrés.

En este ensayo se realizó un estudio en profundidad sobre los niveles de proteína de CIRP en el páncreas y en varios depósitos de grasa diferentes, sin llegar a apreciar modificaciones significativas. Uno de los principales problemas a la hora de analizar los datos fue la desviación de los datos, que era más notable entre las grasas más blancas: epididimal, retroperitoneal, inguinal, escapular blanca y renal, frente a las más pardas, como la femoral y la escapular, cuyos resultados eran más consistentes. La expresión de CIRP se mantuvo bastante constante entre grupos de tratamiento y entre cepas, pero llama la atención la tendencia que se aprecia en la grasa escapular blanca de una caída de los niveles de CIRP en las ratas tratadas con zr17-2. Un número experimental más alto probablemente ayudase a detectar diferencias significativas de expresión, si las hubiera.

A la luz de los resultados obtenidos se decidió continuar los experimentos con la estirpe de ratas Wistar Hanover, corrigiendo la posible aparición de individuos resistentes a DIO con una preselección previa al inicio del tratamiento.

3.5. EXPERIMENTO PILOTO DE TRATAMIENTO A MEDIO PLAZO Y SU EFECTO EN LOS NIVELES DE GLUCOSA E INSULINA

Los objetivos del ensayo a medio plazo del tratamiento de ratas con zr17-2 fueron tanto evaluar posibles efectos adversos de la SM, de forma que se pudiesen solventar de cara al

diseño del experimento DIO e incluirlos en el protocolo ético si procediese, como poner a punto la técnica de realización de la prueba de la tolerancia a la glucosa.

Se ha visto que la exposición al frío agudo^{390,391} y CIRP³⁹² son capaces de favorecer el metabolismo de la glucosa^{55,56}. Esto corrobora los resultados obtenidos en el IPGTT, donde el tratamiento con zr17-2 para aumentar los niveles de CIRP supone una disminución en el pico de la glucosa en las ratas tratadas respecto a los controles. Sin embargo, en el análisis de proteína por Western blotting no se aprecia este aumento, es más, en la grasa inguinal más cercana a la ingle no solo no aumenta, sino que disminuye significativamente. Este dato es muy curioso, puesto que se ve algo similar en los ratones a las 24 horas tras la inoculación de zr17-2. En estudios posteriores convendría profundizar en la caracterización de la cinética de CIRP con el tratamiento con la SM, y así intentar entender mejor el mecanismo de la respuesta de CIRP y su regulación.

Valorando todos los datos en conjunto se consideró que merecía la pena profundizar en el estudio de zr17-2, ya que, aunque no haya cambios moleculares detectables en la mayoría de las grasas (excepto la llamativa disminución de CIRP en el caso de la grasa inguinal), sí que parece haber un efecto de zr17-2 sobre el metabolismo de la glucosa en el tratamiento a medio plazo.

3.6. EXPERIMENTOS DE OBESIDAD INDUCIDA POR DIETA ALTA EN GRASAS (DIO)

Para estudiar el efecto de zr17-2 en el desarrollo de la obesidad, se utilizó una dieta rica en grasa (45% de las Kcal provienen de la grasa) frente a una dieta control cuyo porcentaje de grasa era del 10%. Ambos grupos de animales, DIO y control, se subdividieron en un grupo tratado con zr17-2 y otro con suero fisiológico. La dieta dio lugar a cambios significativos en el peso de los animales, con un aumento de la ganancia de peso en las ratas del grupo DIO, de forma similar a lo que se ha visto en otros estudios publicados de este tipo³⁹³⁻³⁹⁵. Sin embargo, la SM no tuvo un efecto significativo en el peso en ninguno de los grupos experimentales. De todas formas, sí que parece observarse una tendencia en el grupo de la dieta control a subir de peso más lentamente y a alcanzar la meseta de la curva antes en los animales tratados con la SM, y así, quedarse unos gramos por debajo de los animales que recibieron suero fisiológico. Puede que estas diferencias sutiles se acentuasen variando la dosis o la frecuencia de inoculación, por ejemplo.

El efecto observado en los niveles de glucosa entre los animales sometidos a las dos dietas sigue los patrones esperados en los modelos DIO^{395,396}, con una tendencia al aumento en el pico de la curva y una caída más moderada en los animales con dieta alta en grasa, aunque

no muestra diferencias significativas estadísticamente. Lo interesante sucede cuando se observa el efecto que tiene zr17-2. Si se comparan los animales tratados con la SM con los de suero fisiológico del grupo DIO, se observa un máximo similar al obtenido en los controles de la dieta normal (por debajo de los valores del grupo tratado con suero) y una velocidad de recuperación mayor. Sin embargo, zr17-2 administrado junto con la dieta control tiene el efecto contrario: los valores medios de cada tiempo son superiores a los de los animales que recibieron vehículo. Curiosamente, hay un estudio que somete a frío a hombres sanos y que muestra un efecto similar: los niveles de glucosa entre el grupo expuesto a frío son superiores a los del grupo mantenido en termoneutralidad³⁹⁷, y lo mismo se ha visto en ratones³⁹⁸, lo que contradice a otros estudios publicados³⁹⁰⁻³⁹². Debido a la complejidad de la respuesta al frío, profundizar en el estudio sobre cómo responde el organismo ante el estrés térmico puede que nos dé la clave sobre los factores responsables de estas variaciones y, por tanto, del efecto de zr17-2 en la modulación de la glucemia.

A los tres meses del tratamiento, se realizó una bioquímica de la sangre de los animales y se vio un aumento en los niveles de las transaminasas (ALT) y el colesterol (HDL y LDL) en los animales sometidos a DIO, como era de esperar³⁹⁹. Sin embargo, se produjo una disminución no esperada en los niveles de triglicéridos. Las alteraciones bioquímicas debidas a la dieta grasa pueden ser diversas. Por ejemplo, se pueden ver modificadas por las consecuencias del síndrome del hígado graso no alcohólico, que se da a menudo como consecuencia de este tipo de dietas⁴⁰⁰⁻⁴⁰². Sin embargo, los niveles bajos de triglicéridos suelen ser el resultado de dietas pobres en grasa, hipertiroidismo, síndrome de malabsorción o malnutrición⁴⁰³. También pueden darse en casos de fibrosis hepática avanzada⁴⁰⁴, pero en el momento de la necropsia no había indicios de fibrosis en los hígados. El resultado de los triglicéridos es llamativo, ya que esta disminución se ha observado en dietas grasas basadas en aceite de cártamo o de pescado, ricas en ácidos grasos polistaturados n3⁴⁰⁵⁻⁴⁰⁷, pero no es típico de aquellas cuyas grasas proceden de la manteca, como es nuestro caso, y que normalmente aumentan los niveles de triglicéridos significativamente^{399,408}. El porqué de esta disminución, a día de hoy, es una incógnita.

Por último, se evaluaron los niveles de proteína de CIRP en grasa inguinal, epididimal y escapular y, de nuevo, la dispersión de los datos complicó el obtener datos estadísticamente significativos relacionados con el tratamiento con zr17-2. Sin embargo, al analizar el Western blotting de la grasa epididimal con el anticuerpo recombinante contra CIRP (Ab246510), observamos que aparecían bandas a la altura de 28 KDa más intensas que las de 19 KDa. Esta banda se ve aumentada significativamente en las ratas DIO respecto al grupo de dieta control, y podrían ser consistentes con la isoforma Q14011-2, que presenta una delección tras el dominio RRM y una sustitución de secuencia a partir del aminoácido 167^{409,410}. Además, un aumento de CIRP en contexto de la obesidad inducida por dieta podría

explicarse por la inflamación basal crónica asociada a la obesidad⁴¹¹ y el papel de CIRP como mediador de la inflamación⁴¹².

Un comportamiento similar se ha visto al estudiar las fases de letargo-despertar en la hibernación de las ardillas terrestres³⁴⁶. En este caso, los autores describieron variaciones significativas en las bandas de 28 KDa en los distintos órganos, incluyendo la grasa escapular, según el momento de la hibernación mientras que no había cambios en la banda de 19 KDa. Este hecho les llevó a pensar que la razón de que los niveles de mRNA de CIRP no cambien o se reduzcan podría ser debida a la traducción activa de mRNA de CIRP a proteína cuando la temperatura corporal disminuye más allá de un determinado umbral. Por esta razón, es posible que los niveles de CIRP se mantengan relativamente estables hasta un tiempo prolongado en el letargo profundo. De ser así, significaría que la regulación de CIRP en el organismo es aún más compleja de lo que se pensaba, y que su respuesta al frío no depende solo de la sensación térmica si no de la caída de la temperatura corporal producida por el frío.

Pese a todo, zr17-2 no solo no parece inducir el efecto esperado de aumentar los niveles de CIRP, sino que, en prácticamente todas las muestras de ambos grupos de dieta, parece disminuir los niveles de esta proteína. Sin embargo, los resultados derivados de este experimento, tanto a nivel de pesos, de IPGTT y de proteína, parecen quedarse en tendencia y no son determinantes. Quizás aumentando el número de animales disminuiría la dispersión de los datos obtenidos y se obtendrían resultados más concluyentes. O también se podría aumentar la dosis y/o la frecuencia del tratamiento, ya que no hubo muestras de toxicidad del mismo a corto, medio ni largo plazo. También merecería la pena estudiar en profundidad el papel de la banda de CIRP de 28 KDa y su función en la respuesta a la hipotermia, así como la implicación de otros tejidos; por ejemplo, el músculo esquelético⁴¹³. Por tanto, este ensayo deja la puerta abierta a seguir explorando las relaciones entre CIRP, la hipotermia y el papel de zr17-2.

3.7. EXPERIMENTOS *EX VIVO*

De forma similar a lo que se hizo con los adipocitos 3T3-L1, se quiso estudiar el efecto de zr17-2 sobre un cultivo primario de adipocitos humanos. La SM fue diseñada sobre el modelo de CIRP humano y, aunque se une a la región más conservada de la proteína, quizás *in vivo* la interacción entre la molécula y la proteína podría sufrir alguna pequeña variación entre especies que fuese determinante para su funcionamiento real.

La molécula se añadió desde el primero momento de la diferenciación, pero no se apreciaron diferencias significativas en los genes de pardificación, de termogénesis ni CIRP

o RBM3. Esto sucedió tanto en las muestras extraídas a partir de la grasa perirrenal como del hilio en cuanto a los niveles de proteína de CIRP. Debido a la escasez de muestra y el margen tan limitado que permite el trabajo con preadipocitos humanos tomados de muestras clínicas, no se pudo caracterizar la expresión de CIRP a lo largo del tiempo, de forma que se revelase la cinética de la expresión de CIRP en estas muestras. Por tanto, no sabemos si no se modificaron los niveles de CIRP o, simplemente, no fuimos capaces de detectarlos, ya que sí que se vieron diferencias en el análisis de las vesículas.

Al igual que pasaba con los 3T3-L1, se pudo observar una disminución muy significativa en el área de las vesículas en los dos tipos de grasa en todos los pacientes. Esta disminución del tamaño de las vesículas podría ser un indicador de pardificación si fuese acompañado de cambios genéticos específicos. Sin embargo, dada la cinética de expresión de muchos genes y que la pardificación se suele abordar desde la termogénesis, no se puede descartar que el efecto de CIRP no actúe sobre otras vías de señalización más relacionadas con la biogénesis y degradación de las vesículas lipídicas, por ejemplo, que es un campo que cada vez despierta más interés⁴¹⁴.

Además de todo lo comentado en el apartado de los adipocitos 3T3-L1, no hay que obviar la edad, el sexo, y las variabilidades individuales de los pacientes, que son factores que pueden afectar al ensayo. Por ejemplo, se sabe que a medida que va avanzando la edad, disminuye la capacidad de pardificación, se altera la adipogénesis, la secreción de adipocinas, la inflamación y falla la capacidad de producción de calor mediada por la termogénesis^{415,416}. El sexo afecta al programa metabólico del individuo y a su capacidad termogénica a través de las hormonas sexuales⁴¹⁷ de hecho, las hormonas sexuales son los principales responsables del sesgo de sexo en los estudios sobre termogénesis en humanos. Según este estudio, en los hombres se evitan interferencias debidas a las fluctuaciones hormonales durante el ciclo menstrual. Y, por último, parece haber una clara relación entre el estado metabólico del donante y la capacidad de diferenciación de sus preadipocitos del estroma vascular, así como de su capacidad termogénica. Por ejemplo, en donantes obesos se observa una menor capacidad de diferenciación de sus preadipocitos⁴¹⁸, y en el caso de donantes obesos con resistencia a la insulina, los preadipocitos son incapaces de diferenciarse a adipocitos beiges⁴¹⁹.

En otras circunstancias, donde no se hubiesen parado las operaciones y complicado toda la logística debido a la pandemia, se habrían reclutado más pacientes y estudiado otros parámetros, por ejemplo, el efecto de zr17-2 sobre los adipocitos ya maduros. Así que, quizás en un futuro, merezca la pena profundizar en el efecto de zr17-2 en cultivos primarios de adipocitos humanos.

4. CILIO PRIMARIO

Durante el estudio de la respuesta celular a la hipotermia se quiso ahondar en los mecanismos de captación del frío y, así, intentar entender cómo la célula era capaz de “sentir” la temperatura. Y entre los sensores celulares destaca el cilio primario. Esta estructura permite detectar distintos tipos de señales extracelulares y transmitirlos al interior de la célula, lo que le permite adaptarse y reaccionar ante cambios en el ambiente.

Nuestra primera observación en este sentido indicaba que las CSPs estaban localizadas en la zona del cuerpo basal del cilio primario. Desde que se describieron las proteínas de respuesta al frío CIRP y RBM3, se ha visto que, al menos la primera, es capaz de responder, además de a la bajada de temperatura, a otras situaciones de estrés como la hipoxia^{225,420}, la exposición a luz UV⁴²¹, o el daño celular⁴²². Por lo tanto, no es sorprendente encontrar CSPs en los cilios primarios donde pueden servir como sensores químicos para todos esos estímulos. Además, la sobreexpresión de CSPs se ha relacionado con la regulación al alza de proteínas antiapoptóticas como BCL2 y/o una regulación a la baja de proteínas proapoptóticas como BAX, BAD, BAK y otras, protegiendo a las células de la muerte celular programada^{423,424}. Será interesante estudiar la relación real entre las CSPs primarias localizadas en el cilio y la regulación de la apoptosis celular.

4.1. CILIO PRIMARIO E HIPOTERMIA

Pese a que los cilios primarios están presentes en la mayoría de las células de mamíferos, no se había descrito hasta ahora su presencia en células R28, una línea celular constituida a partir de precursores de neuroblastos de la retina de rata. Sin embargo, la relación entre retina y cilio primario no es extraña, ya que los segmentos apicales de los fotorreceptores son básicamente cilios primarios modificados²³⁷. Además, ya hay estudios que demuestran que el ojo es capaz de responder a la hipotermia terapéutica⁴²² y que tanto CIRP como RBM3 están presentes en la retina³²⁸.

En las células R28, hemos observado que, tanto la hipotermia como el estrés de cizalla producido por el flujo, dan lugar a una reducción del número y tamaño de los cilios primarios. Este hecho se puede apreciar también en el sistema cardiovascular, donde hay una correlación entre el flujo y la variación en el número de cilios primarios. En este sistema, el número de cilios disminuye en áreas expuestas a flujo laminar, mientras que, en las zonas de flujo más turbulento u oscilatorio, las células endoteliales presentan más cilios primarios⁴²⁵. La importancia de estas variaciones radica en la capacidad protectora de los cilios primarios, que bloquean la señalización del TGF y secretan óxido nítrico, lo que previene la inflamación y la aterogénesis²³⁶. Es más, las células endoteliales sin cilios

primarios son más propensas a la transición de endotelio a mesénquima mediante la activación de la vía SLUG, incrementando el riesgo de calcificación y aterosclerosis⁴²⁶. En los resultados obtenidos en este trabajo, parece que la reducción de la temperatura tiene un efecto similar a la exposición de los cilios primarios a un flujo menos turbulento. Otro de estos efectos es la reducción del tamaño del cilio primario inducida por el frío.

