



Universitat Autònoma de Barcelona

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

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

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



Universitat Autònoma de Barcelona

DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOLOGIA MOLECULAR

FACULTAT DE VETERINÀRIA

CENTRE DE BIOTECNOLOGIA ANIMAL I TERÀPIA GÈNICA

**ESTUDI DEL PAPER DE LA PROTEÏNA
MORFOGENÈTICA ÒSSIA 7 (BMP7)
EN EL TEIXIT ADIPÓS BLANC EN MODELS
D'OBESITAT I RESISTÈNCIA A LA INSULINA**

ESTEFANIA CASAÑA LORENTE

Aquest treball experimental ha estat realitzat sota la direcció de la Dra. Fàtima Bosch i Tubert al Departament de Bioquímica i Biologia Molecular i al Centre de Biotecnologia Animal i Teràpia Gènica.

ESTEFANIA CASAÑA LORENTE

FÀTIMA BOSCH TUBERT

VERÓNICA JIMÉNEZ CENZANO

JUNY 2017

BELLATERRA

Als meus pares

Son muchas las personas que han formado parte de este trabajo y a las que quiero dar sinceramente las gracias.

En primer lugar, quiero agradecer a la Dra. Fàtima Bosch por haberme dado la oportunidad primero de hacer prácticas y posteriormente de hacer la tesis en su excepcional grupo de investigación. Gracias por contagiarme con tu energía y entusiasmo en los momentos clave. Y enseñarme a ver las cosas con una perspectiva diferente cuando yo no he sabido.

Mil gracias a mi co-directora, mentora y amiga Vero. Gracias por enseñarme todo lo que sabes, por trabajar codo con codo como iguales y saber sacar lo mejor de mí cada día. Gracias por tu paciencia, tu comprensión y tus ánimos en los momentos difíciles, y tu motivación y tus risas que han hecho que sacar adelante el trabajo fuese más sencillo. Esta tesis no hubiese sido lo mismo sin ti, he tenido la suerte de tenerte a mi lado todos estos años y es algo que nunca olvidaré.

Gracias a otra de las reinas del páncreas, Cristina, por las miles de horas juntas en el animalario, esas charlas han hecho mi vida mucho más fácil y agradable dentro del zulo. Gracias por estar siempre ahí, por las risas y los abrazos en los momentos adecuados. ¡Y por ayudarme con el catalán de la tesis!

Gracias a mis otros adiposos, trabajar en equipo con vosotros ha sido genial. A mis frikis y algo despitados, Jordi i Miquel por vuestras salidas, gracias por el etanol y por ayudar siempre con una sonrisa. A Sergio por estar siempre ahí, compartir tu experiencia conmigo y dotarme de tanto conocimiento científico y musical. La tesis no hubiese sido igual sin tus chistes malos y tus piques con Miquel. A mis ya no tan pequeños Claudia y Víctor Sacristán, habéis sido mis manos, mi soporte y sobretodo mis amigos. Gracias por ser mis hermanos dentro del CBATEG, por escucharme, apoyarme, ayudarme en todo y compartir todos estos años juntos. Vuestra incorporación al equipo lo cambio todo, y para mejor. A los nuevos fichajes, Sara.D, Ignasi i Gemma, vuestro buen humor y es contagioso. Gracias por estar siempre dispuestos a ayudar y por tener paciencia conmigo cuando no tengo tiempo para todo. Y en especial a Sara D por hacer de mi lugar de trabajo un santuario artístico del buen humor.

A los *jovenasos*, Victor Sánchez, Xavi Sanchez i Joan. Gracias por formar parte de mi vida y hacer que estos años hayan sido mucho mejores de lo que hubiese

imaginado. Compartir el doctorado con vosotros ha sido extraordinariamente enriquecedor y aún más divertido, me habéis alargado muchos años de vida con vuestras risas y vuestros abrazos, ¡Gracias!

A las becarias Marisa y Jenny por su comprensión y ayuda cuando la he necesitado.

Al soporte técnico i moral de Xavier León y Maria Molas. Muchísimas gracias por vuestra profesionalidad y atención, por contestar siempre a todas las preguntas y regalarme vuestro buen humor y complicidad. Gracias por las bromas de “L” y por ser tan especiales, es tan fácil trabajar con vosotros como tomar una cerveza a vuestro lado.

A Sandra Motas e Iris por empezar este camino conmigo y compartir tantos buenos momentos juntas, por las horas pedidas de aquí para ya arreglando papeles y dando clases, por escucharme siempre y regalarme lo mejor de vosotras, ha sido un verdadero placer (Y muchas gracias Sandra por corregir mi exquisito catalán). Al igual que compartir miles de momentos con Carles Roca y Luca. Gracias por ser tan atentos y tan divertidos, por acoger a la gente con los brazos abiertos y ofrecer todo lo que he necesitado. El CBATEG es un lugar mejor cuando estáis vosotros.

Muchas gracias también a Sara Marco y Albert Ribera por vuestra amabilidad, vuestro humor catalán y sus “buenos días”. Teneros en el laboratorio es un verdadero lujo. Al apoyo técnico de Marta Moya, Lidia y Jennifer Barrero, siempre estáis dispuestas a ayudar y además regalando risas y buen humor. Sois un pilar indispensable del grupo.

A Sylvie, Vicky y Alba por vuestro apoyo como postdocs y vuestra comprensión, vuestro conocimiento es muy importante para nosotros los becarios. A los demás miembros de grupo, Meri, Tura, Ivet y Laia por vuestra amabilidad y disponibilidad a responder cualquier pregunta. Gracias también a otros compañeros que estuvieron en su momento: Edu, Efrén, David Callejas, Albert Però, D. David, Cristian i Pilar.

Al equipo responsable del animalario Pedro, Marta, Mire, Edurne, Carles y Pere. Vuestra ayuda y asesoramiento con el cuidado de los animales ha sido indispensable durante estos años. Gracias por ser tan atentos y agradables conmigo.

A las chicas de la Unidad de Animales Transgénicos, Anna A., Anna P. y Sandra, por los momentos compartidos en la 1a planta, por vuestra simpatía. Y a la Montse Bellido y la Rosmi por facilitarnos siempre el trabajo con la documentación.

Al Dr. Ruberte y Lorena Noya por su trabajo y por compartir su tiempo y experiencia. Al resto de personal de la 4ª y la 5ª planta por su compañerismo y por contribuir en un día a día tan agradable. Gracias también a todo el personal de administración, seguridad, mantenimiento y limpieza por su contribución al buen funcionamiento del CBATEG y por ser tan agradables siempre conmigo.

Gracias al apoyo de las personas fuera del CBATEG, *als meus calamars*, Ari, Soni, Maria, San y Ness por escuchar mis ralladas sobre la tesis y ayudar a olvidarme de ella aunque fuese por un rato. A Ana por sacarme siempre una sonrisa y por las tardes charlando que tanto me ayudan a despejarme.

A mi familia, en especial a mi hermano por saber hacerme reír cuando lo necesito y a mis padres por apoyarme siempre en todo desde el primer momento. Gracias por hacer que crea en mi misma y pensar que todo es posible si lo quieres conseguir de verdad.

Por ultimo gracias al amor de vida, Lorena tu has conseguido que estos últimos meses escribiendo la tesis hayan sido realmente fáciles y poco “traumáticos”. Gracias por tu comprensión, por escucharme siempre y apoyarme en mis decisiones. Gracias por estar disponible y por ocuparte de otras cosas para que yo pudiese escribir. Por esos abrazos cuando más los necesitaba y sobretodo por formar una vida juntas y compartirla con Asia, vuestra empatía y cariño siempre ponen un rayo de luz en los días más oscuros.

Este trabajo ha sido posible gracias a la beca predoctoral FPU, financiada por el Ministerio de Educación, de la que ha sido beneficiaria durante cuatro años. Las investigaciones se han realizado gracias a la financiación recibida por el Ministerio de Economía y Competitividad, Plan Nacional I+D+I (SAF2014-54866R), de la Generalitat de Catalunya (2014 SGR-1669), i de la European Foundation for the Study of Diabetes (EFSD)/MSD Programme 2013.

3'-UTRs	Regions 3' no traduïdes
aa	Aminoàcids
AAP	Proteïna d'activació de l'assemblatge
AAVs	Virus adenoassociats
ACADL	Acil-Coenzim A deshidrogenasa de cadena llarga
ACADM	Acil-Coenzim A deshidrogenasa de cadena mitja
ACC1	<i>Acetyl-CoA carboxylase 1</i>
ACC2	<i>Acetyl-CoA carboxylase 2</i>
ActRIIa	<i>Activin A receptor type IIA</i>
ActRIIb	<i>Activin A receptor type IIB</i>
ADIPOQ	Adiponectina
AGO2	Argonauta2
ALK2	<i>Activin receptor-like kinase-2</i>
ALK3	<i>Activin receptor-like kinase-3</i>
ALK6	Activin receptor-like kinase-6
ALT	Alanina aminotransferasa
AST	Aspartat aminotransferasa
ATGL	<i>Adipose triglyceride lipase</i>
BAT	Teixit adipós marró
BHE	Barrera hematoencefàlica
BMP2	Proteïna morfogenètica òssia 2
BMP4	Proteïna morfogenètica òssia 4
BMP7	Proteïna morfogenètica òssia 7
BMP8B	Proteïna morfogenètica òssia 8b
BMPRI1B	<i>Bone Morphogenetic Protein Receptor Type 1B</i>
BMPRII	<i>Bone Morphogenetic Protein Receptor Type 2</i>
BMPs	Proteïnes morfogèniques òssies
C/EBPα	<i>CCAAT/ enhancer-binding protein alpha</i>
C/EBPβ	<i>CCAAT/ enhancer-binding protein beta</i>
C/EBPδ	<i>CCAAT/ enhancer-binding protein delta</i>
CAG	Promotor de la β -actina de pollastre i l'enhancer del Citomegalovirus
cAMP	Monofosfat d'adenosina cíclic
CBATEG	Centre de biotecnologia animal i teràpia gènica
CD36	<i>cluster of differentiation 36</i>
CD68	<i>Cluster of Differentiation 68</i>
CD8	Limfòcits T citotòxics
CDKAL1	<i>Cyclin-dependent kinase 5 regulatory subunit associated protein 1-like 1</i>

CDKN2A/2B	<i>Cyclin-dependent kinase 4 inhibitor B</i>
chow	Dieta estàndard
ChREBP	<i>Carbohydrate-responsive element-binding protein</i>
CIDEA	<i>Cell-death-inducing DFF45-like effector A</i>
CPT1	<i>Carnitine palmitoyltransferase 1</i>
CPT2	Carnitine palmitoyltransferase 2
CUL4B	Cullin4B
CYTC	Citocrom C
db/db	Ratolí deficient pel receptor de la leptina
DIO	Animal obès induït per la dieta
DNA	Àcid desoxiribonucleic
dNTPs	Deoxinucleòsids trifosfats
DPN	<i>Synthetic uncoupling agent 2,4 dinitrophenol</i>
dsAAV	AAV de doble cadena de DNA
DT1	Diabetis tipus 1
DT2	Diabetis tipus 2
EBF1	<i>Early B-cell factor 1</i>
EBF2	<i>Early B-cell factor 2</i>
ECM	Matriu extracel·lular
EE	<i>Energy Expenditure</i>
EEM	Error Estàndard de la Mitjana
EHMT1	<i>Euchromatic histone-lysine N-methyltransferase 1</i>
eWAT	Teixit adipós blanc epididimal
F4/80	<i>EGF-like module-containing mucin-like hormone receptor-like 1</i>
FABP4	Proteïna d'unió a àcids grassos
FAS	Sintasa d'àcids grassos
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i>
FFA	Àcids grassos lliures
FGF-21	Fibroblast growth factor 21
FTO	<i>Fat mass and obesity-associated protein</i>
GCK	Glucoquinasa
GDF	Factors de creixement i diferenciació
GDNF	Glial cell line-derived neurotrophic factor
GFP	Proteïna fluorescent verda
GLUT4	Transportador de glucosa 4
GRB14	<i>Growth factor receptor-bound protein 14</i>
GTT	Test de tolerància a la glucosa

GWA	<i>Genome-wide association</i>
h	Hores
hAAT	Promotor de la α 1-antitripsina humana
HCR	Regió control del locus de la apolipoproteïna E
HFD	Dieta alta en lípids
HS	<i>Horse Serum</i>
HSL	Lipasa sensible a hormones
iBAT	Teixit adipós marró interescapular
IMC	Índex de massa corporal
iNKT	<i>Natural killer T cells</i>
IRS1	<i>Insulin receptor substrate 1</i>
IRS2	<i>Insulin receptor substrate 2</i>
I-SMAD	Inhibidors de SMADs
ITRs	Repeticions terminals invertides
ITT	Test de la tolerància a la insulina
iWAT	Teixit adipós blanc inguinal
Kcal	Kilocalories
Kg	Kilograms
KLF14	<i>Krüppel-like factor 14</i>
KO	<i>Knockout</i>
LEPR	<i>Receptor de leptina</i>
LOKO mice	ob/ob deficient per els receptors X del fetge α i β
LPL	Lipoproteïna lipasa
m²	Metres al quadrat
MAC2	<i>Galectin-3</i>
MCE	Expansió mitòtica clonal
min	Minut
miR	MicroRNA
miRISC	MicroRNA-induced silencing complex
miRNAs	MicroRNAs
miRT	Seqüència diana per un miRNA
miRT1	Seqüència diana del microRNA-1
miRT122a	Seqüència diana del microRNA-122a
MODY	<i>Madurity Onset Diabetes of the Young</i>
MSC	Cèl·lules mare mesenquimals
MTNR1B	<i>Melatonin receptor 1B</i>
mWAT	Teixit adipós blanc mesentèric

Myf5	Factor miogenic 5
NAFLD	Malaltia del fetge gras no alcohòlic
NASH	Esteatohepatitis no alcohòlica
NDN	<i>Necdin</i>
NRF1	Factor respiratori nuclear 1
ob/ob	Ratolí deficient pel gen de la leptina
oBMP7	BMP7 optimitzat
OMS	Organització mundial de la salut
OP-1	Proteïna osteogènica 1
ORF	Marc de lectura obert
p38-MAPK	Proteïna quinasa activada per mitogen p38
Pax7	<i>Paired box protein</i>
pb	Parells de bases
PCR	Reacció en cadena de la polimerasa
PEG	Polietilenglicol
PGC-1α	Coactivador-1alpha de PPAR γ
PGC-1β	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-beta
PKA	Proteïna quinasa A
PLIN1	Perilipina 1
PPARG	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor gamma</i>
PPARγ	<i>Peroxisome proliferatoractivated receptor gamma</i>
PRDM16	<i>PR domain containing 16p</i>
PREF1	Factor Preadipòcit 1
PXR	Receptor X de pregnan
qPCR	PCR quantitativa
rAAV	Vector AAV recombinant
RB	<i>Roller Bottles</i>
RNA	Àcid ribonucleic
R-SMAD	SMAD regulades per receptor
RT-PCR	<i>Real Time PCR</i>
rWAT	Teixit adipós blanc retroperitoneal
SAT	Teixit adipós subcutani
ScaPCs	<i>Stem cells antigen 1 + progenitor cells</i>
SCD	Desaturasa d'esteril-CoA
SLC30A8	<i>Solute carrier family 30 member 8</i>
SREBP1	<i>Sterol-regulatory-element binding protein 1c</i>
ssDNA	Cadena simple d'DNA

SVF	Fracció vascular estromal
TBG	Promotor de la globulina d'unió a tiroxina
TCF7L2	<i>Transcription factor 7-like 2</i>
TFAM	Factor de transcripció mitocondrial A
TG	Triglicèrids
TGFβ	Transforming Growth Factor β
Th1	Limfòcits T col·laboradors de tipus 1
TNFα	Factor de necrosi tumoral α
Tregs	Limfòcits T reguladors
TZD	Tiazolidinediones
UAB	Universitat Autònoma de Barcelona
UCP1	Proteïna desacobladora 1
V	Volts
vg	Genomes virals
WAT	Teixit adipós blanc
WB	Western Blot
WISP2	<i>WNT1 Inducible Signaling Pathway Protein 2</i>
WNT	<i>Wingless-type MMTV Integration site</i>
ZDF	<i>Zucker Diabetic Fatty</i>
ZFP516	<i>Zinc finger protein 516</i>
ZNF521	<i>Zinc-finger protein 521</i>

I. PRESENTACIÓ	1
II. INTRODUCCIÓ.....	5
1. DIABETES MELLITUS	7
1.1. Diabetis tipus 2	8
1.1.1. <i>Patogènia de la diabetis tipus 2.....</i>	8
1.1.2. <i>Susceptibilitat genètica i factors ambientals en la diabetis tipus 2.....</i>	11
2. OBESITAT	13
2.1. Tipus d'obesitat en humans	14
2.2. Complicacions en l'obesitat.....	15
3. L'ÒRGAN ADIPÓS.....	16
3.1. Components de l'òrgan adipós.....	16
3.2. Tipus d'adipòcits	16
3.2.1. <i>Adipòcits blancs.....</i>	16
3.2.2. <i>Adipòcits marrons.....</i>	18
3.2.3. <i>Adipòcits beige</i>	19
3.3. Plasticitat del teixit adipós	20
3.4. Localització del teixit adipós.....	24
3.4.1. <i>Localització del teixit adipós en ratolins</i>	24
3.4.2. <i>Localització del teixit adipós en humans</i>	25
3.5. Origen del teixit adipós	26
3.6. Característiques generals de l'adipogènesi del teixit adipós	27
3.6.1. <i>Característiques específiques de l'adipogènesi del teixit adipós marró..</i>	31
4. NOUS TRACTAMENTS PER LA DIABETIS TIPUS 2 I L'OBESITAT BASATS EN L'ACTIVACIÓ DEL TEIXIT ADIPÓS MARRÓ I EL BROWNING.....	32
4.1. Activació del teixit adipós marró i browning.....	32

4.2. Possibles teràpies alternatives.....	33
5. PROTEÏNA ÒSSIA MORFOGENETICA 7 (BMP7)	35
5.1. La superfamília de proteïnes TGF β -BMP	35
5.1.1. BMPs en l'adipogènesi.....	35
5.2. Estructura del BMP7	36
5.3. Patró d'expressió del BMP7.....	37
5.4. Cascada de la senyalització del factor BMP7 al teixit adipós	38
5.5. BMP7 i tractament de l'obesitat i la diabetis tipus 2.....	40
5.5.1. Efectes al teixit adipós mediat per BMP7.....	40
5.5.2. Efectes a nivell central mediat per BMP7.....	42
5.6. BMP7 com a teràpia per tractar l'obesitat i la DT2	42
6. TRANSFERÈNCIA GÈNICA MITJANÇANT VECTORS ADENOASSOCIATS (AAV).....	44
6.1. Biologia dels virus adenoassociats	44
6.2. Vectors AAV recombinants	45
6.3. Transferència de gens al teixit adipós mitjançant vectors AAV.....	48
6.4. Transferència de gens al fetge mitjançant vectors AAV	49
III. OBJECTIUS.....	51
IV. RESULTATS	55
PART-I. Estudi de l'efecte de la sobreexpressió de BMP7 específicament al teixit adipós.....	57
PART-IA: Restricció de l'expressió gènica mitjançada per AAVs: utilització de seqüències diana per microRNAs (miRTs).....	59
1. DISSENY I GENERACIÓ DEL VECTOR AAV PER MEDIAR EXPRESSIÓ ESPECÍFICA DE BMP7 EN EL TEIXIT ADIPÓS MITJANÇANT SEQÜÈNCIES DIANA DE miRNAs.....	61

1.1. Anàlisi de l'expressió dels microRNA122a i microRNA1 en ratolins C57BL/6.....	63
1.2. Construcció de vectors virals adenoassociats que codifiquen per la proteïna GFP en presència de seqüències diana per miR122a i/o miR1	64
1.3. Comprovació de la funcionalitat dels miRTs 122a i 1 in vitro i in vivo	65
1.4. Producció dels vectors AAV codificants per GFP.....	67
2. ADMINISTRACIÓ INTRA-eWAT DE VECTORS AAV QUE CODIFIQUEN PER GFP I ESTAN REGULATS PEL miRT122A I miRT1 EN RATOLINS C57BL6 ...	68
2.1. Anàlisi immunohistoquímic de GFP en teixit adipós, fetge i cor.....	69
2.2. Avaluació dels nivells proteics de GFP mitjançant Western Blot	72
PART-IB: Efectes de la sobreexpressió de BMP7 en teixit adipós blanc de ratolins alimentats amb dieta alta en lípids	75
1. CONSTRUCCIÓ I PRODUCCIÓ DEL VECTOR AAV9-CAG-BMP7-dmiRT.....	77
2. ESTUDI DELS EFECTES DE LA SOBREEPRESSIÓ LOCAL DE BMP7 EN L'eWAT	78
2.1. Avaluació del pes, ingesta d'aliments, glucèmia i insulinèmia en els animals tractats amb AAV9-CAG-BMP7-dmiRT	79
2.2. Expressió de BMP7 en els teixits metabòlics dels animals administrats amb AAV9-CAG-BMP7-dmiRT.....	81
2.3. Anàlisi de l'adipogènesi en els teixits adiposos blanc i marró.....	82
2.3.1. Anàlisi histològic dels teixits adiposos.....	82
2.4. Anàlisi de l'activació i la biogènesis mitocondrial en el teixit adipós marró85	
PART-IC. Estudi dels efectes de la sobreexpressió de BMP7 en el teixit adipós epididimal de ratolins ob/ob	87
1. GENERACIÓ DEL VECTOR AAV8-CAG-BMP7-dmiRT	89
2. ESTUDI DELS EFECTES DE LA SOBREEPRESSIÓ DE BMP7 EN L'eWAT DE RATOLINS ob/ob.....	90

2.1. Seguiment del pes i ingesta d'aliments i determinació dels pesos dels teixits en els ratolins ob/ob tractats amb AAV8-CAG-BMP7-dmiRT.....	91
2.2. Nivells d'expressió de BMP7 en teixits metabòlics i nivells circulants en sèrum.....	93
2.3. Avaluació dels pesos dels teixits adiposos i fetge	94
2.4. Anàlisi de l'adipogènesi en els teixits adiposos blanc i marró.....	94
2.4.1. Anàlisi de l'adipogènesi en el teixit adipós blanc epididimal	95
2.4.2. Anàlisi de l'adipogènesi en el teixit adipós blanc inguinal	99
2.4.3. Anàlisi de l'adipogènesi en el teixit adipós marró interescapular.....	101
2.5. Anàlisi de l'activació i la biogènesi mitocondrial en el teixit adipós marró.....	103
2.6. Anàlisi de la inflamació al teixit adipós blanc.....	103
2.7. Anàlisi del fetge	105
2.8. Anàlisi dels paràmetres sèrics i dels tests de sensibilitat a la insulina i tolerància a la glucosa.....	108
PART-ID. Avaluació dels efectes de l'increment dels nivells circulants de BMP7 mitjançant la sobreexpressió del factor en el fetge d'animals ob/ob.....	113
1. GENERACIÓ DEL VECTOR AAV8-hAAT-BMP7.....	116
2. ESTUDI DELS EFECTES A LLARG TERMINI DE L'AUGMENT DELS NIVELLS CIRCULANTS DE BMP7 PER A LA SOBREEXPRESSIÓ D'AQUEST FACTOR EN EL FETGE DE RATOLINS OB/OB.....	116
2.1. Avaluació dels nivells circulants de BMP7, seguiment del pes i ingesta d'aliments i determinació dels pesos dels teixits en els ratolins ob/ob tractats amb AAV8-hAAT-BMP7	117
2.2. Anàlisi de l'adipogènesi en els teixits adiposos blanc i marró	119
2.2.1. Anàlisi de l'adipogènesi en el teixit adipós blanc epididimal	119
2.2.2. Anàlisi de l'adipogènesi en el teixit adipós blanc inguinal.....	121
2.2.3. Anàlisi de l'adipogènesi en el teixit adipós marró interescapular.....	123

2.3. Anàlisi de l'activació i la biogènesis mitocondrial en el teixit adipós marró	125
2.4. Determinació de la inflamació al teixit adipós blanc	125
2.5. Anàlisi del fetge	127
2.6. Anàlisi de paràmetres sèrics i test de sensibilitat a la insulina i tolerància a la glucosa.....	129
Part-II. Avaluació dels efectes de nivells circulants elevats de BMP7	133
1. ESTUDI DE DOSIS RESPOSTA.....	136
1.1. Nivells sèrics de BMP7	137
1.2. Avaluació del dany hepàtic	138
2. ESTUDI DELS EFECTES A LLARG TERMINI DE NIVELLS CIRCULANTS ELEVATS DE BMP7 EN RATOLINS ALIMENTATS AMB DIETA ALTA EN LÍPIDS.....	139
2.1. Avaluació de seguiment del pes i ingesta d'aliments i determinació dels nivells circulants de BMP7	140
2.2. Avaluació del consum energètic.....	142
2.3. Avaluació de la sensibilitat a la insulina	142
V. DISCUSSIÓ	147
VI. CONCLUSIONS	161
VII. MATERIALS I MÈTODES.....	165
1. MATERIALS.....	167
1.1. Animals	167
1.2. Soques bacterianes	167
1.3. Anticossos	167

1.4. Reactius.....	168
1.5. Plasmidis	168
2. MÈTODES	170
2.1. Tècniques bàsiques de DNA.....	170
2.1.1. Preparació del DNA plasmídic.....	170
2.1.2. Digestió del DNA amb enzims de restricció	170
2.1.3. Desfosforilació de fragments de DNA	171
2.1.4. Generació d'extrems roms de fragments de DNA.....	171
2.1.5. Construcció de molècules híbrides: lligació	171
2.1.6. Transformació en cèl·lules competents <i>E.coli</i> XL2-blue	171
2.1.7. Obtenció del DNA i purificació.....	172
2.2. Cèl·lules eucariotes en cultiu	172
2.2.1. Cèl·lules HEK293	172
2.2.2. Cèl·lules C2C12.....	173
2.2.3. Transfecció de DNA en cèl·lules en cultiu	
2.3. Producció, purificació i titulació dels vectors virals adenoassociats.....	173
2.3.1. Producció i purificació.....	173
2.3.2. Titulació de genomes virals	175
2.3.3. Quantificació de les partícules virals per tinció de plata.....	176
2.4. Injecció <i>in vivo</i> dels vectors virals i plasmídics	177
2.4.1. Administració local al teixit adipós blanc	177
2.4.2. Administració sistèmica	177
2.4.3. Administració hidrodinàmica.....	178
2.5. Anàlisi d'expressió del mRNA per RT-PCR.....	178
2.5.1. Extracció de RNA total	178
2.5.2. Síntesi de cDNA	178
2.5.3. Real Time PCR.....	179

2.6. Anàlisi d'expressió dels miRNA per RT-PCR	180
2.6.1. <i>Extracció de miRNA dels teixits</i>	180
2.6.2. <i>Síntesi de cDNA</i>	180
2.6.3. <i>Real Time PCR</i>	180
2.7. Extracció i anàlisi de proteïnes.....	181
2.7.1. <i>Extracció de proteïnes</i>	181
2.7.2. <i>Determinació de la concentració de proteïnes</i>	181
2.7.3. <i>Anàlisi de l'expressió de proteïnes mitjançant Western Blot</i>	182
2.7.3.1. <i>Electroforèsi en gels de poliacrilamida (SDS-PAGE)</i>	182
2.7.3.2. <i>Transferència de proteïnes a membranes i immunodetecció</i>	182
2.8. Determinació del consum d'aliments.....	183
2.9. Determinació de paràmetres sèrics.....	183
2.9.1. <i>Glucosa</i>	184
2.9.2. <i>Insulina</i>	184
2.9.3. <i>Adiponectina</i>	184
2.9.4. <i>BMP7</i>	184
2.9.5. <i>Triglicèrids</i>	184
2.9.6. <i>Àcids grassos lliures</i>	184
2.10. Determinació del contingut de triglicèrids hepàtics.....	185
2.11. Test de tolerància a la glucosa.....	185
2.12. Test de tolerància a la insulina.....	186
2.13. Anàlisi immunohistoquímica del teixit adipós, cor i fetge	186
2.13.1. <i>Determinació de l'àrea mitja dels adipòcits</i>	186
2.14. Anàlisi estadística	187
VIII. BIBLIOGRAFIA.....	189

I.PRESENTACIÓ

L'obesitat i la diabetis tipus 2 estan estretament relacionades i representen un problema de salut, econòmic i social degut a la seva prevalença alarmantment creixent a tot el món. Tot i això, no hi ha tractaments efectius disponibles per aquestes malalties. Durant el desenvolupament de l'obesitat es produeix una expansió hipertròfica de la massa adiposa que resulta en l'acumulació de greix en compartiments ectòpics i finalment en la resistència a la insulina. S'ha postulat que la inducció de l'activitat termogènica del teixit adipós marró (BAT) pot la reduir del pes corporal i millorar la sensibilitat a la insulina en models animals i éssers humans obesos.

La proteïna morfogènica òssia 7 (BMP7) és capaç de dirigir cèl·lules mare mesenquimals al llinatge adipogènic marró, diferenciar preadipòcits marrons a adipòcits marrons madurs i induir l'activitat termogènica del teixit adipós marró en estudis *in vitro* i *in vivo* a curt termini. Però, encara no s'ha establert si el BMP7 podria tenir també un paper en l'adipogènesi del teixit adipós blanc (WAT) i així contribuir a la millora de la sensibilitat a la insulina. Per tant, l'objectiu d'aquest estudi va ser desenvolupar un sistema que permetés per una banda augmentar els nivells d'expressió de BMP7 localment al teixit adipós i d'altra banda, induir l'alliberació contínua de la proteïna per tal d'estudiar els seus efectes *in vivo* a llarg termini en models d'obesitat i resistència a la insulina.

L'enginyeria genètica de les cèl·lules adiposes mitjançant vectors virals adenoassociats (AAV) ofereix un gran potencial com a eina per a comprendre millor els mecanismes moleculars de l'obesitat i DT2. Per tal d'obtenir nivells alts d'expressió del gen d'interès específicament en el teixit adipós i evitar l'expressió del transgèn en els teixits no desitjats, es va generar un casset d'expressió d'AAV que codificava per el la proteïna marcador GFP sota el control del promotor ubic CAG en conjunció amb les seqüències diana per el miR122a i el miR1 (dmiRT), específics de fetge i cor, respectivament (AAV-CAG-GFP-dmiRT). L'administració al teixit adipós blanc epididimal (eWAT) d'aquests vectors, promovia nivells elevats de producció de GFP a l'eWAT, mentre que en el fetge i el cor eren marginals.

Aquesta estratègia de transferència gènica es va utilitzar per sobreexpressar específicament el *BMP7* en el WAT a llarg termini en models animals d'obesitat i resistència a la insulina. Els ratolins tractats intra-eWAT mitjançant vectors AAV-CAG-BMP7-dmiRT van presentar una inducció de l'adipogènesi i una expansió hiperplàstica al WAT. A més, es va observar la disminució de la inflamació en el WAT i l'augment

dels nivells sèrics d'adiponectina, en paral·lel amb la reducció de la insulinèmia i la millora de la sensibilitat a la insulina. Tanmateix, els animals tractats amb AAV8-CAG-BMP7-dmiRT van mostrar una reducció del contingut de triglicèrids i la inflamació del fetge. Tot i això, no es va observar inducció de l'adipogènesi ni la termogènesi al BAT.

Per discernir si el fenotip observat es devia a l'augment de l'expressió de *BMP7* al WAT o a l'increment dels nivells circulants de la proteïna, es va sobreexpressar el *BMP7* específicament de fetge mitjançant AAV, per tal d'induir nivells circulants de *BMP7* similars als de l'aproximació intra-eWAT. En aquest estudi no es van observar modificacions en el pes corporal, l'adipogènesi, la inflamació, la deposició de greix, els nivells sèrics d'adiponectina ni d'insulina. Però la sensibilitat a la insulina sí que estava millorada.

D'altra banda, es van voler estudiar els efectes de nivells circulants molt elevats de *BMP7* a llarg termini en animals obesos mitjançant l'administració a dosis més altes de vectors AAV que sobreexpressaven *BMP7* específicament al fetge. Aquesta aproximació va promoure la normalització del pes corporal mitjançant la reducció de la ingesta d'aliments i l'augment de la despesa energètica, i la millora de la sensibilitat a la insulina i de la tolerància a la glucosa.

En conjunt, aquests resultats indiquen que la sobreexpressió a llarg termini de *BMP7* mitjançant AAV en el WAT induïa l'expansió hiperplàsia d'aquest teixit que juntament amb l'augment dels nivells circulants de *BMP7*, donava lloc a una millora en la sensibilitat a la insulina. D'altra banda, nivells circulants elevats de *BMP7* a llarg termini promovien la reducció del pes corporal i la millora de la sensibilitat a la insulina, el que suggereix que aquesta última estratègia podria servir com una aproximació terapèutica per al tractament de la DT2 i l'obesitat en el futur.

II. INTRODUCCIÓ

1. DIABETES MELLITUS

La diabetis mellitus inclou un grup de malalties metabòliques caracteritzades per la presència d'hiperglucèmia resultant de defectes en la secreció d'insulina, l'acció de la insulina o d'ambdues (American Diabetes Association et al., 2016). La hiperglucèmia crònica de la diabetis està associada a danys a llarg termini, que inclouen retinopaties, nefropaties, cardiopaties, disfuncions cerebrovasculars i vasculars perifèriques, entre d'altres (Gregg et al., 2016).

Actualment la diabetis ha assolit proporcions epidèmiques, amb una estimació de 415 milions de persones afectades a tot el món, de les quals 59.8 milions de persones afectades viuen a Europa i 44.3 milions a Nortamèrica i el carib (International Diabetes Federation et al., 2015). L'organització mundial de la salut (OMS) considera que, a nivell global, la diabetis és la vuitena causa de mortalitat en ambdós sexes i la cinquena causa en done (WHO et al., 2016). Concretament, el nombre de morts per diabetis al món durant el 2015 s'estima en 4.96 milions de persones (International Diabetes Federation et al., 2015). A més, les despeses mèdiques dels pacients amb diabetis són entre dos i tres cops superiors a les de la resta de la població (International Diabetes Federation et al., 2015).

La gran majoria dels casos de diabetis es poden classificar en dos categories: la diabetis tipus 1 (DT1) i la diabetis tipus 2 (DT2). La diabetis tipus 1 està causada per la destrucció autoimmune de les cèl·lules β del pàncrees, fet que provoca una deficiència en la producció i secreció de la insulina (American Diabetes Association et al., 2016). En canvi, la causa de la DT2 és la combinació de la resistència a l'acció de la insulina (principalment en el múscul, el teixit adipós i el fetge) i la secreció inadequada de l'hormona insulina per la disminució de la massa i funcionalitat de les cèl·lules β del pàncrees (American Diabetes Association et al., 2016).

A més d'aquestes dues grans categories, existeixen altres tipus de diabetis amb menys prevalença com ara la diabetis gestacional, que es defineix com qualsevol grau d'intolerància a la glucosa amb inici o primer reconeixement durant l'embaràs; i altres tipus de diabetis associades a defectes monogènics en la funció de les cèl·lules β (American Diabetes Association et al., 2016). Les diabetis monogèniques es caracteritzen sovint per l'aparició d'hiperglucèmia a una edat primerenca (generalment abans dels 25 anys) i se les coneix com MODY (*Madurity Onset Diabetes of the*

Young). Les MODYs es caracteritzen per presentar alteracions en la secreció d'insulina i cap o mínimes alteracions en l'acció de la insulina. Aquestes malalties s'hereten de forma autosòmica dominant (American Diabetes Association et al., 2016).

1.1. Diabetis Tipus 2

La DT2 és la forma més comuna de la malaltia, afectant entre el 90-95% del total dels pacients diabètics. La majoria d'individus amb DT2 són obesos, i els pacients que no ho són per criteris de pes, poden tenir un augment del percentatge de greix corporal distribuït principalment en la regió abdominal (American Diabetes Association et al., 2016). Tot i que anteriorment la DT2 era predominantment diagnosticada en persones de mitjana edat o edat avançada, l'edat d'inici de la malaltia ha disminuït i actualment un nombre creixent de nens estan essent diagnosticats, fet que va en paral·lel amb l'augment de la prevalença de sobrepès en la població jove (Cheng et al., 2005).

Aquesta forma de diabetis amb freqüència no es diagnostica durant els primers anys de la malaltia, donat que la hiperglucèmia es desenvolupa gradualment i sovint els efectes inicials no són prou greus per relacionar-los amb els símptomes clàssics de la diabetis (American Diabetes Association et al., 2016). A més, els pacients amb diabetis tipus 2 presenten una elevada variabilitat en els nivells de resistència i deficiència d'insulina, fet que sustenta la possible existència de subgrups fenotípicament heterogenis amb trets patològics específics (Smith et al., 2010).

1.1.1. Patogènia de la diabetis tipus 2

La DT2 és un trastorn metabòlic caracteritzat per la resistència a la insulina en els teixits perifèrics i la deficiència relativa en la secreció d'insulina per part de les cèl·lules β del pàncrees com a conseqüència d'una hiperglucèmia sense resoldre ((Butler et al., 2003; Ashcroft et al., 2012). La hiperplàsia de la cèl·lula β i la hiperinsulinèmia en resposta a la resistència a la insulina es produeix en el període preclínic de la malaltia (Quan et al., 2013). Quan la hiperglucèmia és crònica, arriba un moment en que les cèl·lules β no poden compensar la demanda d'insulina i entren en fase d'esgotament. En aquesta fase es produeix una hipotròfia, hipoplàsia, desdiferenciació i disminució de la proliferació de la cèl·lula β (Cerf et al., 2015). A més, la hiperglucèmia crònica també dona lloc a la disfunció de les cèl·lules β , les quals redueixen la síntesi, senyalització i secreció de la insulina, i finalment moren per apoptosi, donant lloc a la DT2 (Cerf et al., 2015).

Els pacients diabètics de tipus 2 es caracteritzen per presentar increments en les concentracions d'àcids grassos lliures (FFA) en sang al llarg del dia (Figura 1) (Reaven et al., 1988). Els FFA s'emmagatzemen com a triglicèrids (TG) als adipòcits i són una important font d'energia en condicions de dejú. La insulina és un regulador negatiu de la lipòlisis que limita l'alliberament dels FFA dels adipòcits mitjançant la inhibició de la lipasa sensible a hormones (HSL). En la DT2 l'habilitat de la insulina per inhibir la lipòlisis i reduir les concentracions dels FFA en sang es veu notablement reduïda (Figura 1) (Jansson et al., 1994). En aquest sentit, la ingesta excessiva de calories i la manca d'activitat física condueix a l'augment de la mida dels adipòcits a causa de l'increment de deposicions de triglicèrids dins d'aquestes cèl·lules (Sattar et al., 2014). A mesura que augmenta l'adipositat, els adipòcits hipertrofiats no són capaços d'emmagatzemar eficaçment més lípids i es produeix una alteració en la deposició de TG, que resulta en l'acumulació en compartiments ectòpics, com ara el fetge, el múscul, el teixit adipós perivascular, pericàrdic i omental (Loher et al., 2016; Sattar et al., 2014), així com també un augment de la lipòlisi (Figura 1) (Guilherme et al., 2008). En resposta als FFA circulants en el context de resistència a la insulina acompanyada d'una eventual disfunció de la cèl·lula β , la homeòstasi general de combustible del cos es veu alterada (Nolan et al., 2011). A més, l'augment de l'alliberament d'àcids grassos lliures per part dels adipòcits condueix a l'increment de la producció de citocines proinflamatòries, com per exemple, el factor de necrosi tumoral α (TNF- α) provinent dels macròfags residents en el teixit adipós. Això provoca que augmenti més la lipòlisi i inhibeix l'expressió de gens que són essencials per la senyalització de la insulina i la diferenciació dels adipòcits, proporcionant la base molecular de la resistència a la insulina en el teixit adipós (Ruan et al., 2002). Tot i que els macròfags activats en el teixit adipós produeixen la major part de citocines proinflamatòries, altres tipus cel·lulars com els limfòcits B i les cèl·lules T també poden secretar aquests tipus d'agents immunomoduladors tot augmentant la inflamació local i sistèmica i contribuint a la resistència a la insulina (Strissel et al., 2014).

L'acumulació de greix hepàtic i muscular resulta en la disfunció de la captació de glucosa mitjançada per la insulina degut al deteriorament de la senyalització intracel·lular de la insulina. Aquesta és una causa determinant en la reducció de la sensibilitat hepàtica i muscular a la insulina, un dels principals contribuents de la resistència sistèmica a aquesta hormona (Figura 1) (McGarry et al., 2002; DeFronzo et al., 2004; Birkenfeld et al., 2014). Curiosament, l'esteatosi hepàtica precedeix la DT2 manifesta i s'associa habitualment a l'obesitat, particularment la visceral (Taylor et al.,

2008). Per assegurar la disponibilitat constant d'una font d'hidrats de carboni durant el dejú, el fetge produeix glucosa mitjançant la glicogenòlisi i la gluconeogènesi (Pilkis et al., 1992). Diversos estudis han demostrat un augment de la gluconeogènesi en subjectes amb DT2, que es produeix malgrat un estat de hiperinsulinèmia (Figura 1), el que suggereix la resistència hepàtica a la insulina com un determinant principal de la hiperglucèmia en dejú (DeFronzo et al., 1988; DeFronzo et al., 1989).

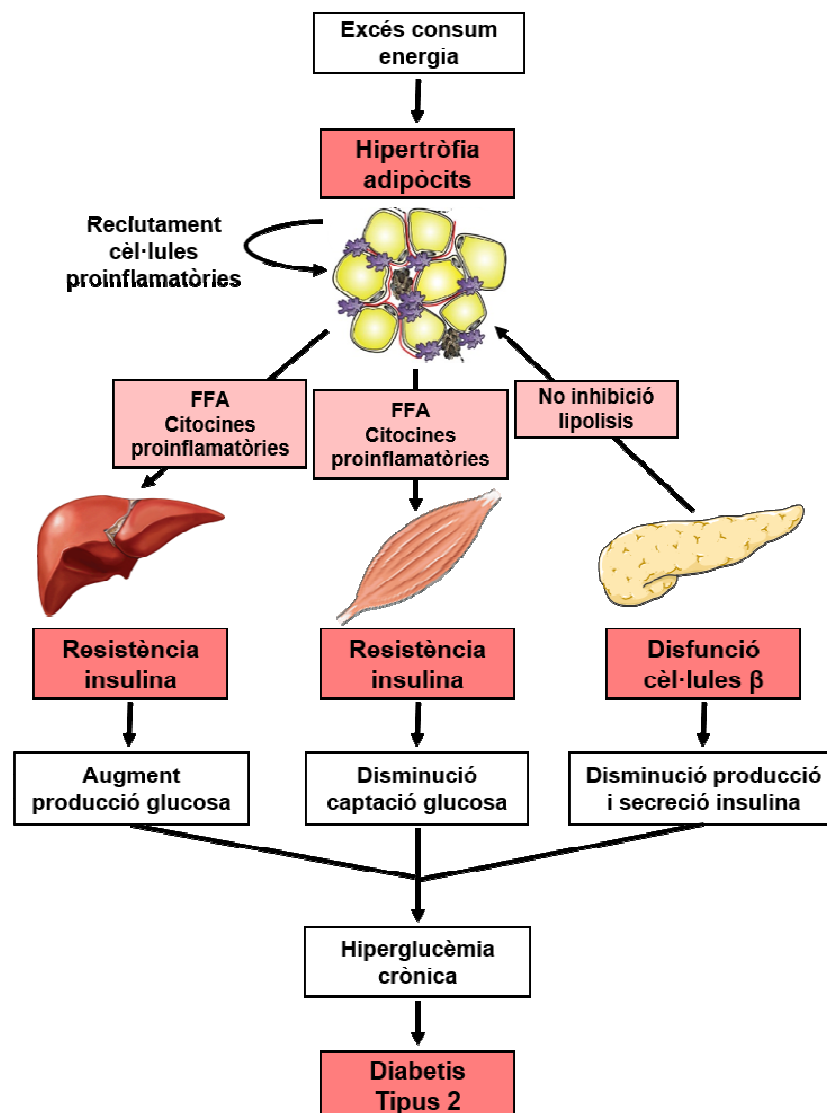


Figura 1. Defectes en el pàncreas i els teixits diana de l'acció de la insulina en la diabetis tipus 2.