Actualmente, hay varias hipótesis relacionadas con el acortamiento del cilio primario. En las células epiteliales de los túbulos renales, la señalización del TGF- β induce el acortamiento de los cilios primarios⁴²⁷. Por lo tanto, la hipotermia podría ser capaz de aumentar la señalización de TGF y disminuir la longitud de los cilios. Además, el aumento en longitud del cilio primario parece estar regulado por la actividad de los GPCRs, los niveles de calcio y la despolimerización de la actina²³¹; así que un bloqueo de este mecanismo también podría llevar a la reducción de la longitud de los cilios. Por último, un informe reciente ha relacionado el acortamiento primario de los cilios con un mecanismo de fragmentación⁴²⁸. Será necesario profundizar más en el tema para averiguar qué mecanismo específico es desencadenado por la hipotermia en el cilio primario.

4.2. CILIO PRIMARIO Y FLUJO

La detección del estrés de cizalla es un mecanismo celular que asegura el buen funcionamiento de la circulación de fluidos en el organismo, y el cilio primario es una pieza clave del engranaje. Por ejemplo, una simple alteración de la largura del cilio en los túbulos y conductos de las nefronas provoca la formación de quistes en el riñón y el desarrollo de la PKD^{283,429}. Además, las células endoteliales son capaces de percibir características espaciotemporales del flujo sanguíneo a través de los cilios primarios⁴³⁰ y otras moléculas mecanotransductoras como PIEZO1⁴³¹, lo que les permite determinar las propiedades morfofuncionales de la red vascular⁴³². En nuestro estudio hemos demostrado que el estrés de cizalla, ya sea fruto de un flujo laminar o turbulento, aumenta la expresión de las proteínas de respuesta al frío, implicando a estas proteínas en la señalización intracelular de la captación de las modificaciones del flujo. Esta observación abre toda una nueva vía de investigación para comprender las implicaciones fisiológicas de este hecho, lo que justifica la necesidad de una investigación más profunda.

Esta activación de la expresión de las CSPs está modulada por el tipo de flujo que perciben las células a través del cilio primario, y condicionada por el tipo celular. Por ejemplo, con un flujo laminar de 31 $\mu\text{L}/\text{min}$ que genera una presión lineal de 0,5 dinas/ cm^2 , observamos un pico de expresión de CIRP a las 1-2 h de exposición, mientras que en el caso de RBM3 el cenit se daba a las 8-12 h. Sin embargo, con una presión más elevada (1 dina/ cm^2), provocada por un flujo de 62 $\mu\text{L}/\text{min}$, no hubo diferencias en la expresión de mRNA de CIRP,

aunque sí en RBM3, que mantuvo un patrón de expresión similar a la condición menos severa. Estos datos coinciden con los obtenidos a partir de la minería de datos, donde las células sometidas a baja presión lineal tuvieron diferencias en la expresión de CIRP mientras que con la presión más elevada este hecho no sucedía; sin embargo, los niveles de RBM3 aumentaban en todas las condiciones^{348,349,433}. Estas observaciones sugieren que la relación entre el estrés de cizalla y la regulación de la expresión de CIRP depende de pequeños detalles en los que merecería la pena profundizar.

Además, la presión lineal no solo afecta a la expresión de las proteínas de respuesta al frío. El número de cilios era significativamente inferior en las células sometidas a flujos bajos, sin embargo, el flujo más alto (124 $\mu\text{l}/\text{min}$) presentaba valores similares a las células estáticas. Esto puede ser debido a que, con una presión elevada, la corriente pudo inducir algunas perturbaciones en las condiciones generales del flujo, acercándose más a lo que sucede en un flujo turbulento.

A diferencia del flujo lineal, el flujo oscilante indujo un aumento en la expresión de CIRP y RBM3 mucho más rápido. A la hora de exposición a flujo, el mRNA de ambos genes estaba sobreexpresado significativamente, lo que se tradujo en el caso de CIRP en un aumento en los niveles de proteína a las 2 h. En el caso de RBM3, sin embargo, no encontramos cambios significativos en los niveles de proteína. Probablemente esto sea debido al pequeño porcentaje que representan los cilios primarios en el volumen total de la célula, por lo que es fácil pasar por alto cambios proteicos que pueden ser relevantes a nivel local pero que se diluyen al tener en cuenta la expresión total en la célula. Además, observamos que la privación de suero disminuye notablemente la expresión de la proteína RBM3, por lo que puede que tenga alguna función aún desconocida que se relacione con una inhibición de su expresión ante esta situación. De todas formas, una vez que se ponga a punto y se valide el dispositivo de flujo oscilante, sería interesante repetir el ensayo de flujo oscilante en un sistema más controlado de forma que se obtuvieran datos más homogéneos.

De nuevo, nuestros datos fueron respaldados por los trabajos de Mohammed, et al.³⁴⁸, Kunnen, et al.³⁴⁹ y Qiao et al.⁴³³ donde, analizados en conjunto y a pesar de estar hechos con células distintas a las nuestras (de origen renal en su caso), se ve un aumento significativo inducido por el estrés de cizalla tanto de CIRP como de RBM3 a corto plazo (3h), una sobreexpresión de RBM3 a medio plazo (6h) e incluso una disminución de RBM3 a largo plazo (24h). Estos datos sugieren que la participación de estas proteínas en el mecanismo de detección del estrés de cizalla es una característica común en la biología celular, lo que abre un campo que merece la pena explorar.

4.3. CIRP Y RBM3 EN CENTROSOMAS

A lo largo de los experimentos hemos visto que estas proteínas colocalizan con el cuerpo basal de los cilios primario en las células R28. De hecho, esta asociación se mantiene incluso durante la metafase del ciclo celular, donde los cilios primarios se desorganizan en preparación de la división celular²³⁷. Si bien ambas proteínas se modulan como respuesta a flujo, como hemos visto en este trabajo, cabe preguntarse qué papel tienen a lo largo de la división celular. Probablemente, en esas circunstancias su labor puede estar también asociada a su papel como proteínas de unión a RNA. De hecho, en torno al centrosoma se da una alta concentración de mRNAs que parecen traducirse localmente, así que no es de extrañar que también se acumulen proteínas de este tipo implicadas en el mantenimiento del material pericentriolar u otras funciones relacionadas con el centrosoma^{434,435}. O, quizás, dada la rápida modificación de la estructura ciliar y la respuesta observada en la exposición a flujo, CIRP y RBM3 estén más implicadas en la biogénesis y mantenimiento del cilio y que, para garantizar la velocidad de la respuesta, se mantengan asociadas al centrosoma como un punto de localización subcelular. Sea cual sea la situación, un análisis de los mRNAs unidos a estas proteínas podría darnos una pista sobre la función de estas proteínas en el cuerpo basal y en el centriolo.

5. REFLEXIONES

CIRP es una proteína de unión a RNA que aumenta como respuesta a múltiples situaciones de estrés, entre ellas el frío. Durante todo este trabajo hemos intentado profundizar en el efecto que tendría aumentar los niveles de CIRP, gracias al tratamiento con zr17-2, en el metabolismo de la grasa empleando distintos modelos experimentales. Pese a todo el esfuerzo, los resultados han sido limitados.

Sin embargo, quizás la pluripotencialidad de CIRP es precisamente donde radica la dificultad de su empleo. Es una proteína muy conservada entre especies²²⁵, sujeta a una estrecha regulación, y cuya actividad deriva en acciones contrapuestas, por ejemplo, siendo capaz de actuar como promotor y supresor oncogénico⁴³⁶, según el momento, la vía o el contexto de actuación. Sin embargo, la idea que fundamenta este trabajo debería trascender a trabajos posteriores, quizás con una diana más específica. Por ejemplo, las SMs que se identificaron como miméticos de la hipotermia se diseñaron a partir de la estructura tridimensional de CIRP³³⁹. Sería muy buena idea hacer lo mismo con la proteína RBM3 pero, desafortunadamente, todavía no se ha dilucidado su estructura tridimensional. Ya que parece que RBM3 tiene una respuesta más limitada que CIRP, podría ser una diana más específica para diseñar estas SMs. Y, sobre todo, aún hace falta mucho trabajo en la

caracterización de la respuesta al frío. Por ejemplo, apenas hay estudios del efecto del frío en cultivos de adipocitos y la mayoría de ellos no tratan la pardificación.

Por otra parte, sabemos que znr17-2 actúa sobre la expresión de CIRP y produce efectos protectores similares a los generados por la hipotermia^{368,369}, al menos en ciertas condiciones, pero algunas de las consecuencias de su uso podrían deberse a su interacción con otras vías de señalización distinta a través de una actividad "off-target". Todo esto requiere estudios más profundos que se abordarán en el futuro.

Sea como fuere, la hipotermia moderada es una condición que la naturaleza ha aprendido a utilizar en su beneficio por ejemplo con la hibernación⁴³⁷, y cuyos efectos beneficiosos son una herramienta terapéutica ampliamente utilizada por la medicina actual⁴³⁸⁻⁴⁴⁰. Por todo ello, merece la pena seguir investigando, profundizando y explorando, hasta dar con un resultado que arroje luz suficiente como para encontrar el cabo que nos permita ir desentrañando la madeja del conocimiento, también en el caso de la obesidad.

Durante la investigación principal, se abrió una pequeña investigación tangencial con los cilios primarios, que resultó ser fascinante. Gracias a ella podemos entrever que la respuesta mediada por las proteínas de respuesta al frío es mucho más compleja de lo previsto. Y su regulación como respuesta al flujo nos ha permitido ver una respuesta mucho más ágil y rápida de lo que los estudios con hipotermia aparentaban en un principio, bien por la magnitud del estímulo que supone la temperatura o bien por el estrecho control del organismo ante un mecanismo con tantas implicaciones a nivel orgánico. Además, personalmente, me parece un ejemplo precioso de la importancia de la ciencia básica. Al fin y al cabo, esta estructura que cuando se descubrió hace 60 años se consideraba vestigial²³² hoy en día acumula "natures", "new englands" y "sciences". La ciencia aplicada se fundamenta en la ciencia básica, y no puede desarrollarse la una sin la otra. Solo hay que ver cómo ha crecido el campo de investigación en los cilios primarios, desde los 234 artículos publicados en el año 2000 hasta los 1054 que se publicaron el año pasado (búsqueda en Pubmed para el término "primary cilia").

Conclusiones

Las conclusiones de este trabajo son las siguientes:

1. Las moléculas zr17-2, SD4 y otras relacionadas son capaces de aumentar los niveles de CIRP en cultivos celulares de células R28 tras 4 días de tratamiento.
2. Una mayor confluencia del cultivo potencia el efecto de zr17-2 en células R28, favoreciendo el acúmulo de CIRP tras 4 días de tratamiento.
3. Zr17-2 es capaz de disminuir el tamaño de las vesículas lipídicas en la línea de adipocitos de ratón 3T3-L1. Sin embargo, no se perciben cambios a nivel genético en los marcadores de pardificación estudiados.
4. Tras hacer muchas pruebas *in vivo* del efecto de zr17-2 en modelos animales, hemos visto que la SM no es capaz de modular la expresión génica o proteica de CIRP de forma consistente a corto, medio ni largo plazo.
5. Zr17-2 tampoco es capaz de modificar los parámetros metabólicos estudiados (peso, índice glucémico o marcadores bioquímicos) en los animales tratados a largo plazo ni parece tener efecto en el metabolismo lipídico de animales sometidos a dieta rica en grasa.
6. En cultivos *ex vivo* de preadipocitos humanos, zr17-2 es capaz de disminuir el tamaño de las vesículas lipídicas de los cultivos procedentes tanto de grasa perirrenal como del hilio renal, y también de aumentar el número de vesículas por células en alguno de los casos. Sin embargo, no se aprecian cambios en el programa genético de los marcadores de pardificación estudiados.
7. En general, podemos afirmar que zr17-2 tiene un efecto muy modesto sobre el metabolismo lipídico y en el futuro habrá que comprobar cómo actúa en combinación con otros compuestos activos.
8. Las proteínas inducidas por frío se acumulan en el centrosoma de las células durante todo el ciclo celular.
9. La hipotermia moderada y el flujo disminuyen el porcentaje de cilios primarios y su longitud en células R28.

10. Tanto el flujo laminar como el oscilante modifican la expresión de CIRP y RBM3 en células R28. Estas modificaciones se traducen en un aumento del nivel de proteína en el caso de CIRP.

11. A falta de más ensayos, el dispositivo de flujo oscilante parece reproducir el aumento de CIRP de las células sometidas a flujo oscilante observado en las placas de Petri.

Bibliografía

- 1 Gewin V. Has the 'great resignation' hit academia? *Nature* 2022; 606: 211–3.
- 2 Obesity. <https://www.who.int/news-room/facts-in-pictures/detail/6-facts-on-obesity> (accessed Feb 16, 2022).
- 3 Defining Adult Overweight & Obesity | Overweight & Obesity | CDC. <https://www.cdc.gov/obesity/adult/defining.html> (accessed April 12, 2022).
- 4 CHAN M. Obesity and Diabetes: The Slow-Motion Disaster. *Milbank Q* 2017; 95: 11–4.
- 5 Obesity and overweight. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight> (accessed Feb 24, 2022).
- 6 Di Cesare M, Bentham J, Stevens GA, et al. Trends in adult body-mass index in 200 countries from 1975 to 2014: A pooled analysis of 1698 population-based measurement studies with 19.2 million participants. *The Lancet* 2016; 387: 1377–96.
- 7 Ward ZJ, Bleich SN, Cradock AL, et al. Projected U.S. State-Level Prevalence of Adult Obesity and Severe Obesity. *N Engl J Med* 2019; 381: 2440–50.
- 8 Peng W, Mu Y, Hu Y, Li B, Raman J, Sui Z. Double Burden of Malnutrition in the Asia-Pacific Region-A Systematic Review and Meta-analysis. *J Epidemiol Glob Health* 2020; 10: 16–27.
- 9 Wei J, Bhurtyal A, Dhungana RR, et al. Changes in patterns of the double burden of undernutrition and overnutrition in Nepal over time. *Obes Rev* 2019; 20: 1321–34.
- 10 Ford ND, Patel SA, Narayan KMV. Obesity in Low- and Middle-Income Countries: Burden, Drivers, and Emerging Challenges. <https://doi.org/10.1146/annurev-publhealth-031816-044604> 2017; 38: 145–64.
- 11 Weihrauch-Blüher S, Wiegand S. Risk Factors and Implications of Childhood Obesity. *Curr Obes Rep* 2018; 7: 254–9.
- 12 Rodriguez-Martinez A, Zhou B, Sophiea MK, et al. Height and body-mass index trajectories of school-aged children and adolescents from 1985 to 2019 in 200 countries and territories: a pooled analysis of 2181 population-based studies with 65 million participants. *Lancet* 2020; 396: 1511–24.
- 13 Di Cesare M, Sorić M, Bovet P, et al. The epidemiological burden of obesity in childhood: A worldwide epidemic requiring urgent action. *BMC Med.* 2019; 17. DOI:10.1186/s12916-019-1449-8.
- 14 Weihrauch-Blüher S, Schwarz P, Klusmann JH. Childhood obesity: increased risk for cardiometabolic disease and cancer in adulthood. *Metabolism* 2019; 92: 147–52.
- 15 Bleich S, Cutler D, Murray C, Adams A. Why is the developed world obese? *Annu Rev Public Health* 2008; 29: 273–95.
- 16 Blüher M. Obesity: global epidemiology and pathogenesis. *Nat Rev Endocrinol* 2019; 15: 288–98.
- 17 Stunkard AJ, Harris JR, Pedersen NL, McClearn GE. The body-mass index of twins who have been reared apart. *N Engl J Med* 1990; 322: 1483–7.

- 18 BÖRJESON M. The aetiology of obesity in children. A study of 101 twin pairs. *Acta Paediatr Scand* 1976; 65: 279–87.
- 19 Lindberg I, Fricker LD. Obesity, POMC, and POMC-processing Enzymes: Surprising Results From Animal Models. *Endocrinology* 2021; 162. DOI:10.1210/ENDOCR/BQAB155.
- 20 Wu Y, He H, Cheng Z, Bai Y, Ma X. The Role of Neuropeptide Y and Peptide YY in the Development of Obesity via Gut-brain Axis. *Curr Protein Pept Sci* 2019; 20: 750–8.
- 21 Cui H, López M, Rahmouni K. The cellular and molecular bases of leptin and ghrelin resistance in obesity. *Nat Rev Endocrinol* 2017; 13: 338–51.
- 22 Farooqi IS, Yeo GSH, Keogh JM, et al. Dominant and recessive inheritance of morbid obesity associated with melanocortin 4 receptor deficiency. *J Clin Invest* 2000; 106: 271–9.
- 23 Yasuda K, Matsunaga T, Adachi T, Aoki N, Tsujimoto G, Tsuda K. Adrenergic receptor polymorphisms and autonomic nervous system function in human obesity. *Trends Endocrinol Metab* 2006; 17: 269–75.
- 24 Jia JJ, Zhang X, Ge CR, Jois M. The polymorphisms of UCP2 and UCP3 genes associated with fat metabolism, obesity and diabetes. *Obes Rev* 2009; 10: 519–26.
- 25 Jia JJ, Tian YB, Cao ZH, et al. The polymorphisms of UCP1 genes associated with fat metabolism, obesity and diabetes. *Mol Biol Rep* 2010; 37: 1513–22.
- 26 Goodarzi MO. Genetics of obesity: what genetic association studies have taught us about the biology of obesity and its complications. *Lancet Diabetes Endocrinol* 2018; 6: 223–36.
- 27 McCabe MP, Mavoa H, Ricciardelli LA, Schultz JT, Waqa G, Fotu KF. Socio-cultural agents and their impact on body image and body change strategies among adolescents in Fiji, Tonga, Tongans in New Zealand and Australia. *Obes Rev* 2011; 12 Suppl 2: 61–7.
- 28 Swinburn BA, Sacks G, Hall KD, et al. The global obesity pandemic: shaped by global drivers and local environments. *Lancet* 2011; 378: 804–14.
- 29 Obesity Update - OECD. <https://www.oecd.org/health/obesity-update.htm> (accessed April 20, 2022).
- 30 Wilkinson R, Pickett K. *The Spirit Level New Edition: Why Equality Is Better For Everyone*. Penguin Sociology 2010; : 15–49.
- 31 Darmon N, Drewnowski A. Contribution of food prices and diet cost to socioeconomic disparities in diet quality and health: a systematic review and analysis. *Nutr Rev* 2015; 73: 643–60.
- 32 Drewnowski A. The real contribution of added sugars and fats to obesity. *Epidemiol Rev* 2007; 29: 160–71.
- 33 Wallmann-Sperlich B, Chau JY, Froboese I. Self-reported actual and desired proportion of sitting, standing, walking and physically demanding tasks of office employees in the workplace setting: Do they fit together? *BMC Res Notes* 2017; 10: 1–6.
- 34 Thorp AA, Healy GN, Winkler E, et al. Prolonged sedentary time and physical activity in workplace and non-work contexts: a cross-sectional study of office, customer service and call centre employees. *Int J Behav Nutr Phys Act* 2012; 9. DOI:10.1186/1479-5868-9-128.
- 35 Parry S, Straker L. The contribution of office work to sedentary behaviour associated risk. *BMC Public Health* 2013; 13. DOI:10.1186/1471-2458-13-296.

- 36 Van Dommelen P, Coffeng JK, Van Der Ploeg HP, Van Der Beek AJ, Boot CRL, Hendriksen IJM. Objectively Measured Total and Occupational Sedentary Time in Three Work Settings. *PLoS One* 2016; 11. DOI:10.1371/JOURNAL.PONE.0149951.
- 37 Church TS, Thomas DM, Tudor-Locke C, et al. Trends over 5 decades in U.S. occupation-related physical activity and their associations with obesity. *PLoS One* 2011; 6. DOI:10.1371/JOURNAL.PONE.0019657.
- 38 Guthold R, Stevens GA, Riley LM, Bull FC. Global trends in insufficient physical activity among adolescents: a pooled analysis of 298 population-based surveys with 1·6 million participants. *Lancet Child Adolesc Health* 2020; 4: 23–35.
- 39 Sallis JF, Cerin E, Conway TL, et al. Physical activity in relation to urban environments in 14 cities worldwide: a cross-sectional study. *Lancet* 2016; 387: 2207–17.
- 40 Creatore MI, Glazier RH, Moineddin R, et al. Association of Neighborhood Walkability With Change in Overweight, Obesity, and Diabetes. *JAMA* 2016; 315: 2211–20.
- 41 Gordon-Larsen P. Food availability/convenience and obesity. *Adv Nutr* 2014; 5: 809–17.
- 42 Gouri Suresh SS, Schauder SA. Income Segregation and Access to Healthy Food. *Am J Prev Med* 2020; 59: e31–8.
- 43 Darbre PD. Endocrine Disruptors and Obesity. *Curr Obes Rep* 2017; 6: 18–27.
- 44 Vrijheid M, Fossati S, Maitre L, et al. Early-Life Environmental Exposures and Childhood Obesity: An Exposome-Wide Approach. *Environ Health Perspect* 2020; 128: 1–14.
- 45 Kahn LG, Philippat C, Nakayama SF, Slama R, Trasande L. Endocrine-disrupting chemicals: implications for human health. *Lancet Diabetes Endocrinol* 2020; 8: 703–18.
- 46 Valvi D, Casas M, Mendez MA, et al. Prenatal bisphenol a urine concentrations and early rapid growth and overweight risk in the offspring. *Epidemiology* 2013; 24: 791–9.
- 47 Hoepner LA, Whyatt RM, Widen EM, et al. Bisphenol A and Adiposity in an Inner-City Birth Cohort. *Environ Health Perspect* 2016; 124: 1644–50.
- 48 Starling AP, Adgate JL, Hamman RF, Kechris K, Calafat AM, Dabelea D. Prenatal exposure to per- and polyfluoroalkyl substances and infant growth and adiposity: the Healthy Start Study. *Environ Int* 2019; 131. DOI:10.1016/J.ENVINT.2019.104983.
- 49 Mora AM, Oken E, Rifas-Shiman SL, et al. Prenatal Exposure to Perfluoroalkyl Substances and Adiposity in Early and Mid-Childhood. *Environ Health Perspect* 2017; 125: 467–73.
- 50 Díaz Santana M V., Hankinson SE, Bigelow C, et al. Urinary concentrations of phthalate biomarkers and weight change among postmenopausal women: a prospective cohort study. *Environ Health* 2019; 18. DOI:10.1186/S12940-019-0458-6.
- 51 Song Y, Hauser R, Hu FB, Franke AA, Liu S, Sun Q. Urinary concentrations of bisphenol A and phthalate metabolites and weight change: a prospective investigation in US women. *Int J Obes (Lond)* 2014; 38: 1532–7.
- 52 Cardenas A, Hauser R, Gold DR, et al. Association of Perfluoroalkyl and Polyfluoroalkyl Substances With Adiposity. *JAMA Netw Open* 2018; 1. DOI:10.1001/JAMANETWORKOPEN.2018.1493.

- 53 Liu G, Dhana K, Furtado JD, et al. Perfluoroalkyl substances and changes in body weight and resting metabolic rate in response to weight-loss diets: A prospective study. *PLoS Med* 2018; 15. DOI:10.1371/JOURNAL.PMED.1002502.
- 54 Marchesi JR, Adams DH, Fava F, et al. The gut microbiota and host health: A new clinical frontier. *Gut* 2016; 65: 330–9.
- 55 Cox AJ, West NP, Cripps AW. Obesity, inflammation, and the gut microbiota. *Lancet Diabetes Endocrinol* 2015; 3: 207–15.
- 56 Abenavoli L, Scarpellini E, Colica C, et al. Gut Microbiota and Obesity: A Role for Probiotics. *Nutrients* 2019; 11. DOI:10.3390/NU11112690.
- 57 Stojanov S, Berlec A, Štrukelj B. The Influence of Probiotics on the Firmicutes/Bacteroidetes Ratio in the Treatment of Obesity and Inflammatory Bowel disease. *Microorganisms* 2020; 8: 1–16.
- 58 Haslam DW, James WPT. Obesity. *Lancet* 2005; 366: 1197–209.
- 59 Bray GA. Medical consequences of obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 2583–9.
- 60 Flegal KM, Kit BK, Orpana H, Graubard BI. Association of all-cause mortality with overweight and obesity using standard body mass index categories: a systematic review and meta-analysis. *JAMA* 2013; 309: 71–82.
- 61 Bhaskaran K, dos-Santos-Silva I, Leon DA, Douglas IJ, Smeeth L. Association of BMI with overall and cause-specific mortality: a population-based cohort study of 3.6 million adults in the UK. *Lancet Diabetes Endocrinol* 2018; 6: 944–53.
- 62 Ma C, Avenell A, Bolland M, et al. Effects of weight loss interventions for adults who are obese on mortality, cardiovascular disease, and cancer: systematic review and meta-analysis. *BMJ* 2017; 359: j4849.
- 63 Nyberg ST, Batty GD, Pentti J, et al. Obesity and loss of disease-free years owing to major non-communicable diseases: a multicohort study. *Lancet Public Health* 2018; 3: e490–7.
- 64 Lavie CJ, Deedwania P, Ortega FB. Obesity is rarely healthy. *Lancet Diabetes Endocrinol* 2018; 6: 678–9.
- 65 Calle EE, Rodriguez C, Walker-Thurmond K, Thun MJ. Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults. *N Engl J Med* 2003; 348: 1625–38.
- 66 Lauby-Secretan B, Scoccianti C, Loomis D, Grosse Y, Bianchini F, Straif K. Body Fatness and Cancer--Viewpoint of the IARC Working Group. *N Engl J Med* 2016; 375: 794–8.
- 67 Kyrgiou M, Kalliala I, Markozannes G, et al. Adiposity and cancer at major anatomical sites: umbrella review of the literature. *BMJ* 2017; 356. DOI:10.1136/BMJ.J477.
- 68 Ng ACT, Delgado V, Borlaug BA, Bax JJ. Diabetes: the combined burden of obesity and diabetes on heart disease and the role of imaging. *Nat Rev Cardiol* 2021; 18: 291–304.
- 69 Twig G, Afek A, Derazne E, et al. Diabetes risk among overweight and obese metabolically healthy young adults. *Diabetes Care* 2014; 37: 2989–95.
- 70 Després JP, Lemieux I. Abdominal obesity and metabolic syndrome. *Nature* 2006 444:7121 2006; 444: 881–7.

- 71 Liang XP, Or CY, Tsoi MF, Cheung CL, Cheung BMY, Division of Clinical Pharmacology and Therapeutics D of MTU of HKHK. Prevalence of metabolic syndrome in the United States National Health and Nutrition Examination Survey (nhanes) 2011–2018. *Eur Heart J* 2021; 42. DOI:10.1093/EURHEARTJ/EHAB724.2420.
- 72 Noubiap JJ, Nansseu JR, Lontchi-Yimagou E, et al. Global, regional, and country estimates of metabolic syndrome burden in children and adolescents in 2020: a systematic review and modelling analysis. *Lancet Child Adolesc Health* 2022; 6: 158–70.
- 73 O'Neill S, O'Driscoll L. Metabolic syndrome: a closer look at the growing epidemic and its associated pathologies. *Obes Rev* 2015; 16: 1–12.
- 74 Li L, Liu DW, Yan HY, Wang ZY, Zhao SH, Wang B. Obesity is an independent risk factor for non-alcoholic fatty liver disease: evidence from a meta-analysis of 21 cohort studies. *Obes Rev* 2016; 17: 510–9.
- 75 Maurice J, Manousou P. Non-alcoholic fatty liver disease. *Clin Med (Lond)* 2018; 18: 245–50.
- 76 Singh S, Dulai PS, Zarrinpar A, Ramamoorthy S, Sandborn WJ. Obesity in IBD: epidemiology, pathogenesis, disease course and treatment outcomes. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2017; 14: 110–21.
- 77 Nam SY. Obesity-Related Digestive Diseases and Their Pathophysiology. *Gut Liver* 2017; 11: 323–34.
- 78 Younossi Z, Tacke F, Arrese M, et al. Global Perspectives on Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Nonalcoholic Steatohepatitis. *Hepatology* 2019; 69: 2672–82.
- 79 Polyzos SA, Kountouras J, Mantzoros CS. Obesity and nonalcoholic fatty liver disease: From pathophysiology to therapeutics. *Metabolism* 2019; 92: 82–97.
- 80 Sheka AC, Adeyi O, Thompson J, Hameed B, Crawford PA, Ikramuddin S. Nonalcoholic Steatohepatitis: A Review. *JAMA* 2020; 323: 1175–83.
- 81 Poston L, Caleyachetty R, Cnattingius S, et al. Preconceptional and maternal obesity: epidemiology and health consequences. *Lancet Diabetes Endocrinol* 2016; 4: 1025–36.
- 82 Catalano PM, Shankar K. Obesity and pregnancy: mechanisms of short term and long term adverse consequences for mother and child. *BMJ* 2017; 356. DOI:10.1136/BMJ.J1.
- 83 Bazurro S, Ball L, Pelosi P. Perioperative management of obese patient. *Curr Opin Crit Care* 2018; 24: 560–7.
- 84 Peters U, Dixon AE, Forno E. Obesity and asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2018; 141: 1169–79.
- 85 Mamun AA, Lawlor DA, Alati R, O'Callaghan MJ, Williams GM, Najman JM. Increasing body mass index from age 5 to 14 years predicts asthma among adolescents: evidence from a birth cohort study. *Int J Obes (Lond)* 2007; 31: 578–83.
- 86 Zhang Z, Lai HJ, Roberg KA, et al. Early childhood weight status in relation to asthma development in high-risk children. *J Allergy Clin Immunol* 2010; 126: 1157–62.
- 87 Forno E, Young OM, Kumar R, Simhan H, Celedon JC. Maternal obesity in pregnancy, gestational weight gain, and risk of childhood asthma. *Pediatrics* 2014; 134: e535–46.