Quan el fetge, el múscul i el teixit adipós es tornen resistents a la insulina, augmenta la producció hepàtica de glucosa, disminueix la seva captació i s'indueix la lipòlisi en el teixit adipós, ja que la insulina no està disminuint el procés. L'augment dels FFA provinents de la lipòlisi estimula la captació de FFA per part del fetge i el múscul. En el múscul l'augment de la disponibilitat dels FFA accelera l'oxidació de lípids, fet que dona lloc a una disminució de la captació de glucosa mitjançada per la insulina. En el fetge, els nivells elevats de FFA estimulen la gluconeogènesi i incrementen la sortida de glucosa. Quan també es produeix la disfunció de la cèl·lula β , la resistència a insulina en els teixits esmentats dona lloc a hiperglucèmia i al desenvolupament de DT2.

1.1.2. Susceptibilitat genètica i factors ambientals en la diabetis tipus 2

Els factors genètics i ambientals contribueixen al desenvolupament de la DT2 (Stumvoll et al., 2005), però els mecanismes moleculars que participen en el desenvolupament de la malaltia continuen essent poc clars. Recentment, gràcies als estudis genètics *Genome-wide association* (GWA), s'ha ampliat a més de 60 el nombre de loci que estan robustament associats a DT2 (Voight et al., 2010; Morris et al., 2012; Dupuis et al., 2010; Billings et al., 2010). Cada un d'aquests loci conté variacions de seqüència que són causals del risc a patir la malaltia, i l'esclariment dels mecanismes a través dels quals aquests loci actuen tenen el potencial de revelar processos fonamentals per a la patogènesi d'aquesta.

Hi ha nombrosos loci que estan associats a un augment de la susceptibilitat a patir diabetis, per exemple: els loci *PPARG* (*Peroxisome proliferator-activated receptor gamma gene*), *FTO* (*Fat mass and obesity-associated protein gene*), *IRS1* (*Insulin receptor substrate 1 gene*) i *KLF14* (*Krüppel-like factor 14 gene*) estan relacionats amb nivells superiors d'insulina en dejú, conseqüent amb un efecte primari en l'acció de la insulina (Voight et al., 2010). També existeixen loci caracteritzats per l'associació amb una important reducció de la funció de les cèl·lules β com el *GCK* (glucoquinasa) i el *MTNR1B* (*melatonin receptor 1B*). D'altra banda, hi ha loci associats amb defectes en la secreció de la insulina sense efectes marcats en la glicèmia com *TCF7L2* (*Transcription factor 7-like 2*), *SLC30A8* (*Solute carrier family 30 member 8*), *CDKAL1* (*Cyclin-dependent kinase 5 regulatory subunit associated protein 1-like 1*), i *CDKN2A/2B* (*Cyclin-dependent kinase 4 inhibitor B*) (Dimas et al., 2014). L'estreta relació entre obesitat i DT2 (Hu et al., 2001) fa que gran part d'aquests loci també estiguin involucrats en susceptibilitat a obesitat, com és el cas de *FTO* (Karaderi et al., 2015). D'altra banda, també s'han identificat loci que augmenten la susceptibilitat a patir sobrepès i obesitat en diabètics tipus 2 tals com: el gen de *ADIPOQ* (adiponectina), *LEPR* (receptor de leptina), *IRS2* (*Insulin receptor substrate 2*) o *GRB14* (*Growth factor receptor-bound protein 14*) (Kasim et al., 2016).

Si es té en compte que el teixit adipós marró pot tenir un paper protector contra la DT2 i l'obesitat, també s'han detectat loci associats a una major susceptibilitat a desenvolupar DT2 o a augmentar el índex de massa corporal (BMI) en gens claus de l'activació del teixit adipós marró com per exemple en proteïna desacobladora 1 (UCP1) o en el receptor β 3-adrenergic (Vimaleswaran et al., 2010; Sramkova et al., 2007; Kurokawa et al., 2008; Brondani et al., 2012).

No obstant això, la patogenicitat de la DT2 és heterogènia, per tant, es considera que les variants genètiques contribueixen només a la susceptibilitat a patir la malaltia i es suggereix que aquesta contribució és modesta en comparació amb els factors ambientals, que determinarien si un individu amb predisposició desenvolupa o no DT2 i obesitat. Aquesta relació ha estat demostrada per estudis en poblacions migratòries on es produeix la reversió de la malaltia després del retorn a la seva forma de vida prèvia (O'dea et al., 1984).

2. OBESITAT

L'obesitat és una malaltia metabòlica molt complexa i un dels factors de risc més importants per a la resistència a la insulina i el desenvolupament de DT2 (Kusminski et al., 2016). Tal i com ha succeït amb la DT2, la obesitat ha assolit proporcions epidèmiques tant en els països desenvolupats com en vies de desenvolupament. Segons l'Organització Mundial de la Salut, en el 2014 al voltant de 2 bilions de persones patien sobrepès a tot el món, 670 milions de les quals eren clínicament obeses i 98 milions estaven greument afectades per l'obesitat. Si les tendències actuals es mantenen, s'estima que l'any 2025, 2.7 bilions de persones adultes tindran sobrepès, i al voltant d'1 bilió seran obesos, fet que augmentarà encara més la incidència de DT2.

Segons les dades de la OMS durant el 2014 a la regió europea, al voltant del 50% dels homes i de les dones patien sobrepès, essent el 23% de les dones i el 20% dels homes obesos. Per contra, la regió de nord-amèrica continua essent la més afectada amb més del 25% de la població obesa. Dintre d'aquesta pandèmia, una qüestió alarmant és la que concerneix als més joves; s'estima que al voltant de 200 milions de nens en edat escolar tenen sobrepès. Aquesta generació desenvoluparà diabetis a una edat més primerenca que les anteriors i a més, està predestinada a ser la primera progènie a tenir una vida més curta que la dels seus pares. Per tant, la obesitat associada a diabetis ha esdevingut un important problema de salut pública (Morigny et al., 2016).

El desenvolupament de l'obesitat depèn del desequilibri que es produeix quan el consum d'energia excedeix la despesa energètica i de la distribució del greix en els diferents dipòsits adiposos (Frühbeck et al., 2009). El mètode més utilitzat per mesurar i identificar l'obesitat és l'índex de massa corporal (IMC). Aquest es defineix com el pes en kilograms (Kg) dividit entre l'alçada en metres al quadrat (m^2). El sobrepès o pre-obesitat es defineix amb un IMC entre 25-29.9 kg/m^2 , alhora que un IMC superior a 30 kg/m^2 determina obesitat; si supera els 35 kg/m^2 es defineix com obesitat mòrbida. D'altra banda, l'OMS estableix que l'IMC òptim en la població caucàsica adulta és del rang de 21-23 kg/m^2 (WHO et al., 2000). No obstant, l'IMC no permet distingir entre el pes associat a múscul o a greix. Per tant, donat que els individus tenen una constitució corporal diferent, l'IMC no correspon al mateix grau de greix (James et al., 2008). Altres mètodes habituals per a la classificació dels individus obesos són la

circumferència de la cintura o la ratio de la circumferència cintura i cadera, la qual és més específica de la distribució de greix (Pischon et al. 2008).

2.1. Tipus d'obesitat en humans

La distribució i quantitat de greix corporal són crucials per a determinar el risc a patir algunes malalties associades amb l'obesitat. La distribució del greix varia entre sexes, entre els individus d'una mateixa família, amb l'edat, en estadis de malaltia, o bé en resposta a drogues i/o hormones (Tchkonina et al. 2013). Es poden distingir dos tipus d'obesitat en funció dels dipòsits d'acumulació de greix (Figura 2):

- **Obesitat central (forma de poma):** la també anomenada obesitat androide, es caracteritza per la presència de greix al voltant de les vísceres i està composta pels dipòsits adiposos omental, mesentèric i retroperitoneal. Aquests individus presenten una reducció de la sensibilitat a la insulina i de la tolerància a la glucosa, lligat a un increment del risc a patir complicacions metabòliques com la DT2 (Tchernof et al., 2013).
- **Obesitat perifèrica (forma de pera):** els individus obesos amb baixos nivells de greix visceral i elevat greix subcutani presenten una tolerància a la glucosa normal (Tchernof et al., 2013).

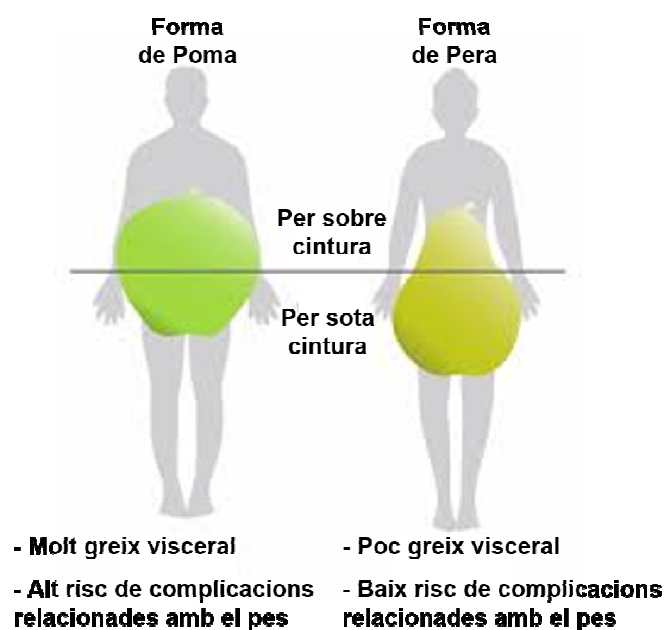


Figura 2. Il·lustració dels tipus d'obesitat: visceral o en forma de poma i perifèrica o forma de pera.

2.2. Complicacions en l'obesitat

L'obesitat és una malaltia altament complexa i un dels factors de risc més importants per al desenvolupament de DT2. També s'associa amb un major risc de patir altres malalties metabòliques, cardiovasculars i inflamatòries cròniques (Van Gaal et al., 2006), com ara la malaltia del fetge gras no alcohòlic (NAFLD). Aquesta és la malaltia crònica del fetge més prevalent al món, i es caracteritza per mostrar un espectre histològic que van des de l'esteatosi més lleugera fins a la forma més agressiva necro-inflamatòria, l'esteatohepatitis no alcohòlica (NASH), la qual pot acumular fibrosi i resultar en cirrosi (Bertot et al., 2016). D'altra banda, l'obesitat també s'associa amb la hipertensió, malaltia crònica consistent en una elevació persistent de la pressió arterial. Aquesta malaltia suposa un factor de risc molt important en relació a les malalties cardiovasculars com la hipertròfia ventricular esquerra, arítmies ventriculars i atrials, fallida de cor diastòlica i sistòlica, i cor isquèmic, així com també danys en el sistema nerviós central i els ronyons (Black et al., 2003). A més a més, l'obesitat incrementa el risc a patir càncer colorectal, d'esòfag, de ronyó i de pàncrees en ambdós sexes. Com també, incrementa la predisposició a patir càncer de tiroides en homes i d'endometri, vesicular biliar, i de mama en dones (Renehan et al., 2008).

3. L'ÒRGAN ADIPÓS

El teixit adipós es considera un òrgan format per múltiples dipòsits adiposos, els quals contribueixen a diversos processos essencials dels organismes tals com la termogènesi, el subministrament d'energia, les respostes immunes o la lactància (Cinti et al., 2012). A més a més, el teixit adipós té importants propietats mecàniques que serveixen per protegir òrgans delicats, per exemple els ulls, o per amortir parts del cos exposades a nivells elevats d'estrès mecànic (Pond et al., 1992).

3.1. Components de l'òrgan adipós

El teixit adipós es compon principalment d'adipòcits madurs, teixit nerviós, nòduls limfàtics, petits vasos sanguinis i la fracció vascular estromal (SVF). La SVF presenta una combinació de múltiples tipus cel·lulars entre els quals destaquen: cèl·lules del sistema immune, -com els macròfags-, cèl·lules endotelials, preadipòcits i fibroblasts (Armani et al. 2010; Cawthorn, Scheller, and MacDougald et al., 2012). Es poden distingir tres tipus d'adipòcits madurs: els adipòcits blancs, els adipòcits marrons i els posteriorment descrits adipòcits beige (Seale et al. 2008; Ishibashi 2010; J. Wu et al., 2012).

3.2. Tipus d'adipòcits

3.2.1. Adipòcits blancs

Els adipòcits blancs són esfèrics i es caracteritzen per contenir una única gran gota lipídica, la qual ocupa més del 90% de l'espai intracel·lular i desplaça el nucli a l'extrem de l'adipòcit. Això els hi permet maximitzar la seva capacitat d'emmagatzematge (Figura 3) (Smorlesi et al., 2012). El seu diàmetre mig varia entre soques, sexes i edats (Taula 1). En el cas dels ratolins C57BL6, la mida d'un adipòcit de 12 setmanes és aproximadament 2000 μm^2 en dieta estàndard i 4000 μm^2 en dieta alta en lípids (Chen et al., 2002).

La funció principal dels adipòcits blancs és emmagatzemar energia en forma d'àcids grassos lliures, que obtenen del plasma o per síntesi *de novo*, com a triglicèrids (Figura 3, Taula 1). Alhora, aquestes cèl·lules són capaces d'alliberar FFA i glicerol ràpidament en resposta a les demandes metabòliques d'altres teixits en situacions de dèficits energètics com el dejú (Gesta et al., 2007; Koppen et al., 2010; Algire et al.,

2013). Els FFA circulants serveixen de combustible pels teixits metabòlicament actius i influeixen en la regulació del metabolisme de la glucosa (Ahmadian et al., 2010).

Els adipòcits blancs també es caracteritzen per tenir una elevada capacitat secretora; els factors secretats pels adipòcits s'anomenen adipoquines. Les adipoquines són molècules senyalitzadores que regulen nombrosos processos biològics mitjançant mecanismes autocrins, paracrins i endocrins. Aquestes són essencials pel balanç entre apetit i sacietat, la regulació de l'emmagatzematge de greix, la tolerància a la glucosa, la sensibilitat a la insulina, el creixement cel·lular, la inflamació, l'angiogènesi o la reproducció. Els teixits diana de les adipoquines són diversos i inclou entre altres: el fetge, el cervell, el múscul, el cor, el pàncrees, la melsa o els nòduls limfàtics. Alhora, l'alteració en la secreció d'aquestes adipoquines s'ha descrit com un factor important en la patogènesi de la resistència a la insulina entre d'altres malalties (Koppen et al., 2010; Booth et al., 2016; Trayhurn et al., 2011).

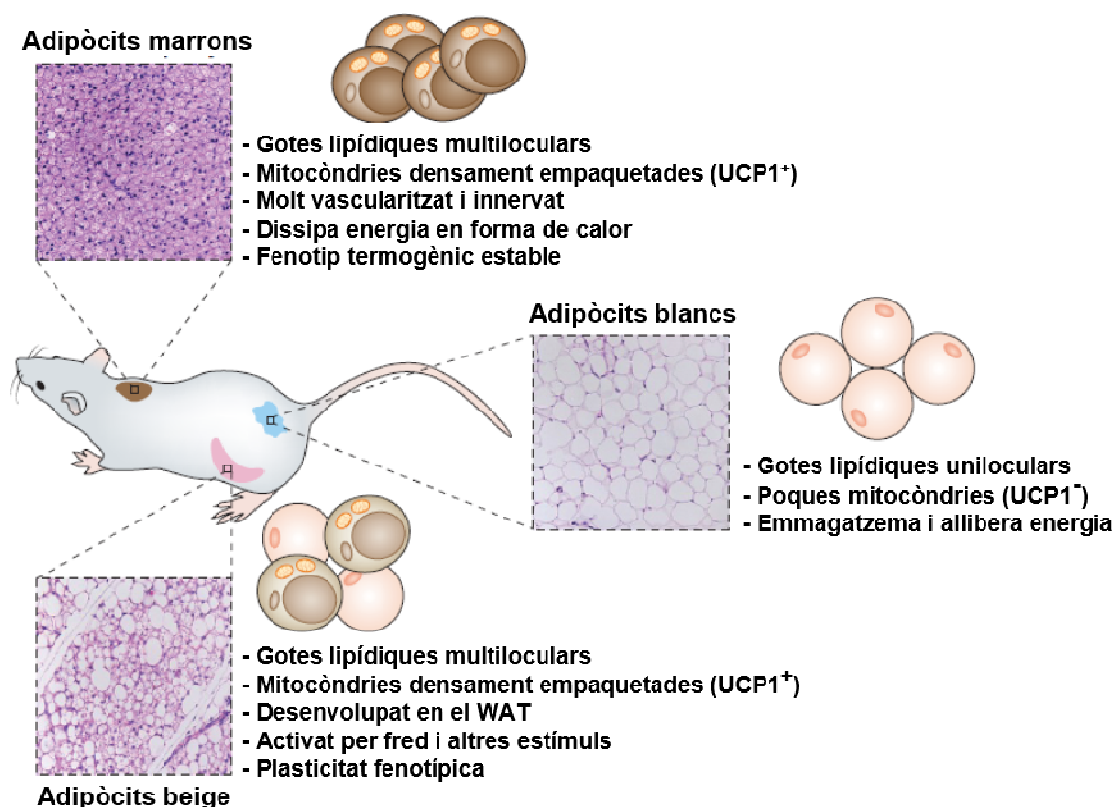


Figura 3. Tipus d'adipòcits. Els adipòcits es poden classificar en cèl·lules termogèniques marrons, cèl·lules emmagatzemadores blanques o cèl·lules intermèdies beige. Els adipòcits marrons es caracteritzen per la presència de múltiples gotes lipídiques i l'elevada densitat de mitocòndries que contenen la proteïna desacobladora 1 (UCP1). Els adipòcits blancs presenten una única gran gota lipídica i una elevada capacitat d'emmagatzemar energia. Els adipòcits beige emmagatzemen energia de manera semblant a com ho fan els adipòcits blancs, però en resposta a certs estímuls són capaços de presentar un fenotip semblant als adipòcits marrons amb múltiples gotes lipídiques i elevada densitat de mitocòndries UCP1 positives (Adaptat de Wang et al., 2016).

3.2.2. Adipòcits marrons

A diferència dels adipòcits blancs, els adipòcits marrons deriven del llinatge cel·lular “*muscular-like*” Myf-5 (Seale et al., 2008). A més, són considerablement més petits que els blancs i presenten múltiples gotes lipídiques al citoplasma. Això, juntament amb l'elevat nombre de mitocòndries característic d'aquestes cèl·lules, els hi permet metabolitzar ràpidament grans quantitats d'àcids grassos per generar calor mitjançant un procés conegut com termogènesi no associada a tremolor (Figura 3, Taula 1) (Cinti et al., 2012; Smorlesi et al., 2012).

Per produït calor, els adipòcits marrons s'activen predominantment per l'acció de la norepinefrina, alliberada pels sistema nerviós simpàtic sota estímuls adrenèrgics o altres senyals, en els receptors β 3-adrenergics (Bachman et al., 2002; Jimenez et al., 2002). A continuació, es produeix una cascada de senyalització mitjançant l'acoblament a proteïnes G que activa l'adenilat ciclase. Aquesta genera monofosfat d'adenosina cíclic (cAMP) que al seu torn activa la proteïna quinasa A (PKA) que fosforilarà la lipasa sensible a hormones, desencadenant així l'alliberament d'àcids grassos lliures. Aquests FFA són transportats al mitocondri mitjançant la *carnitine palmitoyltransferase 1*, on activaran la proteïna desacobladora 1 o termogenina i serviran com a substrat. En els mitocondris, UCP1 desacobla el gradient de protons produït en la fosforilació oxidativa generant calor, aquest procés és el que coneixem com termogènesi no associada a tremolor (Figura 4) (Honek et al., 2014; Bargut et al., 2016a).

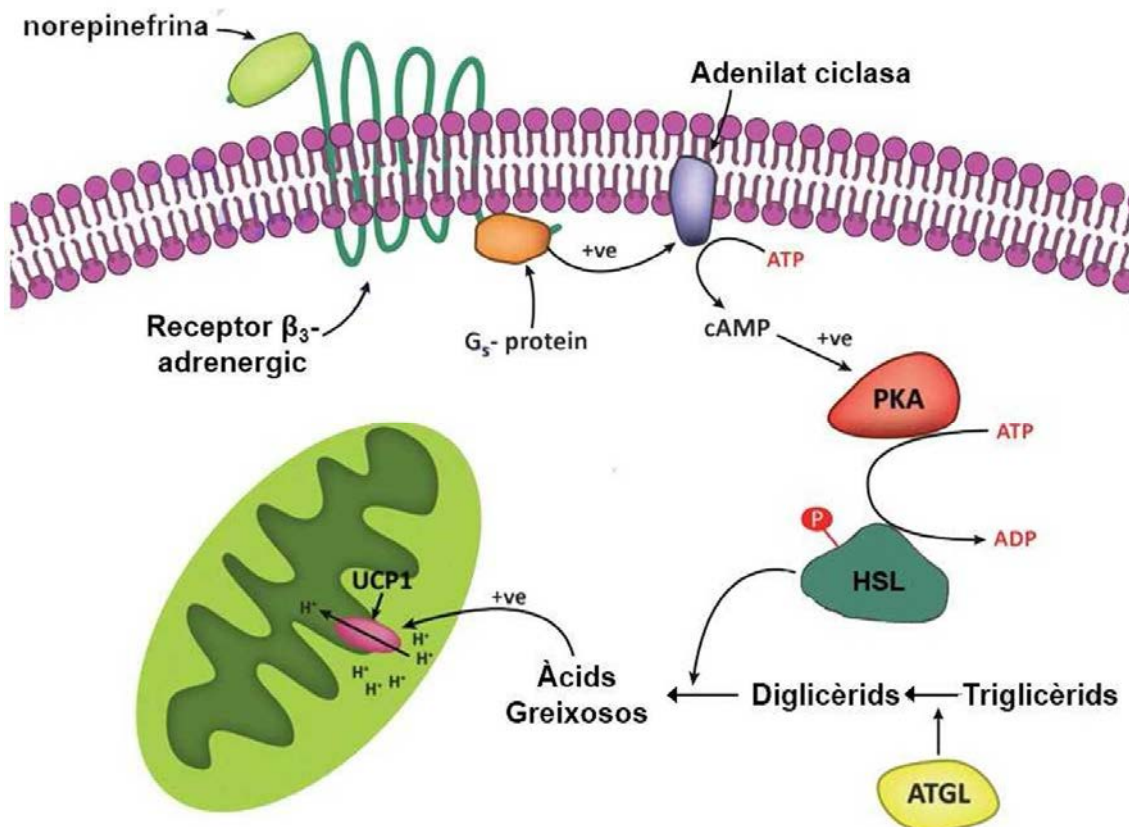


Figura 4. Generació de calor per termogènesi no associada a tremolor en els adipòcits marrons. En resposta a estímuls adrenergics com el fred, la norepinefrina s'uneix als receptors β₃-adrenergics dels adipòcits marrons, resultant en l'activació de l'adenilat ciclase. Aquesta genera cAMP que alhora activa la proteïna kinasa A (PKA), donant lloc a l'activació de la lipasa sensible a hormones (HSL). La HSL accelera l'alliberament d'àcids grassos que són oxidats i activen UCP1, que desacobla el gradient d'electrons al mitocondri, alliberant energia en forma de calor (Adaptat de King et al., 2017).

L'activació del teixit adipós marró (BAT) en rosegadors està relacionada amb la reducció dels dipòsits de greix, la prevenció de guany de pes corporal i/o la millora de la resistència a la insulina (Bargut et al., 2016b). A més, en humans l'activació BAT està inversament associada a l'obesitat (Wang et al., 2015). Per tot això, l'activació dels adipòcits marrons es considera una diana terapèutica pel tractament de l'obesitat i la DT2 (Taula 1).

3.2.3. Adipòcits beige

Fa temps que es van detectar adipòcits UCP1 positius al teixit adipós blanc que adoptaven una aparença multilocular sota certs estímuls com l'exposició prolongada al fred (Cousin et al., 1992). No obstant, aquestes cèl·lules "brown-like" presents en els dipòsits adiposos blancs no derivaven del llinatge Myf-5 com els adipòcits marrons (Seale et al., 2008), suggerint que es tractava d'un altre tipus cel·lular. Però no va ser fins fa pocs anys que es va considerar que aquestes cèl·lules representaven un altre

tipus d'adipòcits, els adipòcits beige o brite (*brown in white*) (Vegiopoulos et al., 2010; Petrovic et al., 2010).

Així doncs, els adipòcits beige són cèl·lules UCP1 positives que tenen una morfologia semblant a la dels adipòcits marrons, amb múltiples gotes lipídiques i que expressen els gens requerits per a la termogènesi (Figura 3). Tot i això, els adipòcits beige presenten un patró d'expressió gènica diferent als adipòcits marrons i un menor nombre de mitocondris (Taula 1) (Wu et al., 2012; Waldén et al., 2012). Estímuls com l'exposició prolongada al fred, l'exercici, la immunitat innata, determinades hormones endocrines o compostos sintètics entre d'altres, poden promoure el reclutament d'adipòcits beige (Kajimura et al., 2015). D'altra banda, en absència d'estímuls, els adipòcits beige s'assemblen als blancs en termes de consum d'oxigen i respiració desacoblada. Això fa pensar que els adipòcits beige són bifuncionals, presentant nivells basals baixos d'UCP1, comparables als dels adipòcits blancs, i amb la capacitat d'activar l'expressió d'aquest gen i de la resta de maquinaria de la termogènesi a nivells equivalents als adipòcits marrons (Figura 3, Taula 1) (Wu et al., 2012).

Taula 1. Principals diferències entre els tres tipus de teixits adiposos (Adaptat Cedikova et al., 2016).

Característiques	Adipòcits blancs	Adipòcits marrons	Adipòcits beige
Morfologia			
(i) Forma	Esfèrica	Elipsoide/poligonal	Esfèrica
(ii) Mida	Variable (25-200µm)	Petita (15-60µm)	Més petita que els blancs
(iii) Gota lipídica	Única i gran	Múltiples i petites	Múltiples amb mides variables
(iv) Mitocondri	+	+++	++(sota estimulació)
Localització	Subcutani i visceral	Suprarenal, paravertebral, supraclavicular	Inguinal, coll, altres
Funció	Emmagatzematge energia	Producció calor	Termogènesi adaptativa
UCP1	Pràcticament no detectable	+++	++(sota estimulació)
Vascularització	Baixa	Elevada	Elevada sota estimulació

3.3. Plasticitat del teixit adipós

En funció del tipus d'adipòcit que forma majoritàriament un dipòsit adipós, tradicionalment s'han distingit dos tipus de teixit adipós: el teixit adipós blanc (WAT), que conté principalment adipòcits blancs, i el teixit adipós marró (BAT), que conté predominantment adipòcits marrons. Tot i això, la majoria dels dipòsits adiposos contenen diferents tipus d'adipòcits, encara que la seva proporció varia entre dipòsits i

també pot variar depenent de les condicions. Per exemple, s'ha descrit que la exposició al fred indueix l'increment del nombre d'adipòcits marrons i la reducció d'adipòcits blancs. Aquesta capacitat per adaptar-se fa que el teixit adipós presenti una elevada plasticitat (Cinti et al., 2006; Vitali et al., 2012; Cinti et al., 2012; Rosen et al., 2014).

El teixit adipós és un òrgan molt plàstic i dinàmic, és per això que els adipòcits són regulats pel que fa al seu nombre, mida i característiques metabòliques. Per tal de mantenir aquesta capacitat renovadora, és necessària la presència d'un *pool* de progenitors dels adipòcits en el teixit adipós durant la vida adulta. Aquests progenitors s'activen durant el recanvi homeostàtic i l'expansió hiperplàsica, i també poden participar en la remodelació catabòlica del teixit adipós (Armani et al., 2010; Tchkonja et al., 2013; Lee et al., 2014).

Per tal d'emmagatzemar l'excés d'energia consumida característic de l'obesitat, el WAT porta a terme una sèrie de canvis a nivell cel·lular i estructural. El teixit ha d'expandir-se i ho pot fer mitjançant l'augment de la mida dels adipòcits (hipertrofia) o del nombre d'adipòcits (hiperplàsia). D'altra banda, es produeix una remodelació de la vasculatura i de la matriu extracel·lular per permetre l'expansió del teixit, la seva oxigenació i la mobilització de nutrients (Pellegrinelli et al., 2016). A més, durant aquest procés es recluten cèl·lules inflamatòries, quan l'obesitat i la inflamació es mantenen, aquests mecanismes d'adaptació homeostàtica es saturen, donant lloc a la disfunció del teixit adipós blanc. Aquesta disfunció és caracteritzada per una secreció deficient d'adipoquines, un insuficient emmagatzematge de greix, una adipogènesi anòmala, així com també una fibrosi exacerbada i resistència a la insulina (Algire et al., 2013; Pellegrinelli et al., 2016).

En una situació d'excés de consum de nutrients, l'expansió del teixit adipós mitjançant la seva hipertròfia es considera un mecanisme nociu. Els adipòcits augmenten la seva mida per tal d'acumular més lípids, però aquesta capacitat és limitada, fet que provoca un augment de l'alliberament de FFA i citocines pro-inflamatòries, l'increment de la hipòxia i la fibrosi, la disminució dels nivells d'adiponectina i finalment empitjora la sensibilitat a la insulina.

L'adiponectina és una hormona produïda pels adipòcits madurs que està involucrada en l'oxidació de lípids en el múscul i el fetge, i la reducció de la producció hepàtica de glucosa. A més, s'ha establert una relació inversa entre els nivells

d'adiponectina en sèrum i el desenvolupament d'obesitat, resistència a la insulina i DT2 (Paniagua et al., 2016).

D'altra banda, l'expansió mitjançant hiperplàsia és un fenomen saludable pel teixit adipós ja que contribueix a l'augment dels nivells d'adiponectina, a la disminució de l'alliberament de FFA i citocines pro-inflamatòries, a la reducció de la hipòxia i la fibrosi i millora la sensibilitat a la insulina. Hi ha certa controvèrsia sobre quin del dos mecanismes és majoritari en els diferents dipòsits adiposos en resposta al consum excessiu de nutrients, i si succeeix igual en ratolins que en humans. D'altra banda, està establert que la capacitat d'expansió del teixit adipós subcutani (SAT) per a emmagatzemar l'excés de greix, - per tal d'impedir que s'acumuli en dipòsits ectòpics com el fetge, múscul, cor o pàncrees-, determina en gran part la salut metabòlica de l'individu. Malgrat tot, els adipòcits tenen una capacitat màxima d'expansió a partir de la qual es produeix la necrosi/apoptosi (Figura 5) (Lee et al., 2014; Choe et al. 2016b; Pellegrinelli et al., 2016).

La remodelació és molt important per a l'expansió saludable del teixit adipós, ja que presenta la capacitat de promoure la seva pròpia vascularització. Però tot i els esforços per reclutar nous vasos sanguinis, en la majoria dels casos d'obesitat i DT2 es produeix hipòxia de l'òrgan adipós. D'altra banda, la fibrosi és un altre element que permet determinar la salut del teixit adipós. Els adipòcits es mantenen dins d'una densa xarxa tridimensional formada per proteïnes de la matriu extracel·lular (ECM). Aquesta xarxa proporciona suport mecànic i té la capacitat de remodelar-se activament durant el creixement del teixit mitjançant l'expressió per part dels adipòcits de proteïnes de la matriu i d'enzims necessaris pel seu trencament. L'expressió dels gens codificants per aquestes proteïnes està altament regulada pels canvis en la disponibilitat de nutrients. Amb l'increment del guany de pes, augmenta la fibrosi i la matriu es torna més rígida, fet que limita la capacitat per emmagatzemar nutrients, i desencadena entre d'altres, la deposició de greix ectòpic (Divoux et al., 2011; Chun et al., 2012; Rosen et al., 2014).

Durant la DT2 i l'obesitat també es produeixen canvis en la composició de les cèl·lules immunitàries que infiltren el teixit adipós. Així, augmenta el nombre de cèl·lules pro-inflamatòries com neutròfils, macròfags tipus 1, limfòcits T col·laboradors de tipus 1 i limfòcits T citotòxics (CD8⁺), i es redueix el nombre de cèl·lules immunes antiinflamatòries com els eosinòfils, macròfags tipus 2, limfòcits T col·laboradors de tipus 2, *Natural killer T cells* (iNKT) i limfòcits T reguladors (Tregs) (Figura 5) (Choe et

al., 2016). Específicament, el nombre de macròfags incrementa de manera notable. Els macròfags residents en el teixit adipós es poden classificar en M1, activats clàssicament, o M2, activats alternativament. Els M1 tenen un fenotip pro-inflamatori i expressen citocines com TNF- α , IL-6 i IL-1 β . D'altra banda, els M2 responen a IL-4 i IL-13 secretant citocines antiinflamatòries com IL-10. A mesura que avança l'obesitat, més macròfags M1 s'infiltra al teixit adipós desenvolupant així resistència a la insulina. A més, els adipòcits morts atreuen als macròfags formant-se *crown-like-structures* que desencadenen una resposta inflamatòria local afectant al funcionament dels adipòcits propers. Tot i que els macròfags M2 no disminueixen durant l'obesitat, hi ha un major percentatge M1 respecte M2, afavorint el fenotip pro-inflamatori (Figura 5) (Rosen et al., 2014; Choe et al. 2016; Pellegrinelli et al., 2016).

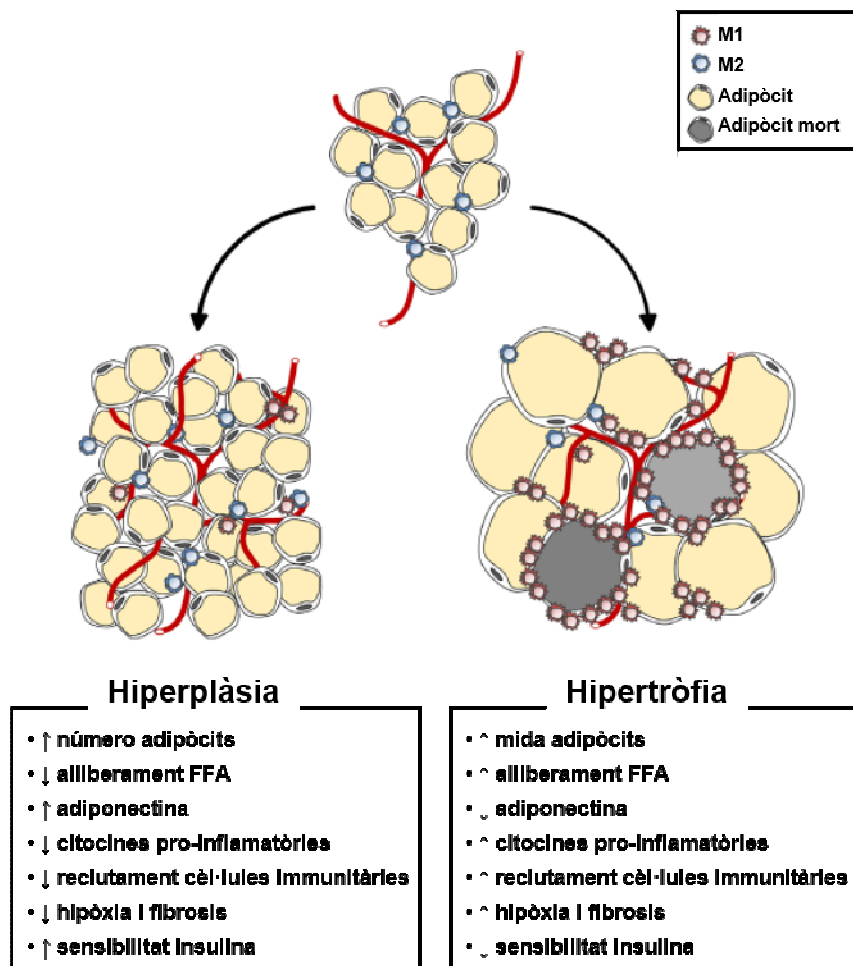


Figura 5. Característiques de l'expansió del teixit adipós per hipertròfia o hiperplàsia dels adipòcits. En l'obesitat, l'expansió del teixit adipós es produeix mitjançant dos mecanismes diferents, la hipertrofia i la hiperplàsia. En la hiperplàsia, augmenta el nombre d'adipòcits incrementant la secreció d'adiponectina, disminuint l'alliberament de FFA i citocines pro-inflamatòries, reduint la hipòxia, fibrosi i millorant la sensibilitat a la insulina. D'altra banda, durant l'expansió del teixit adipós per hipertròfia s'incrementa la mida dels adipòcits. Quan la capacitat d'emmagatzemar lípids dels adipòcits es veu sobrepassada, augmenta l'alliberament de FFA i citocines pro-inflamatòries (augment de macròfags M1 i formació de *crown-like structures*), incrementa la hipòxia (reducció vascularització, vermell), la fibrosi, disminueixen la secreció d'adiponectina i empitjora la sensibilitat a la insulina. (Adaptat Choe et al. 2016).

3.4. Localització del teixit adipós

El teixit adipós en mamífers està format per múltiples dipòsits localitzats en dos compartiments del cos: sota la pell es localitzen els dipòsits subcutanis, delimitats per una càpsula connectiva, mentre que a la cavitat abdominal es troben els dipòsits viscerals, delimitats per làmines peritoneals (Cinti et al., 2012; Smorlesi et al., 2012).

3.4.1. Localització del teixit adipós en ratolins

En ratolins, l'òrgan adipós presenta dos dipòsits subcutanis: anterior i posterior, i varis dipòsits viscerals. El dipòsit subcutani anterior es localitza principalment al nivell de l'escàpula i conté el teixit adipós interescapular, l'axil·lar i el cervical. Mentre que el dipòsit subcutani posterior està situat a la zona ventral inferior del cos i compren tres parts, la dorso-ventral, la inguinal i la gluteal. D'altra banda, podem distingir diversos dipòsits viscerals situats al mediastí o a l'abdomen. Entre els dipòsits abdominals es troben el mesentèric, el retroperitoneal i l'epididimal en mascles, o abdominopèlvic en femelles (Figura 6) (Frontini et al., 2010; Vitali et al., 2012; Cinti et al., 2012).

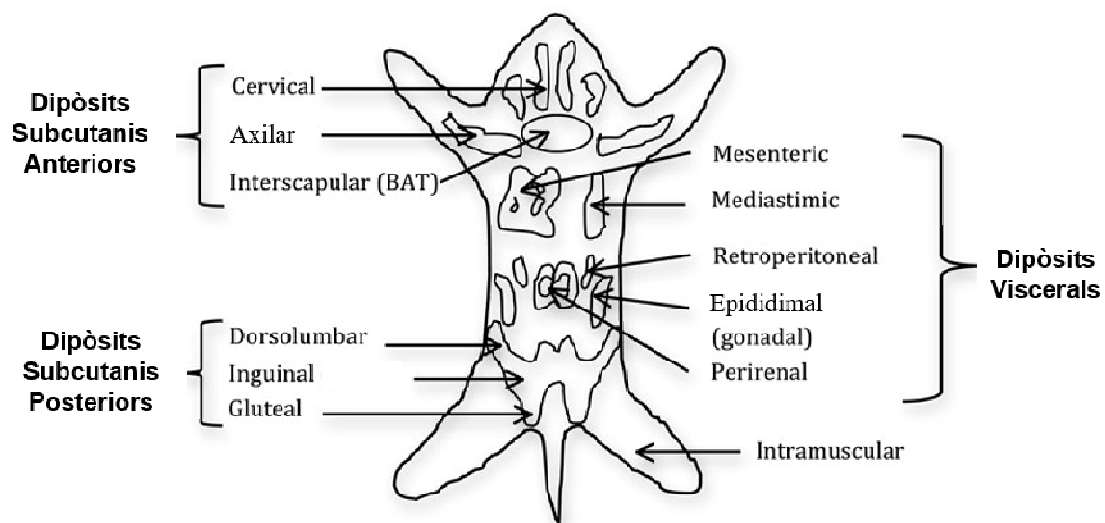


Figura 6. Localització dels dipòsits adiposos en ratolí. L'òrgan adipós en ratolins està format per dipòsits subcutanis i viscerals. Dintre dels subcutanis es poden distingir els anteriors (cervical, axil·lar i interescapular) i els posteriors (dorso-lumbar, inguinal i gluteal). Mentre que els dipòsits viscerals estan formats pel mediastímic, mesentèric, retroperitoneal i epididimal en mascles, o abdominopèlvic en femelles (Adaptat de (Chusyd et al. 2016)).

En condicions normals, el BAT dels ratolins es troba a les regions properes a l'aorta, als ronyons i en els dipòsits subcutanis anteriors. Aquest teixit està altament vascularitzat i presenta una elevada densitat de fibres parenquimals noradrenèrgiques. D'altra banda, els dipòsits adiposos viscerals abdominals i subcutanis posteriors estan formats principalment per WAT, encara que la seva proporció d'adipòcits UCP1

positius varia entre ells. A més, es pot trobar WAT a altres regions tals com a l'espai retro-orbital, a la cara, a les extremitats o al moll de l'ós. El teixit adipós blanc disposa d'una vascularització i innervació de cinc a sis cops menor que el BAT (Cinti et al., 2012; Gesta et al., 2007; Smorlesi et al., 2012).

3.4.2. Localització del teixit adipós en humans

En humans també es poden distingir dipòsits adiposos subcutanis i viscerals, tot i que la seva distribució i mida és diferent respecte als rosegadors. El WAT es troba distribuït pel cos amb grans dipòsits a la zona intraabdominal: al voltant de l'omentum i els intestins, i subcutània, a les natges i les cuixes. Cal destacar que el greix blanc perigonadal o epididimal en ratolins mascles (el teixit adipós més gran i accessible en ratolins) no està present en humans (Chusyd et al., 2016). D'altra banda, en recent nascuts el BAT es localitza a la regió interescapular, axil·lar, coll, ronyons i al voltant dels vasos. Aquest teixit adipós marró involuciona poc a poc després de néixer, però tot i això, es pot detectar BAT metabòlicament actiu al coll, regió supraclavicular, abdomen i pit d'humans adults (Figura 7) (Cypess et al., 2009; van Marken Lichtenbelt et al., 2009; Virtanen et al., 2009).