- 88 Dumas O, Varraso R, Gillman MW, Field AE, Camargo CA. Longitudinal study of maternal body mass index, gestational weight gain, and offspring asthma. *Allergy* 2016; 71: 1295–304.
- 89 The top 10 causes of death. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death> (accessed May 4, 2022).
- 90 Lainscak M, von Haehling S, Doehner W, et al. Body mass index and prognosis in patients hospitalized with acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* 2011; 2: 81–6.
- 91 Suissa S. Medications to modify lung function decline in chronic obstructive pulmonary disease: some hopeful signs. *Am J Respir Crit Care Med* 2008; 178: 322–3.
- 92 Spelta F, Pasini AMF, Cazzoletti L, Ferrari M. Body weight and mortality in COPD: focus on the obesity paradox. *Eat Weight Disord* 2018; 23: 15–22.
- 93 Wu TD, Ejike CO, Wise RA, McCormack MC, Brigham EP. Investigation of the Obesity Paradox in Chronic Obstructive Pulmonary Disease, According to Smoking Status, in the United States. *Am J Epidemiol* 2019; 188: 1977–83.
- 94 Masa JF, Pépin JL, Borel JC, Mokhlesi B, Murphy PB, Sánchez-Quiroga MÁ. Obesity hypoventilation syndrome. *Eur Respir Rev* 2019; 28. DOI:10.1183/16000617.0097-2018.
- 95 Patel SR. Obstructive Sleep Apnea. *Ann Intern Med* 2019; 171: ITC81–96.
- 96 WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard | WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard With Vaccination Data. <https://covid19.who.int/> (accessed May 6, 2022).
- 97 Richardson S, Hirsch JS, Narasimhan M, et al. Presenting Characteristics, Comorbidities, and Outcomes Among 5700 Patients Hospitalized With COVID-19 in the New York City Area. *JAMA* 2020; 323: 2052–9.
- 98 Demeulemeester F, de Punder K, van Heijningen M, van Doesburg F. Obesity as a Risk Factor for Severe COVID-19 and Complications: A Review. *Cells* 2021; 10. DOI:10.3390/CELLS10040933.
- 99 Zhou Y, Chi J, Lv W, Wang Y. Obesity and diabetes as high-risk factors for severe coronavirus disease 2019 (Covid-19). *Diabetes Metab Res Rev* 2021; 37. DOI:10.1002/DMRR.3377.
- 100 Price-Haywood EG, Burton J, Fort D, Seoane L. Hospitalization and Mortality among Black Patients and White Patients with Covid-19. *N Engl J Med* 2020; 382: 2534–43.
- 101 Hamer M, Kivimäki M, Gale CR, Batty GD. Lifestyle risk factors, inflammatory mechanisms, and COVID-19 hospitalization: A community-based cohort study of 387,109 adults in UK. *Brain Behav Immun* 2020; 87: 184–7.
- 102 Huang Y, Lu Y, Huang YM, et al. Obesity in patients with COVID-19: a systematic review and meta-analysis. *Metabolism* 2020; 113. DOI:10.1016/J.METABOL.2020.154378.
- 103 Maurya R, Sebastian P, Namdeo M, Devender M, Gertler A. COVID-19 Severity in Obesity: Leptin and Inflammatory Cytokine Interplay in the Link Between High Morbidity and Mortality. *Front Immunol* 2021; 12. DOI:10.3389/FIMMU.2021.649359.
- 104 Kompaniyets L, Goodman AB, Belay B, et al. Body Mass Index and Risk for COVID-19–Related Hospitalization, Intensive Care Unit Admission, Invasive Mechanical Ventilation, and Death — United States, March–December 2020. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2021; 70: 355–61.

- 105 Bartleson JM, Radenkovic D, Covarrubias AJ, Furman D, Winer DA, Verdin E. SARS-CoV-2, COVID-19 and the aging immune system. *Nature Aging* 2021 1:9 2021; 1: 769–82.
- 106 Kass DA, Duggal P, Cingolani O. Obesity could shift severe COVID-19 disease to younger ages. *Lancet* 2020; 395: 1544–5.
- 107 Tartof SY, Murali SB, Malden DE. Obesity and Mortality Among Patients Diagnosed With COVID-19. *Ann Intern Med* 2021; 174: 887–8.
- 108 Cunningham JW, Vaduganathan M, Claggett BL, et al. Clinical Outcomes in Young US Adults Hospitalized With COVID-19. *JAMA Intern Med* 2020; 181: 379–81.
- 109 Mason SM, Flint AJ, Roberts AL, Agnew-Blais J, Koenen KC, Rich-Edwards JW. Posttraumatic stress disorder symptoms and food addiction in women by timing and type of trauma exposure. *JAMA Psychiatry* 2014; 71: 1271–8.
- 110 Konttinen H. Emotional eating and obesity in adults: the role of depression, sleep and genes. *Proc Nutr Soc* 2020; 79: 283–9.
- 111 Muscogiuri G, Barrea L, Annunziata G, et al. Obesity and sleep disturbance: the chicken or the egg? *Crit Rev Food Sci Nutr* 2019; 59: 2158–65.
- 112 Kivimäki M, Batty GD, Singh-Manoux A, et al. Association between common mental disorder and obesity over the adult life course. *Br J Psychiatry* 2009; 195: 149–55.
- 113 Kivimäki M, Lawlor DA, Singh-Manoux A, et al. Common mental disorder and obesity: insight from four repeat measures over 19 years: prospective Whitehall II cohort study. *BMJ* 2009; 339: 902–5.
- 114 Rao WW, Zong QQ, Zhang JW, et al. Obesity increases the risk of depression in children and adolescents: Results from a systematic review and meta-analysis. *J Affect Disord* 2020; 267: 78–85.
- 115 Milaneschi Y, Simmons WK, van Rossum EFC, Penninx BW. Depression and obesity: evidence of shared biological mechanisms. *Mol Psychiatry* 2019; 24: 18–33.
- 116 Rubino F, Puhl RM, Cummings DE, et al. Joint international consensus statement for ending stigma of obesity. *Nat Med* 2020; 26: 485–97.
- 117 Flint SW, Nobles J, Gately P, Sahota P. Weight stigma and discrimination: a call to the media. *Lancet Diabetes Endocrinol* 2018; 6: 169–70.
- 118 Pont SJ, Puhl R, Cook SR, et al. Stigma Experienced by Children and Adolescents With Obesity. *Pediatrics* 2017; 140. DOI:10.1542/PEDS.2017-3034.
- 119 Palad CJ, Yarlagadda S, Stanford FC. Weight stigma and its impact on paediatric care. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 2019; 26: 19–24.
- 120 OECD. The Heavy Burden of Obesity. OECD, 2019 DOI:10.1787/67450d67-en.
- 121 Shrestha N, Kukkonen-Harjula KT, Verbeek JH, Ijaz S, Hermans V, Pedisic Z. Workplace interventions for reducing sitting at work. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2018; 2018. DOI:10.1002/14651858.CD010912.pub4.
- 122 Staiano AE, Beyl RA, Guan W, Hendrick CA, Hsia DS, Newton RL. Home-based exergaming among children with overweight and obesity: a randomized clinical trial. *Pediatr Obes* 2018; 13: 724–33.

- 123 Valeriani F, Protano C, Marotta D, et al. Exergames in Childhood Obesity Treatment: A Systematic Review. *Int J Environ Res Public Health* 2021; 18. DOI:10.3390/IJERPH18094938.
- 124 Obesity prevention | Knowledge for policy. https://knowledge4policy.ec.europa.eu/health-promotion-knowledge-gateway/obesity_en#navigation5 (accessed May 14, 2022).
- 125 CDC Nutrition, Physical Activity, and Obesity - Legislation | Chronic Disease and Health Promotion Data & Indicators. <https://chronicdata.cdc.gov/Nutrition-Physical-Activity-and-Obesity/CDC-Nutrition-Physical-Activity-and-Obesity-Legisl/nxst-x9p4> (accessed May 14, 2022).
- 126 Hawkes C, Smith TG, Jewell J, et al. Smart food policies for obesity prevention. *Lancet* 2015; 385: 2410–21.
- 127 Strategy on nutrition, overweight and obesity-related health issues. https://ec.europa.eu/health/nutrition-and-physical-activity/overview/strategy-nutrition-overweight-and-obesity-related-health-issues_en (accessed May 14, 2022).
- 128 Dansinger ML, Tatsioni A, Wong JB, Chung M, Balk EM. Meta-analysis: the effect of dietary counseling for weight loss. *Ann Intern Med* 2007; 147: 41–50.
- 129 Park H, He A, Lodhi JJ. Lipid Regulators of Thermogenic Fat Activation. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 2019; 30: 710–23.
- 130 Khera R, Murad MH, Chandar AK, et al. Association of pharmacological treatments for obesity with weight loss and adverse events a systematic review and meta-analysis. *JAMA - Journal of the American Medical Association* 2016; 315: 2424–34.
- 131 Liu J, Lee J, Hernandez MAS, Mazitschek R, Ozcan U. Treatment of obesity with celastrol. *Cell* 2015; 161: 999–1011.
- 132 Steinbrook R. Surgery for severe obesity. *N Engl J Med* 2004; 350: 1075–9.
- 133 Arterburn DE, Telem DA, Kushner RF, Courcoulas AP. Benefits and Risks of Bariatric Surgery in Adults: A Review. *JAMA* 2020; 324: 879–87.
- 134 Bray GA. Medical treatment of obesity: the past, the present and the future. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2014; 28: 665–84.
- 135 Kang JG, Park CY, Kang JH, Park YW, Park SW. Randomized controlled trial to investigate the effects of a newly developed formulation of phentermine diffuse-controlled release for obesity. *Diabetes Obes Metab* 2010; 12: 876–82.
- 136 Krempf M, Louvet JP, Allanic H, Miloradovich T, Joubert JM, Attali JR. Weight reduction and long-term maintenance after 18 months treatment with orlistat for obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2003; 27: 591–7.
- 137 Torgerson JS, Hauptman J, Boldrin MN, Sjöström L. XENical in the prevention of diabetes in obese subjects (XENDOS) study: a randomized study of orlistat as an adjunct to lifestyle changes for the prevention of type 2 diabetes in obese patients. *Diabetes Care* 2004; 27: 155–61.
- 138 Allison DB, Gadde KM, Garvey WT, et al. Controlled-release phentermine/topiramate in severely obese adults: a randomized controlled trial (EQUIP). *Obesity (Silver Spring)* 2012; 20: 330–42.

- 139 Gadde KM, Allison DB, Ryan DH, et al. Effects of low-dose, controlled-release, phentermine plus topiramate combination on weight and associated comorbidities in overweight and obese adults (CONQUER): a randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet* 2011; 377: 1341–52.
- 140 Smith SR, Weissman NJ, Anderson CM, et al. Multicenter, placebo-controlled trial of lorcaserin for weight management. *N Engl J Med* 2010; 363: 245–56.
- 141 Fidler MC, Sanchez M, Raether B, et al. A one-year randomized trial of lorcaserin for weight loss in obese and overweight adults: the BLOSSOM trial. *J Clin Endocrinol Metab* 2011; 96: 3067–77.
- 142 Apovian CM, Aronne L, Rubino D, et al. A randomized, phase 3 trial of naltrexone SR/bupropion SR on weight and obesity-related risk factors (COR-II). *Obesity (Silver Spring)* 2013; 21: 935–43.
- 143 Wadden TA, Foreyt JP, Foster GD, et al. Weight loss with naltrexone SR/bupropion SR combination therapy as an adjunct to behavior modification: the COR-BMOD trial. *Obesity (Silver Spring)* 2011; 19: 110–20.
- 144 Huynh K, Klose M, Krogsgaard K, et al. Randomized controlled trial of Tesomet for weight loss in hypothalamic obesity. *Eur J Endocrinol* 2022; 186. DOI:10.1530/EJE-21-0972.
- 145 Pi-Sunyer X, Astrup A, Fujioka K, et al. A Randomized, Controlled Trial of 3.0 mg of Liraglutide in Weight Management. *N Engl J Med* 2015; 373: 11–22.
- 146 Le Roux CW, Astrup AV, Fujioka K, et al. 3 years of liraglutide versus placebo for type 2 diabetes risk reduction and weight management in individuals with prediabetes: a randomised, double-blind trial. *Lancet* 2017; 389: 1399–409.
- 147 Bessesen DH, Van Gaal LF. Progress and challenges in anti-obesity pharmacotherapy. *Lancet Diabetes Endocrinol* 2018; 6: 237–48.
- 148 Bäckhed F, Ding H, Wang T, et al. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 15718–23.
- 149 Torres-Fuentes C, Schellekens H, Dinan TG, Cryan JF. The microbiota-gut-brain axis in obesity. *Lancet Gastroenterol Hepatol* 2017; 2: 747–56.
- 150 Yu EW, Gao L, Stastka P, et al. Fecal microbiota transplantation for the improvement of metabolism in obesity: The FMT-TRIM double-blind placebo-controlled pilot trial. *PLoS Med* 2020; 17. DOI:10.1371/JOURNAL.PMED.1003051.
- 151 Mocanu V, Zhang Z, Deehan EC, et al. Fecal microbial transplantation and fiber supplementation in patients with severe obesity and metabolic syndrome: a randomized double-blind, placebo-controlled phase 2 trial. *Nat Med* 2021; 27: 1272–9.
- 152 Leong KSW, Jayasinghe TN, Wilson BC, et al. Effects of Fecal Microbiome Transfer in Adolescents With Obesity: The Gut Bugs Randomized Controlled Trial. *JAMA Netw Open* 2020; 3: e2030415.
- 153 de Clercq NC, van den Ende T, Prodan A, et al. Fecal Microbiota Transplantation from Overweight or Obese Donors in Cachectic Patients with Advanced Gastroesophageal Cancer: A Randomized, Double-blind, Placebo-Controlled, Phase II Study. *Clin Cancer Res* 2021; 27: 3784–92.
- 154 Rinott E, Youngster I, Meir AY, et al. Autologous fecal microbiota transplantation can retain the metabolic achievements of dietary interventions. *Eur J Intern Med* 2021; 92: 17–23.

- 155 Rinott E, Youngster I, Yaskolka Meir A, et al. Effects of Diet-Modulated Autologous Fecal Microbiota Transplantation on Weight Regain. *Gastroenterology* 2021; 160: 158-173.e10.
- 156 Martínez A, Weaver C, López J, et al. Regulation of insulin secretion and blood glucose metabolism by adrenomedullin. *Endocrinology* 1996; 137: 2626–32.
- 157 Gómez-Hernández A, Beneit N, Díaz-Castroverde S, Escribano Ó. Differential Role of Adipose Tissues in Obesity and Related Metabolic and Vascular Complications. *Int J Endocrinol* 2016; 2016. DOI:10.1155/2016/1216783.
- 158 Wang S, Yang X. Inter-organ regulation of adipose tissue browning. *Cell Mol Life Sci* 2017; 74: 1765–76.
- 159 Wang W, Seale P. Control of brown and beige fat development. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2016; 17: 691–702.
- 160 Barquissau V, Beuzelin D, Pisani DF, et al. White-to-brite conversion in human adipocytes promotes metabolic reprogramming towards fatty acid anabolic and catabolic pathways. *Mol Metab* 2016; 5: 352–65.
- 161 Bartelt A, Heeren J. Adipose tissue browning and metabolic health. *Nat Rev Endocrinol* 2014; 10: 24–36.
- 162 Harms M, Seale P. Brown and beige fat: development, function and therapeutic potential. *Nat Med* 2013; 19: 1252–63.
- 163 Kiefer FW. Browning and thermogenic programming of adipose tissue. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2016; 30: 479–85.
- 164 Harms M, Seale P. Brown and beige fat: development, function and therapeutic potential. *Nat Med* 2013; 19: 1252–63.
- 165 Cohen P, Kajimura S. The cellular and functional complexity of thermogenic fat. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2021 22:6 2021; 22: 393–409.
- 166 Ottaviani E, Malagoli D, Franceschi C. The evolution of the adipose tissue: a neglected enigma. *Gen Comp Endocrinol* 2011; 174: 1–4.
- 167 Choe SS, Huh JY, Hwang IJ, Kim JI, Kim JB. Adipose tissue remodeling: Its role in energy metabolism and metabolic disorders. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2016; 7: 30.
- 168 Zwick RK, Guerrero-Juarez CF, Horsley V, Plikus M V. Anatomical, Physiological, and Functional Diversity of Adipose Tissue. *Cell Metab* 2018; 27: 68–83.
- 169 Peirce V, Carobbio S, Vidal-Puig A. The different shades of fat. *Nature* 2014; 510: 76–83.
- 170 Karastergiou K, Fried SK. Cellular Mechanisms Driving Sex Differences in Adipose Tissue Biology and Body Shape in Humans and Mouse Models. *Adv Exp Med Biol* 2017; 1043: 29–51.
- 171 Chusyd DE, Wang D, Huffman DM, Nagy TR. Relationships between Rodent White Adipose Fat Pads and Human White Adipose Fat Depots. *Front Nutr* 2016; 3. DOI:10.3389/FNUT.2016.00010.
- 172 Sakers A, De Siqueira MK, Seale P, Villanueva CJ. Adipose-tissue plasticity in health and disease. *Cell* 2022; 185: 419–46.

- 173 Funcke JB, Scherer PE. Beyond adiponectin and leptin: adipose tissue-derived mediators of inter-organ communication. *J Lipid Res* 2019; 60: 1648–97.
- 174 Pan WW, Myers MG. Leptin and the maintenance of elevated body weight. *Nat Rev Neurosci* 2018; 19: 95–105.
- 175 Koenen M, Hill MA, Cohen P, Sowers JR. Obesity, Adipose Tissue and Vascular Dysfunction. *Circ Res* 2021; 128: 951–68.
- 176 Cannon B, Nedergaard J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev* 2004; 84: 277–359.
- 177 Shao M, Wang QA, Song A, et al. Cellular Origins of Beige Fat Cells Revisited. *Diabetes* 2019; 68: 1874–85.
- 178 Tajima K, Ikeda K, Chang HY, et al. Mitochondrial lipoylation integrates age-associated decline in brown fat thermogenesis. *Nat Metab* 2019; 1: 886–98.
- 179 Berry DC, Jiang Y, Arpke RW, et al. Cellular Aging Contributes to Failure of Cold-Induced Beige Adipocyte Formation in Old Mice and Humans. *Cell Metab* 2017; 25: 166–81.
- 180 Rosenwald M, Perdikari A, Rüllicke T, Wolfrum C. Bi-directional interconversion of brite and white adipocytes. *Nat Cell Biol* 2013; 15: 659–67.
- 181 Min SY, Kady J, Nam M, et al. Human ‘brite/beige’ adipocytes develop from capillary networks, and their implantation improves metabolic homeostasis in mice. *Nat Med* 2016; 22: 312–8.
- 182 Liu X, Wang S, You Y, et al. Brown Adipose Tissue Transplantation Reverses Obesity in Ob/Ob Mice. *Endocrinology* 2015; 156: 2461–9.
- 183 Chondronikola M, Volpi E, Børsheim E, et al. Brown Adipose Tissue Activation Is Linked to Distinct Systemic Effects on Lipid Metabolism in Humans. *Cell Metab* 2016; 23: 1200–6.
- 184 Chen KY, Brychta RJ, Sater ZA, et al. Opportunities and challenges in the therapeutic activation of human energy expenditure and thermogenesis to manage obesity. *J Biol Chem* 2020; 295: 1926–42.
- 185 Crompton AW, Taylor CR, Jagger JA. Evolution of homeothermy in mammals. *Nature* 1978; 272: 333–6.
- 186 Chen KY, Brychta RJ, Abdul Sater Z, et al. Opportunities and challenges in the therapeutic activation of human energy expenditure and thermogenesis to manage obesity. *Journal of Biological Chemistry* 2019; 295: jbc.REV119.007363.
- 187 Kellogg DL. In vivo mechanisms of cutaneous vasodilation and vasoconstriction in humans during thermoregulatory challenges. *J Appl Physiol (1985)* 2006; 100: 1709–18.
- 188 Betz MJ, Enerbäck S. Targeting thermogenesis in brown fat and muscle to treat obesity and metabolic disease. *Nat Rev Endocrinol* 2018; 14: 77–87.
- 189 Murano I, Barbatelli G, Giordano A, Cinti S. Noradrenergic parenchymal nerve fiber branching after cold acclimatisation correlates with brown adipocyte density in mouse adipose organ. *J Anat* 2009; 214: 171–8.
- 190 Berry BJ, Trewin AJ, Amitrano AM, Kim M, Wojtovich AP. Use the protonmotive force: mitochondrial uncoupling and reactive oxygen species. *J Mol Biol* 2018; 430: 3873.

- 191 Nicholls DG. Mitochondrial proton leaks and uncoupling proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 2021; 1862: 148428.
- 192 Bal NC, Maurya SK, Sopariwala DH, et al. Sarcolipin is a newly identified regulator of muscle-based thermogenesis in mammals. *Nature Medicine* 2012 18:10 2012; 18: 1575–9.
- 193 Enerbäck S, Jacobsson A, Simpson EM, et al. Mice lacking mitochondrial uncoupling protein are cold-sensitive but not obese. *Nature* 1997; 387: 90–4.
- 194 Shin H, Ma Y, Chanturiya T, et al. Lipolysis in Brown Adipocytes Is Not Essential for Cold-Induced Thermogenesis in Mice. *Cell Metab* 2017; 26: 764-777.e5.
- 195 Rowland LA, Bal NC, Kozak LP, Periasamy M. Uncoupling Protein 1 and Sarcolipin Are Required to Maintain Optimal Thermogenesis, and Loss of Both Systems Compromises Survival of Mice under Cold Stress. *J Biol Chem* 2015; 290: 12282–9.
- 196 Kazak L, Chouchani ET, Jedrychowski MP, et al. A creatine-driven substrate cycle enhances energy expenditure and thermogenesis in beige fat. *Cell* 2015; 163: 643–55.
- 197 Silverman MG, Scirica BM. Cardiac arrest and therapeutic hypothermia. *Trends Cardiovasc Med* 2016; 26: 337–44.
- 198 Arrich J, Holzer M, Havel C, Müllner M, Herkner H. Hypothermia for neuroprotection in adults after cardiopulmonary resuscitation. *Cochrane Database Syst Rev* 2016; 2. DOI:10.1002/14651858.CD004128.PUB4.
- 199 Wassink G, Davidson JO, Dhillon SK, et al. Therapeutic Hypothermia in Neonatal Hypoxic-Ischemic Encephalopathy. *Curr Neurol Neurosci Rep* 2019; 19. DOI:10.1007/S11910-019-0916-0.
- 200 Tamames I, King C, Bas E, Dietrich WD, Telischi F, Rajguru SM. A cool approach to reducing electrode-induced trauma: Localized therapeutic hypothermia conserves residual hearing in cochlear implantation. *Hear Res* 2016; 339: 32–9.
- 201 Yenari MA, Han HS. Neuroprotective mechanisms of hypothermia in brain ischaemia. *Nat Rev Neurosci* 2012; 13: 267–78.
- 202 Vedantam A, Levi AD. Hypothermia for Acute Spinal Cord Injury. *Neurosurg Clin N Am* 2021; 32: 377–87.
- 203 Martin LJ, Niedzwiecki M v., Wong M. Chronic Intermittent Mild Whole-Body Hypothermia Is Therapeutic in a Mouse Model of ALS. *Cells* 2021; 10: 1–16.
- 204 Villarroya F, Cereijo R, Villarroya J, Giral M. Brown adipose tissue as a secretory organ. *Nat Rev Endocrinol* 2017; 13: 26–35.
- 205 Choi HA, Badjatia N, Mayer SA. Hypothermia for acute brain injury--mechanisms and practical aspects. *Nat Rev Neurol* 2012; 8: 214–22.
- 206 Wu D, Chen J, Zhang X, Ilagan R, Ding Y, Ji X. Selective therapeutic cooling: To maximize benefits and minimize side effects related to hypothermia. *J Cereb Blood Flow Metab* 2022; 42: 213–5.
- 207 Al-Fageeh MB, Smales CM. Cold-inducible RNA binding protein (CIRP) expression is modulated by alternative mRNAs. *RNA* 2009; 15: 1165–76.

- 208 Sano Y, Shiina T, Naitou K, Nakamori H, Shimizu Y. Hibernation-specific alternative splicing of the mRNA encoding cold-inducible RNA-binding protein in the hearts of hamsters. *Biochem Biophys Res Commun* 2015; 462: 322–5.
- 209 Logan SM, Storey KB. Cold-inducible RNA-binding protein Cirp, but not Rbm3, may regulate transcript processing and protection in tissues of the hibernating ground squirrel. *Cell Stress Chaperones* 2020; 25: 857–68.
- 210 Nichols RC, Wang XW, Tang J, et al. The RGG domain in hnRNP A2 affects subcellular localization. *Exp Cell Res* 2000; 256: 522–32.
- 211 de Leeuw F, Zhang T, Wauquier C, Huez G, Kruijs V, Gueydan C. The cold-inducible RNA-binding protein migrates from the nucleus to cytoplasmic stress granules by a methylation-dependent mechanism and acts as a translational repressor. *Exp Cell Res* 2007; 313: 4130–44.
- 212 Thandapani P, O'Connor TR, Bailey TL, Richard S. Defining the RGG/RG motif. *Mol Cell* 2013; 50: 613–23.
- 213 Aziz M, Brenner M, Wang P. Extracellular CIRP (eCIRP) and inflammation. *J Leukoc Biol* 2019; 106: 133–46.
- 214 Lujan DA, Ochoa JL, Hartley RS. Cold-inducible RNA binding protein in cancer and inflammation. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 2018; 9. DOI:10.1002/WRNA.1462.
- 215 Liao Y, Feng J, Zhang Y, Tang L, Wu S. The mechanism of CIRP in inhibition of keratinocytes growth arrest and apoptosis following low dose UVB radiation. *Mol Carcinog* 2017; 56: 1554–69.
- 216 LLeonart ME. A new generation of proto-oncogenes: Cold-inducible RNA binding proteins. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer* 2010; 1805: 43–52.
- 217 Yang R, Weber DJ, Carrier F. Post-transcriptional regulation of thioredoxin by the stress inducible heterogenous ribonucleoprotein A18. *Nucleic Acids Res* 2006; 34: 1224–36.
- 218 Baba T, Nishimura M, Kuwahara Y, et al. Analysis of gene and protein expression of cytochrome P450 and stress-associated molecules in rat liver after spaceflight. *Pathol Int* 2008; 58: 589–95.
- 219 Zhong P, Huang H. Recent progress in the research of cold-inducible RNA-binding protein. *Future Sci OA* 2017; 3. DOI:10.4155/FSOA-2017-0077.
- 220 Zhang HT, Xue JH, Zhang ZW, et al. Cold-inducible RNA-binding protein inhibits neuron apoptosis through the suppression of mitochondrial apoptosis. *Brain Res* 2015; 1622: 474–83.
- 221 Wu L, Sun H liang, Gao Y, et al. Therapeutic Hypothermia Enhances Cold-Inducible RNA-Binding Protein Expression and Inhibits Mitochondrial Apoptosis in a Rat Model of Cardiac Arrest. *Mol Neurobiol* 2017; 54: 2697–705.
- 222 Zhang Y, Wu Y, Mao P, et al. Cold-inducible RNA-binding protein CIRP/hnRNP A18 regulates telomerase activity in a temperature-dependent manner. *Nucleic Acids Res* 2016; 44: 761–75.
- 223 Liu J, Xue J, Zhang H, et al. Cloning, expression, and purification of cold inducible RNA-binding protein and its neuroprotective mechanism of action. *Brain Res* 2015; 1597: 189–95.

- 224 Jo JW, Lee JR, Jee BC, Suh CS, Kim SH. Exposing mouse oocytes to necrostatin 1 during in vitro maturation improves maturation, survival after vitrification, mitochondrial preservation, and developmental competence. *Reprod Sci* 2015; 22: 615–25.
- 225 Zhu X, Bühner C, Wellmann S. Cold-inducible proteins CIRP and RBM3, a unique couple with activities far beyond the cold. *Cell Mol Life Sci* 2016; 73: 3839–59.
- 226 Morf J, Rey G, Schneider K, et al. Cold-inducible RNA-binding protein modulates circadian gene expression posttranscriptionally. *Science* 2012; 338: 379–83.
- 227 Qiang X, Yang WL, Wu R, et al. Cold-inducible RNA-binding protein (CIRP) triggers inflammatory responses in hemorrhagic shock and sepsis. *Nat Med* 2013; 19: 1489–95.
- 228 Liu Y, Liu P, Hu Y, et al. Cold-Induced RNA-Binding Protein Promotes Glucose Metabolism and Reduces Apoptosis by Increasing AKT Phosphorylation in Mouse Skeletal Muscle Under Acute Cold Exposure. *Front Mol Biosci* 2021; 8. DOI:10.3389/FMOLB.2021.685993.
- 229 Huang X, Liu G, Guo J, Su ZQ. The PI3K/AKT pathway in obesity and type 2 diabetes. *Int J Biol Sci* 2018; 14: 1483–96.
- 230 Zeng Y, Kulkarni P, Inoue T, Getzenberg RH. Down-regulating cold shock protein genes impairs cancer cell survival and enhances chemosensitivity. *J Cell Biochem* 2009; 107: 179–88.
- 231 Anvarian Z, Mykityn K, Mukhopadhyay S, Pedersen LB, Christensen ST. Cellular signalling by primary cilia in development, organ function and disease. *Nat Rev Nephrol* 2019; 15: 199–219.
- 232 SOROKIN S. Centrioles and the formation of rudimentary cilia by fibroblasts and smooth muscle cells. *J Cell Biol* 1962; 15: 363–77.
- 233 Wheway G, Nazlamova L, Hancock JT. Signaling through the Primary Cilium. *Front Cell Dev Biol* 2018; 6. DOI:10.3389/FCELL.2018.00008.
- 234 Hildebrandt F, Benzing T, Katsanis N. Ciliopathies. *N Engl J Med* 2011; 364: 1533–43.
- 235 Singla V, Reiter JF. The primary cilium as the cell's antenna: signaling at a sensory organelle. *Science* 2006; 313: 629–33.
- 236 Wang W, Jack BM, Wang HH, Kavanaugh MA, Maser RL, Tran P V. Intraflagellar Transport Proteins as Regulators of Primary Cilia Length. *Front Cell Dev Biol* 2021; 9. DOI:10.3389/FCELL.2021.661350.
- 237 Chen HY, Kelley RA, Li T, Swaroop A. Primary cilia biogenesis and associated retinal ciliopathies. *Semin Cell Dev Biol* 2021; 110: 70–88.
- 238 Pigino G. Intraflagellar transport. *Curr Biol* 2021; 31: R530–6.
- 239 Garcia G, Raleigh DR, Reiter JF. How the Ciliary Membrane Is Organized Inside-Out to Communicate Outside-In. *Curr Biol* 2018; 28: R421–34.
- 240 Sun S, Fisher RL, Bowser SS, Pentecost BT, Sui H. Three-dimensional architecture of epithelial primary cilia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2019; 116: 9370–9.
- 241 Gluenz E, Höög JL, Smith AE, Dawe HR, Shaw MK, Gull K. Beyond 9+0: noncanonical axoneme structures characterize sensory cilia from protists to humans. *FASEB J* 2010; 24: 3117–21.