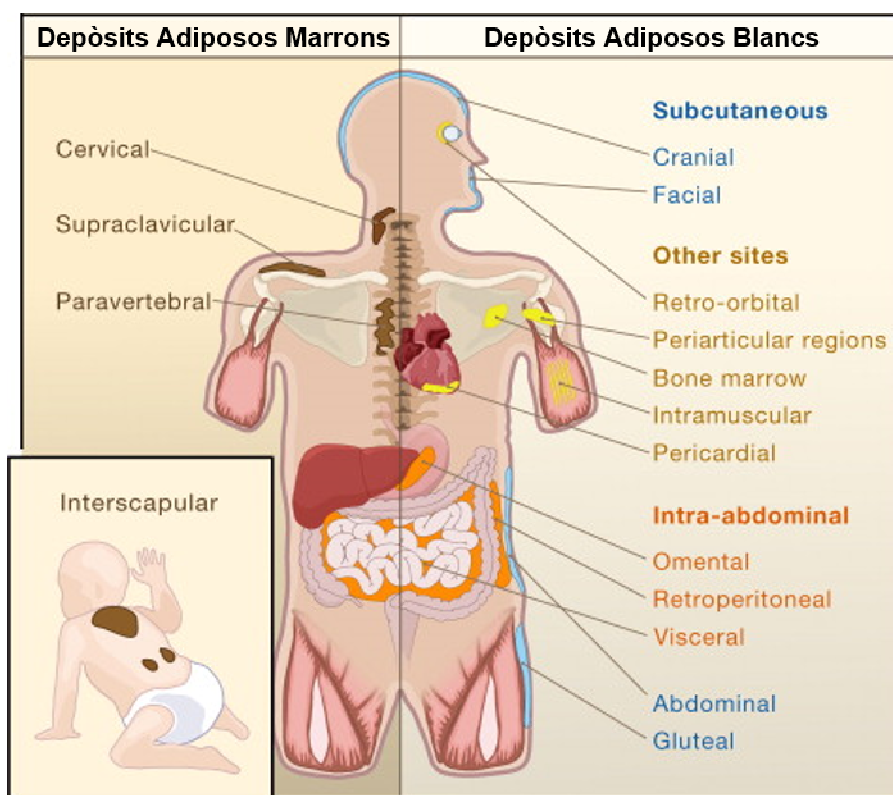


Figura 7. Distribució dels dipòsits adiposos blancs i marrons en humans. En humans els dipòsits adiposos blancs es troben en àrees al voltant de tot el cos, amb dipòsits subcutanis i intraabdominals representant els principals compartiments de l'emmagatzematge de greix. El teixit adipós marró és abundant en néixer i continua present en adults, però en menys extensió (Adaptació Gesta et al., 2007).

3.5. Origen del teixit adipós

Les cèl·lules mare mesenquimals (MSC) residents al teixit adipós es consideren la principal font d'adipòcits durant el creixement postnatal i el manteniment del teixit adipós (Cawthorn et al., 2012). Les MSC són progenitores multipotents que es poden trobar en el teixit adipós, en el moll de l'òs i en altres teixits connectius. Tot i això, hi ha heterogeneïtat en els precursors depenent dels dipòsits adiposos als que donen lloc. Això va en consonància amb el fet que els diferents teixits adiposos es desenvolupin a temps diferents i difereixin en les seves característiques moleculars i funcionals (Lee et al., 2014).

En rosegadors, el teixit adipós blanc es desenvolupa principalment després del naixement. En el cas dels humans, el WAT comença a desenvolupar-se en el segon semestre de gestació, i a l'hora del naixement els dipòsits viscerals i subcutanis estan ben desenvolupats. Per contra, el teixit adipós marró es desenvolupa durant la embriogènesi tant en rosegadors com en humans (Gesta et al., 2007).

Els adipòcits marrons provenen de precursors multipotents Pax7⁺ (*Paired box protein*)/ Myf5⁺ (factor miogénic 5) presents a les somites que també donaran lloc als miòcits. Aquest origen somític comú fa que els preadipòcits marrons expressin múltiples gens específics de múscul (Figura 8) (Seale et al., 2008; Sanchez-Gurmaches et al., 2012; Timmons et al., 2007).

Altrament, els adipòcits blancs i beige provenen d'un precursor multipotent comú, Pax7/Myf5, diferent al que dona lloc als adipòcits marrons. Tot i això, els adipòcits beige són un tipus cel·lular diferent als adipòcits blancs que s'indueixen sota l'acció de diversos estímuls. Diferents estudis han demostrat que aquesta inducció es pot donar a terme per l'activació d'adipòcits madurs ja existents o via diferenciació *de novo* de cèl·lules precursoras residents al teixit adipós (Sanchez-Gurmaches et al., 2012; Barbatelli et al., 2010; J. Wu et al., 2012; Rosen et al., 2014). Sembla que hi ha cert consens en l'existència de precursors d'adipòcits beige al teixit adipós blanc capaços de diferenciar-se en adipòcits beige madurs quan les condicions ho requereixen, i que són capaços de tornar a una funció d'emmagatzematge d'energia quan la generació de calor deixa de ser una prioritat (Figura 8) (Rosenwald et al., 2013; Lee et al., 2014; Rosen et al., 2014).

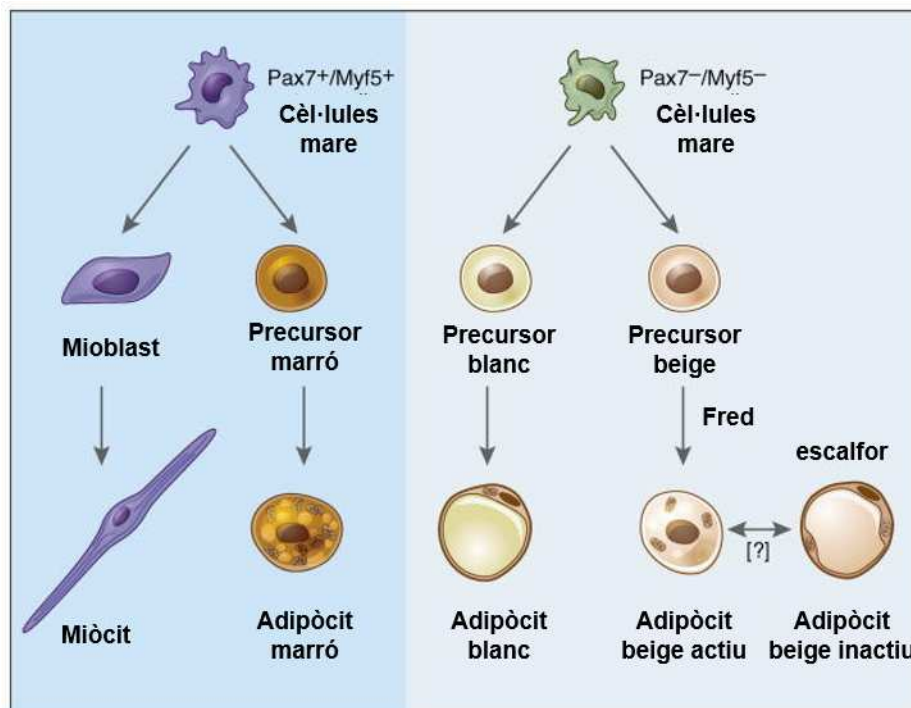


Figura 8. Origen dels adipòcits. Els adipòcits marrons provenen del llinatge Pax7⁺/Myf5⁺ compartit amb el múscul esquelètic. En canvi, els adipòcits blancs i beige deriven de progenitors Pax7⁻/Myf5⁻. Els adipòcits beige es diferencien per l'activació per fred o altres inductors, en absència de l'estímul s'inactiven i tornen a la morfologia d'adipòcit blanc (Adaptat Rosen et al., 2014).

3.6. Característiques generals de l'adipogènesi del teixit adipós

El creixement del teixit adipós és el resultat de l'augment de la mida dels adipòcits, hipertròfia, i de l'increment del nombre d'adipòcits, hiperplàsia. La hiperplàsia està relacionada amb la generació de nous adipòcits a partir de cèl·lules precursors; aquest procés s'anomena adipogènesi (Fajas et al., 2003).

L'adipogènesi és el procés mitjançant el qual les MSCs esdevenen adipòcits madurs. A nivell cel·lular es poden distingir dues fases del procés, la determinació i la diferenciació (Fajas et al., 2003; Ma et al., 2015). En el *commitment* o determinació les cèl·lules pluripotencials esdevenen *committed adipocyte progenitors* (preadipòcits), procés que és poc conegut a nivell molecular. Posteriorment, durant la diferenciació els preadipòcits adquireixen les característiques funcionals pròpies dels adipòcits madurs. A diferència de la determinació, la fase de diferenciació està àmpliament caracteritzada (Cristancho et al., 2011; Farmer et al., 2006; Rosen et al., 2006; Tang et al., 2012; Rosen et al., 2014; Ma et al., 2015).

Durant l'adipogènesi es poden distingir sis estadis principals: precursor o MSC, *committed preadipocyte*, preadipòcit bloquejat pel creixement, expansió mitòtica clonal, diferenciació terminal i adipòcit madur (Figura 9) (Fajas et al., 2003). La determinació inclou des de la cèl·lula mare mesenquimal progenitora fins al *committed preadipocyte*. Mentre que la diferenciació consisteix en la interrupció del creixement, l'expansió mitòtica clonal i la diferenciació terminal (Farmer et al., 2006; Moseti et al., 2016).

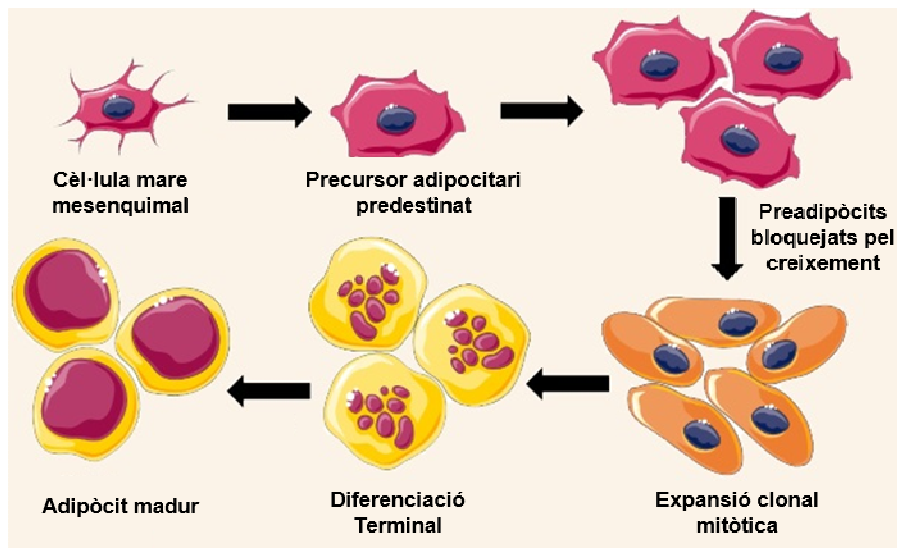


Figura 9. Estadis de l'adipogènesi. Durant l'adipogènesi es poden distingir sis estadis principals: precursor o cèl·lula mare mesenquimal, precursor adipocitari predestinat o *committed preadipocyte*, preadipòcit bloquejat pel creixement, expansió mitòtica clonal, diferenciació terminal i adipòcit madur.

A l'inici, les MSCs es mantenen indeterminades per varis complexos inhibitoris en que participen la *zinc-finger protein 521* (ZNF521) i el *wingless-type MMTV Integration site (WNT) family member 2* (Wisp2). Concretament, Zfn521 i Wisp2 inhibeixen el *commitment* mitjançant la interacció amb *zinc-finger protein 423* (Zfp423) i *early B-cell factor 1* (Ebf1), respectivament, generant així complexos inhibitoris. Zfp423 indueix la determinació del llinatge dels adipòcits amplificant els efectes de la via de senyalització de les proteïnes morfogèniques òssies (BMPs), necessàries per a la determinació. En els teixits adiposos blancs, el BMP4 ajuda a la dissociació dels complexos inhibitoris, permetent la interacció d'EBF1 i ZFP423 indispensable per a la generació dels preadipòcits (Figura 10) (Ma et al., 2015; Gustafson et al., 2015).

Inicialment, els preadipòcits es troben en una etapa de proliferació abans d'entrar en la fase de segrest proliferatiu. En aquest punt comencen a expressar marcadors de la diferenciació, donat que l'entrada a cada fase del procés requereix l'expressió dels inductors adequats (Farmer et al., 2006; Moseti et al., 2016).

La proliferació cel·lular i la diferenciació són fenòmens excloents. La reentrada al cicle cel·lular dels preadipòcits bloquejats pel creixement es coneix com expansió mitòtica clonal (MCE) (Fajas et al., 2003). Aquesta fase és necessària perquè finalment es dugui a terme la diferenciació terminal.

L'inici de la diferenciació és promogut per l'expressió primerenca de *CCAAT/enhancer-binding protein beta* (C/EBP β) i de *CCAAT/enhancer-binding protein delta* (C/EBP δ) (Tang et al., 2012; Cao et al., 1991; Tang et al., 1999; Yeh et al., 1995). C/EBP β induïx l'expressió del *peroxisome proliferator-activated receptor gamma* (PPAR γ) mitjançant la unió als elements reguladors del seu promotor (Wu et al., 1995). PPAR γ juntament amb *CCAAT/enhancer-binding protein alpha* (C/EBP α) són els reguladors transcripcionals centrals en la promoció de la diferenciació terminal. Aquesta diferència temporal entre l'expressió de C/EBP β i C/EBP δ versus PPAR γ i C/EBP α , és necessària ja que PPAR γ i C/EBP α són anti-mitòtics i la seva expressió prematura impediria la MCE (Guo et al., 2015). PPAR γ i C/EBP α mantenen la seva pròpia expressió mitjançant la seva retroalimentació durant aquest procés (Figura 10) (Tontonoz et al., 2008; Rosen et al., 2006; Farmer et al., 2006).

A més a més, C/EBP β inhibeix la senyalització Wnt/ β -catenin per mitjà de la regulació descendent de l'expressió de Wnt10b. La via Wnt/ β -catenin és una de les encarregades de mantenir l'estat indiferenciat dels progenitors adipocitaris mitjançant la inhibició de l'expressió de PPAR γ (Chung et al., 2012). També és necessària la regulació descendent d'altres inhibidors de l'adipogènesi com el Factor Preadipòcit 1 (PREF-1), el qual evita l'acumulació de lípids, l'expressió de PPAR γ i C/EBP α , i altres marcadors de l'adipogènesi terminal (Wang et al., 2006; Moon et al., 2002), o Necdin (NDN), que actua com un regulador negatiu de les primeres fases de la diferenciació dels adipòcits (Figura 10) (Tseng et al., 2005).

Per últim, la diferenciació terminal es caracteritza per la inducció de mecanismes necessaris per a la síntesi i el transport de lípids, la secreció de proteïnes pròpies dels adipòcits i l'expressió de programes metabòlics associats a cèl·lules diferenciades (Mosesti et al., 2016). PPAR γ i C/EBP α activen gens relacionats amb la lipogènesi tals com la sintasa d'àcids grassos (FAS) o la desaturasa d'esteril-CoA (SCD), així com també gens específics dels adipòcits com la proteïna d'unió a àcids grassos (FABP4), la perilipina 1 (PLIN1), el transportador de glucosa 4 (GLUT4) i la lipoproteïna lipasa (LPL) (Kaiden et al., 1980; Tontonoz et al., 1994; Takahashi et al., 2013). A més, PPAR γ regularà en els adipòcits madurs l'expressió d'altres lipases com

la *adipose triglyceride lipase* (ATGL) i la lipasa sensible a hormones (Kershaw et al., 2007; Shen et al., 2011). El manteniment de la diferenciació terminal s'aconsegueix per l'expressió mantinguda de C/EBP α (Figura 10) (Moseti et al., 2016).

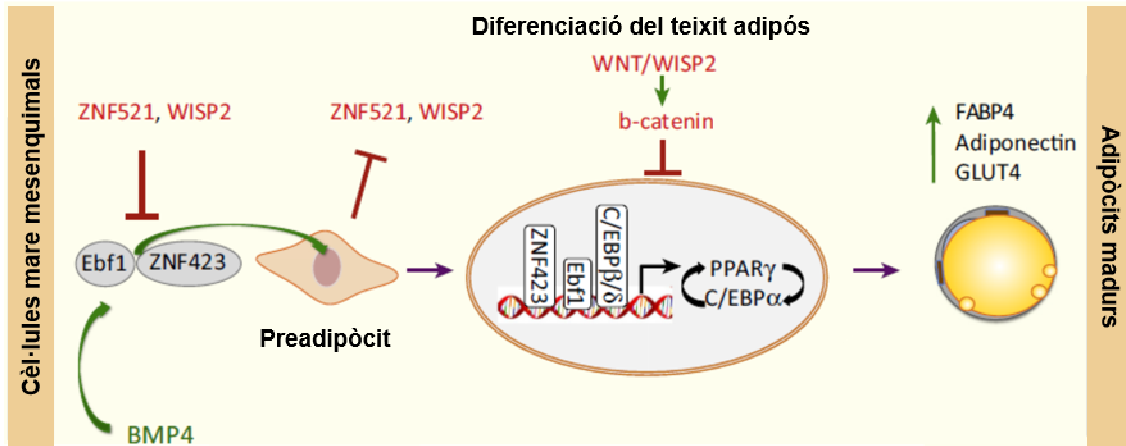


Figura 10. Regulació de la determinació i diferenciació de les cèl·lules precursors adiposes mesenquimals. Les MSCs es mantenen indeterminades per varis complexos inhibitoris en que els participen Zfn521 i Wisp2. En els adipòcits blancs, el BMP4 ajuda a la dissociació d'aquests complexos inhibitoris, permetent la interacció de Zfp423 i Ebf1 necessària per a la generació dels preadipòcits. En resposta a estímuls adipogènics, els preadipòcits expressen C/EBP β i C/EBP δ , que alhora indueixen l'expressió de PPAR γ i C/EBP α . Això fa que s'inhibeixi el senyal Wnt/ β -catenin que reté la diferenciació adipocitària. Per la seva banda, PPAR γ i C/EBP α es retroalimenten per induir la seva pròpia expressió, i activen l'expressió dels gens que definiran el fenotip dels adipòcits madurs (adaptat de Gustafson et al., 2015).

Més enllà de PPAR γ i C/EBP α , la diferenciació dels adipòcits suposa l'expressió de molts altres factors de transcripció que interaccionen en diferents moments de l'adipogènesi per tal de donar lloc a adipòcits madurs (Moseti et al., 2016). Per exemple, a l'etapa final de l'adipogènesi, el C/EBP β indueix l'expressió de la *sterol-regulatory-element binding protein 1c* (SREBP1), un factor de transcripció involucrat en la inducció de PPAR γ i l'expressió de gens vinculats a la biosíntesi de lípids. Altres factors de transcripció involucrats en la lipogènesi *de novo* com la *Carbohydrate-responsive element-binding protein* (ChREBP) també s'han vinculat al procés de diferenciació (Payne et al., 2010; Hurtado et al., 2011; Tang et al., 2016).

Cal destacar que PPAR γ està vinculat indirectament amb l'augment de la sensibilitat a la insulina, per una banda per l'increment del nombre d'adipòcits madurs que inicialment seran petits i per l'altra per la inducció de l'adiponectina, hormona provinent dels adipòcits (Moseti et al., 2016).

3.6.1. Característiques específiques de l'adipogènesi del teixit adipós marró

L'adipogènesi dels adipòcits marrons comença per la determinació i la posterior diferenciació mitjançant una cascada d'interaccions de factors transcripcionals similar a la dels adipòcits blancs. Tot i això, s'observen algunes diferències en el procés. La proteïna morfogenètica òssia 7 (BMP7) promou el desenvolupament del teixit adipós marró mitjançant el *commitment* dels progenitors a preadipòcits marrons (Wang et al., 2016). Posteriorment, la *PR domain containing 16p* (PRDM16), reguladora central de la diferenciació marró (Seale et al., 2007), s'uneix i co-regula C/EBP β , PPAR γ (Barbera et al., 2001), coactivador-1alpha de PPAR γ (PGC-1 α) (Seale et al., 2007), *euchromatic histone-lysine N-methyltransferase 1* (EHMT1) (Ohno et al., 2013) i *zinc finger protein 516* (ZFP516) (Figura 11) (Wang et al., 2016). També cal destacar que PGC-1 α és essencial per l'adipogènesi del teixit adipós marró donat que regula la biogènesi mitocondrial, el metabolisme oxidatiu i la termogènesi (Kajimura et al., 2010; Seale et al., 2008; Peirce et al., 2014; Wang et al., 2016). Alhora, l'*early B-cell factor 2* (EBF2) coopera amb PPAR γ per activar el programa d'expressió específic dels adipòcits marrons (Rajakumari et al., 2013).

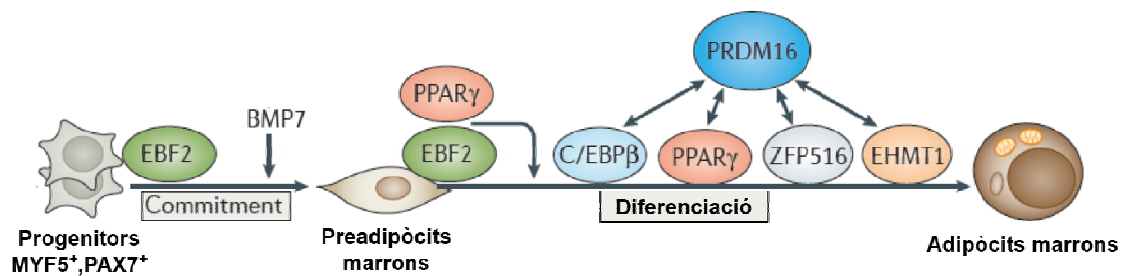


Figura 11. Desenvolupament dels adipòcits marrons. El BMP7 promou el desenvolupament dels progenitors Myf5+/Pax7+ a preadipòcits marrons. Posteriorment, la *PR domain zinc finger protein 16* (PRDM16) guia la diferenciació dels adipòcits marrons mitjançant la interacció amb els factors de transcripció adipocitaris *CCAAT/enhancer-binding protein- β* (C/EBP β), *peroxisome proliferator activated receptor- γ* (PPAR γ), *zinc finger protein 516* (ZFP516) i *euchromatic histone-lysine N-methyltransferase 1* (EHMT1). Alhora, l'*early B-cell factor 2* (EBF2) coopera amb PPAR γ per activar el programa d'expressió gènica específic dels adipòcits marrons (Adaptat de Wang et al., 2016).

4. NOUS TRACTAMENTS PER A LA DIABETIS TIPUS 2 I L'OBESITAT BASATS EN L'ACTIVACIÓ DEL TEIXIT ADIPÓS MARRÓ I EL *BROWNING*

Tot i els progressos en el tractament de la DT2 i l'obesitat, existeixen molts efectes secundaris i cap de les teràpies actuals representa una cura real de la malaltia (Rodgers et al., 2012; Yen et al., 2012). Per tant, hi ha una necessitat urgent de desenvolupar noves aproximacions terapèutiques segures per prevenir i combatre l'actual epidèmia de DT2 i obesitat. En aquest sentit, el desenvolupament de noves estratègies terapèutiques destinades a augmentar la taxa metabòlica a través de, per exemple, l'augment de la termogènesi sense tremolor poden tenir un gran potencial per al tractament de l'obesitat i DT2.

4.1. Activació del teixit adipós marró i *browning*

En rosegadors, l'obesitat i la resistència a la insulina estan fortament associades a l'activitat del teixit adipós marró i més del 50% de l'activitat metabòlica corporal total prové de la termogènesi no associada a tremolor en el BAT (Janský et al., 1995). En humans també s'ha descrit la importància del teixit adipós marró en adults, establint-se una correlació inversa entre l'activitat del BAT i el BMI (van Marken Lichtenbelt et al., 2009; Cypess et al., 2009). També s'ha establert una correlació inversa entre l'activitat del BAT i la glicèmia, indicant que el desenvolupament de la diabetis pot estar vinculat a la reducció de l'activitat del BAT (Timmons et al., 2009). A més, els ratolins que presenten deficiència del receptor d'insulina específicament en el teixit adipós marró manifesten defectes en la secreció d'insulina i intolerància a la glucosa (Guerra et al., 2001). Això suggereix que l'activitat del teixit adipós marró està involucrada en la secreció d'insulina i la homeòstasi de la glucosa.

D'altra banda, el fenomen del *browning* o inducció d'adipòcits beige sota certs estímuls com el fred, està associada a la reducció de l'obesitat en animals. Aquest procés és altament dependent del dipòsit adipós en qüestió. En ratolins, el teixit adipós blanc inguinal (iWAT) experimenta la major inducció d'aquest tipus d'adipòcits, mentre que el teixit adipós blanc epididimal (eWAT) és bastant resistent al *browning* (Ohno et al., 2012; Vitali et al., 2012). A més, sembla que aquesta natura induïble dels adipòcits beige es conserva en certs dipòsits adiposos dels humans (Kajimura et al., 2015).

L'activació dels adipòcits beige o marrons per induir la termogènesi ofereix múltiples avantatges a més d'un balanç energètic negatiu, per exemple, el consum de

lípid i glucosa per part d'aquestes cèl·lules podria suposar a més d'una reducció de l'obesitat, efectes cardioprotectors i antidiabètics (Kusminski et al., 2016).

4.2. Possibles teràpies alternatives

Durant els darrers anys nombrosos estudis han identificat reguladors positius i negatius del *browning*. Concretament, els inductors del *browning* i de l'activitat del teixit adipós marró són objecte d'estudi per al tractament de l'obesitat i la DT2. Per exemple, la sobreexpressió d'UCP1 en el BAT i el WAT de ratolins transgenics els protegia de l'obesitat induïda per dieta alta en lípid (Kopecky et al., 1995). Els ratolins amb deficiència pel *cell-death-inducing DFF45-like effector A* (Cidea) també presenten un augment de la despesa energètica i són resistent a l'obesitat i a la diabetis induïda per dieta alta en lípid (Zhou et al., 2003). La sobreexpressió de PRDM16 en el teixit adipós de ratolins transgènics induïx el desenvolupament d'adipòcits beige en els dipòsits adiposos blancs incrementant així la despesa energètica, limitant el guany de pes i millorant la tolerància a la glucosa en resposta a una dieta alta en lípid (Seale et al., 2011). En humans s'han provat compostos que augmentaven el gast energètic com el *synthetic uncoupling agent 2,4 dinitrophenol* (DPN), que es va fer servir per perdre pes en els 1930s, però presentava greus efectes secundaris (Harper et al., 2001). També s'han utilitzat agonistes dels receptors β 3-adrenergic per activar el BAT, però la seva eficiència ha estat molt limitada (Arch et al., 2008). Actualment, el resveratrol, un activador al·lostèric de SIRT1 que redueix la resistència a insulina i augmenta el metabolisme oxidatiu en el BAT i el múscul esquelètic, es troba en fase II (Giordano et al., 2016).

A més, també s'han fet servir factors no provinents del teixit adipós per activar la termogènesi en els adipòcits beige i marrons. Per exemple, la Irisina, una hormona la secreció de la qual es veu augmentada en el múscul sota l'estímul de l'exercici, és un factor capaç d'induir *browning* en el teixit adipós subcutani (Boström et al., 2012). Així mateix, el *Fibroblast growth factor 21* (FGF-21), factor secretat principalment pel fetge (Muisse et al., 2008), augmenta els nivells d'UCP1 i altres gens involucrats en la termogènesi tant en el teixit adipós marró com en el teixit adipós blanc per tal d'augmentar la despesa d'energia (Xu et al. 2009; Coskun et al. 2008; Fisher et al. 2012). Així, l'administració de FGF21 en models obesos com el ratolí deficient pel gen de la leptina (ob/ob), el ratolí deficient pel receptor de la leptina (db/db), ratolins alimentat amb dieta alta en lípid (HFD) i *Zucker Diabetic Fatty* (ZDF) promou una robusta reducció de l'adipositat, disminuint els triglicèrids en sang, els nivells

d'insulina en dejú i millorant la sensibilitat a la insulina (Berglund et al., 2009; Coskun et al., 2008; Xu et al., 2009; Kharitononkov et al., 2005; Adams et al., 2012). Així mateix, les proteïnes morfogènètiques òssies 7 (BMP7) i 8b (BMP8B) són capaces d'induir l'activitat del teixit adipós marró i el *browning* en el teixit adipós blanc subcutani (Giordano et al., 2016; Tseng et al., 2008; Schulz et al., 2011; Whittle et al., 2012).

Per tant, el teixit adipós juga un paper clau en el desenvolupament de noves teràpies per a la DT2 i l'obesitat, essent especialment interessants les dianes i molècules que puguin estimular l'activitat del teixit adipós marró o el fenotip marró en adipòcits *beige* (Giordano et al., 2016).

5. PROTEÏNA MORFOGENÈTICA ÒSSIA 7 (BMP7)

El BMP7 pertany a la superfamília *Transforming Growth Factor β* (TGF β) i va ser identificada en bovins com a proteïna osteogènica 1 (OP-1) l'any 1990 (Sampath et al., 1990). Encara que inicialment es va descriure el seu paper en l'osteogènesi, aviat van ser relacionada amb el desenvolupament del ronyó (Dudley et al., 1995) i en la darrera dècada ha emergit la importància del seu rol en l'adipogènesi i activació del teixit adipós marró (Tseng et al., 2008; Townsend et al., 2013; Schulz et al., 2013) i el *browning* del WAT (Schulz et al., 2011; Elsen et al., 2014).

5.1. La superfamília de proteïnes TGF β -BMP

Els membres de la superfamília *Transforming Growth Factor β* són citocines que regulen un ampli ventall de processos cel·lulars fonamentals com la proliferació, diferenciació, apoptosi o morfogènesi (Oxburgh et al., 2009; Carreira et al., 2015). La superfamília TGF- β està formada per 35 membres que poden ser dividits generalment en quatre subgrups: proteïnes TGF- β , proteïnes morfogèniques òssies (BMPs)/ factors de creixement i diferenciació (GDF), *proteïnes activin/inhibin*, i proteïnes *glial cell line-derived neurotrophic factor* (GDNF) (Manson et al., 2015).

Les TGF- β /BMP estan relacionades per les seves funcions de senyalització, per l'homologia en els dominis d'unió a receptors i per característiques de la seva estructura terciària (Manson et al., 2015). Fins al moment s'han identificat més de 20 BMPs que han estat agrupades en subfamílies tenint en compte la similitud de la seva seqüència aminoacídica. Per contra, el BMP1 no pertany a la superfamília TGF- β per ser una metalloproteasa (Kessler et al., 1996).

5.1.1. BMPs en l'adipogènesi

Les BMPs són molècules secretables que contribueixen en la determinació de les cèl·lules precursors durant l'adipogènesi. En concret, proteïna morfogenètica òssia 2 (BMP2) i la proteïna morfogenètica òssia 4 (BMP4) indueixen la proliferació dels progenitors a adipòcits blancs en ratolins, i BMP4 particularment també en humans (Suenaga et al., 2013; Huang et al., 2009). D'altra banda, BMP7 és capaç de dirigir les MSC cap al lligatge d'adipòcits marrons i pot induir la diferenciació de preadipòcits marrons a adipòcits marrons madurs (Tseng et al., 2008; Schulz et al., 2011). Això s'aconsegueix mitjançant la supressió de l'expressió dels inhibidors de la diferenciació primerenca com Pref-1, Necdin i Wnts, i amb la inducció de l'expressió de

molècules claus pel llinatge del greix marró, com PRDM16 i PGC-1 α (Figura 12) (Tseng et al., 2008).

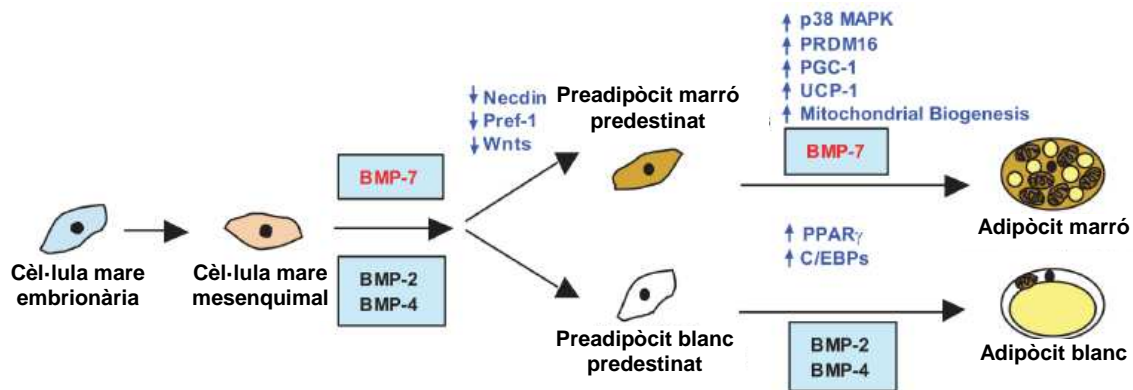


Figura 12. BMPs en l'adipogènesi. BMP2 i BMP4 indueixen la proliferació de les MSC a adipòcits blancs. Mentre que BMP7 és capaç de dirigir les MSC cap al lligatge d'adipòcits marrons i pot induir la diferenciació de preadipòcits marrons a adipòcits marrons madurs mitjançant la supressió dels inhibidors de la diferenciació primerenca i la inducció de molècules claus pel llinatge del greix marró, com PRDM16 i PGC-1 α (Adaptació Tseng et al., 2008).

5.2. Estructura del BMP7

En humans el gen que codifica per *BMP7* es localitza al locus 20q13.31 i codifica per un transcrit madur de 4 Kb amb 7 exons, que és traduït a una proteïna de 431 aminoàcids (aa). La forma madura murina i humana del BMP7 presenten un 98% d'homologia en la seqüència aminoacídica (Ozkaynak et al., 1990). Així mateix, el BMP7 presenta uns dominis i una estructura general compartits amb altres BMPs i amb la superfamília TGF β -BMP (Manson et al., 2015). Aquesta estructura inclou diverses característiques importants que són crítiques per les funcions senyalitzadores del BMP7 (Figura 13):

1. **Seqüència senyal amino-terminal:** Petita seqüència senyal hidrofòbica de 29 aminoàcids que dirigeix el BMP7 a les vies de secreció del reticle endoplasmàtic.
2. **Pro-domini associat a latència:** Gran pro-domini de 263 aa que facilita el plegament proteic, millora la solubilitat i promou les interaccions quaternàries del BMP7. El precursor proteic es forma al citoplasma i és tallat per secretases. El pro-domini alliberat es manté associat no covalentment amb el pèptid madur i el dirigeix a la matriu extracel·lular després de la secreció.
3. **Pèptid senyal madur:** Un pèptid madur de 129 aa que s'encarrega de la senyalització cèl·lula - cèl·lula del BMP7.
4. **Llocs de glicosilació:** La presència de llocs de N-glicosilació faciliten el plegament proteic, marquen el BMP7 per a la secreció després de les modificacions a l'aparell de Golgi, i contribueixen a les interaccions proteïna - proteïna.

5. Ponts disulfid intrapèptid: Sis residus de cisteïna formen tres ponts disulfid per establir el monòmer de BMP7.
6. Ponts disulfid interpèptid: El setè residu de cisteïna permet formar homodímers estables.

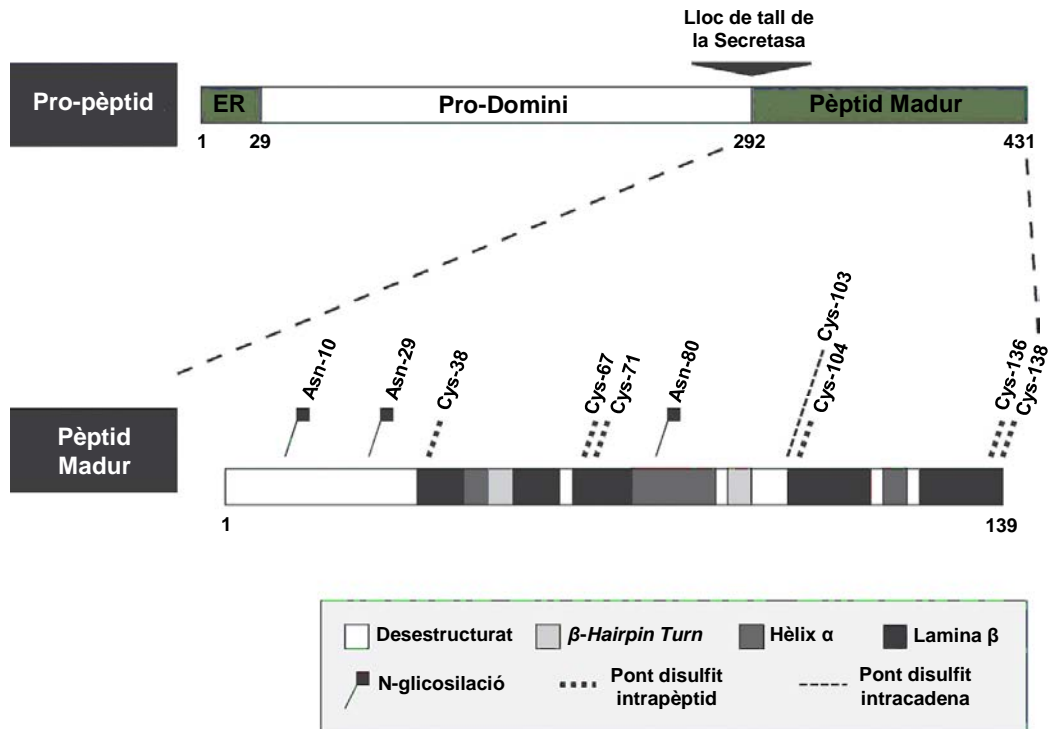


Figura 13. Organització estructural de la proteïna BMP7. El BMP7 és sintetitzat com un pro-pèptid de 431 aminoàcids que conté la seqüència senyal (ER) que dirigeix el BMP7 cap a la via de secreció al reticle endoplasmàtic, un pro-domini gran que facilita el plegament de la proteïna, i un pèptid madur a C-terminal que és alliberat del pro-pèptid mitjançant un tall per formar el component del BMP7 que s'encarrega de la senyalització cèl·lula - cèl·lula. El pèptid madur de 139 aa adopta la seva estructura terciària mitjançant elements estructurals tals com hèlix- α , làmina- β i gir- β , o la formació de ponts disulfid intrapèptid i N-glicosilacions. Els monòmers de BMP7 són posteriorment units per crear un dímer antiparal·lel que s'estabilitza gràcies a un pont disulfid intercatenari (Adaptat de Manson et al., 2015).

5.3. Patró d'expressió del BMP7

El BMP7 s'expressa durant el desenvolupament embrionari i en l'etapa adulta. En l'embrió s'expressa al notocordi, a la superfície de l'ectoderma i al sac vitel·lí (Lyons et al., 1995). En etapes més tardanes del desenvolupament, els transcrits de BMP7 es detecten en molts òrgans tals com l'ull, el ronyó, el cor, el cervell, els ossos o el teixit adipós (Dudley et al., 1995; Vukicevic et al., 1994; Rocha-Rodrigues et al., 2016).

El ronyó és l'òrgan on té lloc una major síntesi de BMP7 durant l'embriogènesi així com en el desenvolupament postnatal (Zeisberg et al., 2006; Tanaka et al., 2008).

Cal destacar que el ratolí deficient per BMP7 mor poc després de néixer degut a la greu hipoplàsia renal. De la mateixa manera, el BMP7 ha demostrat ser important en els ratolins adults per la preservació de les funcions del ronyó (Zeisberg et al., 2006; Tanaka et al., 2008). Varies regions del cervell sintetitzen BMP7, concretament l'hipotàlem, el còrtex, l'hipocamp, les leptomeninges i el nucli habenular, essent l'hipotàlem el major lloc d'acció del BMP7 al cervell (Dattatreymurty et al., 2001). L'expressió de BMP7 també és imprescindible a nivell ossi. Durant el desenvolupament destaca la presència de BMP7 en àrees de degradació de cartílag i formació d'ós, osteoblasts i periosti (Vukicevic et al., 1994). A banda d'això, s'han observat malformacions a nivell ossi en absència del gen, en concret, el doble mutant de *Bone Morphogenetic Protein Receptor Type 1B* (BMPRI1) i de BMP7 presenta greus defectes de l'esquelet apendicular de les extremitats anteriors i posteriors (Yi et al., 2000). A més, en aquest model el cúbit és gairebé absent i el radi s'escurça (Yi et al., 2000). Cal destacar també que el BMP7 s'expressa en el cartílag articular humà, essent elevada la seva concentració en la superfície i molt baixa a la zona interior (Chubinskaya et al., 2002). Tot i això, hi ha una reducció clara dels nivells de BMP7 al cartílag entre els 35 i els 75 anys d'edat (Chubinskaya et al., 2002).

El BMP7 s'expressa de forma transitòria en el teixit adipós durant el desenvolupament embrionari. Concretament, en el dia E15.5 el BMP7 és detectable al BAT, mentre que a dia E18.8 no s'observen transcrits del gen en aquest teixit (Park et al., 2013). La seva expressió és necessària pel desenvolupament del teixit adipós marró, tal i com es va demostrar amb la reducció de la massa del BAT que presenta el *knockout* de BMP7 (Tseng et al., 2008). En etapes postnatales s'han observat nivells d'expressió de BMP7 al BAT que poden variar depenent de l'exposició a estímuls com el fred (Park et al., 2013; Tseng et al., 2008).

5.4. Cascada de la senyalització del factor BMP7 al teixit adipós

Es requereixen dos tipus de receptors serina-treonina quinasa per transduir el senyal del BMP7, un de tipus I i un altre de tipus II. Ambdós receptors tenen un domini curt extracel·lular, un únic domini que travessa la membrana i un domini intracel·lular que conté un domini serina-treonina quinasa (Miyazono et al., 2010).

El BMP7 es pot unir a 3 receptors BMP de tipus I: *activin receptor-like kinase-2* (ALK2), *activin receptor-like kinase-3* (ALK3), *activin receptor-like kinase-6* (ALK6) i a 3 receptors de tipus II: *Bone Morphogenetic Protein Receptor Type 2* (BMPRII), *activin A*

receptor type IIA (ActRIIa), *activin A receptor type IIB* (ActRIIb), amb diferents afinitats i combinacions (Miyazono et al., 2010; Mueller et al., 2012). Encara que el receptor de tipus II és constitutivament actiu, i una petita part pre-existeix formant heterodímers amb els receptors de tipus I, de seguida que s'uneix el lligand el nombre d'heterodímers incrementa notablement (Modica et al., 2013). En produir-se la unió, el receptor de tipus II fosforila el receptor tipus I, fet que inicia la transducció del senyal intracel·lular (Figura 14) (Modica et al., 2013).