- 242 Kiesel P, Alvarez Viar G, Tsoy N, et al. The molecular structure of mammalian primary cilia revealed by cryo-electron tomography. *Nat Struct Mol Biol* 2020; 27: 1115–24.
- 243 Garcia G, Reiter JF. A primer on the mouse basal body. *Cilia* 2016; 5. DOI:10.1186/S13630-016-0038-0.
- 244 Garcia-Gonzalo FR, Reiter JF. Open Sesame: How Transition Fibers and the Transition Zone Control Ciliary Composition. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2017; 9. DOI:10.1101/CSHPERSPECT.AO28134.
- 245 Kozminski KG, Johnson KA, Forscher P, Rosenbaum JL. A motility in the eukaryotic flagellum unrelated to flagellar beating. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90: 5519–23.
- 246 Taschner M, Kotsis F, Braeuer P, Wolfgang Kuehn E, Lorentzen E. Crystal structures of IFT70/52 and IFT52/46 provide insight into intraflagellar transport B core complex assembly. *Journal of Cell Biology* 2014; 207: 269–82.
- 247 Taschner M, Lorentzen E. The Intraflagellar Transport Machinery. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2016; 8. DOI:10.1101/CSHPERSPECT.AO28092.
- 248 Prevo B, Scholey JM, Peterman EJG. Intraflagellar transport: mechanisms of motor action, cooperation, and cargo delivery. *FEBS J* 2017; 284: 2905–31.
- 249 Cole DG, Diener DR, Himmelblau AL, Beech PL, Fuster JC, Rosenbaum JL. Chlamydomonas kinesin-II-dependent intraflagellar transport (IFT): IFT particles contain proteins required for ciliary assembly in *Caenorhabditis elegans* sensory neurons. *J Cell Biol* 1998; 141: 993–1008.
- 250 Pazour GJ, Wilkerson CG, Witman GB. A dynein light chain is essential for the retrograde particle movement of intraflagellar transport (IFT). *J Cell Biol* 1998; 141: 979–92.
- 251 Nachury M V. The molecular machines that traffic signaling receptors into and out of cilia. *Curr Opin Cell Biol* 2018; 51: 124–31.
- 252 Yu F, Li T, Sui Y, et al. O-GlcNAc transferase regulates centriole behavior and intraflagellar transport to promote ciliogenesis. *Protein Cell* 2020; 11: 852–7.
- 253 Liu H, Kiseleva AA, Golemis EA. Ciliary signalling in cancer. *Nature Reviews Cancer* 2018 18:8 2018; 18: 511–24.
- 254 Sorokin SP. Reconstructions of centriole formation and ciliogenesis in mammalian lungs. *J Cell Sci* 1968; 3: 207–30.
- 255 Wang L, Dynlacht BD. The regulation of cilium assembly and disassembly in development and disease. *Development* 2018; 145. DOI:10.1242/DEV.151407.
- 256 May EA, Sroka TJ, Mick DU. Phosphorylation and Ubiquitylation Regulate Protein Trafficking, Signaling, and the Biogenesis of Primary Cilia. *Front Cell Dev Biol* 2021; 9. DOI:10.3389/FCELL.2021.664279.
- 257 Zhang W, Taylor SP, Nevarez L, et al. IFT52 mutations destabilize anterograde complex assembly, disrupt ciliogenesis and result in short rib polydactyly syndrome. *Hum Mol Genet* 2016; 25: 4012–20.
- 258 Shaheen R, Alsahli S, Ewida N, et al. Biallelic Mutations in Tetratricopeptide Repeat Domain 26 (Intraflagellar Transport 56) Cause Severe Biliary Ciliopathy in Humans. *Hepatology* 2020; 71: 2067–79.

- 259 Ritter A, Friemel A, Kreis NN, et al. Primary Cilia Are Dysfunctional in Obese Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cell Reports* 2018; 10: 583–99.
- 260 Han YM, Kang GM, Byun K, et al. Leptin-promoted cilia assembly is critical for normal energy balance. *J Clin Invest* 2014; 124: 2193–7.
- 261 Yu F, Guo S, Li T, et al. Ciliary defects caused by dysregulation of O-GlcNAc modification are associated with diabetic complications. *Cell Research* 2018 29:2 2018; 29: 171–3.
- 262 Verghese E, Weidenfeld R, Bertram JF, Ricardo SD, Deane JA. Renal cilia display length alterations following tubular injury and are present early in epithelial repair. *Nephrology Dialysis Transplantation* 2008; 23: 834–41.
- 263 Nager AR, Goldstein JS, Herranz-Pérez V, et al. An Actin Network Dispatches Ciliary GPCRs into Extracellular Vesicles to Modulate Signaling. *Cell* 2017; 168: 252-263.e14.
- 264 Wood CR, Rosenbaum JL. Ciliary ectosomes: transmissions from the cell's antenna. *Trends Cell Biol* 2015; 25: 276–85.
- 265 Heydeck W, Fievet L, Davis EE, Katsanis N. The complexity of the cilium: spatiotemporal diversity of an ancient organelle. *Curr Opin Cell Biol* 2018; 55: 139–49.
- 266 Goetz SC, Anderson K V. The primary cilium: a signalling centre during vertebrate development. *Nat Rev Genet* 2010; 11: 331–44.
- 267 Bangs F, Anderson K V. Primary Cilia and Mammalian Hedgehog Signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2017; 9. DOI:10.1101/CSHPERSPECT.A028175.
- 268 Briscoe J, Théron PP. The mechanisms of Hedgehog signalling and its roles in development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2013; 14: 418–31.
- 269 Ingham PW. Hedgehog signaling. *Curr Top Dev Biol* 2022; 149: 1–58.
- 270 Huangfu D, Liu A, Rakeman AS, Murcia NS, Niswander L, Anderson K V. Hedgehog signalling in the mouse requires intraflagellar transport proteins. *Nature* 2003; 426: 83–7.
- 271 Andreu-Cervera A, Catala M, Schneider-Maunoury S. Cilia, ciliopathies and hedgehog-related forebrain developmental disorders. *Neurobiol Dis* 2021; 150. DOI:10.1016/J.NBD.2020.105236.
- 272 Murdoch JN, Copp AJ. The relationship between sonic Hedgehog signaling, cilia, and neural tube defects. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2010; 88: 633–52.
- 273 Ohba S. Hedgehog signaling in skeletal development: Roles of indian hedgehog and the mode of its action. *Int J Mol Sci* 2020; 21: 1–17.
- 274 Wachten D, Mick DU. Signal transduction in primary cilia – analyzing and manipulating GPCR and second messenger signaling. *Pharmacol Ther* 2021; 224: 107836.
- 275 Guo J, Otis JM, Higginbotham H, et al. Primary Cilia Signaling Shapes the Development of Interneuronal Connectivity. *Dev Cell* 2017; 42: 286-300.e4.
- 276 Wang CY, Tsai HL, Syu JS, Chen TY, Su MT. Primary Cilium-Regulated EG-VEGF Signaling Facilitates Trophoblast Invasion. *J Cell Physiol* 2017; 232: 1467–77.
- 277 Jones C, Roper VC, Foucher I, et al. Ciliary proteins link basal body polarization to planar cell polarity regulation. *Nat Genet* 2008; 40: 69–77.

- 278 Braun DA, Hildebrandt F. Ciliopathies. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2017; 9: a028191.
- 279 Reiter JF, Leroux MR. Genes and molecular pathways underpinning ciliopathies. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2017; 18: 533–47.
- 280 Williams MD, Mitchell GM. MicroRNAs in insulin resistance and obesity. *Exp Diabetes Res* 2012; 2012. DOI:10.1155/2012/484696.
- 281 Goggolidou P. Wnt and planar cell polarity signaling in cystic renal disease. *Organogenesis* 2014; 10: 86–95.
- 282 Habbig S, Bartram MP, Müller RU, et al. NPHP4, a cilia-associated protein, negatively regulates the Hippo pathway. *J Cell Biol* 2011; 193: 633–42.
- 283 Upadhyay VS, Muntean BS, Kathem SH, Hwang JJ, AbouAlaiwi WA, Nauli SM. Roles of dopamine receptor on chemosensory and mechanosensory primary cilia in renal epithelial cells. *Front Physiol* 2014; 5. DOI:10.3389/FPHYS.2014.00072.
- 284 Masyuk AI, Masyuk T V., Splinter PL, Huang BQ, Stroope AJ, LaRusso NF. Cholangiocyte cilia detect changes in luminal fluid flow and transmit them into intracellular Ca²⁺ and cAMP signaling. *Gastroenterology* 2006; 131: 911–20.
- 285 Wills ES, Roepman R, Drenth JPH. Polycystic liver disease: ductal plate malformation and the primary cilium. *Trends Mol Med* 2014; 20: 261–70.
- 286 Lamb TD, Collin SP, Pugh EN. Evolution of the vertebrate eye: opsins, photoreceptors, retina and eye cup. *Nat Rev Neurosci* 2007; 8: 960–76.
- 287 Bujakowska KM, Liu Q, Pierce EA. Photoreceptor cilia and retinal ciliopathies. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2017; 9. DOI:10.1101/CSHPERSPECT.A028274.
- 288 Mitchison HM, Valente EM. Motile and non-motile cilia in human pathology: from function to phenotypes. *J Pathol* 2017; 241: 294–309.
- 289 Ma R, Kutchy NA, Chen L, Meigs DD, Hu G. Primary cilia and ciliary signaling pathways in aging and age-related brain disorders. *Neurobiol Dis* 2022; 163. DOI:10.1016/J.NBD.2021.105607.
- 290 Guemez-Gamboa A, Coufal NG, Gleeson JG. Primary cilia in the developing and mature brain. *Neuron* 2014; 82: 511–21.
- 291 Loktev A V., Jackson PK. Neuropeptide Y family receptors traffic via the Bardet-Biedl syndrome pathway to signal in neuronal primary cilia. *Cell Rep* 2013; 5: 1316–29.
- 292 Engle SE, Bansal R, Antonellis PJ, Berbari NF. Cilia signaling and obesity. *Semin Cell Dev Biol* 2021; 110: 43–50.
- 293 Davenport JR, Watts AJ, Roper VC, et al. Disruption of intraflagellar transport in adult mice leads to obesity and slow-onset cystic kidney disease. *Curr Biol* 2007; 17: 1586–94.
- 294 Berbari NF, Pasek RC, Malarkey EB, et al. Leptin resistance is a secondary consequence of the obesity in ciliopathy mutant mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013; 110: 7796–801.
- 295 Siljee JE, Wang Y, Bernard AA, et al. Subcellular localization of MC4R with ADCY3 at neuronal primary cilia underlies a common pathway for genetic predisposition to obesity. *Nat Genet* 2018; 50: 180–5.

- 296 Farooqi IS, Keogh JM, Yeo GSH, Lank EJ, Cheetham T, O'Rahilly S. Clinical spectrum of obesity and mutations in the melanocortin 4 receptor gene. *N Engl J Med* 2003; 348: 1085–95.
- 297 Satir P, Pedersen LB, Christensen ST. The primary cilium at a glance. *J Cell Sci* 2010; 123: 499–503.
- 298 Marion V, Stoetzel C, Schlicht D, et al. Transient ciliogenesis involving Bardet-Biedl syndrome proteins is a fundamental characteristic of adipogenic differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106: 1820–5.
- 299 Christensen ST, Clement CA, Satir P, Pedersen LB. Primary cilia and coordination of receptor tyrosine kinase (RTK) signalling. *J Pathol* 2012; 226: 172–84.
- 300 Christensen ST, Morthorst SK, Mogensen JB, Pedersen LB. Primary Cilia and Coordination of Receptor Tyrosine Kinase (RTK) and Transforming Growth Factor β (TGF- β) Signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2017; 9. DOI:10.1101/CSHPERSPECT.A028167.
- 301 Tobin JL, Beales PL. The nonmotile ciliopathies. *Genetics in Medicine* 2009 11:6 2009; 11: 386–402.
- 302 Gerdes JM, Christou-Savina S, Xiong Y, et al. Ciliary dysfunction impairs beta-cell insulin secretion and promotes development of type 2 diabetes in rodents. *Nat Commun* 2014; 5. DOI:10.1038/NCOMMS6308.
- 303 Dere R, Perkins AL, Bawa-Khalife T, Jonasch D, Walker CL. β -catenin links von Hippel-Lindau to aurora kinase A and loss of primary cilia in renal cell carcinoma. *J Am Soc Nephrol* 2015; 26: 553–64.
- 304 Egeberg DL, Lethan M, Manguso R, et al. Primary cilia and aberrant cell signaling in epithelial ovarian cancer. *Cilia* 2012; 1. DOI:10.1186/2046-2530-1-15.
- 305 Gradilone SA, Radtke BN, Bogert PS, Huang BQ, Gajdos GB, LaRusso NF. HDAC6 inhibition restores ciliary expression and decreases tumor growth. *Cancer Res* 2013; 73: 2259–70.
- 306 Seeley ES, Carrière C, Goetze T, Longnecker DS, Korc M. Pancreatic cancer and precursor pancreatic intraepithelial neoplasia lesions are devoid of primary cilia. *Cancer Res* 2009; 69: 422–30.
- 307 Nishimura Y, Kasahara K, Shiromizu T, et al. Primary Cilia as Signaling Hubs in Health and Disease. *Advanced Science* 2019; 6: 1801138.
- 308 Yasar B, Linton K, Slater C, Byers R. Primary cilia are increased in number and demonstrate structural abnormalities in human cancer. *J Clin Pathol* 2017; 70: 571–4.
- 309 Han YG, Kim HJ, Dlugosz AA, Ellison DW, Gilbertson RJ, Alvarez-Buylla A. Dual and opposing roles of primary cilia in medulloblastoma development. *Nat Med* 2009; 15: 1062–5.
- 310 Sánchez I, Dynlacht BD. Cilium assembly and disassembly. *Nat Cell Biol* 2016; 18: 711.
- 311 Hassounah NB, Bunch TA, McDermott KM. Molecular Pathways: The Role of Primary Cilia in Cancer Progression and Therapeutics with a Focus on Hedgehog Signaling. *Clin Cancer Res* 2012; 18: 2429.
- 312 Picon-Galindo E, Latz E, Wachten D. Primary cilia and their effects on immune cell functions and metabolism: a model. *Trends Immunol* 2022; 43: 366–78.
- 313 Djenoune L, Berg K, Brueckner M, Yuan S. A change of heart: new roles for cilia in cardiac development and disease. *Nat Rev Cardiol* 2022; 19: 211–27.