Les proteïnes SMAD són les principals responsables de la transducció del senyal del citoplasma al nucli. El receptor de tipus I fosforila les proteïnes SMAD regulades per receptor (R-SMAD), SMAD1, SMAD5 i SMAD 8, fent que aquestes formin un complex amb el SMAD4 o Co-SMAD que es transloca dins del nucli per unir-se al promotor dels gens diana pel BMP7 (Figura 14) (Nishimura et al., 2003). En aquesta via també cal destacar la presència d'inhibidors de SMADs (I-SMAD), els quals són SMAD6 i SMAD7. Els I-SMAD es poden unir a receptors de tipus I activats evitant l'activació dels R-SMAD, i fins i tot poden actuar al nucli impedit la formació del complex SMAD-DNA funcional (Figura 14) (Zhang et al., 2007; Ishida et al., 2000).

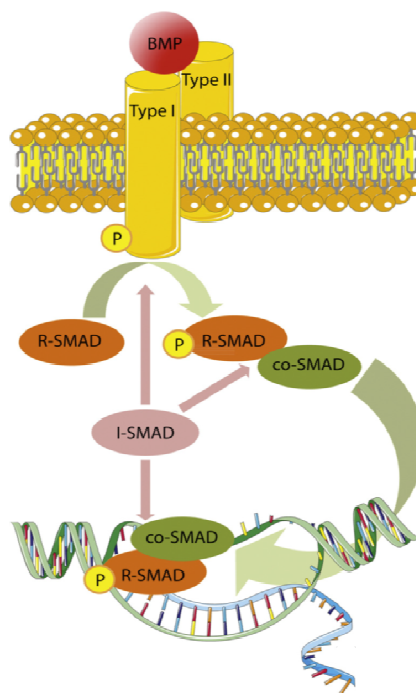


Figura 14. Via de senyalització del BMP7 en el teixit adipós. El BMP7 promou la formació de l'heterodímer entre dos tipus de receptors serina-treonina quinasa de tipus I i II. El receptor de tipus II fosforila el de tipus I que ahora activa les R-SMAD (SMAD1, SMAD5 i SMAD8) mitjançant la seva fosforilació. Un cop activades les R-SMAD formen un complex amb el Co-SMAD (SMAD4), el qual es transloca al nucli per regular l'expressió de gens diana del BMP7. Les I-SMAD (SMAD6 i SMAD7) interfereixen en la via de senyalització impedit la fosforilació de les R-SMAD, la formació del complex R-SMAD/Co-SMAD o la formació del complex SMAD/DNA (Adaptat de Modica et al., 2013).

A part de la via de senyalització mitjançant proteïnes SMAD, l'altra cascada de senyalització *downstream* és la de la proteïna quinasa activada per mitogen p38 (p38-MAPK) (Townsend et al., 2012).

5.5. BMP7 i tractament de l'obesitat i la diabetis tipus 2

El BMP7 té un paper molt important en la regulació dels adipòcits, especialment en el teixit adipós marró. Aquesta proteïna multifuncional està involucrada en la despesa energètica i la biogènesi mitocondrial del BAT i el *browning* del iWAT (Tseng et al., 2008; Townsend et al., 2013; Schulz et al., 2011; Schulz et al., 2013; Elsen et al., 2014). A més, el BMP7 ha estat identificat com un anorexígen que actua mitjançant una via central mTOR independent de leptina al hipotàlem (Townsend et al., 2012). Tot això el converteix en un factor terapèutic amb molt potencial pel tractament de l'obesitat i la DT2.

5.5.1. Efectes al teixit adipós mediat per BMP7

El BMP7 participa en la inducció, diferenciació i desenvolupament del teixit adipós marró. S'ha descrit que el *knockout* de BMP7 presenta una pèrdua de la massa del BAT que ja és detectable en estadis embrionaris i que pot arribar al 50-70% de disminució en néixer (Tseng et al., 2008). A més, aquesta reducció va acompanyada de la supressió de l'expressió d'UCP1 en aquest teixit, evidenciant la disminució del nombre d'adipòcits marrons (Tseng et al., 2008).

Concretament, el BMP7 participa en la diferenciació dels adipòcits marrons *in vitro*. El cultiu de preadipòcits marrons conjuntament amb BMP7 promou la diferenciació a adipòcits marrons (Tseng et al., 2008). De manera similar, el cultiu de cèl·lules mesenquimals multipotens amb BMP7 determina la inclinació cap al llinatge d'adipòcits marrons (Tseng et al., 2008).

Per dur a terme aquesta inducció, el BMP7 suprimeix l'expressió de gens inhibidors de l'adipogènesi com *NDN*, *PREF-1* o *WNTs*, mentre que inicia el programa transcripcional de l'adipogènesi amb l'augment dels nivells d'expressió de *PRDM16*, *PPAR γ* , *C/EBP α* o *AP2*. Aquest fet dona lloc a l'expressió de gens propis dels adipòcits marrons i de la biogènesi mitocondrial, tals com la proteïna desacobladora 1 o termogenina (*UCP1*), el *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha* (*PGC-1 α*), el *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-beta* (*PGC-1 β*), el factor respiratori nuclear 1 (*NRF1*), el factor de

transcripció mitocondrial A (*TFAM*) o el citocrom C (*CYTC*) (Figura 15) (Tseng et al., 2008).

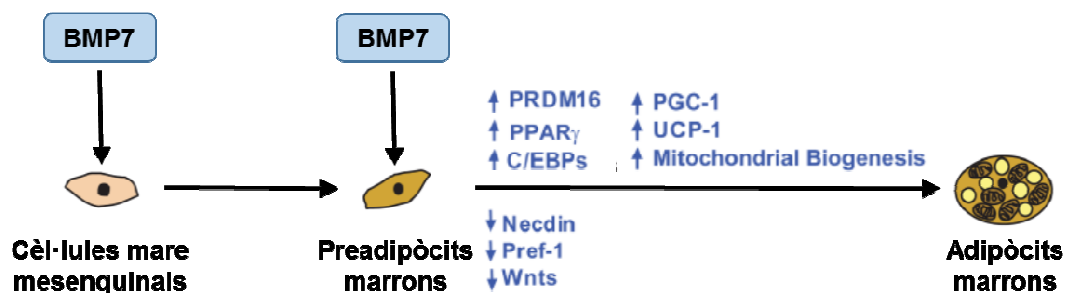


Figura 15. Determinació del desenvolupament d'adipòcits marrons per part de BMP7. El cultiu de les cèl·lules mare mesenquimials amb BMP7 determina la seva inclinació cap al llinatge d'adipòcits marrons. Així mateix, el cultiu de pre-adipòcits marrons conjuntament amb BMP7, promou la diferenciació a adipòcits marrons. El BMP7 suprimeix l'expressió de gens inhibidors de l'adipogènesi tals com *NDN*, *PREF-1* o *WNT10a*, mentre que inicia el programa transcripcional de l'adipogènesi induint l'expressió de *Prdm16*, *Ppar γ* , *C/EBP α* o *AP2*. En conseqüència, es produeix un augment de l'expressió de gens propis dels adipòcits marrons i de la biogènesi mitocondrial (Adaptat de Tseng et al., 2008).

Quan el cultiu amb BMP7 es duu a terme en adipòcits marrons madurs, es produeix un augment de l'activitat mitocondrial (Townsend et al., 2013). Concretament, hi ha un increment del transport d'àcids grassos i de la seva oxidació, però no s'observen canvis en l'expressió d'UCP1 (Townsend et al., 2013).

El BMP7 també presenta capacitat per induir la diferenciació en altres tipus cel·lulars *in vitro*. En cèl·lules precursorses *Stem cells antigen 1 + progenitor cells* (ScaPCs), una subpoblació de progenitors adipògenics que es troba en el teixit adipós marró, teixit adipós blanc i múscul esquelètic de ratolins, el BMP7 té la capacitat d'induir la diferenciació a adipòcits *brown-like* en múscul i teixit adipós blanc subcutani (Schulz et al., 2011). Un efecte semblant també s'ha observat en cèl·lules humanes, on el BMP7 pot induir la transició a adipòcits *brown-like* en cèl·lules precursorses humanes derivades de teixit adipós blanc (Elsen et al., 2014).

Estudis a curt termini en ratolins sans on s'administrava sistèmicament adenovirus (Ad) codificants per BMP7, van promoure nivells circulants d'uns 3000 pg/mL de BMP7, que van induir la reducció del guany de pes corporal, el desenvolupament del teixit adipós marró i l'increment de la despesa energètica (Tseng et al., 2008). A més, el tractament a curt termini en models murins d'obesitat induïda i genètica (*ob/ob*) amb dosis més elevades d'Ad-BMP7 administrats sistèmicament promovia nivells de BMP7 en sèrum superiors a 300000 pg/mL que induïen la reducció

del pes corporal i la massa de greix, disminuïen la ingesta d'aliments i milloraven al sensibilitat a la insulina (Townsend et al., 2012).

D'altra banda, també s'ha descrit que l'administració subcutània de proteïna recombinant BMP7 a curt termini en ratolins alimentats amb dieta alta en lípids provoca la inducció de *browning* en el iWAT, només en condicions de subtermoneutralitat (Boon et al., 2013).

5.5.2. Efectes a nivell central mediat per BMP7

S'ha descrit que BMP7 té capacitat per regular l'apetit, definint-se com un nou factor anorèctic (Townsend et al., 2012). Alhora, l'administració intracerebroventricular a curt termini de la proteïna recombinant BMP7 en ratolins C57BL/6 o ob/ob també és capaç de reduir el consum d'aliments (Townsend et al., 2012). Específicament, BMP7 duu a terme les seves funcions anorèctiques actuant a l'hipotàlem mitjançant la via mTOR-p70S6K (Townsend et al., 2012; Schulz et al., 2013).

5.6. BMP7 com a teràpia per tractar l'obesitat i la DT2

Els estudis *in vitro* han demostrat que BMP7 pot ser capaç d'induir *browning* tant en cèl·lules progenitores murines com humanes provinents de teixit adipós blanc inguinal (Schulz et al., 2011; Elsen et al., 2014), i d'activar l'adipogènesi del teixit adipós marró murí (Tseng et al., 2008). Malgrat això, el seu mecanisme d'acció al teixit adipós no ha estat caracteritzat *in vivo*.

D'altra banda, els estudis a curt termini en ratolins semblen indicar que BMP7 pot ser un bon candidat per al tractament de l'obesitat i la DT2. L'augment dels nivells circulants de BMP7 per sobre de 3000 pg/mL en ratolins sans o de 300000 pg/mL en ratolins obesos indueix la reducció del pes corporal mitjançant l'activació del teixit adipós marró i/o de la reducció de l'apetit (Tseng et al., 2008; Townsend et al., 2012). Tot i això, no s'han fet estudis a llarg termini per poder valorar si el BMP7 pot ser una teràpia real per la DT2 i l'obesitat, ni es coneix què succeeix quan els nivells circulants en sèrum de BMP7 són moderadament baixos.

Per tant, existeix la necessitat d'estudiar més extensament el rol de BMP7 *in vivo* a llarg termini tant específicament en el teixit adipós com a nivell sistèmic. El tractament amb proteïna recombinant BMP7 presenta diversos inconvenients que inclouen la ràpida degradació, l'elevat cost de producció i la necessitat de

readministracions, entre d'altres (Sierra-Garcia et al., 2016). D'altra banda, els Ad són molt útils per fer proves de concepte en estudis a curt termini gràcies a la seva elevada eficiència de transducció *in vitro* i *in vivo*, però la seva elevada immunogenicitat impedeix la seva utilització per al tractament de malalties cròniques com la diabetis (Romano et al., 2006). Per tant, cal desenvolupar un sistema o vehicle que permeti augmentar els nivells d'expressió de BMP7 localment al teixit adipós i d'altra banda, que indueixi l'alliberació contínua de la proteïna per tal d'augmentar els nivells circulants per mitjà d'una única administració.

6. TRANSFERÈNCIA GÈNICA *IN VIVO* MITJANÇANT VECTORS ADENOASSOCIATS (AAV)

La transferència gènica es basa en la introducció de material genètic forà a les cèl·lules diana, amb la finalitat de contrarestar o reemplaçar el mal funcionament d'un gen mitjançant edició gènica, addició gènica o tecnologia *knockdown* (Naldini et al., 2015).

Els vectors virals adenoassociats (AAV) són virus modificats genèticament en els quals s'ha reemplaçat o eliminat algun o tots els gens virals involucrats en els mecanismes d'integració i replicació, i s'ha afegit el constructe amb el gen terapèutic d'interès (Nayerossadat et al., 2012). Conseqüentment, els vectors virals adenoassociats mantenen la infectivitat del virus parental però no són capaços de generar nous virions.

Els vectors virals adenoassociats presenten un perfil de seguretat excel·lent i la capacitat de proporcionar una expressió a llarg termini en una gran varietat de teixits, trets que els converteixen en vehicles molt eficients per a la teràpia gènica (Mount et al., 2002). A més, a dia d'avui cap procés patogènic ha estat associat als AAV en humans. Conseqüentment, gran part de les estratègies terapèutiques per al tractament de malalties genètiques en humans per mitjà de la teràpia gènica *in vivo* estant fent ús de la tecnologia dels AAV amb resultats molt prometedors i productes com Glibera® ja al mercat (Mingozzi et al., 2011; Ylä et al., 2012).

6.1. Biologia dels virus adenoassociats

Els AAVs són parvovirus no patogènics i sense envolta, que depenen de les funcions d'un virus auxiliar, con un adenovirus o un herpes simplex virus, per la seva eficient replicació (Buller et al., 1981; Casto et al., 1967). Sense la presència del virus auxiliar, els AAVs salvatges són retinguts en forma episomal formant grans concatèmers circulars, o integrats en baixa freqüència dintre d'una regió específica del cromosoma humà 19 (19q13.3-qter) (McCarty et al., 2004).

El genoma dels virus AAVs consisteix en una cadena simple de DNA (ssDNA) d'aproximadament 4.7 Kb. Aquest inclou les seqüències codificants per les proteïnes Rep i Cap flanquejades per repeticions terminals invertides (ITRs) de 145 parells de

bases (pb), que es comporten com l'origen de replicació viral i el senyal d'empaquetament (Figura 16) (Lisowski et al., 2015; Kotterman et al., 2014). El marc de lectura obert (ORF) del gen *Rep* codifica per quatre proteïnes no estructurals (REP REP78, REP68, REP52 i REP40), expressades mitjançant promotors alternatius i variants d'*splicing*, les quals són crucials per la replicació, transcripció, integració i encapsidació del genoma (Figura 16) (Kotterman et al., 2014). L'ORF *Cap* codifica per tres proteïnes estructurals d'assemblatge de la càpsida, VP1, VP2 i VP3, que formen una càpsida icosaèdrica de 60 subunitats amb l'ajuda de la proteïna d'activació de l'assemblatge (AAP), expressada a partir de l'ORF2 del gen *Cap* (Kotterman et al., 2014; Naumer et al., 2012) (Figura 16).

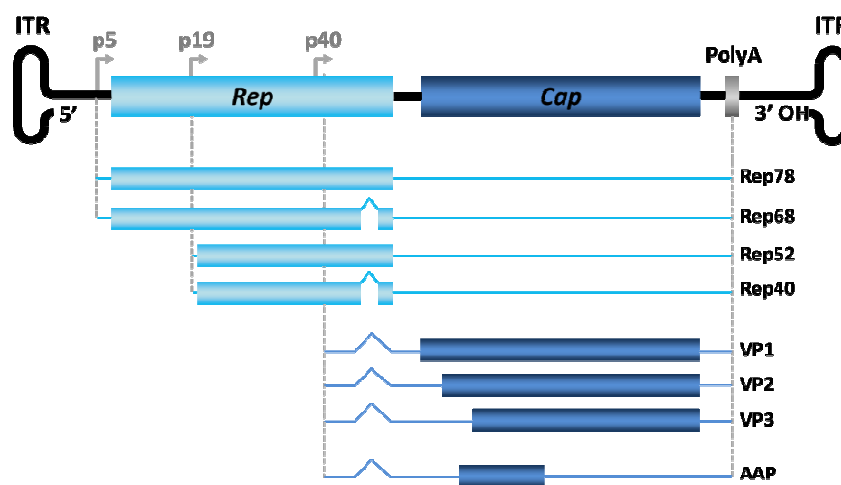


Figura 16. Genoma dels virus adenoassociats. Representació esquemàtica del genoma de DNA de cadena simple d'un virus AAV, que conté dos gens (*Rep* i *Cap*) amb tres marcs oberts de lectura (ORF) flanquejats per repeticions terminals invertides (ITRs). Mitjançant l'*splicing* alternatiu, l'ORF de *Rep* codifica per quatre proteïnes no estructurals (Rep78, Rep68, Rep52 and Rep40) i l'ORF de *Cap* codifica per tres proteïnes estructurals (VP1, VP2 and VP3) i la proteïna d'activació de l'assemblatge (AAP). Rep78 i Rep68 són transcrits pel promotor intern p5, Rep52 i Rep40 pel promotor p19 i *Cap* pel promotor p40 (Adaptat de Balakrishnan et al., 2014).

6.2. Vectors AAV recombinants

Per tal d'obtenir vectors per aplicacions de transferència gènica, es substitueixen tots els ORFs del genoma viral per la seqüència de DNA heteròleg que conté el constructe terapèutic d'elecció flanquejada per les ITRs. La partícula resultant s'anomena vector AAV recombinant (rAAV). El vector conserva la seva capacitat d'empaquetament, però es incapaç de replicar-se (Hirata et al., 2000; Snyder et al., 2011). D'aquesta manera, les cèl·lules transduïdes pels rAAVs no expressen cap gen viral, i per tant, no poden ser reconegudes i destruïdes pel sistema immunitari. Tot i que aquesta afirmació és certa en models animals, en humans pot haver existit una

resposta contra el virus AAV salvatge que provoqui posteriorment una resposta immune contra el vector AAV administrat, o contra el transgèn, que podria interferir en la eficiència terapèutica (Manno et al., 2006; Mingozi et al., 2011; Mingozi et al., 2013).

Els vectors AAVs recombinants es mantenen majoritàriament episomals en el nucli de la cèl·lula hoste, tot i que també poden integrar-se a freqüències molt baixes en el genoma de la cèl·lula hoste, habitualment en zones de transcripció gènica activa o en zones on es produeix un trencament de la doble cadena de DNA (Deyle et al., 2009; Lisowski et al., 2015). Un cop s'ha produït la transducció de la cèl·lula, els genomes de cadena simple dels rAAVs s'han de convertir a doble cadena per ser transcrits i facilitar l'expressió del transgèn. La síntesi de la cadena complementària requereix de l'activitat de la cèl·lula hoste i és un pas limitant del procés (Ferrari et al., 1996).

Per tal d'evitar el pas limitant de sintetitzar la cadena complementària de DNA, es van dissenyar AAVs que contenen un genoma de doble cadena de DNA (dsAAV) per tal d'eludir el pas de la síntesi de la cadena complementària i així millorar la producció de la proteïna terapèutica (McCarty et al., 2001). Altrament, els dsAAV presenten una capacitat de clonatge més limitada i una major dificultat en la seva obtenció. A més, la resposta innata del sistema immune envers aquests vectors és superior a la dels vectors AAV de cadena única (Martino et al., 2011).

La producció i purificació dels vectors rAAV pot aconseguir-se al laboratori a títols elevats (Ayuso et al., 2010a). Per tal d'evitar possibles recombinacions durant la producció dels vectors, els sistemes d'empaquetament acostumen a expressar les proteïnes virals en *trans* amb el gen terapèutic (Snyder et al., 2011).

El sistema més utilitzat per produir vectors rAAV consisteix en la cotransfecció de les cèl·lules HEK293 amb tres plasmidis (Figura 17). Un dels plasmidis conté el constructe terapèutic flanquejat generalment per les dues ITRs del AAV de serotip 2, donat que és el serotip més ben caracteritzat (Samulski et al., 1982; Srivastava et al., 1983). El segon plasmidi aporta els gens *Rep* i *Cap* del genoma del AAV sense les ITRs. Per últim, el tercer plasmidi aporta les funcions adenovirals necessàries per a la replicació dels AAVs. Després de l'expressió i traducció de les proteïnes REP i VP, el constructe terapèutic flanquejat per les ITRs és replicat i les molècules de DNA monocadena són introduïdes a les càpsides de l'AAV (Figura 17).

A continuació, les partícules víriques són purificades a partir del lisat cel·lular i el medi de cultiu per centrifugació en un gradient de densitat (CsCl o iodixanol) i/o per cromatografia en columna. Les preparacions del vector purificat també poden contenir càpsides buides, la quantitat de les quals depèn de l'eficàcia d'empaquetament i del mètode de purificació (Ayuso et al., 2010b). El mètode de purificació que separa més eficientment les càpsides buides de les càpsides amb genoma encapsidat és la purificació per gradient de CsCl (Ayuso et al., 2010b; Scallan et al., 2006; Zolotukhin et al., 1999). En particular, el polietilenglicol (PEG) i el protocol de purificació en CsCl redueixen significativament les càpsides buides dels vectors AAVs i les impureses de DNA i proteïna, augmentant així la puresa de la preparació viral que en darrer terme resulta en una major transducció *in vivo* (Ayuso et al., 2010b).

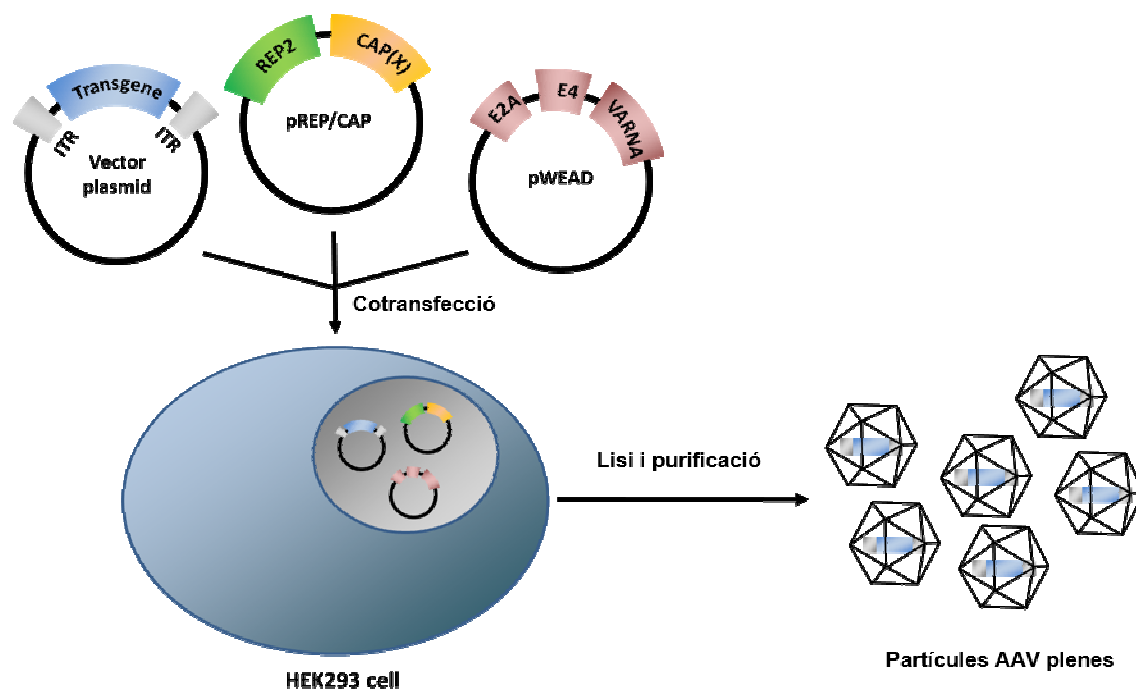


Figura 17. Producció dels AAV recombinants (rAAV) mitjançant triple transfecció. Per a la producció de rAAV ambdós ORFs virals són reemplaçats pel transgèn flanquejat per els senyals d'empaquetament virals (ITRs). Les proteïnes virals dels gens *Rep* i *Cap* són aportades en *trans* pel plasmidi *helper*. Les funcions del virus auxiliars són proporcionades mitjançant la transfecció d'un tercer plasmidi (pWEAD) que codifica pels gens adenovirals necessaris per a la producció dels AAV. Posteriorment, les partícules víriques són purificades a partir del lisat cel·lular per tal d'obtenir el major nombre de partícules AAV plenes. La representació esquemàtica no està feta a escala. (Adaptat de Ayuso et al. 2010b).

La Taula 2 descriu els principals serotips d'AAVs utilitzats en teràpia gènica. Aquest serotips es diferencien per les seqüències que codifiquen per les proteïnes de la càpsida (VP1, VP2 i VP3), que determinen l'afinitat d'unió amb els diferents receptors i co-receptors cel·lulars, conferint a cada serotip diferent tropisme tissular (Balakrishnan et al., 2014).

Taula 2. Característiques dels serotips AAV de l'1 al 10. Resum de l'origen de cada serotip d'AAV, els seus receptors i el seu tropisme tissular.

Serotip	Origen	Receptor i co-receptors	Tropisme tissular
AAV1	Humà o NHP	N-linked sialic acid	MS ^{1,2,3} , SNC ^{1,2} , vies aèries ^{1,2} , retina ¹ , pàncrees ¹ , cor ^{1,4} , fetge ¹
AAV2	Humà	HSPG, FGFR1, HGFR, LamR, CD9, integrina $\alpha_v\beta_5$, $\alpha_5\beta_1$,	MS ¹ , SNC ^{1,5} , fetge ¹ , ronyó ¹ , retina ^{1,2,3,6}
AAV3	Humà o NHP	HSPG, FGFR, HGFR, LamR	HCC ⁶ , MS ¹ , oïda interna, fetge ⁵
AAV4	NHP	O-linked sialic acid	SNC ¹ , retina ^{1,3} , pulmó ^{1,2} , ronyó ¹
AAV5	Humà	N-linked sialic acid, PDGFR	MS ¹ , SNC ^{1,3} , pulmó ¹ , retina ¹ , fetge
AAV6	Humà	HSPG, N-linked sialic acid	MS ^{1,3} , cor ^{1,3,4,7} , pàncrees ¹ , via respiratòria ^{1,2,3}
AAV7	Rhesus macaque	Desconegut	MS ¹ , retina ¹ , SNC ¹ , fetge ¹
AAV8	Rhesus macaque	LamR	Fetge ^{1,2,3} , SNC ^{1,2,3} , retina ^{1,3} , cor ¹ , MS ¹ , pàncrees ¹ , ronyó ¹ , teixit adipós ¹
AAV9	Humà	N-linked glycans, LamR	Fetge ¹ , cor ^{1,2,4} , MS ^{1,3} , pulmó ¹ , pàncrees ¹ , SNC ^{1,2} , retina ^{1,2} , testicles ¹ , ronyó ¹ , teixit adipós ¹
AAV10	NHP	Desconegut	Fetge
AAVrh10	Rhesus macaque	LamR	Fetge ¹ , cor ¹ , MS ^{1,3} , ronyó ¹ , SNC ^{1,8} , pàncrees ¹ , retina ¹ , ronyó ¹

Tropisme tissular a ¹ratolí, ²NHP, ³gos, ⁴porc, ⁵mono, ⁶ésser humà, ⁷ovella i ⁸rata.

Abreviacions: NHP, *non-human primate*; HSPG, *heparan sulfate proteoglycan*; LamR, 37/67 kDa *laminin receptor*; FGFR1, *fibroblast growth factor receptor 1*; HGFR, *hepatocyte growth factor receptor*; PDGFR, *platelet-derived growth factor receptor*; EGFR, *epidermal growth factor receptor*; MS, múscul esquelètic; SNS, sistema nerviós central; HCC, *hepatocellular carcinoma*. (Adaptat de Jimenez et al., 2013; Balakrishnan et al., 2014; Lisowski et al., 2015).

6.3. Transferència de gens al teixit adipós mitjançant vectors AAV

La transferència gènica ha demostrat ser una eina molt útil per a l'estudi de la sobreexpressió de gens, oferint els beneficis d'una aproximació amb una administració única que pot mediar efectes a llarg termini. En aquest sentit en els últims anys s'ha avaluat la manipulació genètica del teixit adipós mitjançant vectors adenoassociats a través de diverses vies d'administració.

En el nostre laboratori s'han testat diferents serotips de vectors adenoassociats per transduir el teixit adipós. Els serotips AAV8 i AAV9 són els que presenten una major transducció dels teixits adiposos, aconseguint la transducció de tots els dipòsits adiposos tant en ratolins sans com en obesos mitjançant la seva administració sistèmica (Jimenez et al., 2013). La via d'administració dels vectors AAVs pot

influenciar notablement en l'eficiència de transducció del dipòsit adipós. En concret, l'administració intra-dipòsit a l'eWAT, iWAT o iBAT, ha demostrat una eficient transducció dels adipòcits, superior a la mediada per l'administració intravenosa dels AAVs, i la modificació predominant del dipòsit injectat (Jimenez et al., 2013). Altres grups també han reportat que l'administració dels vectors AAV dels serotips 8 i 9 donen lloc a una robusta expressió dels adipòcits blancs i marrons en ratolins adults (Liu et al., 2014; O'Neill et al., 2014). A més, l'administració oral del serotip genèticament modificat Rec2, assoleix la transducció preferencial del teixit adipós marró (Huang et al., 2016).

Per tant, els vectors AAVs han demostrat ser una eina molt útil per a la manipulació genètica del teixit adipós, que pot ser utilitzada per estudis metabòlics i patofisiològics de malalties com la DT2 o l'obesitat. Específicament, l'administració al teixit adipós blanc epididimal amb l'AAV8 o AAV9 és l'estratègia que proporciona uns nivells superiors del factor en el teixit adipós i a més, en el cas de ser un factor secretable, també aconsegueix nivells alts de proteïna en sèrum.

6.4. Transferència de gens al fetge mitjançant vectors AAV

L'administració sistèmica de vectors AAV dona lloc a una elevada acumulació de partícules virals al fetge, degut al fet que aquest teixit rep el 25% de la sang que bombeja el cor (Vollmar et al., 2009). A més, els hepatòcits d'individus adults presenten una elevada longevitat, amb un 98% del total de cèl·lules en estat de quiescència (MacDonald et al., 1961), fet que aporta un important avantatge donat que els vectors AAV no són integratius, i així es minimitzen els efectes de dilució del vector (Kattenhorn et al., 2016).

Tot i que diversos serotips de vectors AAV han demostrat ser capaços de transduir el fetge (Taula 2), el vector AAV8 és el que ha mostrat una major transducció d'hepatòcits després de la seva administració sistèmica (Gao et al., 2002; Zincarelli et al., 2008; Wang et al., 2010).

D'altra banda, també s'ha de tenir en compte l'existència de promotors específics per fetge que promouen l'expressió del transgèn específicament en aquest òrgan, tot evitant l'expressió del transgèn en teixits no desitjats. En concret, la regió control del locus de la apolipoproteïna E (HCR) juntament amb el promotor de la α 1-antitripsina humana (hAAT), promouen nivells elevats de producció de proteïna

específicament al fetge (Miao et al., 2000; Davidoff et al., 2005). Altres grups han utilitzat altres promotors específics de fetge, com el promotor de la globulina d'unió a tiroxina (TBG) (Rouet et al., 1992; Wang et al., 2005).

Per tot això, els vectors AAVs han demostrat ser una eina molt útil per la manipulació genètica del fetge. Específicament, l'administració sistèmica amb l'AAV8 juntament amb la utilització de promotors específics de fetge com l'HCR/hAAT és l'estratègia que proporciona uns nivells superiors del transgèn d'interès en el fetge tot aconseguint nivells elevats de proteïnes secretables en sèrum.

III. OBJECTIUS

Estudis *in vitro* i *in vivo* a curt termini han demostrat que la proteïna morfogenètica òssia 7 (BMP7) és capaç de determinar cèl·lules mare mesenquimals al llinatge adipogènic, diferenciar preadipòcits a adipòcits marrons madurs i induir l'activitat termogènica del teixit adipós marró. Altres BMPs, com BMP4 o BMP2, han estat identificats com a inductors de l'adipogènesi dels adipòcits blancs. No obstant, fins al moment no s'ha estudiat si el BMP7 podria també tenir un paper semblant en l'adipogènesi del teixit adipós blanc i contribuir així a la millora de la sensibilitat a la insulina.

Per tant, l'objectiu general d'aquesta tesi doctoral va ser **estudiar el paper de BMP7 al teixit adipós blanc en models murins d'obesitat i de resistència a la insulina, per tal d'examinar la potencialitat d'aquest factor pel tractament d'aquestes malalties**. Aquest objectiu general es va subdividir en els següents objectius específics:

- 1. Estudiar els efectes locals de BMP7 al teixit adipós blanc a partir de la seva sobreexpressió en aquest teixit.**
 - 1.1. Dissenyar una estratègia de transferència gènica al teixit adipós blanc mitjançant vectors AAV que permeti augmentar l'expressió del transgèn específicament en aquest teixit.
 - 1.2. Estudiar els efectes de la sobreexpressió específica de BMP7 al teixit adipós blanc mitjançant vectors AAV en ratolins alimentats amb dieta estàndard, dieta alta en lípids o ratolins genèticament obesos ob/ob.
 - 1.3. Diferenciar els efectes autocrins/paracrins de la sobreexpressió de BMP7 al teixit adipós blanc dels efectes deguts a l'increment dels nivells circulants de BMP7 en ratolins obesos ob/ob.
- 2. Estudiar els efectes dels nivells circulants molt elevats de BMP7 en models murins d'obesitat i de resistència a la insulina.**

IV. RESULTATS

**Part-I. Estudi de l'efecte de la sobreexpressió de BMP7
específicament al teixit adipós**

***Part-IA: Expressió gènica específica de teixit mitjançant
AAVs: utilització de seqüències diana per a microRNAs
(miRTs)***

1. DISSENY I GENERACIÓ DEL VECTOR AAV PER A MEDIAR EXPRESSIÓ ESPECÍFICA DE BMP7 EN EL TEIXIT ADIPÓS MITJANÇANT SEQÜÈNCIES DIANA DE miRNAs

Per tal de dissenyar una estratègia per a transferir gens al teixit adipós mitjançant l'ús de vectors AAV8 o AAV9, és important dirigir l'expressió del transgèn al teixit diana i minimitzar l'expressió ectòpica en altres teixits. Tot i que l'administració sistèmica i local de vectors AAV8 o AAV9 resulta en una transducció molt eficient del eWAT en diferents models animals, el fetge i el cor dels individus injectats també resulten transduïts quan s'utilitzen promotors forts i ubics (Jimenez et al., 2013). Una manera d'aconseguir que l'expressió del transgèn estigui limitada a l'eWAT és mitjançant l'ús de promotors específics d'aquest teixit. No obstant, l'expressió dirigida per aquest tipus de promotor és més dèbil en comparació amb promotors d'origen viral, com el promotor híbrid basat en el promotor de la β -actina de pollastre i l'*enhancer* del Citomegalovirus (CAG). A més, en el cas concret del promotor mini-aP2 específic de teixit adipós, s'ha demostrat que aquest promou una expressió del transgèn molt inferior en comparació amb el CAG (Jimenez et al., 2013).

Una alternativa per a restringir l'expressió del transgèn al teixit d'interès és l'ús de promotors ubics forts conjuntament amb seqüències diana per microRNAs (miRNAs). Els miRNAs són petits RNAs no codificants, que tenen un paper regulador en el silenciament de gens a nivell post-transcripcional. En la seva forma madura, s'uneixen específicament a determinats mRNAs mitjançant el reconeixement de seqüències diana ubicades en les regions 3' no traduïdes (3'-UTRs) que són total o parcialment complementàries al miRNA, que porten a la destrucció dels mRNA, evitant així la seva posterior traducció (Kelly & Russell, 2009). El sistema de miRNAs pot emprar-se per a modular post-transcripcionalment l'expressió gènica del gen contingut en el casset d'expressió del vector AAV mitjançant el sistema endogen de miRNAs específics de teixit. Per a inhibir l'expressió del transgèn en els teixits no desitjats cal incorporar la seqüència diana d'un miRNA (miRT) específic d'aquell teixit en la regió 3'-UTR del constructe AAV (Kelly & Russell, 2009). Així, en administrar els vectors virals, es produeix la transducció de la cèl·lula i el DNA del vector viral es transcriu al nucli. Posteriorment, els transcrits es transporten al citoplasma on les seqüències diana per miRNAs del constructe es poden unir als corresponents miRNAs (Figura 18A). A continuació, Argonata2 (AGO2) s'uneix a aquest dúplex i ajuda a la formació del *MicroRNA-induced silencing complex* (miRISC) produint-se així el tall i posterior degradació del RNA de doble cadena i consegüentment del transgèn codificant dins

del cassat d'expressió. Si en la cèl·lula transduïda no està present el miRNA al que va dirigit la seqüència diana per miRNA codificant al cassat d'expressió, el mRNA és traduït a proteïna (Figura 18B).

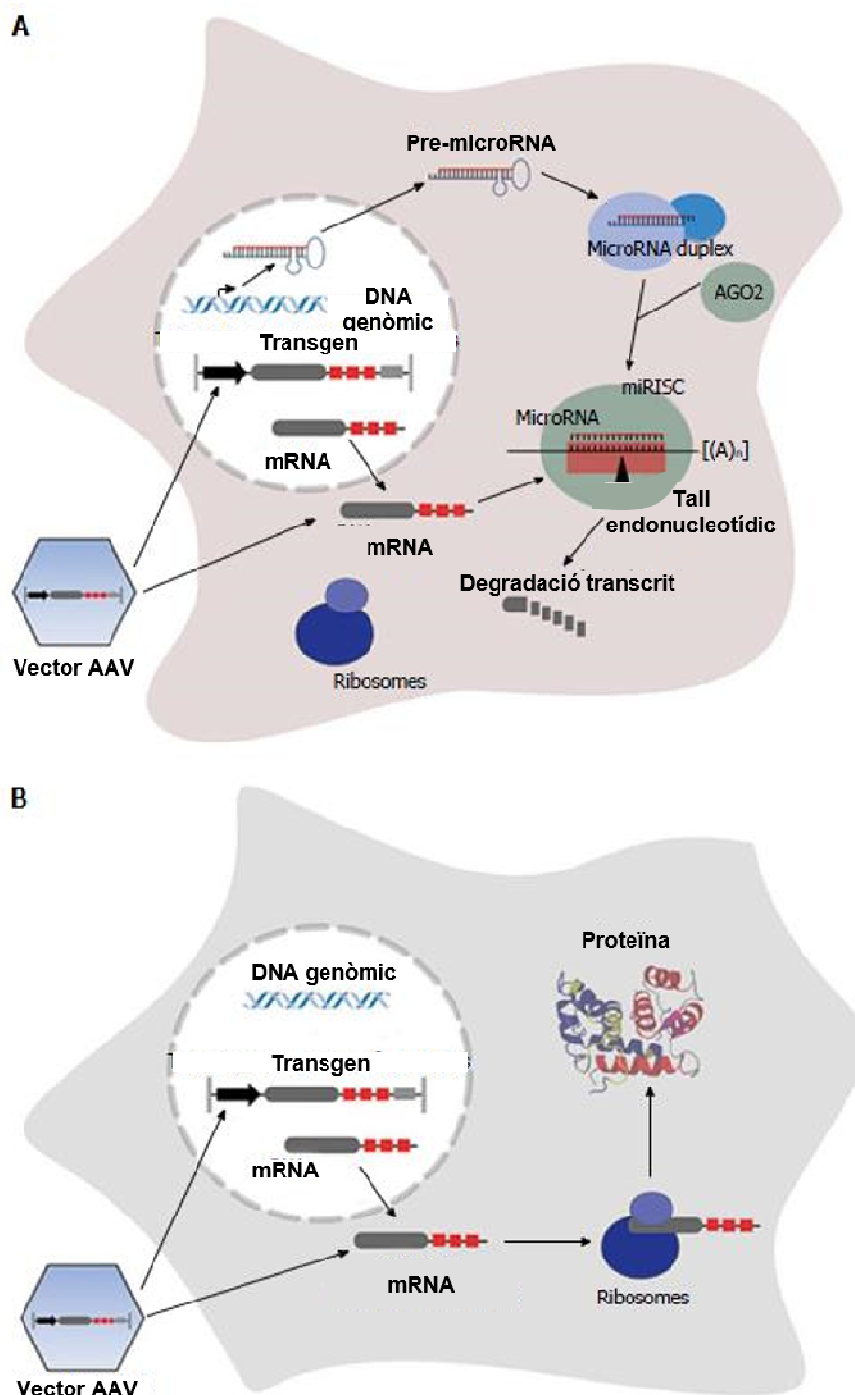


Figura 18. Principi de la supressió de l'expressió del transgèn mitjançant microRNAs en vectors virals. Després de la transducció de la cèl·lula, el DNA del vector viral es transcriu en el nucli. El transcrit que conté les seqüències diana per miRNAs (caixes vermelles) és transportat al citoplasma. Si el corresponent miRNA és expressat en aquella cèl·lula (**A**) s'uneix al miRISC i aquest RNA de doble cadena és tallat i degradat. Si el miRNA al que va dirigit el miRISC no s'expressa en aquest tipus cel·lular (**B**), el transcrit que codifica pel gen d'interès es traduït. AGO2: Argonaua2; miRISC: *MicroRNA-induced silencing complex* (Adaptat de Geisler et al., 2016).

Estudis sobre el perfil d'expressió dels miRNAs han mostrat l'existència de miRNAs que són altament expressats de manera selectiva en un teixit determinat (Shingara et al., 2005). Concretament, el miR122a és un miRNA específic de fetge (Chang et al., 2004; Lagos-Quintana et al., 2002) i el miR1 específic de cor i múscul esquelètic (Shingara et al., 2005; Sweetman et al., 2008; Trepel et al., 2015).

1.1. Anàlisi de l'expressió dels microRNA122a i microRNA1 en ratolins C57BL/6

Per a corroborar l'elecció del miR122a i miR1 com a microRNAs que presenten nivells elevats a fetge i cor, respectivament, i descartar la seva presència en el teixit adipós, es van mesurar els nivells del miR122a i miR1 en el fetge o en el cor i eWAT i iBAT de ratolins mascles C57BL/6 mitjançant RT-PCR.

Es van observar nivells elevats de miR122a al fetge i miR1 al cor respectivament, mentre que la seva presència a l'eWAT o a l'iBAT era indetectable o marginal (Figura 19A,B).

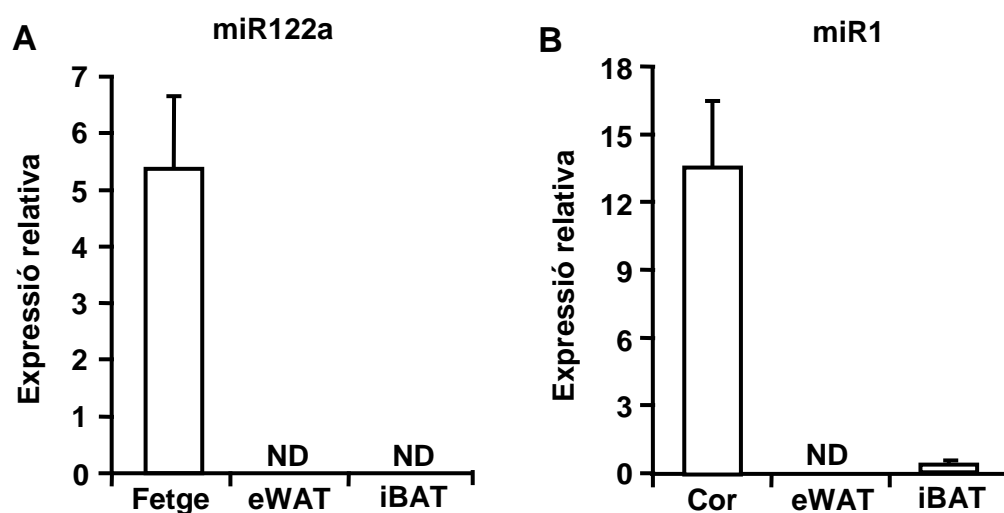


Figura 19. Quantificació dels nivells d'expressió del microRNA122a i del microRNA1 a fetge, cor, teixit adipós blanc i marró. Els nivells d'expressió del microRNA122a (miR122a) (A) i el microRNA1 (miR1) (B) es van quantificar mitjançant RT-PCR en mostres d'extracte de fetge, cor, eWAT i iBAT de ratolins mascles C57BL/6. ND: No detectat. Els resultats s'expressen com la mitjana \pm EEM. $n=4$ animals per grup.

Així, les seqüències diana d'aquests microRNAs es podrien emprar per a modular el tropisme dels AAVs i aconseguir expressió del transgèn específicament al teixit adipós i evitar la seva expressió a fetge i cor.

1.2. Construcció de vectors virals adenoassociats que codifiquen per la proteïna GFP en presència de seqüències diana per miR122a i/o miR1

Amb l'objectiu d'avaluar l'expressió específica a teixit adipós de la proteïna fluorescent verda (GFP) i el bloqueig de l'expressió (*detargeting*) a fetge i cor, es van generar varis constructes per a la producció de vectors AAV. Amb aquesta finalitat, es va utilitzar un promotor ubic fort que permetés aconseguir nivells elevats d'expressió del transgèn i al mateix temps pogués transduir el major nombre possible d'adipòcits. Específicament, es va escollir el promotor ubic CAG. Per tal de bloquejar l'expressió de GFP a teixits no desitjats com el fetge i el cor, es van incorporar a la regió 3'-UTR del constructe 4 còpies de la seqüència diana del microRNA-122a (miRT122a), i/o 4 còpies de la seqüència diana del microRNA-1 (miRT1). Així, es van generar diversos vectors plasmídics per a avaluar els efectes de la presència, absència o combinació dels miRT122a i miRT1 en l'expressió de GFP en el teixit adipós, fetge o múscul esquelètic. Aquests plasmidis es van anomenar: pAAV-CAG-GFP, pAAV-CAG-GFP-miRT122a, pAAV-CAG-GFP-miRT1 i pAAV-CAG-GFP-miRT122a-miRT1 (Brown et al., 2007; Cotugno et al., 2012; Jimenez et al., 2013; Karali et al., 2011). Per tal de simplificar la nomenclatura del constructe, es va fer servir el terme dmiRT per fer referència a la presència conjunta dels miRTs 122a i 1 en la regió 3'-UTR (pAAV-CAG-GFP-dmiRT) (Figura 20).

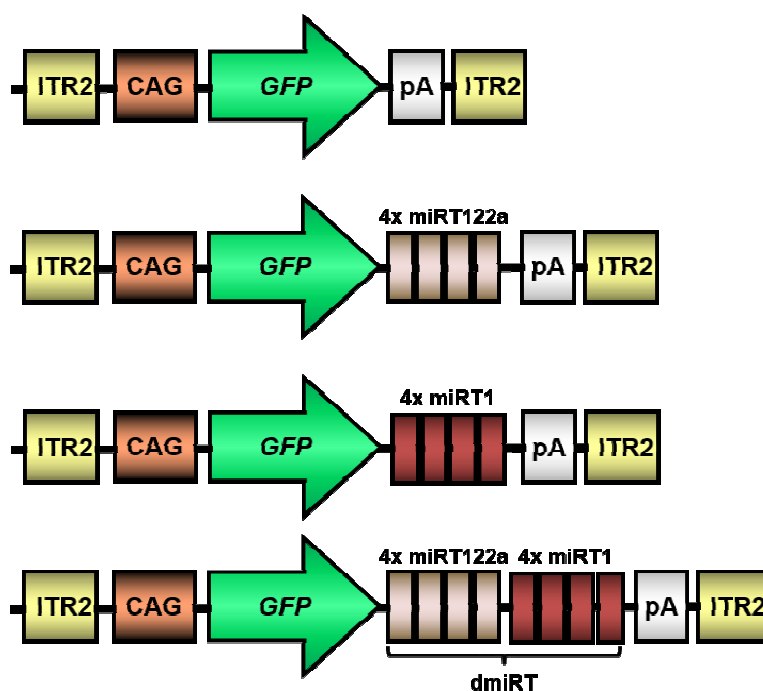


Figura 20. Representació esquemàtica dels constructes AAV codificants per GFP per a estudiar l'expressió específica al teixit adipós i el *detargeting* en fetge i cor mitjançant les seqüències diana dels miR122a i miR1. Col·lecció de cassets d'expressió que codifiquen per la proteïna marcadora GFP: pAAV-CAG-GFP, pAAV-CAG-GFP-miR122a, pAAV-CAG-GFP-miR1 i pAAV-CAG-GFP-dmiRT. ITR2: *Inverted Terminal Repeats* de AAV2; CAG: promotor híbrid basat en el promotor de la β -actina de pollastre i l'*enhancer* del Citomegalovirus; GFP: seqüència del gen GFP; 4xmiR122a: seqüència diana del microRNA de fetge 122a (4 còpies); 4xmiR1: seqüència diana del microRNA de cor 1 (4 còpies); pA: poli A, seqüència de poliadenilació. La forma abreujada dmiRT fa referència a les seqüències diana dels dos microRNAs 122a i 1. Els constructes no estan representats a escala.

1.3. Comprovació de la funcionalitat dels miRTs 122a i 1 *in vitro* i *in vivo*

Abans de produir els vectors virals AAV-CAG-GFP, AAV-CAG-GFP-miR122a, AAV-CAG-GFP-miR1 i AAV-CAG-GFP-dmiRT, es va verificar la capacitat dels miRTs incorporats al cassette d'expressió per a bloquejar l'expressió de GFP en cèl·lules en cultiu amb una elevada producció de miR122a i miR1.

Per tal d'avaluar el bloqueig de l'expressió de GFP mediada per les seqüències diana del miR1 es van fer servir cèl·lules C2C12. Aquesta és una línia immortalitzada de mioblasts de ratolí que proliferen ràpidament en condicions d'elevada concentració de sèrum, i es diferencien i fusionen en miotubs en condicions de baixa concentració de sèrum. A més, s'ha descrit que les cèl·lules C2C12 expressen el microRNA1 i que els nivells d'expressió d'aquest microRNA augmenten a mesura que avança la diferenciació cel·lular assolint la màxima expressió a dia 6 de diferenciació (Kang et al., 2012). Així, amb l'objectiu de comprovar el *detargeting* mediat pel miR1, es van transfectar cèl·lules C2C12 amb pAAV-CAG-GFP-miR1 i pAAV-CAG-GFP-dmiRT i es

va induir el procés de diferenciació d'aquestes cèl·lules. Com a control positiu es van transfectar també cèl·lules amb el vector pAAV-CAG-GFP per tal de comparar els nivells d'expressió regulats per l'efecte de la seqüència diana del microRNA1 en el constructe (Figura 21A).

Després de 6 dies de la transfecció i d'haver induït la diferenciació a miotubs, es va aïllar el mRNA de les cèl·lules i es van quantificar els nivells d'expressió de *GFP* mitjançant RT-PCR. Els resultats van permetre observar una marcada sobreexpressió de *GFP* en les cèl·lules C2C12 transfectades amb el vector pAAV-CAG-GFP. No obstant, la presència de les seqüències diana del microRNA1 soles o juntament amb les del miRT122a en els constructes plasmídics pAAV-CAG-GFP-miRT1 i pAAV-CAG-GFP-dmiRT va provocar una marcada disminució en l'expressió de *GFP* en comparació amb els nivells obtinguts a partir del constructe pAAV-CAG-GFP (Figura 21A). Aquests resultats validaven l'ús de la seqüència diana del microRNA1 per a disminuir els nivells d'expressió de *GFP* en cèl·lules musculars amb elevats nivells de miR1.

La línia cel·lular majoritàriament emprada per a l'estudi *in vitro* del teixit hepàtic són les cèl·lules HepG2, derivades d'un carcinoma hepatocel·lular, però aquestes cèl·lules no expressen el microRNA122a (Jopling et al., 2005). Per tant, per tal d'estudiar l'efecte de la presència del miRT122a, i així poder avaluar l'expressió de *GFP* i la funcionalitat de la seqüència diana del microRNA122a, es va dur a terme un estudi a fetge *in vivo* mitjançant la injecció hidrodinàmica dels plasmidis pAAV-CAG-GFP-miRT122a i pAAV-CAG-GFP-dmiRT en ratolins.

L'administració hidrodinàmica per la vena de la cua (*HTV injection*) d'una solució de DNA plasmídic és una eina molt valuosa per a la transferència de gens al fetge del ratolí. Consisteix en una injecció ràpida en aproximadament 5 segons d'una solució fisiològica que conté el DNA plasmídic en un volum equivalent al 8-10% del pes corporal del ratolí. Aquesta tècnica va ser descrita per primera vegada fa més d'una dècada (Liu et al., 1999; Zhang et al., 1999) i des d'aleshores ha esdevingut un mètode molt comú per a la validació *in vivo* de constructes d'expressió a fetge així com per a altres aplicacions. D'aquesta manera, ratolins de 8 setmanes d'edat van ser administrats per mitjà de la injecció hidrodinàmica per la vena de la cua amb els constructes pAAV-CAG-GFP-miRT122a i pAAV-CAG-GFP-dmiRT. Com a control positiu es va fer servir el pAAV-CAG-GFP (Figura 21B).

A les 24 hores post-administració, es va extreure el fetge, es va aïllar el mRNA i es van quantificar els nivells d'expressió de *GFP* mitjançant RT-PCR. Els resultats van mostrar que la presència de la seqüència diana del microRNA122a en els constructes pAAV-CAG-GFP-miRT122a o pAAV-CAG-GFP-dmiRT era capaç de bloquejar molt eficientment l'expressió de *GFP* en el fetge dels ratolins. En canvi, en els animals injectats amb el vector pAAV-CAG-GFP es va obtenir una marcada sobreexpressió de *GFP* en aquest teixit (Figura 21B). Aquests resultats indicaven que els plasmidis pAAV-CAG-GFP-miRT122a i pAAV-CAG-GFP-dmiRT eren funcionals en el teixit adipós i validaven l'ús de les seqüències diana del microRNA122a per disminuir els nivells d'expressió de *GFP* a les cèl·lules hepàtiques.

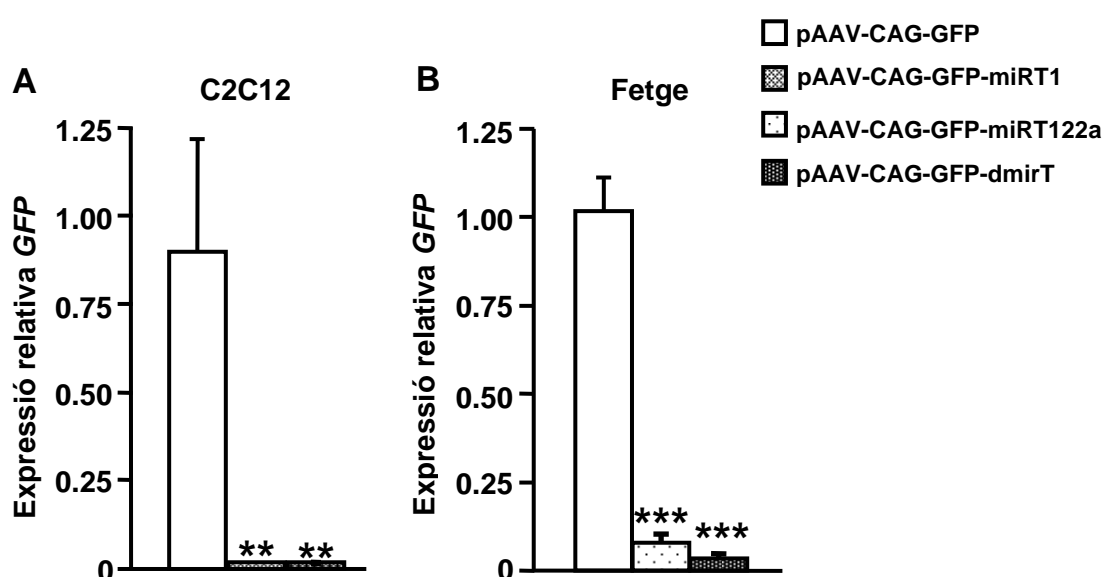


Figura 21. Determinació dels nivells d'expressió de *GFP* i comprovació de la funcionalitat de les seqüències miRT122, miRT1 i dmiRT dels constructes plasmídics pAAV-CAG-GFP, pAAV-CAG-GFP-miRT1, pAAV-CAG-GFP-miRT122a i pAAV-CAG-GFP-dmiRT. (A) Quantificació dels nivells d'expressió de *GFP* 6 dies post-transfecció i post-inducció del procés de diferenciació de les cèl·lules C2C12. (B) Quantificació dels nivells d'expressió de *GFP* al fetge 24h post-injecció hidrodinàmica de 20 µg de DNA en ratolins. Valors expressats en unitats arbitràries equivalents als resultats de la RT-PCR normalitzats pel gen *Rplp0*. Els resultats s'expressen com la mitjana ± EEM. n= 3 pous per condició (A) o 4-5 animals mascles per grup (B). **p<0.01, ***p<0.001 vs pAAV-CAG-GFP.

1.4. Producció dels vectors AAV codificants per GFP

Un cop validada l'expressió dels constructes tant *in vitro* com *in vivo*, es va procedir a la producció dels vectors AAV de serotip 9 o 8, AAV9-CAG-GFP, AAV9-CAG-GFP-miRT122a, AAV9-CAG-GFP-miRT1 i AAV9-CAG-GFP-dmiRT, o AAV8-CAG-GFP i AAV8-CAG-GFP-dmiRT. Tots els vectors virals es van produir utilitzant el sistema de triple transfecció en cèl·lules HEK293 i van ser posteriorment purificats i quantificats, tal i com s'especifica en l'apartat de Material i Mètodes.

2. ADMINISTRACIÓ INTRA-eWAT DE VECTORS AAV REGULATS PEL miRT122A I miRT1 QUE CODIFIQUEN PER GFP EN RATOLINS C57BL/6

Amb l'objectiu de valorar l'eficiència dels vector AAV9-CAG-GFP-dmiRT per mediar una transducció robusta del teixit adipós i alhora reduir la producció de proteïna GFP al fetge i al cor, es van administrar intra-eWAT ratolins C57BL/6 mascles de 8 setmanes d'edat amb els següents vectors: AAV9-CAG-GFP, AAV9-CAG-GFP-miRT122a, AAV9-CAG-GFP-miRT1 i AAV9-CAG-GFP-dmiRT a una dosi de 2×10^{11} genomes virals (vg) per animal. A més, per tal de comparar la potència del promotor específic de teixit adipós mini/aP2 en relació al promotor ubic CAG, també es va administrar el vector AAV9-aP2-GFP-WPRE a la mateixa dosi. Aquest constructe representa una alternativa per a tenir una expressió específica del gen d'interès al teixit adipós. Dues setmanes després de l'administració, es van sacrificar els animals i es van obtenir mostres d'eWAT, fetge i cor per a quantificar els nivells proteics de GFP en aquests teixits (Figura 22). Atès que AAV9 i AAV8 havien estat descrits com els dos serotips que millor transduïen el teixit adipós (Jimenez et al., 2013), un cop validada l'estratègia, es va repetir l'estudi injectant AAV8-CAG-GFP i AAV8-CAG-GFP-dmiRT.

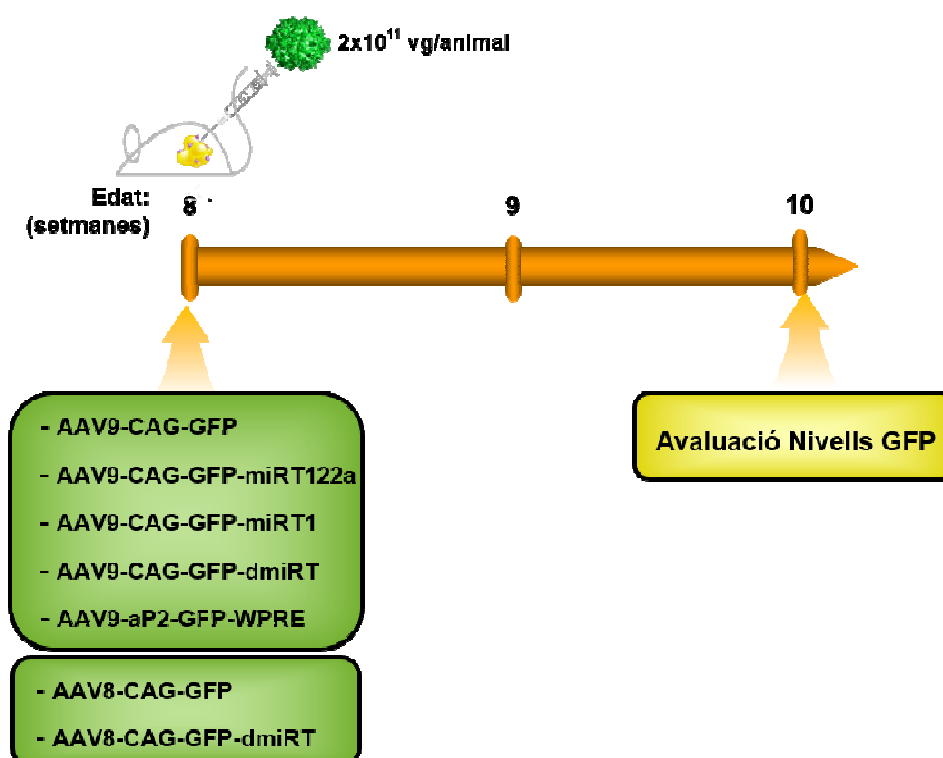


Figura 22. Disseny experimental de l'administració intra-eWAT de vectors virals AAV9 i AAV8 codificants per GFP. Administració intra-eWAT de 2×10^{11} genomes virals (vg) dels vectors virals i) AAV9-CAG-GFP, AAV9-CAG-GFP-miRT122a, AAV9-CAG-GFP-miRT1, AAV9-CAG-GFP-dmiRT i AAV9-aP2-GFP-WPRE; o ii) AAV8-CAG-GFP i AAV8-CAG-GFP-dmiRT en ratolins C57BL/6 mascles de 8 setmanes d'edat. Els animals es van sacrificar 2 setmanes post-injecció i es van analitzar els nivells de GFP.

2.1. Anàlisi immunohistoquímic de GFP en teixit adipós, fetge i cor

L'anàlisi immunohistoquímic contra GFP a eWAT va mostrar nivells elevats de GFP en els adipòcits en tots els animals administrats amb els vectors AAV9-CAG-GFP, AAV9-CAG-GFP-miRT1, AAV9-CAG-GFP-miRT122a i AAV9-CAG-GFP-dmiRT, en comparació amb el grup control injectat amb el vector AAV9-aP2-GFP-WPRE, en els quals els nivells de GFP eren molt inferiors (Figura 23). A més, l'àrea transduïda de l'eWAT era similar entre els quatre grups que expressaven GFP sota el control del promotor CAG. Aquest fet corroborava la no interferència de les seqüències miRT122a i miRT1 en l'expressió del transgèn en aquest teixit (Figura 23). Quan es va avaluar la senyal de GFP en el fetge, només es van detectar nivells elevats de GFP en els animals injectats amb els vectors AAV9-CAG-GFP i AAV9-CAG-GFP-miRT1. En canvi, els animals que van ser administrats amb els vectors que contenien les seqüències diana del microRNA 122a (AAV9-CAG-GFP-miRT122a i AAV9-CAG-GFP-dmiRT) van presentar una senyal per GFP similar a l'obtinguda en els animals injectats amb el vector AAV9-aP2-GFP-WPRE (Figura 23). Així mateix, la senyal per GFP a cor es va detectar en els grups administrats amb AAV9-CAG-GFP i AAV9-CAG-GFP-miRT122a, mentre que no es va observar senyal en cap dels animals injectats amb AAV9-CAG-GFP-miRT1 o AAV9-CAG-GFP-dmiRT (Figura 23).

Per tant, l'AAV9-CAG-GFP-dmiRT demostrava ser un vector que permetia transduir de forma eficient els adipòcits blancs i bloquejar la producció de proteïna del transgèn d'interès a fetge i cor.

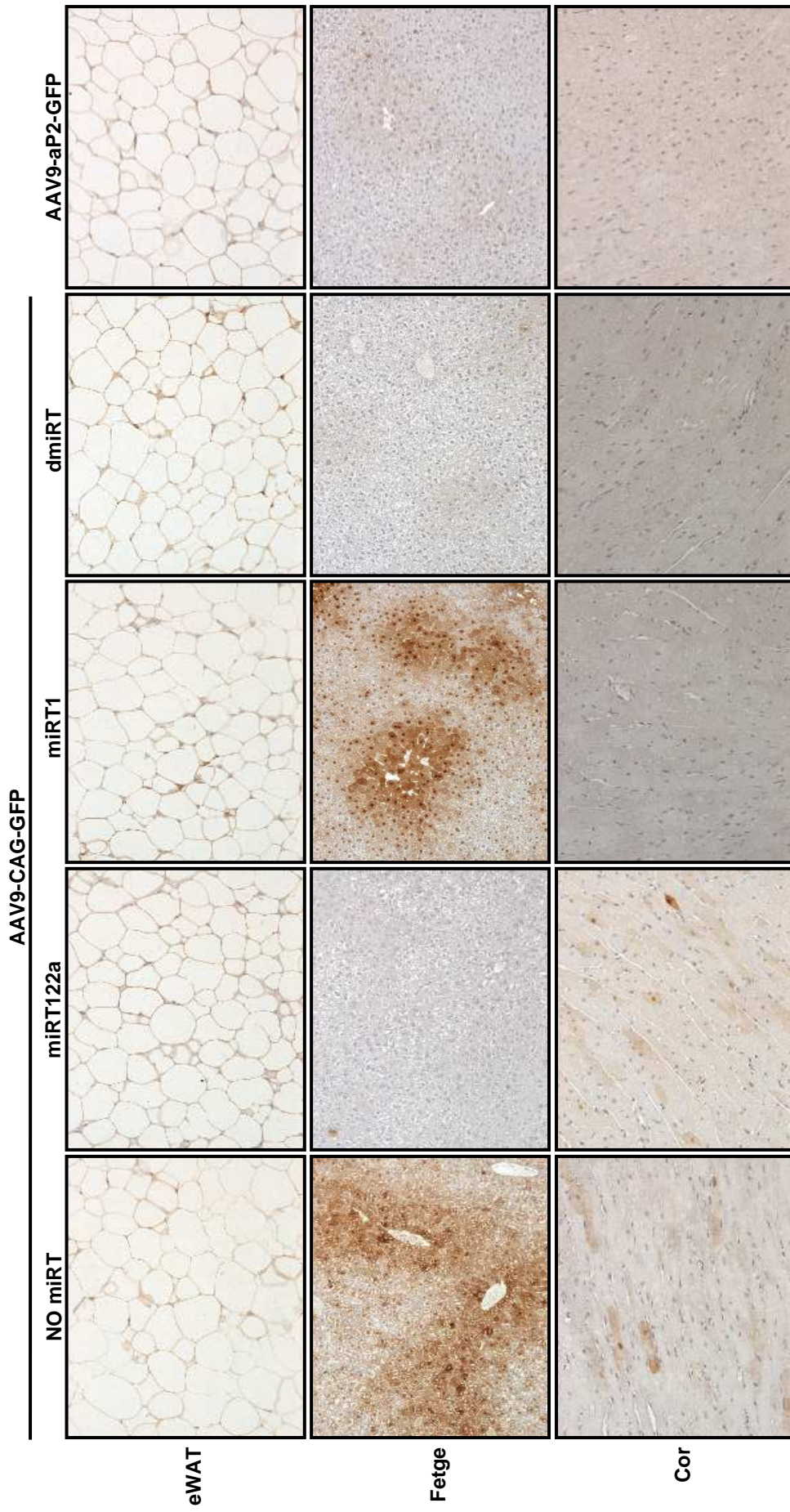


Figura 23. Transducció eficient dels adipòcits i detargeting del transgèn en el fetge i cor per les seqüències miRT després de l'administració intra-eWAT de vectors AAV9. Anàlisi immunohistoquímica contra GFP (marró) en el eWAT, fetge, i cor dos setmanes post-administració intra-eWAT de 2×10^{11} vg de vectors AAV9-CAG-GFP, AAV9-CAG-GFP-miRT122, AAV9-CAG-GFP-miRT1, AAV9-CAG-GFP-dmiRT o AAV9-aP2-GFP-WPRE. Magnificació original x100 (fetge) i x200 (cor i eWAT).

A continuació, també es va examinar la capacitat dels vectors AAV8 per transduir l'eWAT. Així, es van administrar 2×10^{11} vg de vectors AAV8-CAG-GFP o AAV8-CAG-GFP-dmiRT en ratolins C57BL/6.

Tal i com s'havia observat amb el vector AAV9, l'anàlisi immunohistoquímic contra GFP a eWAT d'animals administrats localment en aquest teixit amb AAV8-CAG-GFP o AAV8-CAG-GFP-dmiRT va mostrar una senyal contra GFP elevada en tots dos grups, fet que corroborava novament la no interferència de les seqüències miRT122a i miRT1 en l'expressió del transgèn al teixit adipós (Figura 24). En canvi, quan es va avaluar el senyal de GFP en el fetge i el cor, només es va detectar producció de GFP en els animals injectats amb els vectors AAV8-CAG-GFP, confirmant l'efecte bloquejador de l'expressió dels miRT122a i miRT1 (Figura 24).

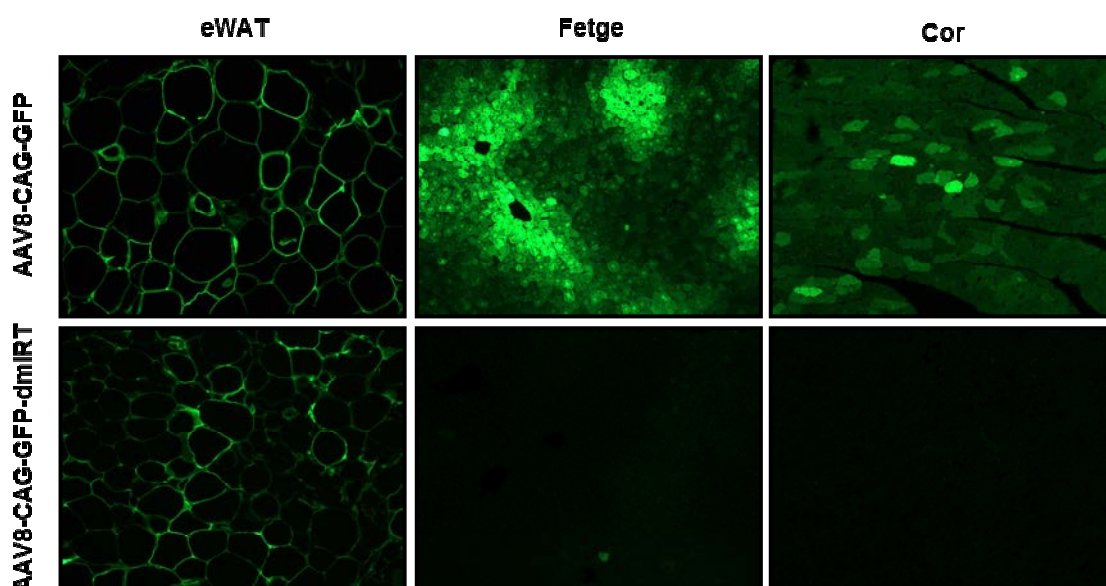


Figura 24. Transducció eficient dels adipòcits i *detargeting* del transgèn en el fetge i cor per les seqüències miRT després de l'administració intra-eWAT de vectors AAV8. Anàlisi immunohistoquímic contra GFP (verd) en l'eWAT, el fetge, i el cor dues setmanes post-administració intra-eWAT de 2×10^{11} vg de vectors AAV8-CAG-GFP o AAV8-CAG-GFP-dmiRT. Magnificació original x100 (fetge) i x200 (cor i eWAT).

2.2. Avaluació dels nivells proteics de GFP mitjançant Western Blot

Per a determinar amb més detall el bloqueig de l'expressió (*detargeting*) mediat per les seqüències miRT, es van quantificar els nivells de GFP en eWAT, fetge i cor mitjançant anàlisi per Western Blot (WB) de proteïnes obtingudes dels teixits esmentats, tal i com s'especifica a Materials i Mètodes.

Tant en el revelat de la pel·lícula fotogràfica com en la posterior quantificació dels Western Blots d'eWAT, s'observava un increment significatiu similar dels nivells de GFP en tots els animals administrats amb els vectors AAV9-CAG-GFP, AAV9-CAG-GFP-miRT1, AAV9-CAG-GFP-miRT122a o AAV9-CAG-GFP-dmiRT, en comparació amb el grup control injectat amb el vector AAV9-aP2-GFP-WPRE (Figura 25A). Aquests resultats demostraven que el vector AAV9-CAG-GFP-dmiRT era capaç de mediar nivells de traducció similars al vector AAV9-CAG-GFP, essent significativament més elevats que els del constructe amb el promotor específic de teixit adipós mini-aP2 (Figura 25A).

Per tal de validar l'eficiència del miRT122a per reduir la presència de transcrit i la seva posterior traducció en el fetge també es van avaluar els nivells proteics de GFP en aquest teixit mitjançant WB. En aquest cas, només es van detectar nivells elevats de GFP en els animals injectats amb els vectors AAV9-CAG-GFP i AAV9-CAG-GFP-miRT1 (Figura 25B). Tal i com s'observava a la imatge i en la posterior quantificació dels WB, els grups administrats amb vectors que contenien les seqüències diana dels microRNA122a (AAV9-CAG-GFP-miRT122a i AAV9-CAG-GFP-dmiRT) presentaven uns nivells de GFP similars als del grup AAV9-aP2-GFP-WPRE (Figura 25B).

Així mateix, en avaluar la intensitat de la banda corresponent a GFP en els WB de cor es va observar un elevat contingut de la proteïna en els grups administrats amb AAV9-CAG-GFP i AAV9-CAG-GFP-miRT122a, mentre que pràcticament no s'observava senyal en cap dels grups administrats amb vectors que codificaven per les seqüències miRT1 (AAV9-CAG-GFP-miRT1 i AAV9-CAG-GFP-dmiRT). Tampoc es va observar senyal en el cor dels animals tractats amb el vector que contenia el promotor específic de teixit adipós mini-aP2 (Figura 25C).

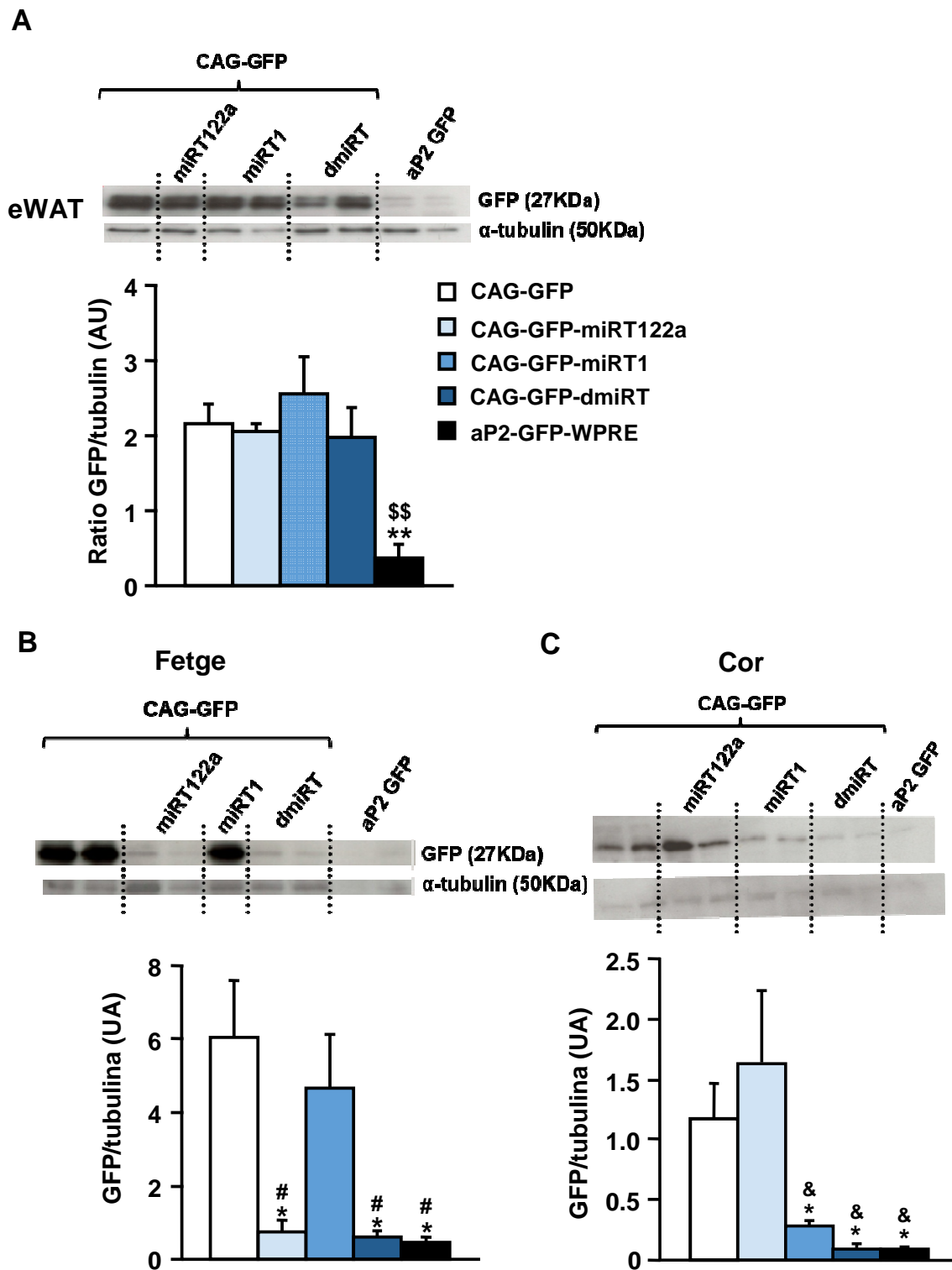


Figura 25. Anàlisi per Western blot del contingut de GFP en el teixit adipós blanc, fetge i cor després de l'administració intra-eWAT de vectors AAV9-GFP. (A-C) Western blot (WB) contra GFP i tubulina, com a control de carrega, en extractes d'eWAT (A), fetge (B) i cor (C) 2 setmanes post-administració intra-eWAT de 2×10^{11} vg de vectors AAV9-CAG-GFP, AAV9-CAG-GFP-miRT122a, AAV9-CAG-GFP-miRT1, AAV9-CAG-GFP-dmiRT o AAV9-aP2-GFP-WPRE. En la part superior de cada panell es mostra una imatge representativa d'una membrana de WB revelada i a la part inferior es mostra la quantificació del contingut de GFP en cadascú dels teixits analitzats. UA: Unitats arbitràries. Els resultats s'expressen com la mitjana \pm EEM. $n = 4-5$ animals per grup. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs pAAV-CAG-GFP; \$\$\$ $p < 0.01$ vs pAAV-CAG-GFP-dmiRT; # $p < 0.05$ vs pAAV-CAG-GFP-miRT1; & $p < 0.05$ vs pAAV-CAG-GFP-miRT122a.

Per tant, la quantificació dels nivells proteics de GFP en l'eWAT, fetge i cor va demostrar la capacitat dels vectors AAV8-CAG-GFP-dmiRT i AAV9-CAG-GFP-dmiRT per mediar nivells tant elevats al teixit adipós com els que aconseguia el vector sense les seqüències diana pels microRNAs 122a i 1. Convé destacar que, l'ús de les seqüències diana pels miR122a i miR1 impedia la traducció al fetge i cor, reduint els nivells proteics en aquests teixits de manera similar al que s'observava quan s'emprava el promotor específic de teixit adipós aP2. A més, l'administració dels vectors que presentaven les seqüències diana pels microRNAs122a i microRNA1 tant conjuntament com per separat, demostraven la no interacció d'aquestes seqüències diana tant en la sobreexpressió en el teixit adipós com en el bloqueig post-transcripcional en el fetge i el cor.

Per tant, aquest estudi demostrava que els vectors virals AAV8 i AAV9 que expressaven el transgèn d'elecció sota el control del promotor ubic CAG conjuntament amb la regulació mitjançada per de les seqüències dmiRT, constituïa una estratègia eficient per a la transferència gènica al teixit adipós blanc, ja que bloquejava la producció del transgèn al fetge i al cor.

***Part-IB: Efectes de la sobreexpressió de BMP7 en el
teixit adipós blanc de ratolins alimentats amb dieta alta
en lípids***

Un cop demostrada l'eficient transducció del teixit adipós mitjançant vectors AAV8 i AAV9, i el *detargeting* de fetge i cor gràcies a la incorporació de les seqüències miRT122a i miRT1 en el casset d'expressió, es va fer servir aquesta estratègia de transferència gènica per a sobreexpressar BMP7 específicament a l'eWAT i estudiar els seus efectes a nivell local en aquest teixit. A més, ja que estava demostrada la capacitat de l'eWAT de secretar proteïnes d'interès després de la seva transducció amb AAVs (Jimenez et al., 2013), aquesta estratègia també permetria estudiar els efectes sistèmics produïts per l'augment dels nivells circulants de BMP7.

En ratolins l'obesitat pot ser induïda mitjançant l'alimentació amb una dieta alta en lípids (HFD) (Surwit et al., 1998). Encara que l'augment de pes pot ser evident en poc més d'una setmana després de l'inici de la dieta, sovint es requereix un període de temps més llarg per a induir un augment de pes pronunciat (8 setmanes o més) (Winzell et al., 2004). L'increment de pes en aquest model està associat amb resistència a la insulina i deficiències en el metabolisme de la glucosa, tot i que normalment no es desenvolupa una diabetis tipus 2 oberta (Almind et al., 2004; Surwit et al., 1995).

Així, en la Part-IB dels Resultats d'aquesta tesi doctoral es va avaluar la sobreexpressió específica l'eWAT de BMP7 a llarg termini, mitjançant l'administració intra-eWAT de vectors AAV en ratolins alimentats amb HFD.

1. CONSTRUCCIÓ I PRODUCCIÓ DEL VECTOR AAV9-CAG-BMP7-dmiRT

En primer lloc, es va generar un vector AAV capaç de dirigir l'expressió del cDNA de BMP7 optimitzat al teixit adipós, gràcies al promotor ubic CAG i a les seqüències miRT122a i miRT1 (pAAV-CAG-BMP7-dmiRT). L'optimització de la seqüència del transgèn, va consistir principalment en l'ús de codons específics per tRNAs per a la cèl·lula l'hoste on es vol sobreexpressar-lo, per així millorar la síntesi proteica sense canviar la seqüència aminoacídica (Bell et al., 2016). A més, també es va generar un segon constructe que estava format pels mateixos elements reguladors, però sense cap seqüència codificant per BMP7 i que es faria servir com a vector control (pAAV-CAG-NUL) (Figura 26).

Els vectors AAV9 amb aquests constructes es van produir utilitzant el sistema de triple transfecció en cèl·lules HEK293 i van ser posteriorment purificats i quantificats, veure Materials i Mètodes.

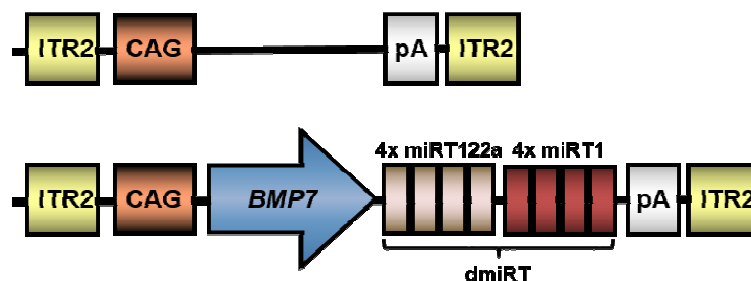


Figura 26. Representació esquemàtica del constructe AAV per a sobreexpressar BMP7 específicament en el teixit adipós. En la part superior de la figura es mostra la representació esquemàtica del constructe control que no codificava per cap transgèn i estava format pel promotor ubic CAG (pAAV-CAG-NUL). En la part inferior es mostra el constructe que codificava per la seqüència optimitzada de BMP7 sota el control del promotor CAG i amb la presència de les seqüències diana dels miR122a i miR1 (pAAV-CAG-BMP7-dmiRT). ITR2: *Inverted Terminal Repeats* de AAV2; CAG: promotor híbrid basat en el promotor de la β -actina de pollastre i l'*enhancer* del Citomegalovirus; BMP7: seqüència optimitzada del CDS murí per BMP7; 4 x miRT122a: seqüència diana pel microRNA de fetge 122a (4 còpies); 4 x miRT1: seqüència diana pel miRNA de cor 1 (4 còpies); pA: poli A, seqüència de poliadenilació. La forma abreviada dmiRT fa referència a les seqüències diana dels dos miR122a i miR1. Els constructes no estan representats a escala.

2. ESTUDI DELS EFECTES DE LA SOBREEXPRESSIONI LOCAL DE BMP7 EN L'eWAT

Un cop generat el vector AAV9-BMP7-dmiRT, es va estudiar si la seva administració intra-eWAT en ratolins alimentats amb dieta estàndard (chow) o HFD produïa efectes a nivell local i si era capaç de prevenir el desenvolupament d'obesitat i la resistència a la insulina. Amb aquest objectiu, es van administrar intra-eWAT ratolins mascles C57BL/6 de 8 setmanes d'edat amb una dosi de 10^{12} vg de AAV9-BMP7-dmiRT. Aquesta dosi de vectors AAV permetia la transducció de la majoria dels adipòcits del teixit. Tres dies després de l'administració dels AAV, la meitat de cada grup d'animals es va sotmetre a una HFD fins al final de l'experiment. Com a control, es van utilitzar ratolins mascles C57BL/6 administrats també per via intra-eWAT amb la mateixa dosi del vector AAV9-NUL. A continuació, es va fer un seguiment fins a les 19 setmanes d'edat del pes, glicèmia i ingesta dels animals. Un cop finalitzat el seguiment, es van analitzar els teixits a nivell histològic i d'expressió de gens clau, i a més es van avaluar diferents paràmetres sèrics (Figura 27).