- 314 Ma M. Cilia and polycystic kidney disease. *Semin Cell Dev Biol* 2021; 110: 139–48.
- 315 Tsang SH, Aycinena ARP, Sharma T. Ciliopathy: Senior-Løken Syndrome. *Adv Exp Med Biol* 2018; 1085: 175–8.
- 316 Ansley SJ, Badano JL, Blacque OE, et al. Basal body dysfunction is a likely cause of pleiotropic Bardet-Biedl syndrome. *Nature* 2003; 425: 628–33.
- 317 Tsyklauri O, Niederlova V, Forsythe E, et al. Bardet-Biedl Syndrome ciliopathy is linked to altered hematopoiesis and dysregulated self-tolerance. *EMBO Rep* 2021; 22. DOI:10.15252/EMBR.202050785.
- 318 Pomeroy J, Krentz AD, Richardson JG, Berg RL, VanWormer JJ, Haws RM. Bardet-Biedl syndrome: Weight patterns and genetics in a rare obesity syndrome. *Pediatr Obes* 2021; 16. DOI:10.1111/IJPO.12703.
- 319 Hartill V, Szymanska K, Sharif SM, Wheway G, Johnson CA. Meckel-Gruber Syndrome: An Update on Diagnosis, Clinical Management, and Research Advances. *Front Pediatr* 2017; 5. DOI:10.3389/FPED.2017.00244.
- 320 Girard D, Petrovsky N. Alström syndrome: insights into the pathogenesis of metabolic disorders. *Nature Reviews Endocrinology* 2010 7:2 2010; 7: 77–88.
- 321 Spasic M, Jacobs CR. Primary cilia: Cell and molecular mechanosensors directing whole tissue function. *Semin Cell Dev Biol* 2017; 71: 42–52.
- 322 Thompson CL, McFie M, Paul Chapple J, Beales P, Knight MM. Polycystin-2 Is Required for Chondrocyte Mechanotransduction and Traffics to the Primary Cilium in Response to Mechanical Stimulation. *Int J Mol Sci* 2021; 22. DOI:10.3390/IJMS22094313.
- 323 Corrigan MA, Johnson GP, Stavenschi E, Riffault M, Labour MN, Hoey DA. TRPV4-mediates oscillatory fluid shear mechanotransduction in mesenchymal stem cells in part via the primary cilium. *Sci Rep* 2018; 8. DOI:10.1038/S41598-018-22174-3.
- 324 Johnson GP, Stavenschi E, Eichholz KF, Corrigan MA, Fair S, Hoey DA. Mesenchymal stem cell mechanotransduction is cAMP dependent and regulated by adenylyl cyclase 6 and the primary cilium. *J Cell Sci* 2018; 131. DOI:10.1242/JCS.222737.
- 325 Yoshida S, Shiratori H, Kuo IY, et al. Cilia at the node of mouse embryos sense fluid flow for left-right determination via Pkd2. *Science (1979)* 2012; 338: 226–31.
- 326 Espinha LC, Hoey DA, Fernandes PR, Rodrigues HC, Jacobs CR. Oscillatory fluid flow influences primary cilia and microtubule mechanics. *Cytoskeleton (Hoboken)* 2014; 71: 435–45.
- 327 Nguyen AM, Young YN, Jacobs CR. The primary cilium is a self-adaptable, integrating nexus for mechanical stimuli and cellular signaling. *Biol Open* 2015; 4: 1733–8.
- 328 Larrayoz IM, Rey-Funes M, Contartese DS, et al. Cold Shock Proteins Are Expressed in the Retina Following Exposure to Low Temperatures. *PLoS One* 2016; 11. DOI:10.1371/JOURNAL.PONE.0161458.
- 329 Caracterización de moléculas de pequeño tamaño que modulan la expresión de CIRP | Documentos - Universidad de La Rioja. <https://investigacion.unirioja.es/documentos/5e4a8599299952031e843c4d> (accessed July 20, 2022).

- 330 FreeCAD: Your own 3D parametric modeler. <https://www.freecadweb.org/index.php> (accessed Sept 12, 2022).
- 331 Wang G-X, Zhao X-Y, Meng Z-X, et al. The brown fat-enriched secreted factor Nrg4 preserves metabolic homeostasis through attenuating hepatic lipogenesis. *Nat Med* 2014; 20: 1436–43.
- 332 Reitman ML. Of mice and men - environmental temperature, body temperature, and treatment of obesity. *FEBS Lett* 2018; 592: 2098–107.
- 333 Mrad JA, Yakubu F, Lin D, Peters JC, Atkinson JB, Hill JO. Skeletal muscle composition in dietary obesity-susceptible and dietary obesity-resistant rats. *Am J Physiol* 1992; 262. DOI:10.1152/AJPREGU.1992.262.4.R684.
- 334 Levin BE, Dunn-Meynell AA, Balkan B, Keesey RE. Selective breeding for diet-induced obesity and resistance in Sprague-Dawley rats. *Am J Physiol* 1997; 273. DOI:10.1152/AJPREGU.1997.273.2.R725.
- 335 Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* 2012; 9: 676–82.
- 336 Blanchet E, Annicotte JS, Lagarrigue S, et al. E2F transcription factor-1 regulates oxidative metabolism. *Nature Cell Biology* 2011 13:9 2011; 13: 1146–52.
- 337 Dempersmier J, Sambeat A, Gulyaeva O, et al. Cold-Inducible Zfp516 Activates UCP1 Transcription to Promote Browning of White Fat and Development of Brown Fat. *Mol Cell* 2015; 57: 235–46.
- 338 Seigel GM. Review: R28 retinal precursor cells: The first 20 years. *Mol Vis* 2014; 20: 301.
- 339 Coderch C, Díaz de Cerio M, Zapico JM, et al. In silico identification and in vivo characterization of small molecule therapeutic hypothermia mimetics. *Bioorg Med Chem* 2017; 25: 6597–604.
- 340 Jash S, Banerjee S, Lee MJ, Farmer SR, Puri V. CIDEA Transcriptionally Regulates UCP1 for Britening and Thermogenesis in Human Fat Cells. *iScience* 2019; 20: 73–89.
- 341 Westerberg R, Månsson JE, Golozoubova V, et al. ELOVL3 Is an Important Component for Early Onset of Lipid Recruitment in Brown Adipose Tissue *. *Journal of Biological Chemistry* 2006; 281: 4958–68.
- 342 Boström P, Wu J, Jedrychowski MP, et al. A PGC1 α -dependent myokine that drives browning of white fat and thermogenesis. *Nature* 2012; 481: 463.
- 343 Zhang F, Hao G, Shao M, et al. An Adipose Tissue Atlas: An Image-Guided Identification of Human-like BAT and Beige Depots in Rodents. *Cell Metab* 2018; 27: 252-262.e3.
- 344 Markan KR, Boland LK, King-McAlpin AQ, et al. Adipose TBX1 regulates β -adrenergic sensitivity in subcutaneous adipose tissue and thermogenic capacity in vivo. *Mol Metab* 2020; 36. DOI:10.1016/J.MOLMET.2020.02.008.
- 345 Arhire LI, Mihalache L, Covasa M. Irisin: A Hope in Understanding and Managing Obesity and Metabolic Syndrome. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2019; 0: 524.
- 346 Logan SM, Storey KB. Cold-inducible RNA-binding protein Cirp, but not Rbm3, may regulate transcript processing and protection in tissues of the hibernating ground squirrel. *Cell Stress Chaperones* 2020; 25: 857–68.

- 347 Nauli SM, Jin X, Aboualaiwi WA, El-Jouni W, Su X, Zhou J. Non-motile primary cilia as fluid shear stress mechanosensors, 1st edn. Elsevier Inc., 2013 DOI:10.1016/B978-0-12-397944-5.00001-8.
- 348 Mohammed SG, Arjona FJ, Verschuren EHJ, et al. Primary cilia-regulated transcriptome in the renal collecting duct. *FASEB J* 2018; 32: 3653–68.
- 349 Kunnen SJ, Malas TB, Semeins CM, Bakker AD, Peters DJM. Comprehensive transcriptome analysis of fluid shear stress altered gene expression in renal epithelial cells. *J Cell Physiol* 2018; 233: 3615–28.
- 350 Qiao C, Meng F, Jang I, Jo H, Chen YE, Zhang J. Deep transcriptomic profiling reveals the similarity between endothelial cells cultured under static and oscillatory shear stress conditions. *Physiol Genomics* 2016; 48: 660–6.
- 351 Obesity and overweight. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight> (accessed Aug 23, 2022).
- 352 Harms M, Seale P. Brown and beige fat: development, function and therapeutic potential. *Nat Med* 2013; 19: 1252–63.
- 353 Guo W, Qiu W, Ao X, et al. Low-concentration DMSO accelerates skin wound healing by Akt/mTOR-mediated cell proliferation and migration in diabetic mice. *Br J Pharmacol* 2020; 177: 3327–41.
- 354 Verheijen M, Lienhard M, Schrooders Y, et al. DMSO induces drastic changes in human cellular processes and epigenetic landscape in vitro. *Sci Rep* 2019; 9. DOI:10.1038/S41598-019-40660-0.
- 355 Galvao J, Davis B, Tilley M, Normando E, Duchon MR, Cordeiro MF. Unexpected low-dose toxicity of the universal solvent DMSO. *FASEB J* 2014; 28: 1317–30.
- 356 Giordano A, Frontini A, Cinti S. Convertible visceral fat as a therapeutic target to curb obesity. *Nat Rev Drug Discov* 2016; 15: 405–24.
- 357 Abreu-Vieira G, Fischer AW, Mattsson C, et al. Cidea improves the metabolic profile through expansion of adipose tissue. *Nat Commun* 2015; 6. DOI:10.1038/NCOMMS8433.
- 358 Gao Y, Qimuge NR, Qin J, et al. Acute and chronic cold exposure differentially affects the browning of porcine white adipose tissue. *Animal* 2018; 12: 1435–41.
- 359 Hao S, Baltimore D. The stability of mRNA influences the temporal order of the induction of genes encoding inflammatory molecules. *Nat Immunol* 2009; 10: 281.
- 360 Al-Fageeh MB, Smales CM. Cold-inducible RNA binding protein (CIRP) expression is modulated by alternative mRNAs. *RNA* 2009; 15: 1165–76.
- 361 Parray HA, Yun JW. Cannabidiol promotes browning in 3T3-L1 adipocytes. *Mol Cell Biochem* 2016; 416: 131–9.
- 362 Fan L, Xu H, Yang R, Zang Y, Chen J, Qin H. Combination of Capsaicin and Capsiate Induces Browning in 3T3-L1 White Adipocytes via Activation of the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ/β 3-Adrenergic Receptor Signaling Pathways. *J Agric Food Chem* 2019; 67: 6232–40.
- 363 Kim JH, Lee S, Cho EJ. Flavonoids from *Acer okamotoanum* Inhibit Adipocyte Differentiation and Promote Lipolysis in the 3T3-L1 Cells. *Molecules* 2020; 25. DOI:10.3390/MOLECULES25081920.

- 364 Parray HA, Yun JW. Cannabidiol promotes browning in 3T3-L1 adipocytes. *Mol Cell Biochem* 2016; 416: 131–9.
- 365 Giri S, Rattan R, Haq E, et al. AICAR inhibits adipocyte differentiation in 3T3L1 and restores metabolic alterations in diet-induced obesity mice model. *Nutr Metab (Lond)* 2006; 3. DOI:10.1186/1743-7075-3-31.
- 366 Yoo HS, Qiao L, Bosco C, et al. Intermittent Cold Exposure Enhances Fat Accumulation in Mice. *PLoS One* 2014; 9: e96432.
- 367 Steinberger A. Effects of temperature on the biochemistry of the testis. *Adv Exp Med Biol* 1991; 286: 33–47.
- 368 Pan HZ, Zhang LJ, Liu YW, et al. Cold-inducible RNA binding protein agonist enhances the cardioprotective effect of UW solution during extended heart preservation. *Artif Organs* 2020; 44: E406–18.
- 369 Larrayoz IM, Contartese DS, Rey-Funes M, et al. A hypothermia mimetic molecule (zr17-2) reduces ganglion cell death and prevents electroretinogram distortion following intraorbital optic nerve crush (IONC) in the rat. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2021; 62: 190–190.
- 370 Dong X. Current Strategies for Brain Drug Delivery. *Theranostics* 2018; 8: 1481–93.
- 371 Kalinovich A v., de Jong JMA, Cannon B, Nedergaard J. UCP1 in adipose tissues: two steps to full browning. *Biochimie* 2017; 134: 127–37.
- 372 Xu Z, You W, Zhou Y, Chen W, Wang Y, Shan T. Cold-induced lipid dynamics and transcriptional programs in white adipose tissue. *BMC Biol* 2019; 17. DOI:10.1186/S12915-019-0693-X.
- 373 Zheng Z, Liu X, Zhao Q, Zhang L, Li C, Xue Y. Regulation of UCP1 in the Browning of Epididymal Adipose Tissue by β 3-Adrenergic Agonist: A Role for MicroRNAs. *Int J Endocrinol* 2014; 2014. DOI:10.1155/2014/530636.
- 374 Bonet ML, Oliver P, Palou A. Pharmacological and nutritional agents promoting browning of white adipose tissue. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 2013; 1831: 969–85.
- 375 Ganeshan K, Chawla A. Warming the mouse to model human diseases. *Nat Rev Endocrinol* 2017; 13: 458–65.
- 376 Nedergaard J, Cannon B. The browning of white adipose tissue: some burning issues. *Cell Metab* 2014; 20: 396–407.
- 377 Cannon B, Nedergaard J. Nonshivering thermogenesis and its adequate measurement in metabolic studies. *J Exp Biol* 2011; 214: 242–53.
- 378 Kalinovich A v., de Jong JMA, Cannon B, Nedergaard J. UCP1 in adipose tissues: two steps to full browning. *Biochimie* 2017; 134: 127–37.
- 379 Raun SH, Henriquez-Olguín C, Karavaeva I, et al. Housing temperature influences exercise training adaptations in mice. *Nature Communications* 2020 11:1 2020; 11: 1–16.
- 380 Poole S, Stephenson JD. Body temperature regulation and thermoneutrality in rats. *Q J Exp Physiol Cogn Med Sci* 1977; 62: 143–9.

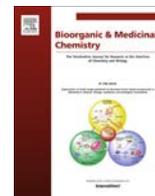
- 381 Romanovsky AA, Ivanov AI, Shimansky YP. Selected contribution: ambient temperature for experiments in rats: a new method for determining the zone of thermal neutrality. *J Appl Physiol* (1985) 2002; 92: 2667–79.
- 382 Kogo H, Maeda N, Kiyokawa Y, Takeuchi Y. Rats do not consider all unfamiliar strains to be equivalent. *Behavioural processes* 2021; 190. DOI:10.1016/J.BEPROC.2021.104457.
- 383 Clemens LE, Jansson EKH, Portal E, Riess O, Nguyen HP. A behavioral comparison of the common laboratory rat strains Lister Hooded, Lewis, Fischer 344 and Wistar in an automated homecage system. *Genes Brain Behav* 2014; 13: 305–21.
- 384 Hestehave S, Abelson KSP, Brønnum Pedersen T, Finn DP, Andersson DR, Munro G. The influence of rat strain on the development of neuropathic pain and comorbid anxio-depressive behaviour after nerve injury. *Scientific Reports* 2020 10:1 2020; 10: 1–19.
- 385 Moreno-Fernández S, Garcés-Rimón M, Vera G, Astier J, Landrier JF, Miguel M. High Fat/High Glucose Diet Induces Metabolic Syndrome in an Experimental Rat Model. *Nutrients* 2018; 10. DOI:10.3390/NU10101502.
- 386 Thornhill J, Halvorson I. Differences in brown adipose tissue thermogenic responses between Long-Evans and Sprague-Dawley rats. *Am J Physiol* 1992; 263. DOI:10.1152/AJPREGU.1992.263.1.R59.
- 387 Blevins JE, Moralejo DH, Wolden-Hanson TH, et al. Alterations in activity and energy expenditure contribute to lean phenotype in Fischer 344 rats lacking the cholecystokinin-1 receptor gene. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2012; 303. DOI:10.1152/AJPREGU.00393.2012.
- 388 Vodička M, Vavřínová A, Mikulecká A, Zicha J, Behuliak M. Hyper-reactivity of HPA axis in Fischer 344 rats is associated with impaired cardiovascular and behavioral adaptation to repeated restraint stress. *Stress* 2020; 23: 667–77.
- 389 Windle RJ, Wood SA, Lightman SL, Ingram CD. The pulsatile characteristics of hypothalamo-pituitary-adrenal activity in female Lewis and Fischer 344 rats and its relationship to differential stress responses. *Endocrinology* 1998; 139: 4044–52.
- 390 Vallerand AL, Perusse F, Bukowiecki LJ. Stimulatory effects of cold exposure and cold acclimation on glucose uptake in rat peripheral tissues. *Am J Physiol* 1990; 259. DOI:10.1152/AJPREGU.1990.259.5.R1043.
- 391 Bukowiecki LJ. Energy balance and diabetes. The effects of cold exposure, exercise training, and diet composition on glucose tolerance and glucose metabolism in rat peripheral tissues. *Can J Physiol Pharmacol* 1989; 67: 382–93.
- 392 Liu Y, Liu P, Hu Y, et al. Cold-Induced RNA-Binding Protein Promotes Glucose Metabolism and Reduces Apoptosis by Increasing AKT Phosphorylation in Mouse Skeletal Muscle Under Acute Cold Exposure. *Front Mol Biosci* 2021; 8. DOI:10.3389/FMOLB.2021.685993.
- 393 Ghibaudi L, Cook J, Farley C, van Heek M, Hwa JJ. Fat Intake Affects Adiposity, Comorbidity Factors, and Energy Metabolism of Sprague-Dawley Rats. *Obes Res* 2002; 10: 956–63.
- 394 Ha SK, Kim J, Chae C. Role of AMP-activated Protein Kinase and Adiponectin during Development of Hepatic Steatosis in High-fat Diet-induced Obesity in Rats. *J Comp Pathol* 2011; 145: 88–94.
- 395 Marques C, Meireles M, Norberto S, et al. High-fat diet-induced obesity Rat model: a comparison between Wistar and Sprague-Dawley Rat. *Adipocyte* 2016; 5: 11.