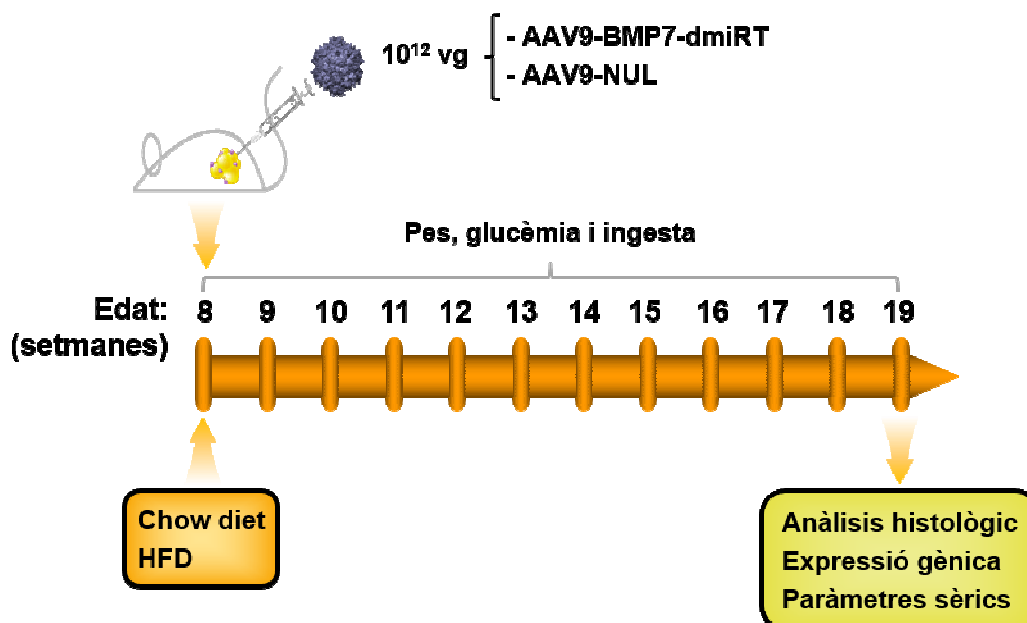


Figura 27. Disseny experimental de l'administració intra-eWAT de vectors AAV que expressaven BMP7 específicament en teixit adipós. Administració intra-eWAT de 10¹² vg dels vector virals AAV9-BMP7-dmiRT i AAV9-NUL en ratolins C57BL/6 mascles de 8 setmanes d'edat. La meitat dels animals (n=19) es van sotmetre a una HFD tres dies després de l'administració dels AAVs i fins a la finalització de l'experiment, la resta (n=18) va seguir alimentant-se amb dieta estàndard (chow). Es va dur a terme un seguiment setmanal de pesos, glucèmies i ingesta. Els animals es van sacrificar a les 19 setmanes d'edat i es van avaluar diferents paràmetres sèrics, els teixits a nivell histològic i els nivells d'expressió de gens clau.

2.1. Avaluació del pes, ingesta d'aliments, glucèmia i insulínemia en els animals tractats amb AAV9-CAG-BMP7-dmiRT

Tot i que es van observar diferències clares en el pes i el guany de pes dels animals alimentats amb HFD respecte als chow, no es van observar canvis entre els grups tractats intra-eWAT amb la mateixa dosis dels vectors AAV9-BMP7-dmiRT i AAV9-NUL dintre de cada condició (Figura 28A). Així mateix, la ingesta dels animals alimentats amb HFD era superior als alimentat amb chow, però no es van observar diferències entre grups injectats amb AAV9-BMP7-dmiRT o AAV9-NUL (Figura 28B). Per tal d'avaluar el possible efecte de BMP7 en el metabolisme de la glucosa, es va determinar la glicèmia i la insulínemia en el sèrum dels animals al finalitzar l'experiment, a les 19 setmanes d'edat. No es van observar diferències en aquests paràmetres entre el grup AAV9-NUL i AAV9-BMP7-dmiRT en els animals alimentats amb dieta estàndard ni alta en lípids (Figura 28C-D).

Aquests resultats semblaven indicar que la producció local de BMP7 al teixit adipós no millorava l'obesitat i tampoc contrarestavava la resistència a la insulina associades a la ingesta d'una HFD.

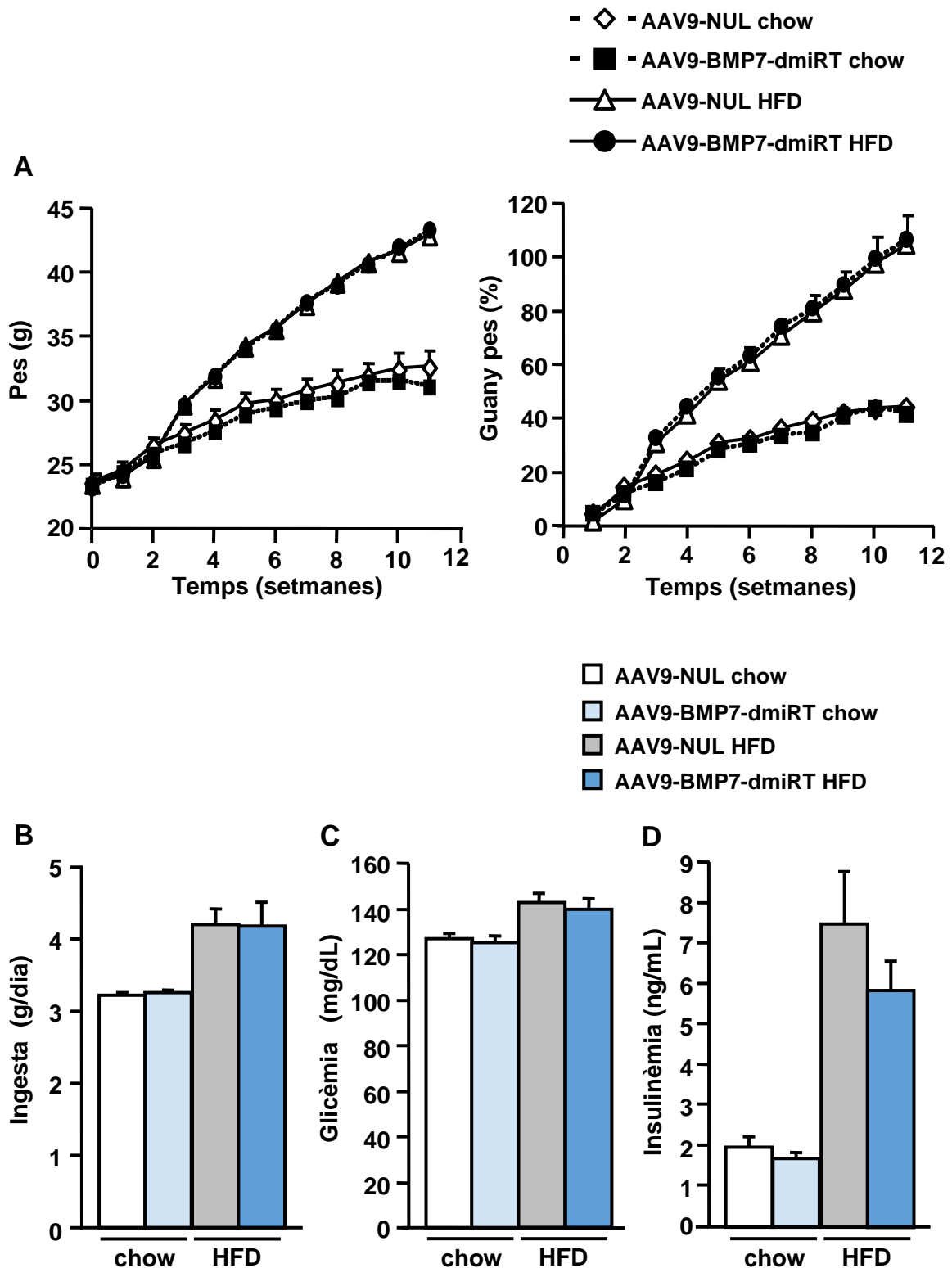


Figura 28. Avaluació del pes, ingesta, glucèmia i insulinèmia en els animals tractats intra-eWAT amb vectors AAV9 que expressaven BMP7 específicament en teixit adipós i alimentats amb dieta estàndard o alta en lípids. Ratolins mascles C57BL/6 de 8 setmanes d'edat es van tractar intra-eWAT amb 10^{12} vg dels vectors AAV9-BMP7-dmiRT o AAV9-NUL i es van alimentar amb dieta estàndard (chow) o dieta alta en lípids (HFD) durant 11 setmanes. **(A)** Evolució del pes en grams (g) o en guany de pes (% respecte el pes inicial). **(B)** Mitjana de la ingesta d'aliments dels diferents grups experimentals al llarg de les 11 setmanes post-AAV. **(C-D)** Glicèmia (C) i insulinèmia (D) en alimentació dels mateixos grups a les 11 setmanes post-AAV. Els resultats s'expressen com la mitjana \pm EEM. $n=7-10$ animals/grup.

2.2. Expressió de BMP7 en els teixits metabòlics dels animals administrats amb AAV9-CAG-BMP7-dmiRT

En finalitzar l'estudi, a les 19 setmanes d'edat, es va comprovar la sobreexpressió de *BMP7* en diferents teixits metabòlics, concretament en el eWAT, el teixit adipós blanc inguinal (iWAT), el iBAT i el marginal fetge (Figura 29A). L'eWAT, teixit on es van administrar els vectors, dels animals tractats amb els vectors AAV9-BMP7-dmiRT, mostrava elevats nivells d'expressió de *BMP7*. També es va observar una expressió important en l'iWAT i una expressió baixa en l'iBAT i el fetge. Els animals administrats amb AAV9-NUL no presentaven nivells d'expressió de *BMP7*. A continuació, donat que el BMP7 és una proteïna secretable, es van quantificar els seus nivells circulants mitjançant ELISA i es va determinar un augment considerable en el grup d'animals administrats amb AAV9-BMP7-dmiRT en comparació als AAV9-NUL, tant en chow com en HFD (Figura 29B). Aquest increment era similar en els animals alimentats amb chow o HFD, ja que tots els animals es van administrar amb la mateixa dosi del vector AAV9-BMP7 (Figura 29B).

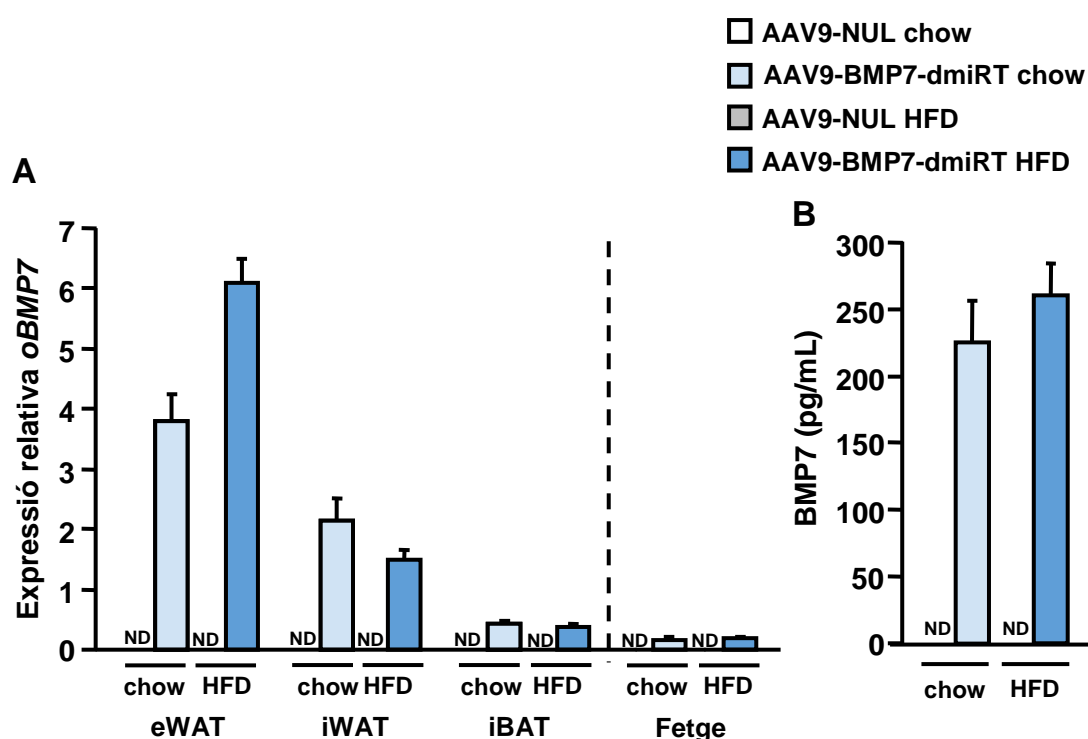


Figura 29. Nivells d'expressió de *BMP7* en teixit adipós blanc, marró i fetge i nivells circulants de *BMP7*. Ratolins mascles C57BL/6 de 8 setmanes d'edat es van tractar intra-eWAT amb 10^{12} vg dels vectors AAV9-BMP7-dmiRT o AAV9-NUL i es van alimentar amb dieta estàndard (chow) o dieta alta en lípids (HFD) durant 11 setmanes. **(A)** Nivells d'expressió de *BMP7* optimitzat (*oBMP7*) en eWAT, iWAT, iBAT i fetge 11 setmanes post-AAV mesurats per RT-PCR i normalitzats per *Rplp0*. **(B)** Nivells sèrics de *BMP7* 11 setmanes post-AAV. ND: no detectat. Els resultats s'expressen com la mitjana \pm EEM. n=7 animals/grup.

2.3. Anàlisi de l'adipogènesi en els teixits adiposos blanc i marró

Donat que l'augment dels nivells d'expressió de *BMP7* en els teixits adiposos i considerant el paper del factor *BMP7* en l'adipogènesi del teixit adipós marró (Tseng et al., 2008) i d'altres factors de la mateixa família en d'adipogènesi del teixit adipós blanc (Huang et al., 2009; Suenaga et al., 2013), es va estudiar a continuació si es produïa un increment en l'adipogènesi dels diferents teixits adiposos.

2.3.1. Anàlisi histològic dels teixits adiposos

Es va valorar a nivell microscòpic la morfologia dels teixits adiposos mitjançant tinció hematoxilina/eosina (Figura 30). Així, es va observar una marcada disminució de la mida dels adipòcits en l'eWAT i l'iWAT en el grup AAV9-BMP7-dmiRT tant en els animals alimentats amb chow com HFD respecte al grup AAV9-NUL (Figura 30). Per contra, no es van detectar canvis aparents en la mida dels adipòcits de l'iBAT entre els grups AAV9-NUL i AAV9-BMP7-dmiRT (Figura 30).

Tot i que prèviament s'havia descrit que *BMP7* indueix l'adipogènesi del teixit adipós marró, aquests resultats indicaven que quan l'administració de l'AAV-BMP7 es duia a terme localment en el teixit adipós blanc, l'adipogènesi del marró no es veia afectada (Figura 30), encara que s'observava un augment de l'expressió de *BMP7* local a l'iBAT i els nivells circulants de *BMP7* estaven incrementats (Figura 29B). Probablement, aquest increment de *BMP7* no era suficient per induir l'adipogènesi en aquest teixit. La reducció de la mida dels adipòcits es donava només en eWAT i iWAT, els teixits on es van observar nivells d'expressió de *BMP7* més elevats (Figura 29A).

Per confirmar que la mida dels adipòcits blancs era inferior en el grup tractat intra-eWAT amb AAV9-BMP7-dmiRT respecte al grup AAV9-NUL, es va realitzar una quantificació de l'àrea dels adipòcits de l'eWAT a partir d'imatges de la tinció d'hematoxilina/eosina de seccions d'aquest teixit. Aquesta determinació va corroborar que efectivament, l'àrea mitja dels adipòcits blancs era menor en el grup AAV9-BMP7-dmiRT respecte al grup AAV9-NUL, tant en animals alimentats en chow com en HFD (Figura 31A). A més, la distribució de l'àrea dels adipòcits va mostrar clarament un augment del nombre d'adipòcits petits i una disminució dels adipòcits més grans en el grup AAV9-BMP7-dmiRT respecte al AAV9-NUL tant en chow com en HFD (Figura 31B). A més a més, el grup AAV9-BMP7-dmiRT alimentat amb HFD presentava un perfil i una àrea mitja d'adipòcits semblant a la del grup tractat amb AAV9-NUL i alimentat amb chow (Figura 31B).

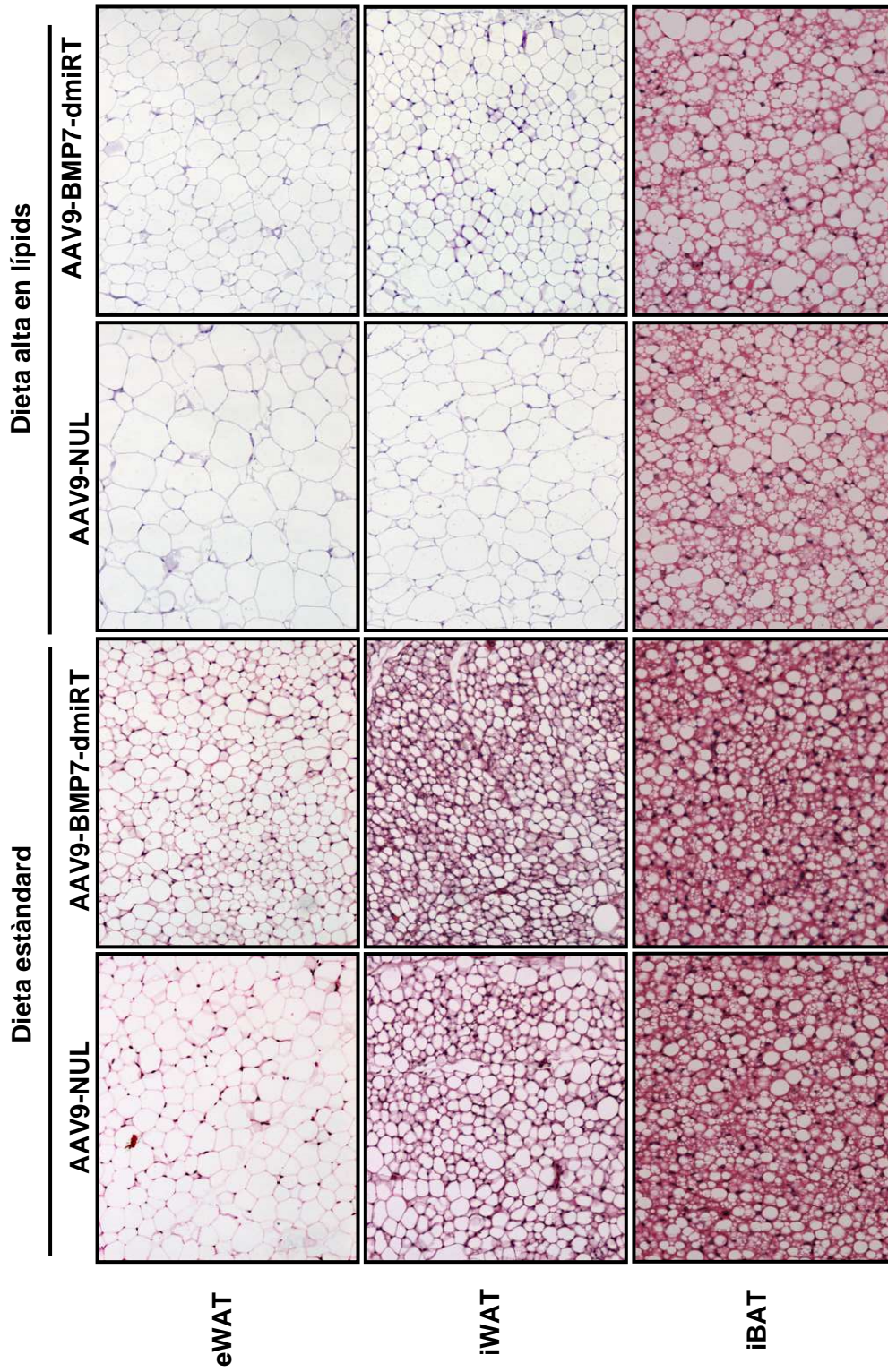


Figura 30. Anàlisi histològic dels teixits adiposos dels animals tractats intra-eWAT amb vectors AAV9 que expressaven BMP7 específicament en el teixit adipós. Tinció hematoxilina/eosina de seccions d'eWAT, iWAT i iBAT 11 setmanes post-administració intra-eWAT de 10^{12} vg de vectors AAV9-NUL o AAV9-BMP7-dmiRT en ratolins C57BL/6 alimentats amb dieta estàndard o dieta alta en lípids. Magnificació original x200.

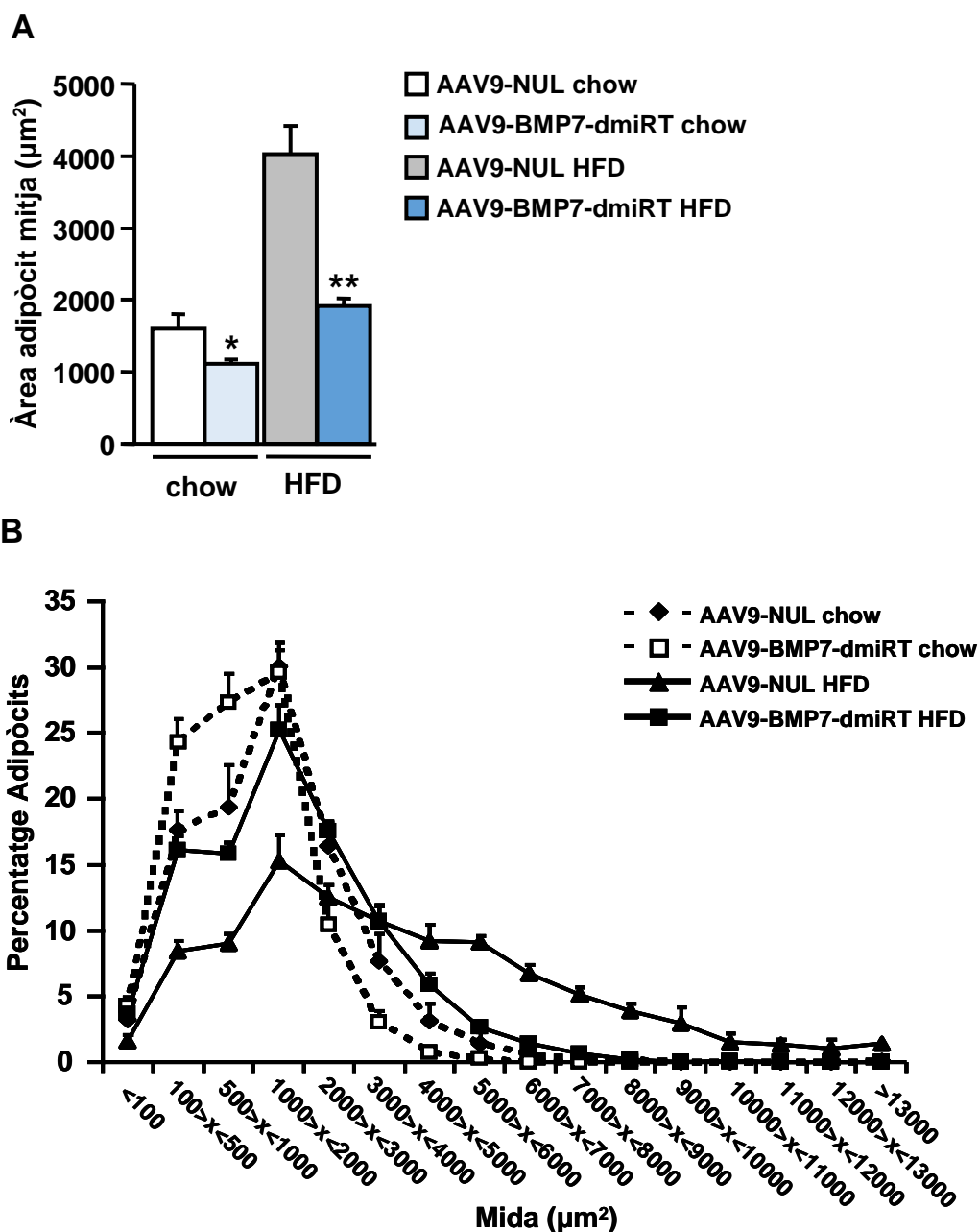


Figura 31. Quantificació de l'àrea dels adipòcits blancs dels animals tractats intra-eWAT amb vectors AAV9 que expressaven BMP7 específicament en el teixit adipós. (A) Àrea mitjana dels adipòcits blancs de l'eWAT 11 setmanes post-administració intra-eWAT de 10^{12} vg de vectors AAV9-NUL o AAV9-BMP7-dmiRT en ratolins C57BL/6 alimentats amb dieta estàndard (chow) o dieta alta en lípids (HFD). (B) Distribució de freqüències de l'àrea dels adipòcits en els mateixos grups experimentals. Dades representades com la mitjana \pm EEM. $n=4-10$ animals/grup. * $p<0.05$, ** $p<0.01$ vs AAV9-NUL.

En avaluar el teixit adipós blanc dels animals tractats amb AAV9-BMP7 es va evidenciar que la mida dels adipòcits era considerablement més petita tant en chow com en HFD, i que es produïa un increment de l'adipogènesi en aquests teixits.

2.4. Anàlisi de l'activació i la biogènesis mitocondrial en el teixit adipós marró

S'ha descrit que el BMP7 és un inductor de l'activitat del teixit adipós marró promovent la biogènesis mitocondrial i augmentant la termogènesis (Tseng et al., 2008). Per això, en aquest estudi donat que s'observava un increment en l'expressió del BMP7 a l'iBAT es van avaluar gens involucrats en aquests processos. Així, es va analitzar l'expressió de gens involucrats en la termogènesis (*UCP1*, *CIDEA*), en la biogènesis mitocondrial (*PGC1 α*), i en el transport d'àcids greixosos (*CD36* i *CPT1 α*) (Figura 32). Es van observar alguns canvis estadísticament significatius en la inducció de *CD36*, *CPT1 α* i *PGC1 α* en el grup tractat amb AAV9-BMP7-dmiRT en HFD, però no es va observar un fenotip clar i així com tampoc hi havia canvis en *UCP1*. Per tant, aquests resultats indicaven que no es produïa una inducció de l'activitat del teixit adipós marró, tot i els nivells locals i circulants incrementats de BMP7.

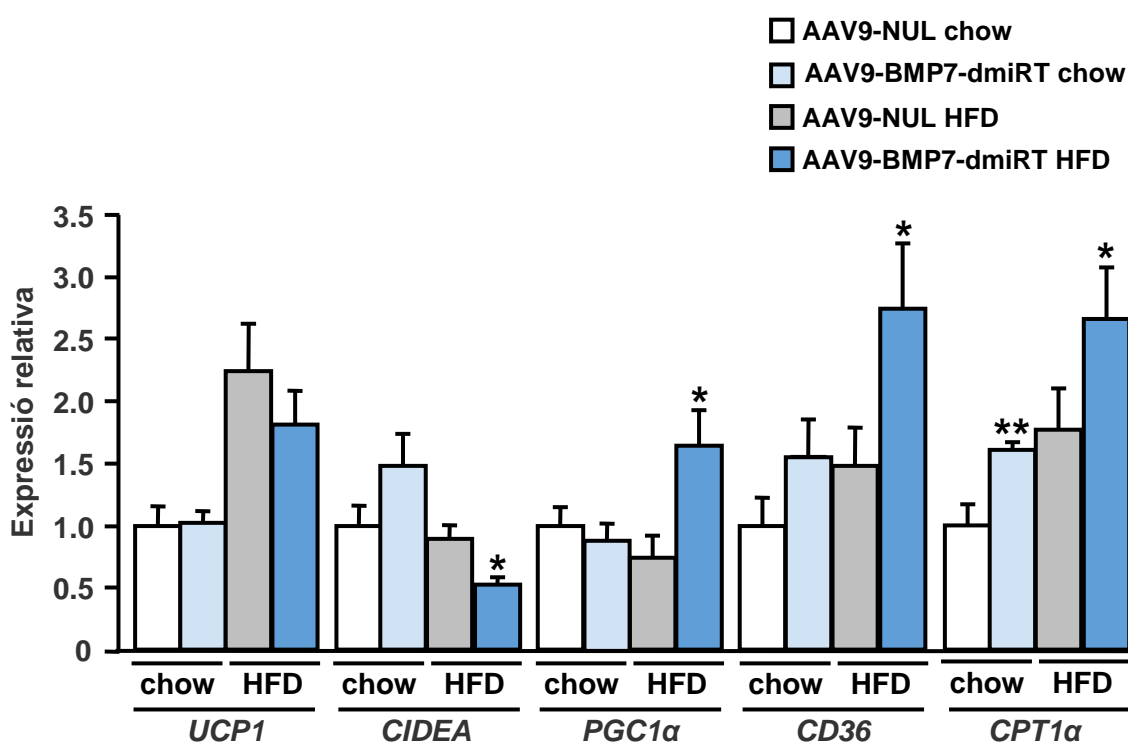


Figura 32. Nivells d'expressió de gens involucrats en l'activitat termogènica del teixit adipós marró en animals tractats intra-eWAT amb vectors AAV9 que expressaven BMP7 específicament en el teixit adipós. Anàlisi per RT-PCR dels nivells d'expressió d'*UCP1*, *CIDEA*, *PGC1 α* , *CD36* i *CPT1 α* en l'iBAT. Els anàlisis es van dur a terme 11 setmanes post-administració intra-eWAT de 10^{12} vg de AAV9-BMP7-dmiRT o AAV9-NUL en ratolins C57BL/6 alimentats amb dieta estàndard (chow) o dieta alta en lípids (HFD). Els resultats s'expressen com la mitjana \pm EEM. n=7 animals/grup. *p<0.05, **p<0.01 vs AAV8-CAG-NUL.

Aquest estudi demostrava que l'administració a l'eWAT dels vectors AAV9-BMP7-dmiRT era capaç de promoure la disminució de la mida dels adipòcits blancs així com també un increment en l'adipogènesi de l'eWAT i l'iWAT, teixits on BMP7 es sobreexpressava considerablement. D'altra banda, tot i induir l'augment dels nivells circulants de BMP7, no s'observava una reducció del pes corporal ni l'augment de la termogènesi del teixit adipós marró, efectes descrits per altres grups en incrementar els nivells circulants de BMP7 mitjançant l'administració sistèmica d'Ad-BMP7. Per tant, era necessari realitzar un estudi més exhaustiu dels efectes locals mediat pel factor BMP7 en el teixit adipós blanc per tal de comprendre millor el paper del BMP7 *in vivo* en aquest teixit en models obesos.

Part-IC. Estudi dels efectes de la sobreexpressió de BMP7 en el teixit adipós epididimal de ratolins ob/ob

Un cop observat l'augment de l'adipogènesi al teixit adipós blanc resultant de la sobreexpressió a llarg termini de *BMP7* en el eWAT de ratolins C57BL/6 alimentats amb HFD, es va decidir fer un estudi més extens en un altre model d'obesitat i resistència a la insulina, el ratolí ob/ob.

El ratolí ob/ob presenta una obesitat severa provocada per una mutació inactivadora espontània en el gen de la leptina. Aquesta mutació autosòmica recessiva va ser originalment detectada a una soca no consanguínia i posteriorment es va retrocreuar amb la soca C57BL/6J (Castracane et al., 2007). El seu fenotip és complex, exhibeix un augment de pes, fàcilment detectable a partir de les dues setmanes d'edat, acompanyat d'una hipertròfia del teixit adipós i d'una elevada acumulació de triglicèrids al fetge (Kim et al., 2007; Lindström, 2007; Wang et al., 2014). Aquests animals presenten altres alteracions tals com disminució de la taxa metabòlica, hiperinsulinèmia, disfunció de la termogènesis, hiperlipidèmia i infertilitat (Kim et al., 2007; Lindström, 2007; Wang et al., 2014).

Per tant, en la Part-IC d'aquesta tesi doctoral es van estudiar els efectes de la sobreexpressió a llarg termini de *BMP7* a l'eWAT, mitjançant l'administració de vectors AAV-CAG-BMP7-dmiRT en ratolins ob/ob.

1. GENERACIÓ DEL VECTOR AAV8-CAG-BMP7-dmiRT

El vector AAV9 és capaç de travessar la barrera hematoencefàlica (BHE) i arribar al cervell al injectar-se sistèmicament a dosis elevades en ratolins (Ruzo et al., 2012). No obstant, no vam detectar transducció del cervell després d'administrar intra-eWAT el vector AAV9-BMP7 en els estudis de la Part-IB (dades no mostrades). Per tal d'evitar una possible transducció del cervell, en aquesta part de l'estudi es va decidir utilitzar vectors AAV de serotip 8, que també havien mostrat una alta capacitat de transduir el teixit adipós (Figura 24) i no poden travessar la BHE. Es van utilitzar els constructes pAAV-CAG-NUL i pAAV-CAG-BMP7-dmiRT, prèviament descrits (Figura 26), per a generar vectors AAV del serotip 8 (AAV8-CAG-BMP7-dmiRT i AAV8-CAG-NUL) i es van emprar aquests vectors pels subseqüents experiments.

2. ESTUDI DELS EFECTES DE LA SOBREEXPRESSIÓ DE *BMP7* EN L'eWAT DE RATOLINS *ob/ob*

Per tal d'estudiar si la sobreexpressió a llarg termini de *BMP7* en un altre model murí d'obesitat severa induïa l'augment de l'adipogènesi del teixit adipós blanc, tal i com s'havia observat en la Part-IB, i si també era capaç de reduir el guany de pes, millorar la sensibilitat a la insulina i/o activar el teixit adipós marró, ratolins mascles *ob/ob* d'11 setmanes d'edat van ser administrats intra-eWAT amb una dosi de 10^{12} vg/animal de AAV8-CAG-BMP7-dmiRT. Com a control es van utilitzar ratolins mascles *ob/ob* administrats també per via intra-eWAT a la mateixa dosi amb el vector viral AAV8-CAG-NUL. A continuació, es va fer un seguiment del pes, glucèmia i ingesta fins les 24 setmanes d'edat i es van dur a terme proves metabòliques com el test de la tolerància a la insulina (ITT) o el test de tolerància a la glucosa (GTT). Un cop finalitzat el seguiment, els animals es van sacrificar i es van disseccionar diversos teixits adiposos i no adiposos pel seu estudi (Figura 33).

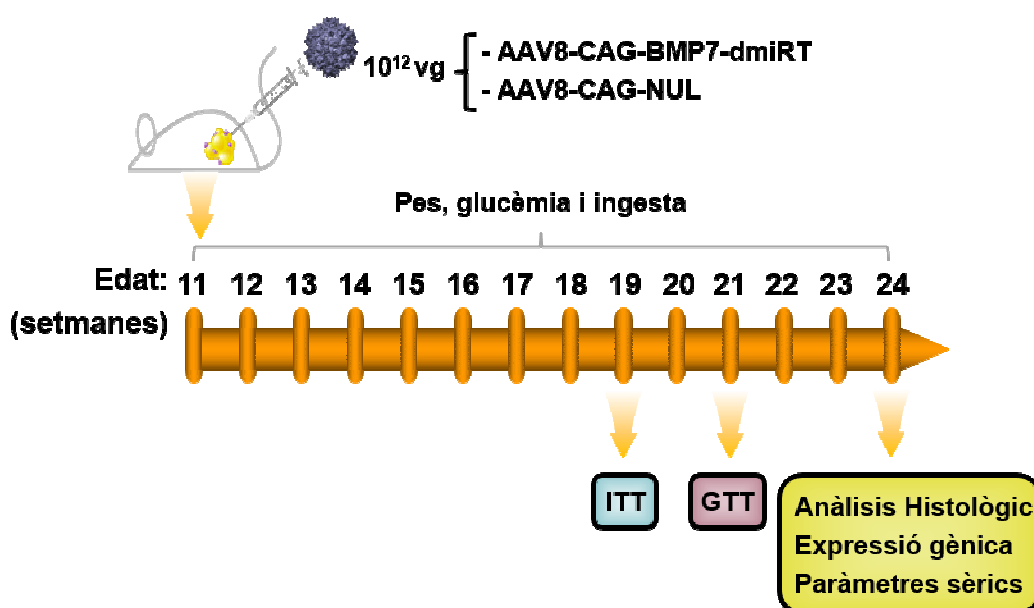


Figura 33. Disseny experimental. Ratolins *ob/ob* mascles d'11 setmanes d'edat es van tractar intra-eWAT amb 10^{12} vg dels vectors virals AAV8-CAG-BMP7-dmiRT o AAV8-CAG-NUL. Els animals es van sotmetre a un seguiment setmanal de pesos, ingesta d'aliments i glucèmies i també a un test de la tolerància a la insulina (ITT) i un test de tolerància a la glucosa (GTT) a les 19 i 21 setmanes d'edat, respectivament. A les 24 setmanes d'edat es van sacrificar els animals i es van disseccionar diversos teixits pel seu posterior anàlisi. Es van analitzar també els nivells d'expressió de *BMP7* i d'altres gens que participen en el procés de *browning* i en l'adipogènesi. A més, també es van determinar diversos paràmetres sèrics com nivells de *BMP7*, insulina o adiponectina.

2.1. Seguiment del pes i ingesta d'aliments i determinació dels pesos dels teixits en els ratolins ob/ob tractats amb AAV8-CAG-BMP7-dmiRT

Per tal d'avaluar si l'administració dels vectors AAV8-CAG-BMP7-dmiRT en comparació amb AAV8-CAG-NUL tenia efectes en el pes dels animals ob/ob, es va fer un seguiment setmanal des de l'administració dels vectors fins al sacrifici, des de les 11 setmanes fins les 24 setmanes d'edat. Així, es va observar que el grup tractat amb AAV8-CAG-BMP7-dmiRT mostrava un sorprenent augment de pes respecte als animals tractats amb els vectors AAV8-CAG-NUL (Figura 34A-C). Per tal de determinar si els canvis en el pes eren deguts a variacions en la ingesta d'aliments, aquest paràmetre també es va quantificar cada setmana. Es va observar que tot i haver un lleuger increment en la ingesta per part dels animals administrats amb AAV8-CAG-BMP7-dmiRT (Figura 34D), l'augment de pes era molt important. Això semblava indicar que era poc probable que fos el resultat només del lleuger increment en la ingesta d'aliments (Figura 34D), sinó que probablement era el resultat de l'augment de la eficiència alimentària, és a dir, guany de pes/Kcal consumides, per part del grup tractat amb AAV8-CAG-BMP7-dmiRT (Figura 34E).

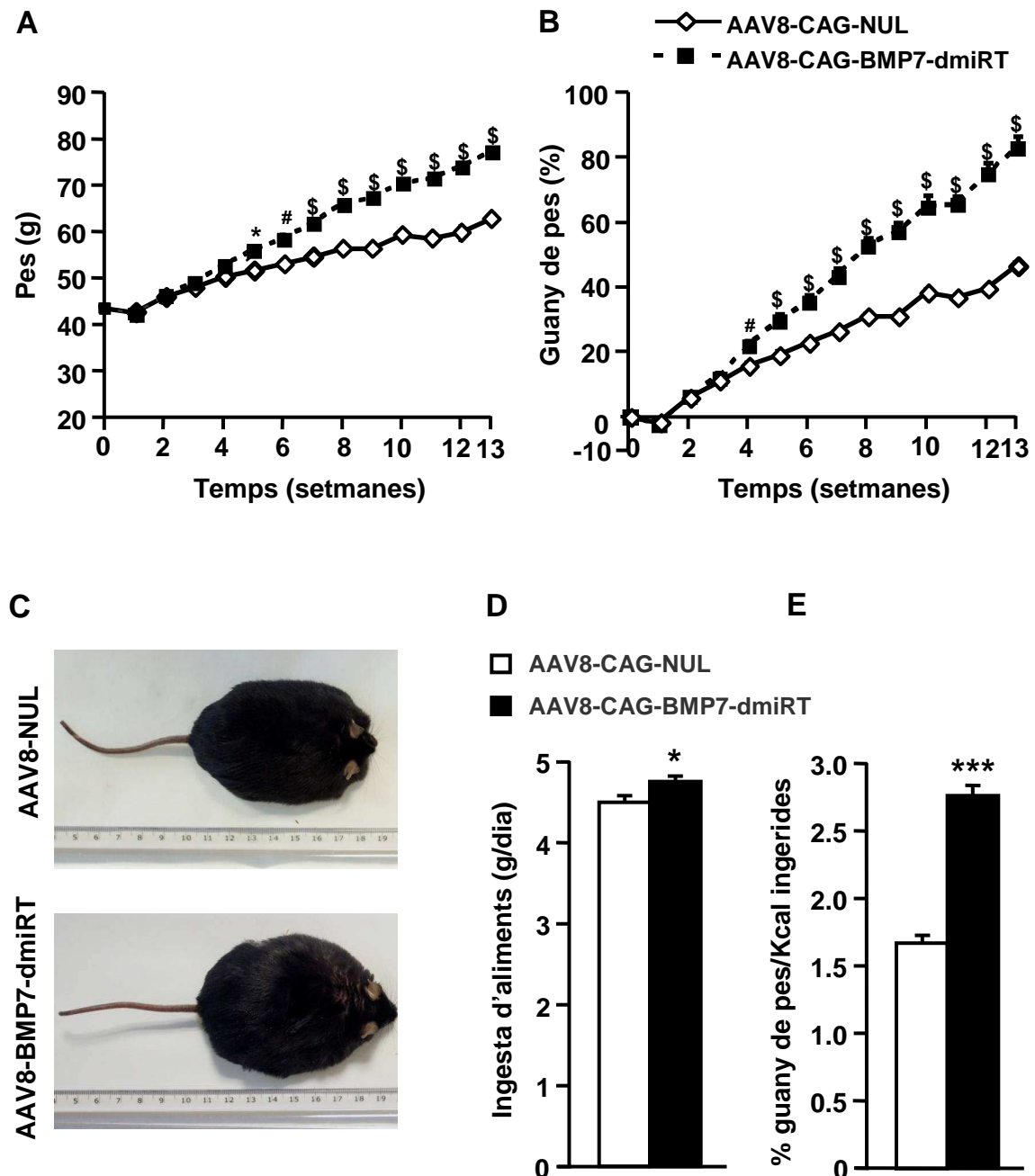


Figura 34. Evolució del pes i la ingesta d'aliments en els ratolins ob/ob administrats intra-eWAT amb vectors AAV8-CAG-BMP7-dmiRT. Ratolins ob/ob mascles d'11 setmanes d'edat es van tractar intra-eWAT amb 10^{12} vg dels vectors virals AAV8-CAG-BMP7-dmiRT o AAV8-CAG-NUL. **(A)** Evolució del pes en grams (g) o **(B)** del guany de pes (en % del pes inicial). **(C)** Imatge representativa dels ratolins ob/ob 13 setmanes post-AAV. **(D)** Mitjana de la ingesta d'aliments diària en g/dia i **(E)** mitjana del percentatge de guany de pes normalitzat per la quantitat d'energia consumida durant 13 setmanes a partir de l'administració intra-eWAT dels vectors. Kcal: kilocalories. Els resultats s'expressen com la mitjana \pm EEM. n=8-10 animals/grup. * $p < 0.05$, # $p < 0.01$, \$ $p < 0.001$, *** $p < 0.001$ vs AAV8-CAG-NUL.

2.2. Nivells d'expressió de *BMP7* en teixits metabòlics i nivells circulants en sèrum

A les 24 setmanes d'edat, 13 setmanes després del tractament intra-eWAT amb AAV8-CAG-BMP7-dmiRT, es va comprovar la sobreexpressió de *BMP7* mitjançant anàlisi per RT-PCR de mostres d'RNA obtingudes en teixits metabòlics, concretament a l'eWAT, l'iWAT, l'iBAT i el fetge. Els animals administrats amb els vectors AAV8-CAG-BMP7-dmiRT exhibien un augment considerable dels nivells d'expressió de *BMP7* en l'eWAT, mentre que el grup nul mostrava nivells no detectables d'expressió del transgèn. A més, l'iWAT també presentava nivells elevats de *BMP7*, mentre que l'iBAT i el fetge tenien nivells d'expressió molt inferiors (Figura 35A). També es van quantificar els nivells circulants de BMP7 i es va detectar una concentració d'aquesta proteïna en sèrum d'uns 350 pg/mL en el grup AAV8-CAG-BMP7-dmiRT, mentre que el grup AAV8-CAG-NUL presentava valors indetectables (Figura 35B).

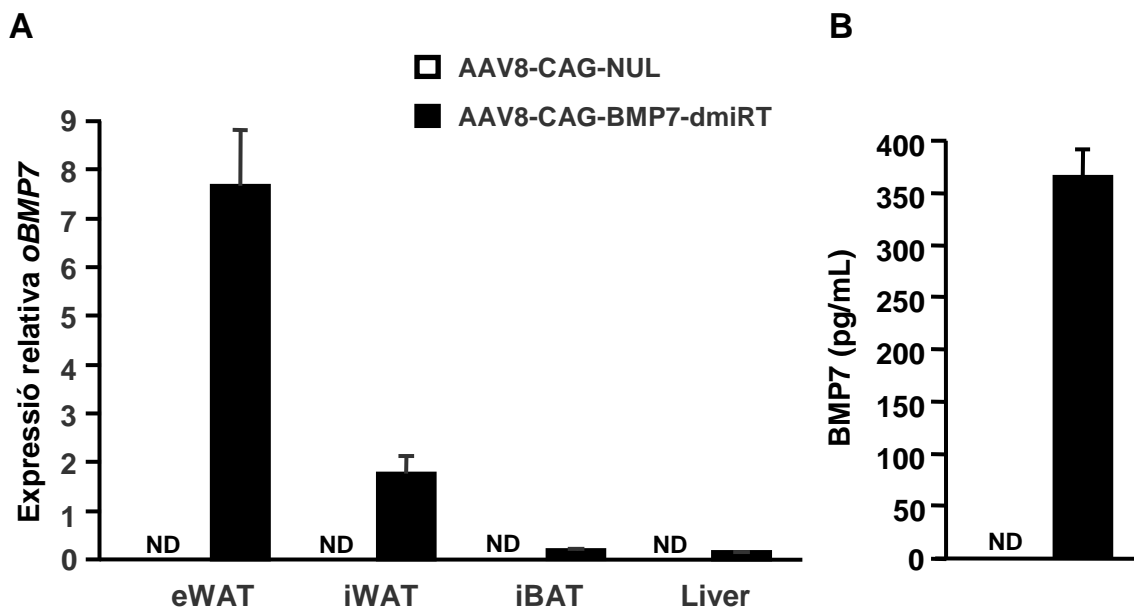


Figura 35. Nivells d'expressió i sèrics de BMP7. Ratolins ob/ob mascles d'11 setmanes d'edat es van tractar intra-eWAT amb 10^{12} vg dels vectors virals AAV8-CAG-BMP7-dmiRT o AAV8-CAG-NUL. **(A)** Anàlisi dels nivells d'expressió de *BMP7* optimitzat (*oBMP7*) en eWAT, iWAT, iBAT i fetge per RT-PCR i normalitzats per *Rplp0*. **(B)** Nivells sèrics de BMP7. Tots els anàlisis es van dur a terme 13 setmanes post-AAV. ND: no detectat. Els resultats s'expressen com la mitjana \pm EEM. n= 8-10 animals per grup.

2.3. Avaluació dels pesos dels teixits adiposos i fetge

Per tal d'esbrinar com s'havia distribuït l'augment de pes dels animals tractats amb AAV8-CAG-BMP7-dmiRT respecte als animals tractats amb AAV8-CAG-NUL, es va determinar el pes dels teixits d'acumulació de greix (eWAT, iWAT, teixit adipós blanc mesentèric (mWAT), teixit adipós blanc retroperitoneal (rWAT)) i el fetge un cop sacrificats els animals a les 24 setmanes d'edat. A més, també es va determinar el pes de l'iBAT, ja que està descrit un augment del pes d'aquest teixit quan incrementen els nivells de BMP7 circulants (Tseng et al., 2008). Així, es va observar un augment considerable del pes dels teixits adiposos blancs, especialment de l'epididimal, en els animals tractats amb AAV8-CAG-BMP7-dmiRT. No obstant, tot i l'augment de pes d'aquests animals, es va observar una disminució del pes del fetge en els animals tractats amb AAV8-CAG-BMP7-dmiRT. Pel que fa a l'iBAT, no es van observar canvis en el pes d'aquest teixit entre els diferents grups (Figura 36).

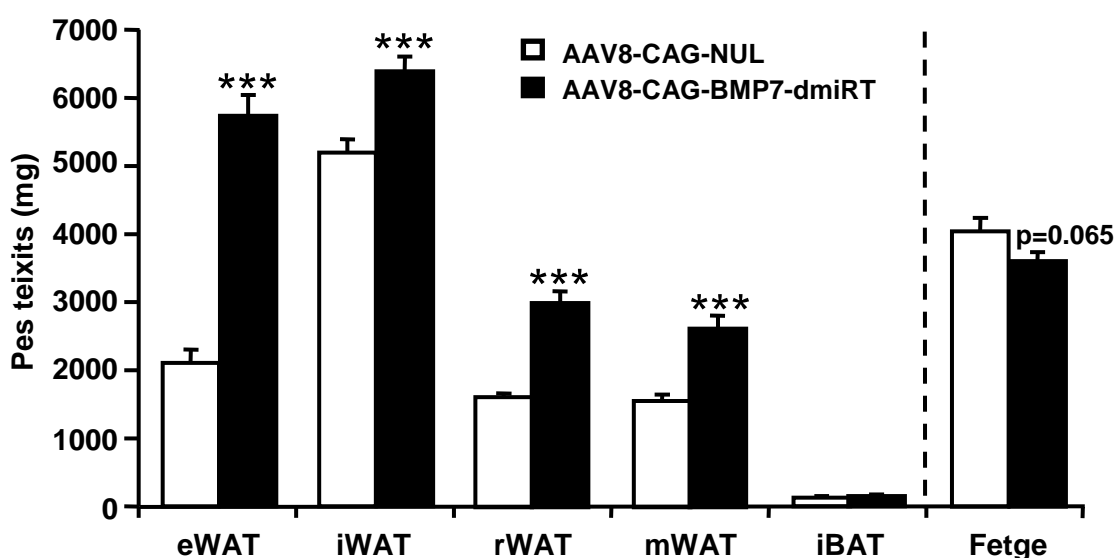


Figura 36. Pesos dels teixits. Ratolins ob/ob mascles d'11 setmanes d'edat es van tractar intra-eWAT amb 10^{12} vg dels vectors virals AAV8-CAG-BMP7-dmiRT o AAV8-CAG-NUL i 13 setmanes post-AAV es va mesurar el pes de eWAT, iWAT, rWAT, mWAT, iBAT i fetge. Els resultats s'expressen com la mitjana \pm EEM. n=8-10 animals per grup. ***p<0.001 vs AAV8-CAG-NUL.

2.4. Anàlisi de l'adipogènesi en els teixits adiposos blanc i marró

Pel que fa a l'adipogènesi, el BMP7 s'ha descrit anteriorment com un factor que afecta tant en la determinació com en la diferenciació dels adipòcits marrons (Townsend et al., 2013; Tseng et al., 2008). Així mateix, en l'apartat 2.3.1 de la Part-IB d'aquesta tesi doctoral s'havia observat una disminució de la mida dels adipòcits en

teixits adiposos blancs que sobreexpressaven *Bmp7* (Figura 30-31). Per això, es va estudiar aquest procés tant en teixit adipós blanc com marró dels animals ob/ob tractats intra-eWAT amb els vectors AAV8-CAG-BMP7-dmiRT.

2.4.1. Anàlisi de l'adipogènesi en el teixit adipós blanc epididimal

En primer lloc es va realitzar una tinció hematoxilina/eosina en seccions de l'eWAT per a analitzar la morfologia del teixit. Així, es va observar una clara reducció en l'àrea dels adipòcits en el grup AAV8-CAG-BMP7-dmiRT (Figura 37A).

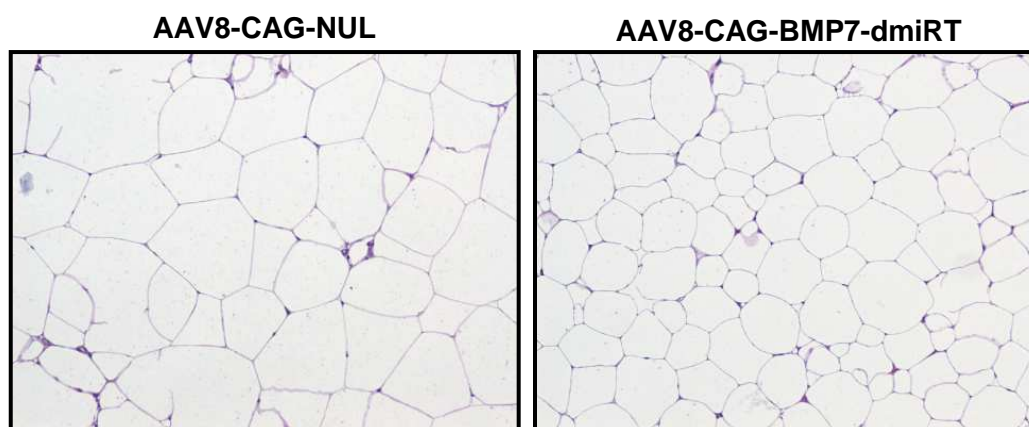


Figura 37. Anàlisi de la morfologia del teixit adipós blanc epididimal. Tinció hematoxilina/eosina en seccions d'eWAT de ratolins ob/ob 13 setmanes post-administració intra-eWAT de 10^{12} vg de AAV8-CAG-NUL i AAV8-CAG-BMP7-dmiRT. Magnificació original x200.

La quantificació de l'àrea dels adipòcits va demostrar que l'àrea mitja dels adipòcits era menor en el grup AAV8-CAG-BMP7-dmiRT respecte al grup AAV8-CAG-NUL (Figura 38A). Així com també la distribució de l'àrea dels adipòcits mostrava un increment clar en el nombre d'adipòcits petits i una disminució dels adipòcits més grans en el grup tractat amb AAV8-CAG-BMP7-dmiRT respecte al grup AAV8-CAG-NUL (Figura 38B).

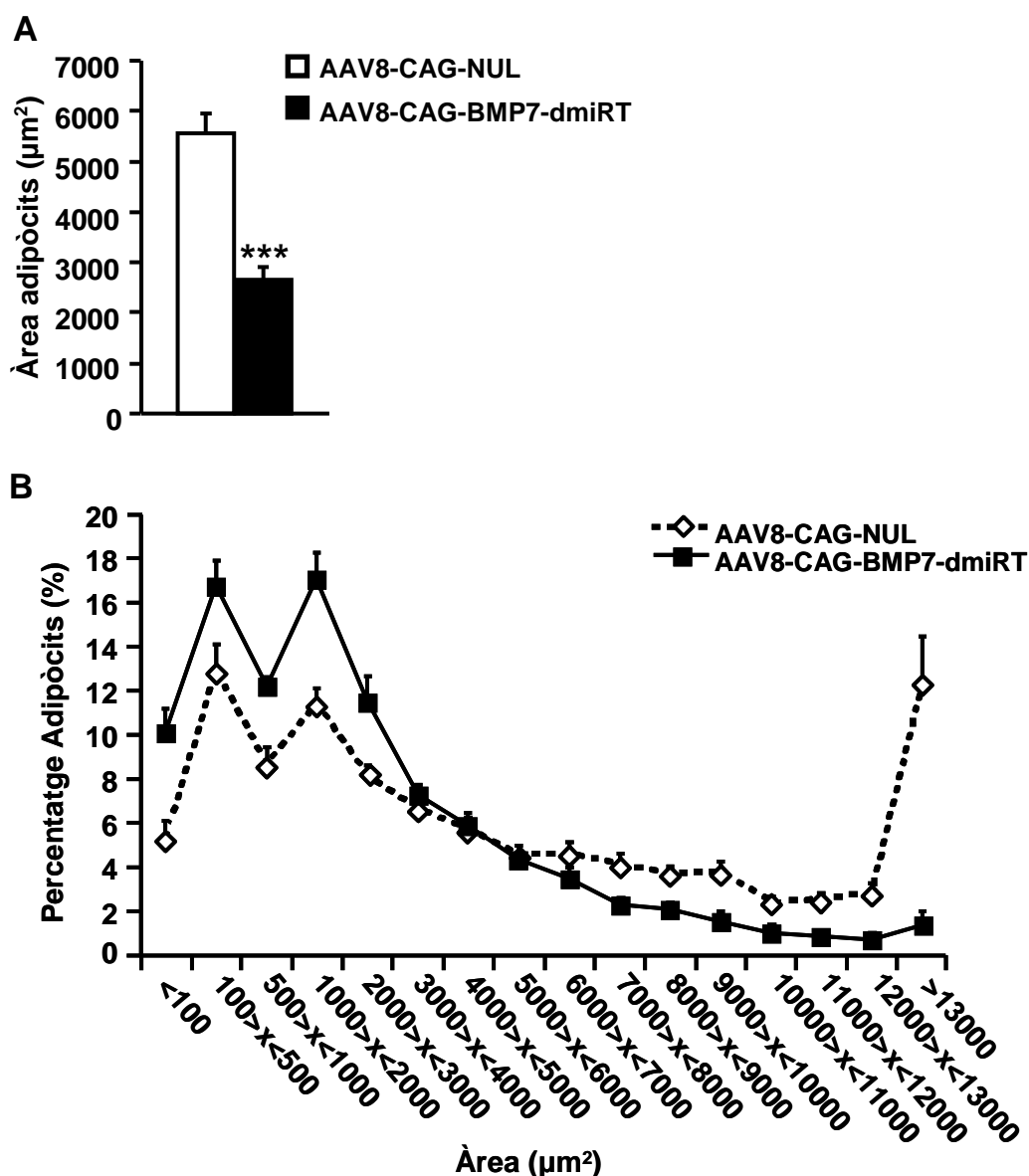


Figura 38. Àrea mitjana i distribució dels adipòcits per àrea en el teixit adipós epididimal. **(A)** Àrea mitjana dels adipòcits blancs en l'eWAT de ratlins ob/ob 13 setmanes post-administració intra-eWAT de 10^{12} vg de AAV8-CAG-NUL i AAV8-CAG-BMP7-dmiRT. **(B)** Distribució de freqüències de l'àrea dels adipòcits en els mateixos grups experimentals. Els resultats s'expressen com la mitjana \pm EEM. $n=8-10$ animals per grup. *** $p<0.001$ vs AAV8-CAG-NUL.

Posteriorment, es van analitzar els nivells d'expressió de gens reguladors de l'adipogènesi en l'eWAT. Específicament, es va observar un augment estadísticament significatiu de l'expressió d'inductors de l'adipogènesi com *CEBP α* i *PPAR γ* en el grup AAV8-CAG-BMP7-dmiRT tot i que *CEBP β* es mantenia a nivells semblants del grup AAV8-CAG-NUL (Figura 39A). D'altra banda, pel que fa als repressors de la diferenciació, no es van observar canvis en l'expressió de *Necdin* (*NDN*) i *WNT10b* entre els dos grups (Figura 39A). Tot i això, el gen *PREF1*, que també es defineix com

a marcador de preadipòcits, es va induir clarament en els ob/ob tractats amb AAV8-CAG-BMP7-dmiRT (Figura 39A). Aquest resultat semblava indicar que es produïa un augment de la diferenciació alhora que també es produïa un increment en el nombre dels preadipòcits en els animals tractats amb AAV8-CAG-BMP7-dmiRT.

Donat l'increment en l'expressió de *PPAR γ* , també es van quantificar per RT-PCR els nivells d'expressió d'alguns dels factors que *PPAR γ* indueix al final de la diferenciació i que, per tant, defineixen als adipòcits madurs, com la proteïna d'unió a àcids greixosos 4 (*FABP4*), la perilipina 1 (*PLIN1*), el transportador de glucosa 4 (*GLUT4*), la lipoproteïna lipasa (*LPL*) i altres lipases com la *adipose triglyceride lipase* (*ATGL*) i la lipasa sensible a hormones (*HSL*) (Figura 39B). En els animals tractats amb AAV8-CAG-BMP7-dmiRT es va observar un increment molt estadísticament significatiu en l'expressió de tots els gens induïts per *PPAR γ* mencionats anteriorment, a excepció del gen *LPL* (Figura 39B).

Així mateix, també es van analitzar els nivells d'expressió de gens que participen en la lipogènesi al teixit adipós blanc, ja que aquest procés s'indueix al final de la diferenciació dels adipòcits (Student et al., 1980; Takahashi et al., 2013; Tontonoz et al., 1994). Es va observar una marcada sobreexpressió de gens clau en la lipogènesi del teixit adipós tals com *SREBF1* (*sterol-regulatory-element binding Transcription Factor 1*), *ACC1* (*Acetyl-CoA carboxylase 1*), *FASN* (*Fatty acid synthase*), *SCD1* (*Stearoyl-CoA Desaturase*), *ChREBP* (*Carbohydrate-responsive element-binding protein*) i *ACC2* (*Acetyl-CoA carboxylase 2*) (Figura 39C).

Per tant, tots aquests resultats indicaven que l'administració local d'AAV8-CAG-BMP7-dmiRT al teixit adipós induïa l'augment del nombre d'adipòcits madurs, és a dir, activava l'adipogènesi de l'eWAT en els ratolins ob/ob.

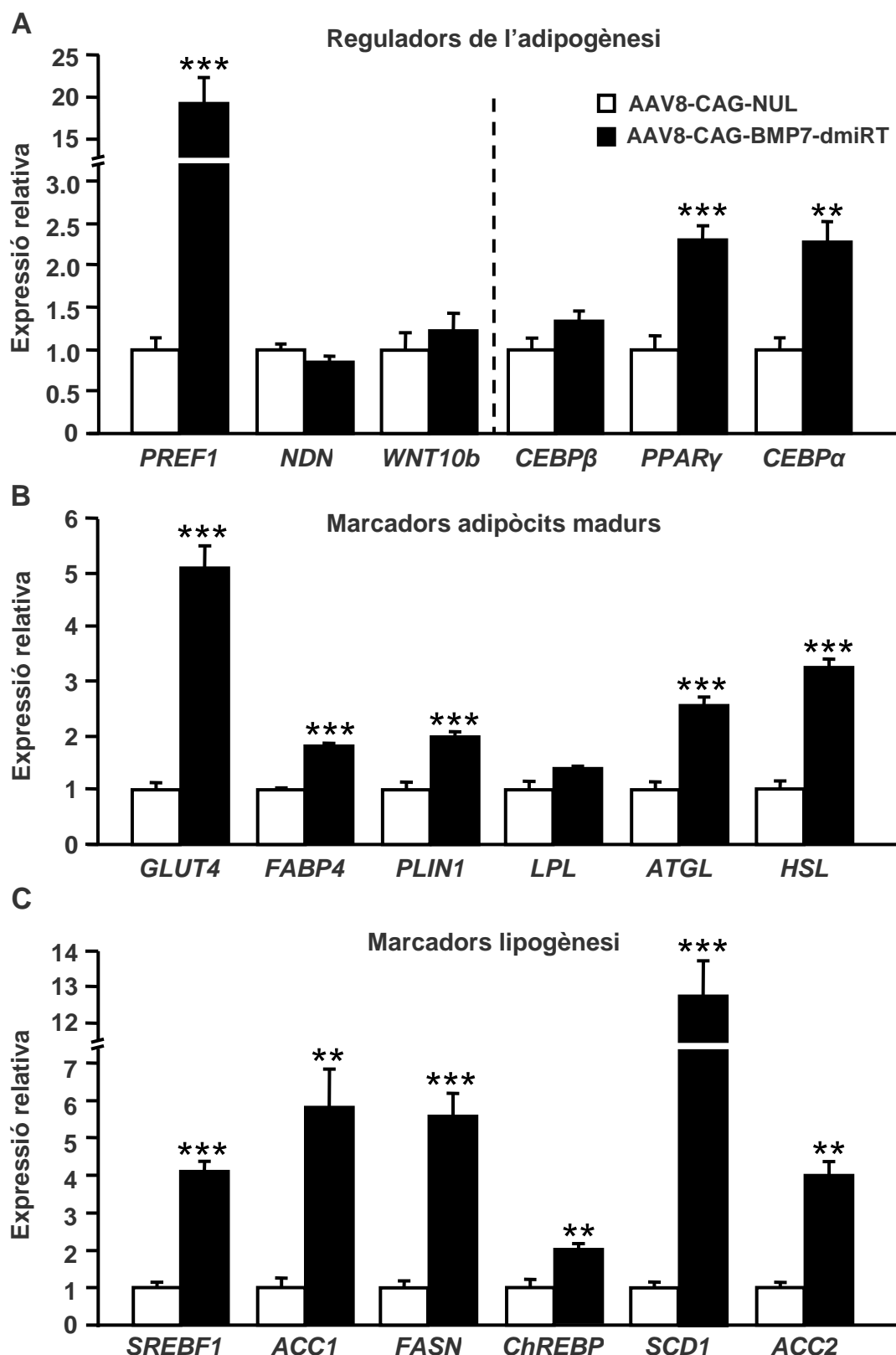


Figura 39. Nivells d'expressió de gens reguladors de l'adipogènesi i gens marcadors d'adipòcits madurs en eWAT. (A-C) Anàlisi per RT-PCR dels nivells d'expressió en eWAT de gens repressors (*PREF1*, *NDN* i *WNT10b*) i inductors (*CEBPβ*, *CEBPα* i *PPARγ*) de la diferenciació d'adipòcits (A), gens marcadors d'adipòcits madurs (B) i gens involucrats en la lipogènesi (C). Tots els anàlisis es van dur a terme 13 setmanes post-administració intra-eWAT de 10^{12} vg de AAV8-CAG-NUL o AAV8-CAG-BMP7-dmiRT en ratolins ob/ob d'11 setmanes d'edat. Els resultats s'expressen com la mitjana \pm EEM. n= 8-10 animals per grup. **p<0.01, ***p<0.001 vs AAV8-CAG-NUL.

2.4.2. Anàlisi de l'adipogènesi en el teixit adipós blanc inguinal

Per a comprovar si l'increment de l'expressió de *BMP7* a l'iWAT (Figura 35A), també havia induït l'adipogènesi en aquest teixit, es va analitzar la morfologia de l'iWAT mitjançant tinció amb hematoxilina/eosina de seccions d'aquest teixit. Tal i com s'havia observat i quantificat en l'eWAT (Figura 37-38), l'iWAT també presentava una clara disminució de la mida de la majoria d'adipòcits en el grup tractat amb AAV8-CAG-BMP7-dmiRT en comparació amb el grup AAV8-CAG-NUL (Figura 40).

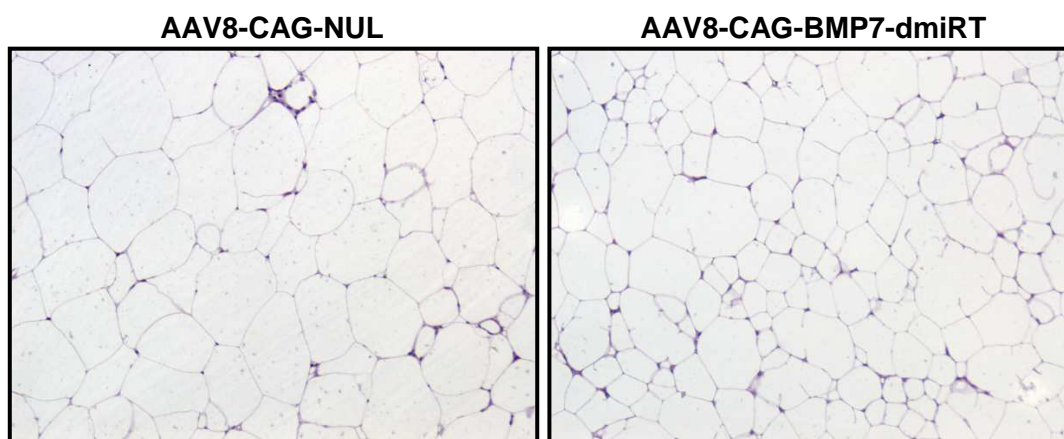


Figura 40. Anàlisi de la morfologia del teixit adipós blanc inguinal. Tinció hematoxilina/eosina en seccions d'iWAT de ratolins ob/ob 13 setmanes post-administració intra-eWAT de 10^{12} vg de AAV8-CAG-NUL o AAV8-CAG-BMP7-dmiRT. Magnificació original x200.

A continuació es van quantificar els nivells d'expressió de gens inductors de la diferenciació dels adipòcits com *CEBP β* , *CEBP α* , *PPAR γ* , i d'inhibidors de la diferenciació com *PREF1*, *NDN* i *WNT10b*. En l'iWAT dels animals tractats amb AAV8-CAG-BMP7-dmiRT, es van obtenir resultats similars als obtinguts a l'eWAT, amb un increment notable de *PPAR γ* i *CEBP α* , gens clau per a la diferenciació, i *PREF1*, gen marcador de preadipòcits (Figura 41A).

En aquest cas, donat que es va observar un augment en els nivells d'expressió de *PPAR γ* , també es van quantificar per RT-PCR els nivells d'expressió de *FABP4*, *PLIN1*, *GLUT4*, *LPL*, *ATGL* i *HSL*. Es va observar en el grup tractat amb AAV8-CAG-BMP7-dmiRT un increment molt significatiu estadísticament en l'expressió dels gens induïts per *PPAR γ* mencionats anteriorment, a excepció de *FABP4*, i que ahora són propis de l'estadi d'adipòcits madurs (Figura 41B). També es van analitzar els nivells d'expressió de gens que participen en la lipogènesi del teixit adipós, tals com *SREBF1*, *ACC1*, *FASN*, *ChREBP* i *ACC2*. Es va observar una sobreexpressió de tots els gens analitzats a excepció de *ChREBP* (Figura 41C).

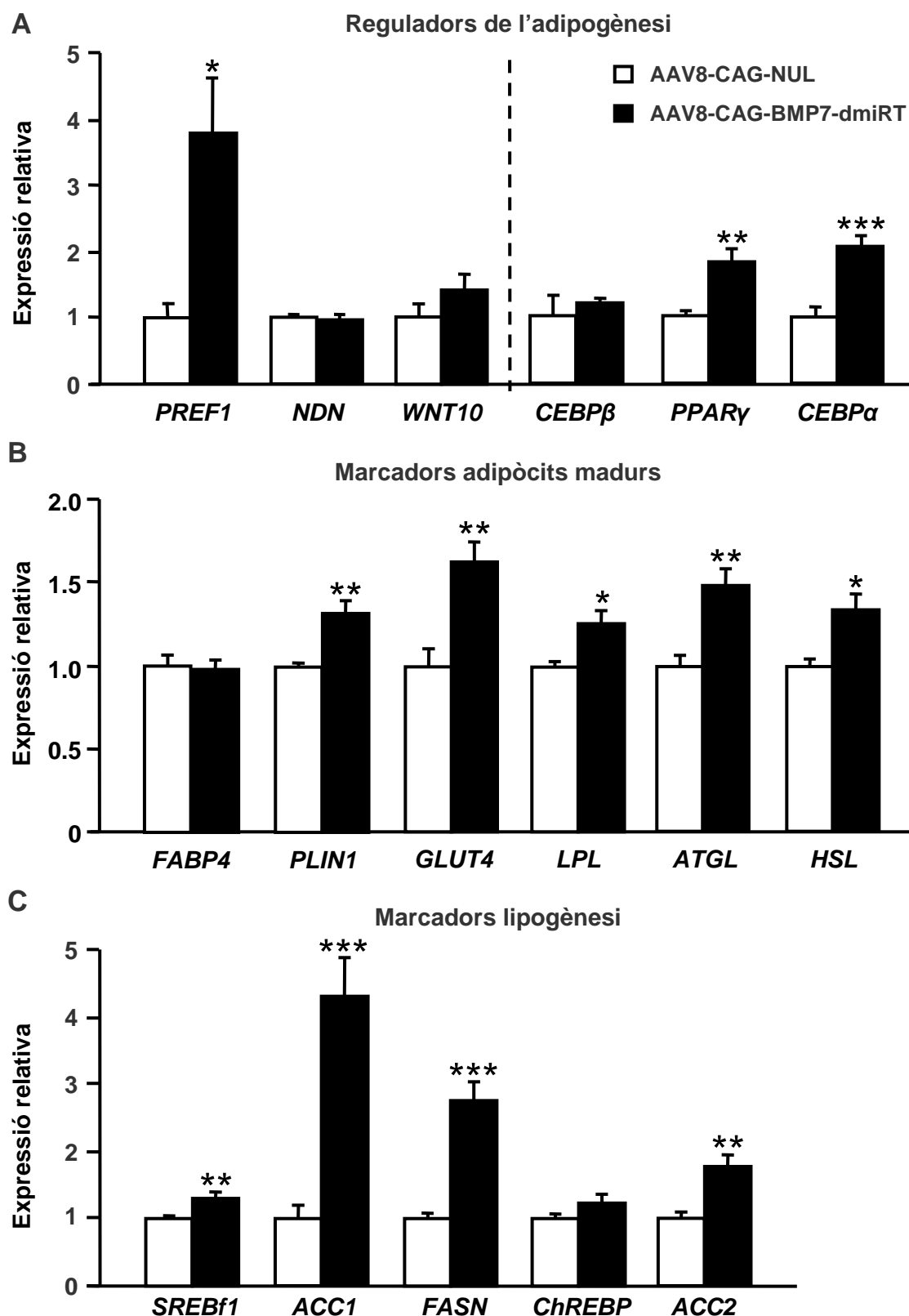


Figura 41. Nivells d'expressió de gens reguladors de l'adipogènesi i gens marcadors d'adipòcits madurs en l'iWAT. (A-C) Anàlisi per RT-PCR dels nivells d'expressió en iWAT de gens repressors (*PREF1*, *NDN* i *WNT10b*) i inductors (*CEBPβ*, *CEBPα* i *PPARγ*) de la diferenciació d'adipòcits **(A)**, gens marcadors d'adipòcits madurs **(B)** i gens involucrats en la lipogènesi **(C)**. Tots els anàlisis es van dur a terme 13 setmanes post-administració intra-eWAT de 10^{12} vg de AAV8-CAG-NUL o AAV8-CAG-BMP7-dmiRT en ratolins ob/ob d'11 setmanes d'edat. Els resultats s'expressen com la mitjana \pm EEM. n= 8-10 animals per grup. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs AAV8-CAG-NUL.

Així doncs, l'augment dels nivells d'expressió a l'iWAT promoguda per l'administració intra-eWAT dels vectors AAV8-CAG-BMP7-dmiRT va induir la hiperplàsia en aquest dipòsit. Concretament, es va observar una reducció de la mida dels adipòcits lligada a un increment en la diferenciació dels preadipòcits i un augment dels adipòcits madurs.

2.4.3. Anàlisi de l'adipogènesi en el teixit adipós marró interescapular

Donat que s'ha descrit que BMP7 indueix la determinació al llinatge adipòcit marró en cèl·lules mare mesenquimals i la diferenciació de preadipòcits marrons *in vitro*, i que es va observar un increment, tot i que lleu, dels nivells d'expressió de *BMP7* a l'iBAT dels animals tractats amb AAV8-CAG-BMP7-dmiRT (Figura 35A), es va analitzar la morfologia del teixit i es va quantificar l'expressió de gens reguladors de l'adipogènesi en general com *CEBPβ*, *CEBPα*, *PPARγ*, *PREF1*, *NDN* i *WNT10b*, així com també gens específics de l'adipogènesi al teixit adipós marró com *PRDM16*. No obstant, no es van observar canvis importants en la morfologia del teixit, tot i que hi havia una reducció clara dels nivells de *NDN* i una tendència a augmentar els nivells d'expressió de *CEBPβ*, *PPARγ* i *PRDM16* en els animals tractats amb AAV8-CAG-BMP7-dmiRT respecte al grup AAV8-CAG-NUL (Figura 42A-B).

Donat que es va observar una tendència a augmentar els nivells d'expressió de *PPARγ*, es van quantificar per RT-PCR els nivells d'expressió de gens diana d'aquest factor i que alhora són factors marcadors d'adipòcits madurs, tals com *FABP4*, *PLIN1*, *GLUT4*, *LPL*, *ATGL* i *HSL*. No es van observar canvis en l'expressió d'aquests gens a excepció d'*ATGL*, el qual va mostrar nivells d'expressió augmentats en el grup d'animals tractats amb AAV8-CAG-BMP7-dmiRT (Figura 42C).

Els resultats obtinguts en l'anàlisi d'expressió indicaven que es va induir l'increment de tot el procés adipogènic en els teixits adiposos blancs, en els quals hi havia un augment dels nivells d'expressió de *BMP7*, essent més elevats els nivells d'expressió de marcadors de preadipòcits com *PREF1*, inductors de la diferenciació com *CEBPα* i *PPARγ*, i gens propis d'adipòcits madurs com *PLIN1*, *GLUT4*, *ATGL*, *HSL*, *SREBF1*, *ACC1*, *ACC2* i *FASN*. Tot i que l'administració local de vectors AAV8 a l'eWAT permetia la transducció d'altres teixits adiposos, com l'inguinal, els nivells de transducció a l'iBAT eren baixos, fet que podria ser responsable de l'absència de canvis en l'adipogènesi d'aquest teixit. A més, tot i que es produïa un increment dels nivells circulants de BMP7, aquests no eren tant elevats com els reportats en altres estudis (Townsend et al., 2012; Tseng et al., 2008).

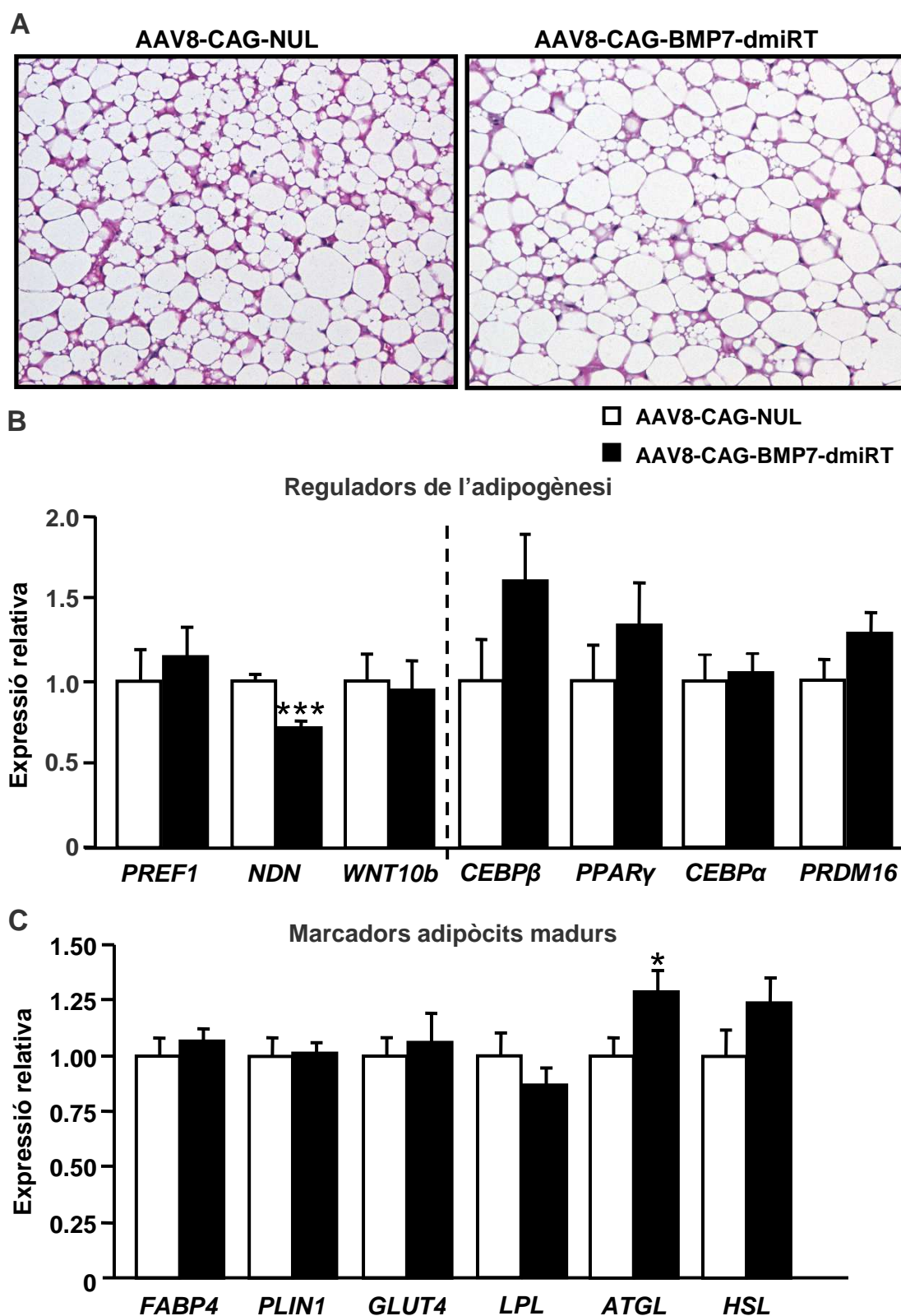


Figura 42. Anàlisi de la morfologia i nivells d'expressió de gens reguladors de l'adipogènesi i gens marcadors d'adipòcits madurs en l'iBAT. (A) Tinció hematoxilina/eosina en seccions d'iBAT de ratolins ob/ob 13 setmanes post-administració intra-eWAT de 10^{12} vg de AAV8-CAG-NUL o AAV8-CAG-BMP7-dmiRT. Magnificació original x200. **(B-C)** Anàlisi per RT-PCR dels nivells d'expressió en l'iBAT de gens repressors (*PREF1*, *NDN* i *WNT10b*) i inductors (*CEBPβ*, *CEBPα*, *PPARγ* i *PRDM16*) de la diferenciació d'adipòcits **(B)** i gens marcadors d'adipòcits madurs **(C)** en els mateixos grups experimentals. Els resultats s'expressen com la mitjana \pm EEM. n= 8-10 animals per grup. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ vs AAV8-CAG-NUL.

2.5. Anàlisi de l'activació i la biogènesis mitocondrial en el teixit adipós marró

Donat que després del tractament amb AAV-CAG-BMP7-dmiRT es produïa un increment de l'expressió de BMP7 a l'iBAT, i tot i que no es van observar canvis en l'adipogènesi d'aquest teixit, es van analitzar gens claus per a l'activitat del BAT, com ara gens termogènics (*UCP1* i *CIDEA*), gens reguladors de la biogènesis mitocondrial, com *PGC1 α* , i gens transportadors d'àcids greixosos (*CD36* (*cluster of differentiation 36*) i *CPT1 α*). Només es va observar una marcada inducció de l'expressió de *CIDEA* i la reducció dels nivells d'expressió de *CPT1 α* en el grup d'animals tractats amb AAV8-CAG-BMP7-dmiRT (Figura 43). L'absència d'una inducció generalitzada d'aquests gens indicava que no es produïa una activació de la termogènesi en aquest teixit, que podria ser degut a la baixa expressió de *BMP7* a l'iBAT i a l'increment limitat dels nivells circulants de BMP7 obtinguts a través de la transferència gènica al teixit adipós mitjançant AAVs. Aquests nivells eren molt baixos (350 pg/mL) en comparació amb nivells descrits en altres estudis mitjançant l'administració sistèmica d'Ad-BMP7 (2000 pg/mL o 300000 pg/mL) (Townsend et al., 2012; Tseng et al., 2008).

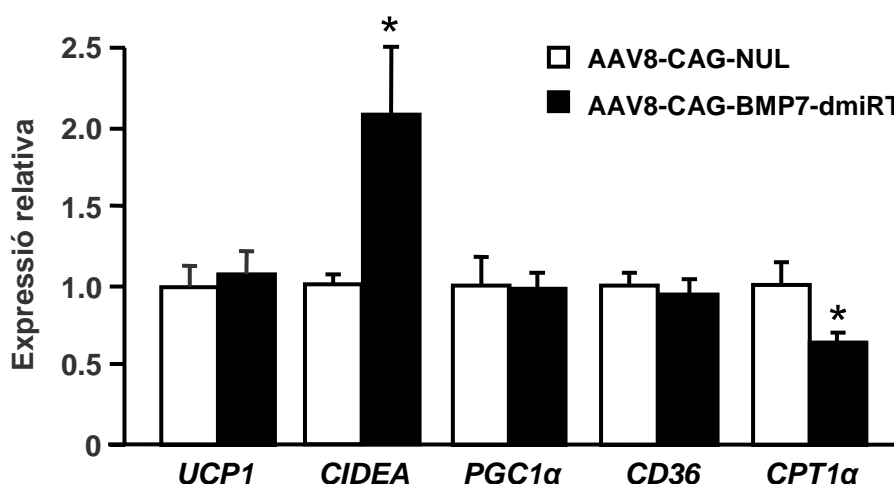


Figura 43. Nivells d'expressió de gens involucrats en l'activitat termogènica del teixit adipós marró. Anàlisi per RT-PCR dels nivells d'expressió en l'iBAT d'*UCP1*, *CIDEA*, *PGC1 α* , *NFR1*, *TFAM*, *CD36* i *CPT1 α* . Tots els anàlisis es van dur a terme 13 setmanes post-administració intra-eWAT de 10^{12} vg de AAV8-CAG-NUL o AAV8-CAG-BMP7-dmiRT en ratolins ob/ob d'11 setmanes d'edat. Els resultats s'expressen com la mitjana \pm EEM. n= 8-10 animals per grup. * $p < 0.05$ vs AAV8-CAG-NUL.

2.6. Anàlisi de la inflamació al teixit adipós blanc

En incrementar l'acumulació de greix al teixit adipós blanc, s'ha observat que canvia la composició de les cèl·lules immunitàries presents al mateix, augmentant principalment el nombre de macròfags (Choe et al., 2016). A mesura que avança

l'obesitat, els macròfags proinflamatoris M1 s'infiltra al teixit adipós causant resistència a la insulina i els adipòcits morts atreuen més macròfags M1 formant-se estructures en forma de corona que desencadenen una resposta inflamatòria local (Choe et al., 2016). L'augment de la inflamació del teixit adipós blanc provoca l'alliberament de citocines pro-inflamatòries que, juntament amb l'increment de la hipòxia i la fibrosis, donen lloc a la disfunció dels adipòcits que provoca la reducció dels nivells d'adiponectina i finalment la reducció de la sensibilitat a la insulina (Choe et al., 2016; Pellegrinelli et al., 2016; Rosen et al., 2014).