- 396 Posey KA, Clegg DJ, Printz RL, et al. Hypothalamic proinflammatory lipid accumulation, inflammation, and insulin resistance in rats fed a high-fat diet. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2009; 296: 1003–12.
- 397 Sellers AJ, Pallubinsky H, Rense P, et al. The effect of cold exposure with shivering on glucose tolerance in healthy men. *J Appl Physiol (1985)* 2021; 130: 193–205.
- 398 Zhu P, Zhang ZH, Huang XF, et al. Cold exposure promotes obesity and impairs glucose homeostasis in mice subjected to a high-fat diet. *Mol Med Rep* 2018; 18: 3923–31.
- 399 Buettner R, Schölmerich J, Bollheimer LC. High-fat Diets: Modeling the Metabolic Disorders of Human Obesity in Rodents. *Obesity* 2007; 15: 798–808.
- 400 Eng JM, Estall JL. Diet-Induced Models of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: Food for Thought on Sugar, Fat, and Cholesterol. *Cells* 2021; 10. DOI:10.3390/CELLS10071805.
- 401 Lian CY, Zhai ZZ, Li ZF, Wang L. High fat diet-triggered non-alcoholic fatty liver disease: A review of proposed mechanisms. *Chem Biol Interact* 2020; 330. DOI:10.1016/J.CBI.2020.109199.
- 402 Aydos LR, Amaral LA do, Souza RS de, Jacobowski AC, Santos EF dos, Macedo MLR. Nonalcoholic Fatty Liver Disease Induced by High-Fat Diet in C57bl/6 Models. *Nutrients* 2019; 11. DOI:10.3390/NU11123067.
- 403 Triglyceride level. <https://www.ucsfhealth.org/medical-tests/triglyceride-level> (accessed Sept 15, 2022).
- 404 Jiang ZG, Tsugawa Y, Tapper EB, et al. Low-fasting triglyceride levels are associated with non-invasive markers of advanced liver fibrosis among adults in the United States. *Aliment Pharmacol Ther* 2015; 42: 106–16.
- 405 Brinton EA, Mason RP. Prescription omega-3 fatty acid products containing highly purified eicosapentaenoic acid (EPA). *Lipids Health Dis* 2017; 16: 1–13.
- 406 Chalkley SM, Hettiarachchi M, Chisholm DJ, Kraegen EW. Long-term high-fat feeding leads to severe insulin resistance but not diabetes in Wistar rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2002; 282. DOI:10.1152/AJPENDO.00173.2001.
- 407 CONNOR WE, DeFRANCESCO CA, CONNOR SL. N-3 Fatty Acids from Fish Oil: Effects on Plasma Lipoproteins and Hypertriglyceridemic Patients. *Ann N Y Acad Sci* 1993; 683: 16–34.
- 408 Rodríguez-Correa E, González-Pérez I, Clavel-Pérez PI, Contreras-Vargas Y, Carvajal K. Biochemical and nutritional overview of diet-induced metabolic syndrome models in rats: what is the best choice? *Nutr Diabetes* 2020; 10. DOI:10.1038/S41387-020-0127-4.
- 409 CIRBP - Cold-inducible RNA-binding protein - Homo sapiens (Human) | UniProtKB | UniProt. <https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q14011/entry> (accessed Sept 7, 2022).
- 410 Ota T, Suzuki Y, Nishikawa T, et al. Complete sequencing and characterization of 21,243 full-length human cDNAs. *Nat Genet* 2004; 36: 40–5.
- 411 Ellulu MS, Patimah I, Khaza'ai H, Rahmat A, Abed Y. Obesity and inflammation: the linking mechanism and the complications. *Arch Med Sci* 2017; 13: 851.
- 412 Aziz M, Brenner M, Wang P. Extracellular CIRP (eCIRP) and inflammation. *J Leukoc Biol* 2019; 106: 133–46.

- 413 Blondin DP, Daoud A, Taylor T, et al. Four-week cold acclimation in adult humans shifts uncoupling thermogenesis from skeletal muscles to brown adipose tissue. *The Journal of Physiology C* 2016 The Authors The Journal of Physiology C 2017; 595: 2099–113.
- 414 Olzmann JA, Carvalho P. Dynamics and functions of lipid droplets. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2019; 20: 137.
- 415 Berry DC, Jiang Y, Arpke RW, et al. Cellular Aging Contributes to Failure of Cold-Induced Beige Adipocyte Formation in Old Mice and Humans. *Cell Metab* 2017; 25: 166–81.
- 416 Silva G da N, Amato AA. Thermogenic adipose tissue aging: Mechanisms and implications. *Front Cell Dev Biol* 2022; 10. DOI:10.3389/FCELL.2022.955612.
- 417 Isacco L, Miles-Chan JL. Gender-specific considerations in physical activity, thermogenesis and fat oxidation: implications for obesity management. *Obes Rev* 2018; 19 Suppl 1: 73–83.
- 418 Isakson P, Hammarstedt A, Gustafson B, Smith U. Impaired preadipocyte differentiation in human abdominal obesity: role of Wnt, tumor necrosis factor-alpha, and inflammation. *Diabetes* 2009; 58: 1550–7.
- 419 Rodriguez-López LA, Torre-Villalvazo I, Aleman-Escondrillas G, et al. The capacity of differentiation of stromal vascular fraction cells into beige adipocytes is markedly reduced in subjects with overweight/obesity and insulin resistance: effect of genistein. *Int J Obes (Lond)* 2021; 45: 2471–81.
- 420 LLeonart ME. A new generation of proto-oncogenes: cold-inducible RNA binding proteins. *Biochim Biophys Acta* 2010; 1805: 43–52.
- 421 Baba T, Nishimura M, Kuwahara Y, et al. Analysis of gene and protein expression of cytochrome P450 and stress-associated molecules in rat liver after spaceflight. *Pathol Int* 2008; 58: 589–95.
- 422 Rey-Funes M, Larrayoz IM, Contartese DS, et al. Hypothermia Prevents Retinal Damage Generated by Optic Nerve Trauma in the Rat. *Sci Rep* 2017; 7. DOI:10.1038/S41598-017-07294-6.
- 423 Zhang HT, Xue JH, Zhang ZW, et al. Cold-inducible RNA-binding protein inhibits neuron apoptosis through the suppression of mitochondrial apoptosis. *Brain Res* 2015; 1622: 474–83.
- 424 Wu L, Sun H liang, Gao Y, et al. Therapeutic Hypothermia Enhances Cold-Inducible RNA-Binding Protein Expression and Inhibits Mitochondrial Apoptosis in a Rat Model of Cardiac Arrest. *Mol Neurobiol* 2017; 54: 2697–705.
- 425 Dinsmore C, Reiter JF. Endothelial primary cilia inhibit atherosclerosis. *EMBO Rep* 2016; 17: 156–66.
- 426 Sánchez-Duffhues G, de Vinuesa AG, Lindeman JH, et al. SLUG is expressed in endothelial cells lacking primary cilia to promote cellular calcification. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2015; 35: 616–27.
- 427 Han SJ, Jung JK, Im SS, et al. Deficiency of primary cilia in kidney epithelial cells induces epithelial to mesenchymal transition. *Biochem Biophys Res Commun* 2018; 496: 450–4.
- 428 Park KM. Can Tissue Cilia Lengths and Urine Cilia Proteins Be Markers of Kidney Diseases? *Chonnam Med J* 2018; 54: 83.

- 429 Shao L, El-Jouni W, Kong F, et al. Genetic reduction of cilium length by targeting intraflagellar transport 88 protein impedes kidney and liver cyst formation in mouse models of autosomal polycystic kidney disease. *Kidney Int* 2020; 98: 1225–41.
- 430 Luu VZ, Chowdhury B, Al-Omran M, Hess DA, Verma S. Role of endothelial primary cilia as fluid mechanosensors on vascular health. *Atherosclerosis* 2018; 275: 196–204.
- 431 Iring A, Jin YJ, Albarrán-Juárez J, et al. Shear stress-induced endothelial adrenomedullin signaling regulates vascular tone and blood pressure. *J Clin Invest* 2019; 129: 2775–91.
- 432 Roux E, Bougaran P, Dufourcq P, Couffignal T. Fluid Shear Stress Sensing by the Endothelial Layer. *Front Physiol* 2020; 11. DOI:10.3389/FPHYS.2020.00861.
- 433 Qiao C, Meng F, Jang I, Jo H, Chen YE, Zhang J. Deep transcriptomic profiling reveals the similarity between endothelial cells cultured under static and oscillatory shear stress conditions. *Physiol Genomics* 2016; 48: 660–6.
- 434 Lerit DA. Signed, sealed, and delivered: RNA localization and translation at centrosomes. *Mol Biol Cell* 2022; 33: pe3.
- 435 Zein-Sabatto H, Lerit DA. The Identification and Functional Analysis of mRNA Localizing to Centrosomes. *Front Cell Dev Biol* 2021; 9. DOI:10.3389/FCELL.2021.782802.
- 436 Lujan DA, Ochoa JL, Hartley RS. Cold-inducible RNA binding protein in cancer and inflammation. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 2018; 9: 1–10.
- 437 Wu CW, Storey KB. Life in the cold: Links between mammalian hibernation and longevity. *Biomol Concepts* 2016; 7: 41–52.
- 438 Silverman MG, Scirica BM. Cardiac arrest and therapeutic hypothermia. *Trends Cardiovasc Med* 2016; 26: 337–44.
- 439 Kurisu K, Yenari MA. Therapeutic hypothermia for ischemic stroke; pathophysiology and future promise. *Neuropharmacology* 2018; 134: 302–9.
- 440 Wassink G, Davidson JO, Dhillon SK, et al. Therapeutic Hypothermia in Neonatal Hypoxic-Ischemic Encephalopathy. *Curr Neurol Neurosci Rep* 2019; 19. DOI:10.1007/S11910-019-0916-0.

ANEXOS



In silico identification and in vivo characterization of small molecule therapeutic hypothermia mimetics



Claire Coderch^a, María Díaz de Cerio^b, Jose María Zapico^a, Rafael Peláez^b, Ignacio M. Larrayoz^b, Ana Ramos^{a,*}, Alfredo Martínez^{b,*}, Beatriz de Pascual-Teresa^{a,*}

^a Department of Chemistry and Biochemistry, Facultad de Farmacia, Universidad San Pablo-CEU, Madrid, Spain

^b Oncology Area, Center for Biomedical Research of La Rioja (CIBIR), Logroño, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 24 July 2017

Revised 20 October 2017

Accepted 29 October 2017

Available online 31 October 2017

Keywords:

Cold-shock protein

HTVS

CIRBP

Hypothermia mimetics

Molecular modeling

ABSTRACT

Hypothermia has been proved to have a beneficial effect on several pathologies. CIRBP is one of the so termed cold-shock proteins involved in this process. In this work, we have detected small molecules capable of modulating the activity of CIRBP in the absence of a cold stimulus, by High Throughput Virtual Screening (HTVS) of the Diversity Set IV of the NCI and 15 compounds of our in-house data base. Fifteen compounds were selected from the HTVS to carry out a second screening through a cell-based Western blot assay. This assay, together with molecular modeling studies allowed us to select compound **zr17-2** for an in vivo experiment, which showed an interesting increase of CIRBP expression in several organs of experimental animals. Therefore, we have demonstrated that the effect of hypothermia can be mimicked by small molecules, which can be developed as first-in-class new drugs for the treatment of several diseases.

© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Hypothermia, or reduction of the body's temperature, is being used clinically as a therapeutic intervention to reduce the symptoms of several pathologies, including stroke,^{1–4} coronary artery bypass surgery,⁵ neurodegeneration after cardiopulmonary resuscitation,⁶ neonatal asphyxia⁷, or traumatism⁸ among others. Investigations in the last three decades have been trying to unravel the molecular mechanisms underlying the beneficial effects of hypothermia.⁹ Usually, exposure to moderately cold temperatures induces a general reduction of metabolism and protein expression in all cells, but there is a small group of proteins, the so-termed cold-shock proteins (CSP), whose expression increases under these conditions. In mammals, there are two main CSPs, RNA-binding motif protein 3 (RBM3) and cold inducible RNA-binding protein (CIRP or CIRBP). These proteins, which belong to the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein family, bind to cellular RNAs and regulate their half-life and thus their expression potential and their final functions.^{10–13} In view of the many applications of therapeutic hypothermia, we decided to search for small molecules capable of mimicking the beneficial effects of cold but acting at normothermia. Since structural data are available for CIRBP but not for

RBM3, we looked for small molecules able to bind CIRBP and increase its protein expression.

CIRBP is a small 172-amino acid RNA-binding protein. It has an extremely conserved tertiary structure constituted by an arginine and glycine rich domain (RGG) and an RNA-recognition motif (RRM), which is shared by this type of RNA-binding proteins. The overall tertiary structure of this family of proteins presents two flexible N- and C-terminal domains that lack a defined secondary structure, and a central globular domain with the typical RRM made up of 2 α -helices and 4 β -sheets (Supplementary Fig. 1). The structure of CIRBP was first determined by NMR in the apo form in 2005 and deposited in the PDB under the code 1X5S, an entry with 20 models that account for the high mobility of the N- and C-terminal ends.^{10,14–16} A more recent CIRBP apo structure has been obtained by X-ray crystallography and deposited in 2017 under the PDB code 5TBX.¹⁷ However, to date there is no 3D-structure available of a CIRBP-RNA bound complex.

After visual inspection of other RNA-bound RRM, we could infer that several hydrophobic amino acids such as Val⁴³, Val⁴⁵, Phe¹⁶, Phe⁵⁶ and Phe⁵⁸ in the RRM motif of CIRBP could be implicated in the stabilization of the nitrogen bases of the RNA. In addition, several positively charged amino acids such as Arg⁴⁸, Arg⁵⁴, Arg⁸² and Arg⁸⁵ could interact with the negative charges of the RNA phosphate backbone. However, to understand the nature of the CIRBP-RNA interaction, it was necessary to analyze the

* Corresponding authors.

E-mail address: bpaster@ceu.es (B. de Pascual-Teresa).