És per això que a continuació es va valorar la inflamació de l'eWAT mitjançant l'anàlisi immunohistoquímic contra MAC2 (*Galectin-3*, proteïna de la superfície cel·lular dels macròfags), marcador de macròfags, i la quantificació dels nivells d'expressió mitjançant RT-PCR de marcadors específics de macròfags com *F4/80* (*EGF-like module-containing mucin-like hormone receptor-like 1*) i *CD68* (*Cluster of Differentiation 68*). Es va observar una clara disminució de la inflamació en l'eWAT dels animals administrats amb AAV8-CAG-BMP7-dmiRT en comparació amb els animals tractats amb AAV8-CAG-NUL tant a nivell histològic com en l'anàlisi de l'expressió de gens claus mitjançant RT-PCR (Figura 44A-B).

Així mateix, donat que la hiperplàsia observada al teixit adipós blanc anava acompanyada de la reducció de la inflamació a nivell local, es van avaluar mitjançant ELISA els nivells d'adiponectina, hormona secretada pels adipòcits i inversament relacionada amb el desenvolupament de resistència a la insulina (Paniagua et al., 2016). Els animals administrats amb AAV8-CAG-BMP7-dmiRT van mostrar nivells molt superiors d'adiponectina en relació al grup tractat amb AAV8-CAG-NUL (Figura 44C).

L'augment de la hiperplàsia, juntament amb la reducció de la inflamació localment al teixit adipós blanc i l'increment dels nivells d'adiponectina en sang, suggerien que tot i contenir més greix, el teixit adipós blanc dels ratolins ob/ob administrats amb AAV8-CAG-BMP7-dmiRT s'estava expandint d'una manera més saludable que el dels animals administrats amb AAV8-CAG-NUL.

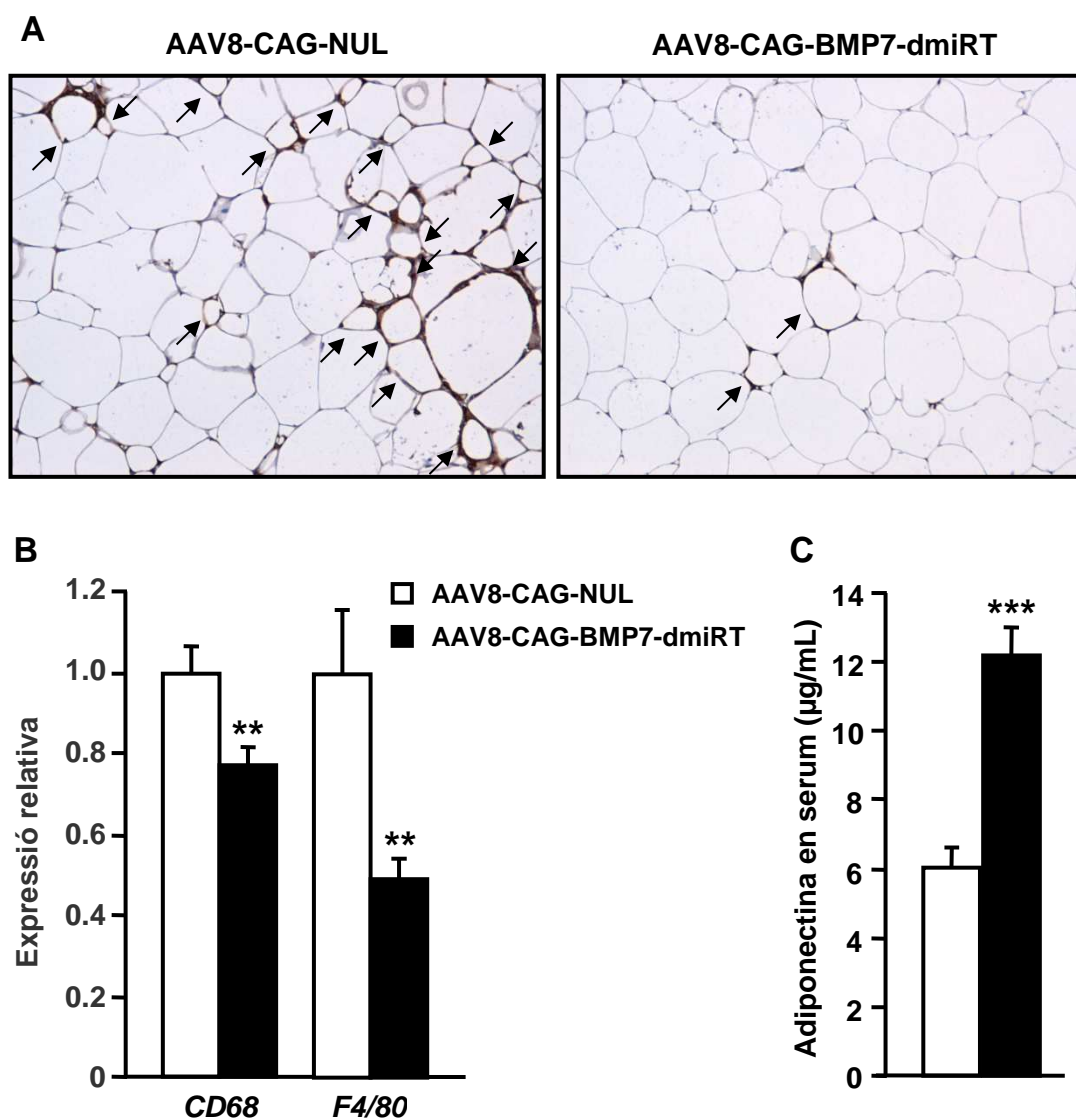


Figura 44. Avaluació de la inflamació del teixit adipós blanc epididimal i dels nivells d'adiponectina en sèrum. (A) Tinció immunohistoquímica contra Mac2 (marró) en seccions d'eWAT de ratolins ob/ob 13 setmanes post-administració intra-eWAT de 10^{12} vg de AAV8-CAG-NUL i AAV8-CAG-BMP7-dmiRT. Magnificació original x200. (B) Anàlisi per RT-PCR dels nivells d'expressió en eWAT de *CD68* i *F4/80* i (C) nivells d'adiponectina en sèrum en els mateixos grups experimentals. Els resultats s'expressen com la mitjana \pm EEM. n= 8-10 animals per grup. **p<0.01, ***p<0.001 vs AAV8-CAG-NUL.

2.7. Anàlisi del fetge

Tal i com s'ha descrit anteriorment, el BMP7 promovia l'acumulació de greix als teixits adiposos blancs però no al fetge (Figura 36). Es va analitzar també el fetge dels ratolins ob/ob i es va examinar l'acumulació de greix mitjançant tinció d'hematoxilina/eosina en seccions del teixit. Es va observar una lleugera disminució de l'acumulació de greix al fetge del grup AAV8-CAG-BMP7-dmiRT (Figura 45A), la qual es va corroborar quan es va determinar el contingut de triglicèrids del teixit (Figura 45B).

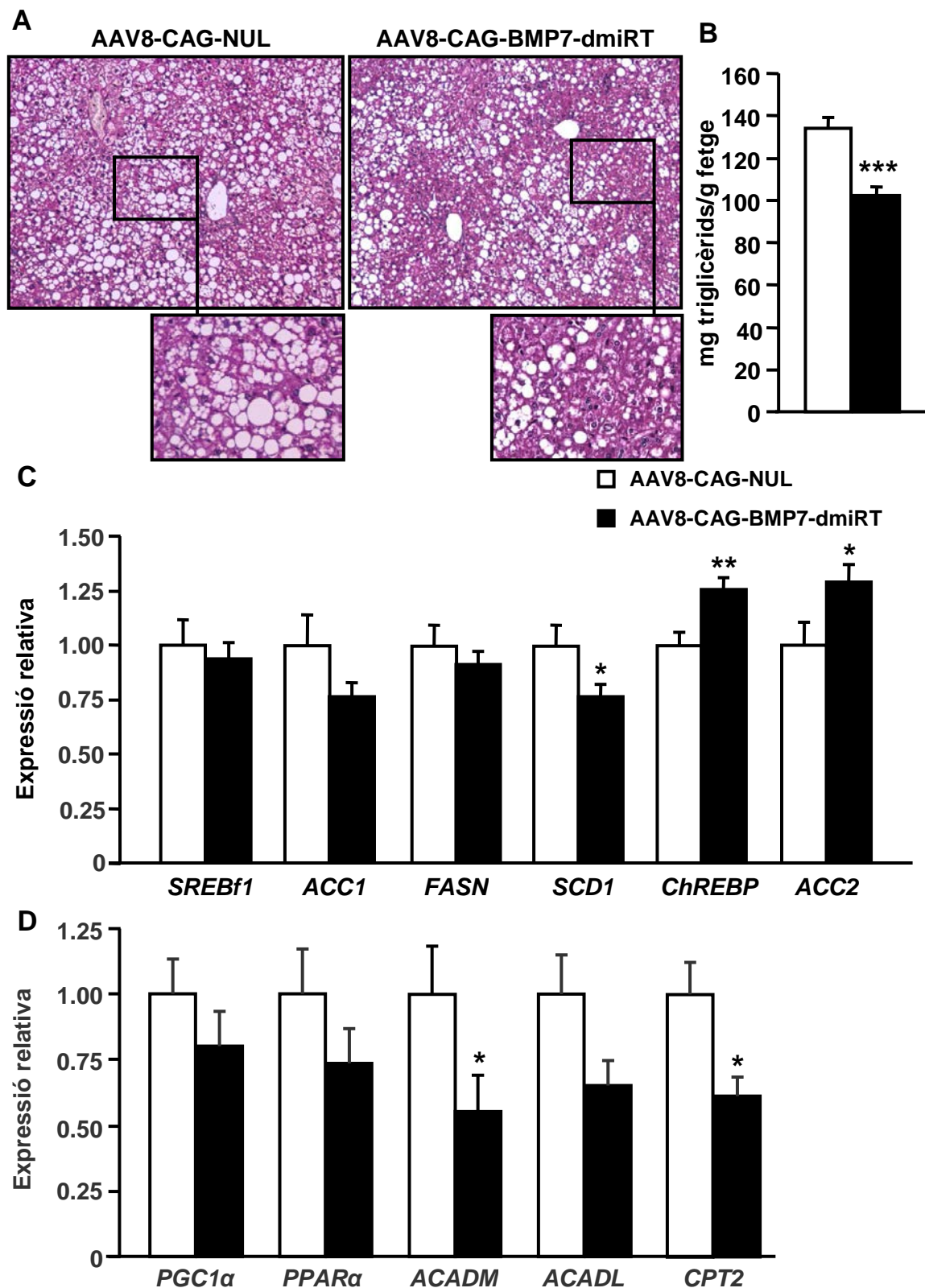


Figura 45. Anàlisi de la morfologia, contingut de triglicèrids i nivells d'expressió de gens involucrats en la síntesi de lípids i la β -oxidació en el fetge. **(A)** Tinció hematoxilina/eosina en seccions de fetge de ratolins ob/ob 13 setmanes post-administració intra-eWAT de 10^{12} vg de AAV8-CAG-NUL o AAV8-CAG-BMP7-dmiRT. Magnificació original x100 i x400 (inset). **(B)** Contingut de triglicèrids en el fetge i **(C-D)** anàlisi per RT-PCR dels nivells d'expressió en el mateix teixit de gens involucrats en la lipogènesi (*SREBf1*, *ACC1*, *FASN*, *SCD1*, *ChREBP* i *ACC2*) (C) i la β -oxidació (*PGC1α*, *PPARα*, *ACADM*, *ACADL* i *CPT2*) (D). Els resultats s'expressen com la mitjana \pm EEM. n= 8-10 animals per grup. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs AAV8-CAG-NUL.

A més, també es van analitzar els nivells d'expressió de gens involucrats en la lipogènesi i la β -oxidació al fetge (Figura 45C,D). Tot i observar un augment en els nivells d'expressió de *ChREBP* i *ACC2*, la majoria dels gens lipogènics analitzats no van variar, pel que no es produïen canvis generalitzats en la lipogènesi del fetge dels animals administrats amb AAV8-CAG-BMP7-dmiRT (Figura 45C). Respecte a la β -oxidació, hi havia una clara reducció del procés, representada per una disminució estadísticament significativa en l'expressió de l'acil-Coenzim A deshidrogenasa de cadena mitja (*ACADM*) i *carnitine palmitoyltransferase 2 (CPT2)*, i una tendència en reduir l'expressió de *PGC1 α* , *PPAR α* i l'acil-Coenzim A deshidrogenasa de cadena llarga (*ACADL*) (Figura 45D). Aquesta reducció de la β -oxidació podria ser conseqüència de la reducció de l'acumulació de greix al fetge, ja que per tant no seria necessari que es produís la inducció de la seva oxidació.

Molts estudis han demostrat que l'obesitat dona lloc a inflamació hepàtica que està associada a un substancial increment en el nombre de macròfags en el fetge (Johnson et al., 2013; Osborn et al., 2012). Tenint en compte la reducció de l'acumulació de greix observada en el fetge de ratolins ob/ob tractats amb AAV8-CAG-BMP7-dmiRT, es van analitzar els nivells de macròfags en aquest teixit mitjançant l'anàlisi immunohistoquímic contra MAC2 (Figura 46A), i la quantificació dels nivells d'expressió de *F4/80* i *CD68*, marcadors de macròfags (Figura 46B-C). Es va observar que el fetge dels animals tractats amb AAV8-CAG-BMP7-dmiRT presentava una reducció del nombre de macròfags (Figura 46A) i, al mateix temps, una reducció en els nivells d'expressió de *CD68* (Figura 46B). No es van observar canvis en els nivells d'expressió de *F4/80* (Figura 46B).

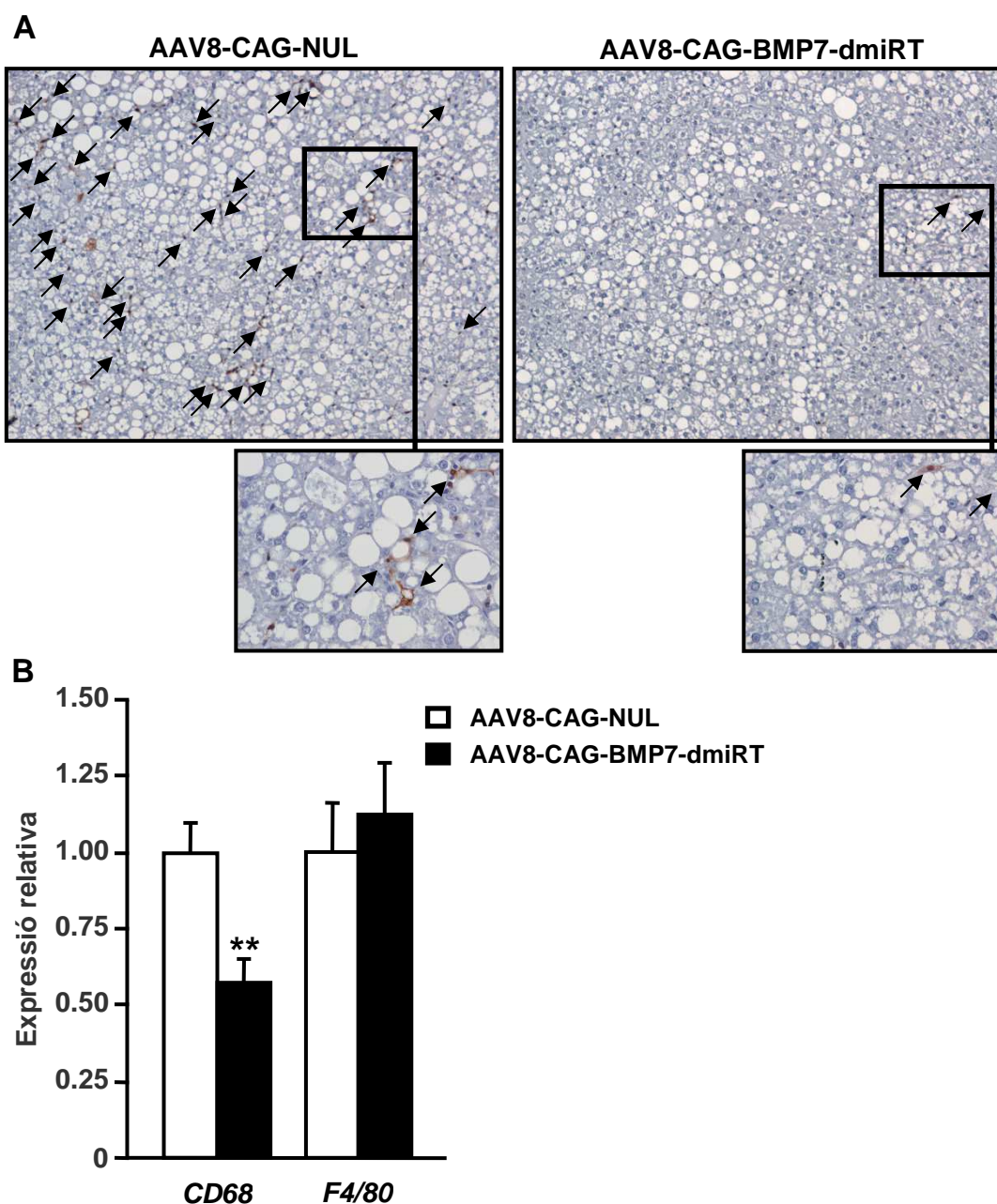


Figura 46. Avaluació de la inflamació al fetge. (A) Tinció immunohistoquímica contra Mac2 (marró) en seccions d'eWAT de ratolins ob/ob 13 setmanes post-administració intra-eWAT de 10^{12} vg de AAV8-CAG-NUL o AAV8-CAG-BMP7-dmiRT. Les fletxes indiquen les cèl·lules Mac2⁺. Magnificació original x200 i x400 (inset). (B) Anàlisi per RT-PCR dels nivells d'expressió en fetge de *CD68* i *F4/80*. Els resultats s'expressen com la mitjana \pm EEM, n=8-10 animals per grup. **p<0.01 vs AAV8-CAG-NUL.

2.8. Anàlisi dels paràmetres sèrics i dels tests de sensibilitat a la insulina i tolerància a la glucosa

Els ratolins ob/ob després del tractament amb AAV8-CAG-BMP7-dmiRT van mostrar un important augment en l'adipogènesi, reducció de la mida dels adipòcits, augment dels nivells d'adiponectina, reducció de la inflamació i disminució de l'acumulació de greix al fetge, fet que podria resultar en una millora en la sensibilitat a

la insulina. D'altra banda, s'ha descrit que el model animal ob/ob a més de ser obès, presenta una acusada hiperinsulinèmia (Wang et al., 2014). Per aquest motiu, es van determinar la glucèmia i la insulinèmia en condicions d'alimentació i la insulinèmia en dejú. Tot i que no es van observar variacions en la glucèmia en alimentació (Figura 47A), el grup administrat amb els vectors AAV8-CAG-BMP7-dmiRT va presentar una important reducció en els nivells d'insulina circulant tant en condicions d'alimentació com en dejú (al voltant de 35%) (Figura 47B-C).

A més a més, els ratolins ob/ob són un model d'obesitat que entre d'altres alteracions, presenta hiperlipidèmia (Kim et al., 2007; Lindström, 2007; Wang et al., 2014). Per tal d'avaluar com afectava el tractament amb AAV8-CAG-BMP7-dmiRT a l'augment de lípids a nivells sistèmic, es van quantificar els nivells de triglicèrids. Es va observar una baixada estadísticament significativa en els nivells de triglicèrids en el grup tractat amb AAV8-CAG-BMP7-dmiRT respecte al grup AAV8-CAG-NUL (Figura 47D).

Tenint en compte els canvis en la insulinèmia observats, es va avaluar la sensibilitat a la insulina i la tolerància a la glucosa. Tot i que es va observar una lleugera millora en la sensibilitat a la insulina en el grup tractat amb AAV8-CAG-BMP7-dmiRT (Figura 47E), la tolerància a la glucosa es veia empitjorada en aquest grup respecte al grup AAV8-CAG-NUL (Figura 47F).

Per tant, els resultats obtinguts a llarg termini en tractar ratolins ob/ob intra-eWAT amb vectors AAV8-CAG-BMP7-dmiRT indicaven que es produïa un augment dels nivells circulant de BMP7 i la transducció dels dipòsits adiposos blancs mentre que el teixit adipós marró i el fetge presentaven nivells baixos d'expressió de *BMP7*. L'augment local de BMP7 a l'eWAT i l'iWAT promovia l'increment de la massa d'aquests dipòsits que alhora provocava un augment del pes corporal dels ratolins no associat a l'augment de la ingesta d'aliments (Figura 48). A més, aquest augment de la massa corporal no estava vinculat a l'acumulació de greix al fetge (Figura 48). Els efectes de BMP7 al teixit adipós blanc incloïen l'increment de l'expansió del teixit per hiperplàsia, caracteritzada per la reducció de la mida dels adipòcits, la reducció de la inflamació i l'augment de la sensibilitat a la insulina (Figura 48). La hiperplàsia estava lligada a un augment de l'adipogènesi generalitzada, amb l'increment de marcadors de preadipòcits, de diferenciació i d'adipòcits madurs (Figura 48).

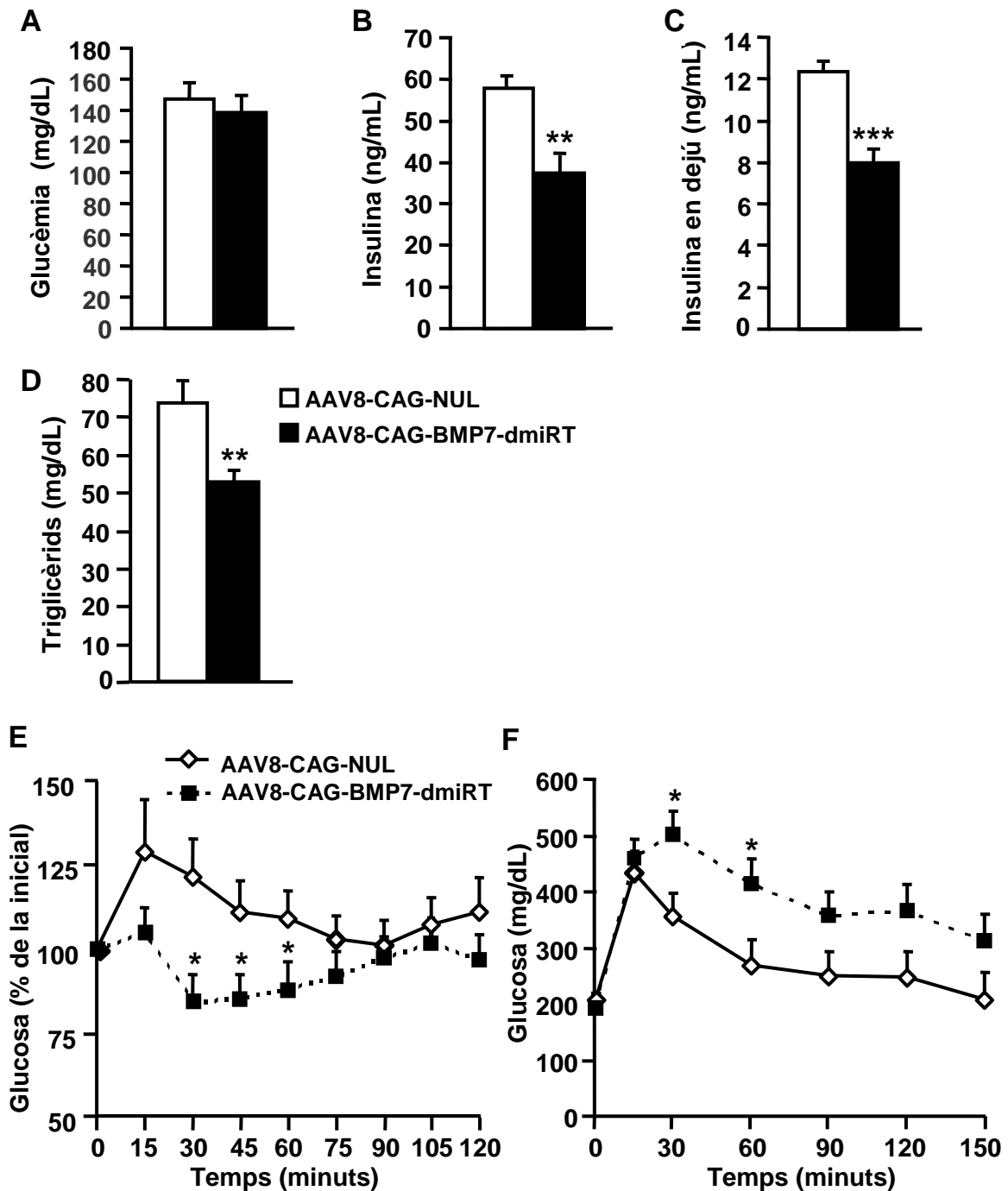


Figura 47. Avaluació dels paràmetres sèrics i de la sensibilitat a la insulina i la tolerància a la glucosa. Ratolins ob/ob mascles d'11 setmanes d'edat es van tractar intra-eWAT amb 10^{12} vg dels vectors virals AAV8-CAG-BMP7-dmiRT o AAV8-CAG-NUL. Es va mesurar **(A)** la glucèmia i **(B)** la insulinèmia en alimentació 13 setmanes post-AAV. **(C)** Nivells d'insulina en dejú 10 setmanes post-AAV. **(D)** Nivells circulants de triglicèrids 13 setmanes post-AAV. **(E)** Test de tolerància a la insulina (ITT) 8 setmanes post-AAV. **(F)** Test de tolerància a la glucosa (GTT) (1 g glucosa/kg) 10 setmanes post-AAV. Dades representades com la mitjana \pm EEM. $n=8-10$. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ vs AAV8-CAG-NUL.

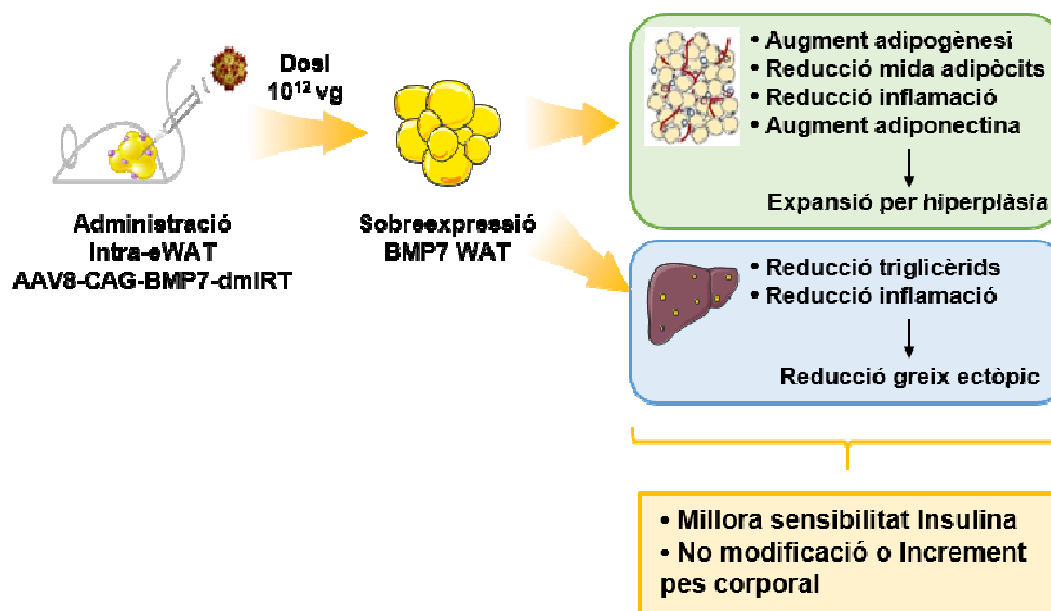


Figura 48. Efectes metabòlics a llarg termini de l'administració intra-eWAT dels vectors AAV8-CAG-BMP7-dmiRT. L'administració intra-eWAT de 10^{12} vg dels vectors AAV8-CAG-BMP7-dmiRT en ratolins alimentats amb dieta estàndard o alta en lípids així com en ratolins ob/ob va promoure la sobreexpressió de *BMP7* principalment a l'eWAT i l'iWAT, així com també l'increment dels nivells circulants d'aquest factor. Els ratolins ob/ob tractats intra-eWAT amb els vectors AAV8-CAG-BMP7-dmiRT van augmentar el seu pes corporal degut a l'expansió del teixit adipós blanc per l'augment de l'adipogènesi del adipòcits blancs. A més, tant en ratolins alimentats amb dieta estàndard o alta en lípids i en ratolins ob/ob, l'administració intra-eWAT de vectors AAV8-CAG-BMP7-dmiRT va mediar la reducció de la mida dels adipòcits. Els ratolins ob/ob també van mostrar una reducció de la inflamació del WAT i nivells circulants incrementats d'adiponectina. D'altra banda, aquest ratolins també van presentar menor acumulació de greix ectòpic i de triglicèrids al fetge així com una disminució de la inflamació en aquest teixit. Com a conseqüència, els ratolins ob/ob tractats localment al eWAT amb vectors AAV8-CAG-BMP7-dmiRT van millorar la sensibilitat a la insulina.

Aquests resultats eren discordants amb els efectes a curt termini prèviament descrits per l'augment dels nivells de *BMP7* circulants mitjançant la sobreexpressió d'aquest factor a fetge després del tractament amb vectors adenovirals: reducció del guany de pes corporal, promoció del desenvolupament del teixit adipós marró i increment de l'oxidació d'àcids greixosos, l'activitat mitocondrial i la despesa energètica (Schulz et al., 2013; Townsend et al., 2012; Tseng et al., 2008). Això podria ser degut a la baixa transducció de l'iBAT i que els nivells circulants de *BMP7* obtinguts per la transferència local de *BMP7* l'eWAT eren inferiors als reportats anteriorment.

Part-ID. Avaluació dels efectes de BMP7 en el teixit adipós de ratolins ob/ob després de la transducció del fetge mitjançant vectors AAVs

A continuació es va analitzar si nivells circulants de BMP7 similars als de l'experiment anterior provocaven efectes semblants al teixit adipós per tal de descartar l'efecte local de la sobreexpressió de BMP7 al WAT. Per aquest motiu, es va utilitzar una nova estratègia mitjançant la sobreexpressió específica de BMP7 al fetge. Per tal d'assolir aquest objectiu, es van administrar per via intravenosa vectors AAV que codificaven per *BMP7* sota el control d'un promotor específic de fetge, de manera que aquest òrgan actues com a bomba secretora de BMP7 a la circulació.

1. GENERACIÓ DEL VECTOR AAV8-hAAT-BMP7

Per tal de sobreexpressar el *BMP7* al fetge i així poder augmentar els nivells circulants d'aquest factor, es van generar vectors plasmídics que codificaven pel *BMP7* optimitzat sota el control del promotor de l'alfa-1-antitripsina humana (hAAT), específic de fetge, tal i com s'havia demostrat anteriorment en el nostre laboratori (pAAV-hAAT-BMP7) (Vilà et al., 2014). D'altra banda, com a control es va generar un plasmidi no codificant que portava la mateixa seqüència del promotor hAAT, el senyal de poli A i les ITRs que el vector (pAAV-hAAT-NUL) (Figura 49).

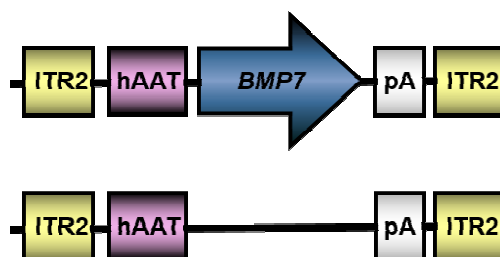


Figura 49. Representació esquemàtica del vector AAV per a expressar *BMP7* específicament a fetge. En la part superior de la figura es mostra la representació esquemàtica del constructe que permet expressar específicament *BMP7* a fetge. Aquest constructe codificava per *BMP7* optimitzat sota el control del promotor de l'alfa-1-antitripsina humana (hAAT) (pAAV-hAAT-BMP7). En la part inferior es mostra el constructe control que no codificava per cap transgèn i contenia el promotor hAAT (pAAV-hAAT-NUL). ITR2: *Inverted Terminal Repeats* de AAV2; hAAT: promotor de la *human alpha 1-anti-trypsin*; *BMP7*: seqüència optimitzada del CDS murí per *BMP7*; pA: poli A, seqüència de poliadenilació. Els constructes no estan representats a escala.

A partir d'aquests constructes es van generar vectors AAV8 que es van produir utilitzant el sistema de triple transfecció en cèl·lules HEK293 i van ser posteriorment purificats i quantificats, segons es detalla a l'apartat de Material i Mètodes.

2. ESTUDI DELS EFECTES A LLARG TERMINI DE L'AUGMENT DELS NIVELLS CIRCULANTS DE BMP7 PER A LA SOBREEXPRESSIONI D'AQUEST FACTOR EN EL FETGE DE RATOLINS ob/ob

Es van estudiar els efectes a llarg termini de la sobreexpressió de *BMP7* en el fetge de ratolins ob/ob. Amb aquesta finalitat, es va procedir a realitzar l'administració intravenosa de 5×10^{11} vg/ratolí dels vectors AAV8-hAAT-BMP7 o AAV8-hAAT-NUL, dosi que permet la transducció del voltant del 55% dels hepatòcits (Vilà et al., 2014), en ratolins ob/ob d'11 setmanes d'edat. El vector viral AAV8-hAAT-NUL es va administrar com a control a la mateixa dosi. A continuació, es va fer un seguiment dels animals fins a les 31 setmanes d'edat i es van realitzar proves metabòliques com el

test de la tolerància a la insulina (ITT) i el test de tolerància a la glucosa (GTT). Un cop finalitzat el seguiment, es van sacrificar els animals i es van disseccionar diversos teixits adiposos i altres teixits somàtics per al seu posterior anàlisi (Figura 50).

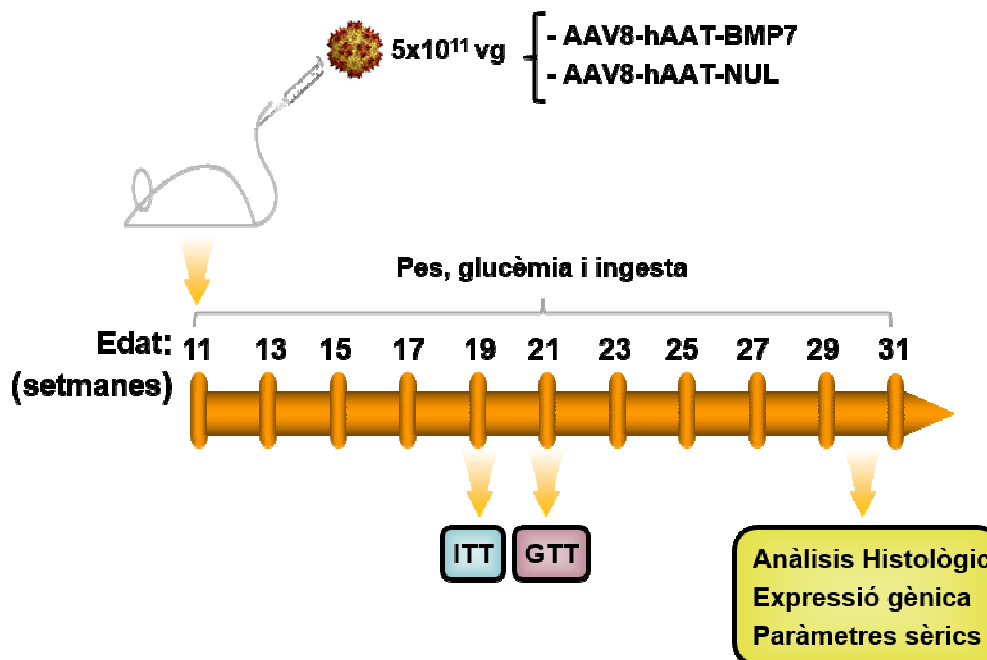


Figura 50. Disseny experimental. Ratolins ob/ob mascles d'11 setmanes d'edat es van administrar per via intravenosa amb 5×10^{11} vg dels vector viral AAV8-hAAT-BMP7 o AAV8-hAAT-NUL. Els animals es van sotmetre a un seguiment setmanal de pesos, ingesta d'aliments i glucèmies. A les 8 i 10 setmanes post-AAV es va realitzar un ITT i un GTT, respectivament. Posteriorment, a les 19 setmanes post-AAV es van sacrificar els animals i es van disseccionar els teixits per realitzar un anàlisi a nivell histològic. També es van analitzar els nivells d'expressió de *BMP7* i d'altres gens que participen en el procés de *browning* i en l'adipogènesi. A més, es van mesurar els nivells circulants de BMP7, d'insulina i d'adiponectina.

2.1. Avaluació dels nivells circulants de BMP7, seguiment del pes i ingesta d'aliments i determinació dels pesos dels teixits en els ratolins ob/ob tractats amb AAV8-hAAT-BMP7

El seguiment setmanal dels pesos va evidenciar que no hi havia diferències ni en pes absolut ni en guany de pes entre grups (Figura 51A-B), fet que es contraposava a l'increment de pes observat mitjançant l'administració local dels vectors AAV8-CAG-BMP7-dmiRT a l'eWAT (Figura 34A-C). Tampoc es van observar diferències en la ingesta d'aliments entre grups (Figura 51C).

En sacrificar els animals 19 setmanes post-administració dels vectors AAV8-hAAT-BMP7 o AAV8-hAAT-NUL, es va comprovar la sobreexpressió de *BMP7* mitjançant RT-PCR en el fetge. Així, es va observar que els animals administrats amb

els vectors AAV8-hAAT-BMP7 mostraven un augment considerable dels nivells d'expressió de *BMP7* en aquest teixit, mentre que el grup nul no expressava el transgèn (Figura 51A). Així mateix, es van quantificar els nivells circulants de BMP7, i es va obtenir una concentració d'aproximadament 550 pg/mL en el grup AAV8-hAAT-BMP7 (Figura 51B), valor superior, però dintre del mateix rang, de l'obtingut després del tractament intra-eWAT amb AAV8-CAG-BMP7-dmiRT (Figura 35B). D'altra banda, els nivells circulants de BMP7 en els ratolins ob/ob tractats amb AAV8-hAAT-NUL eren indetectables (Figura 51B).

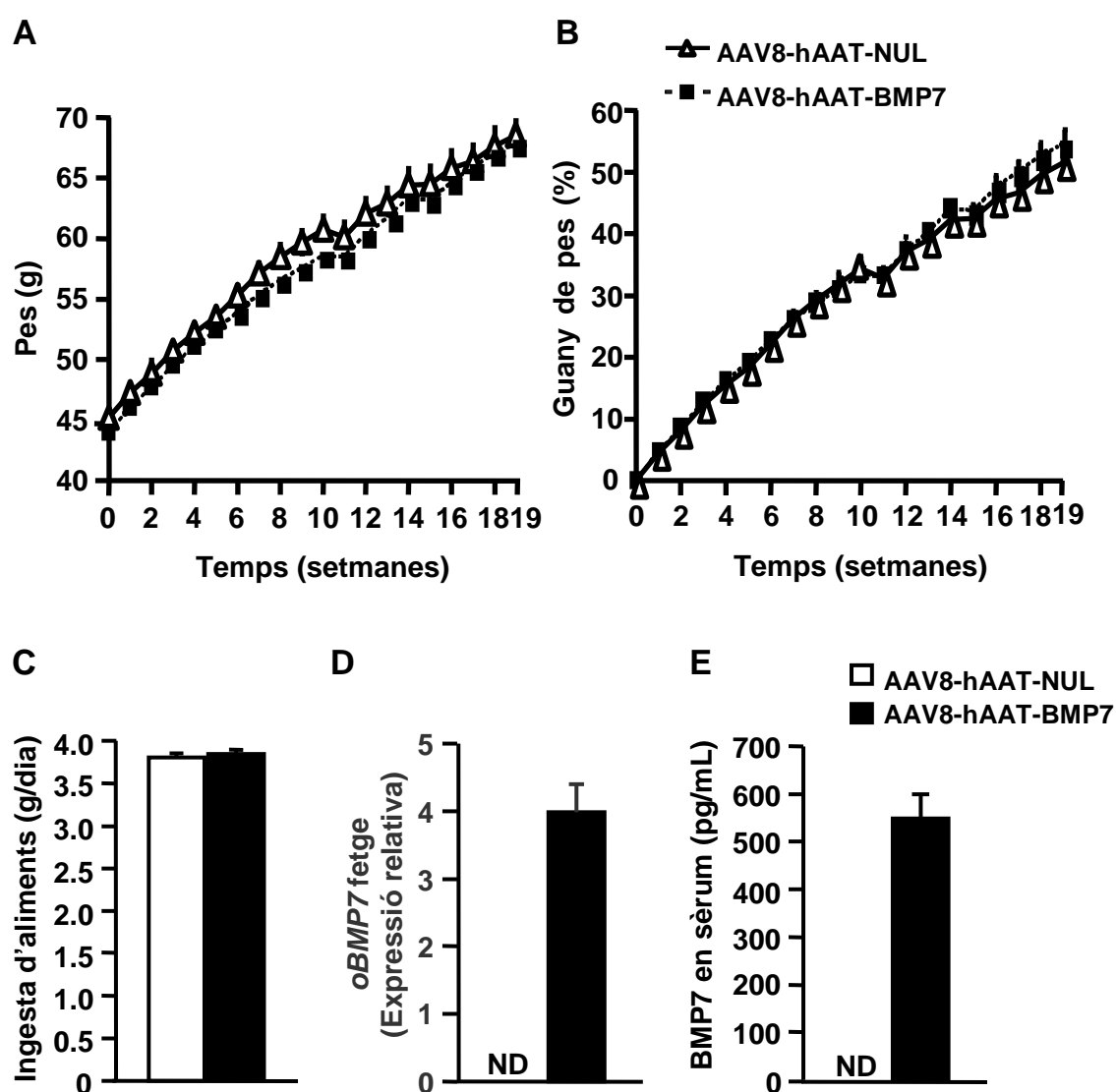


Figura 51. Evolució del pes, ingesta d'aliments i nivells d'expressió i sèrics de BMP7. Ratolins ob/ob mascles d'11 setmanes d'edat es van tractar per via intravenosa amb 5×10^{11} vg dels vectors virals AAV8-hAAT-BMP7 o AAV8-hAAT-NUL. **(A)** Evolució del pes en grams (g) o **(B)** del guany de pes (en % del pes inicial). **(C)** Mitjana de la ingesta d'aliments diària en g/dia. **(D)** Anàlisi dels nivells d'expressió de *BMP7* optimitzat (*oBMP7*) en fetge per RT-PCR i normalitzats per *Rplp0*. **(E)** Nivells sèrics de BMP7. Tots els anàlisis es van dur a terme 19 setmanes post-AAV. Els resultats s'expressen com la mitjana \pm EEM. $n=8-10$ animals/grup. ND: No detectat.

A continuació, es va mesurar el pes del fetge, eWAT, iWAT, rWAT, mWAT i iBAT. A diferència del que s'havia observat en els ratolins ob/ob tractats intra-eWAT amb AAV8-CAG-BMP7-dmiRT (Figura 36), els ratolins ob/ob tractats amb AAV8-hAAT-BMP7 no presentaven canvis en el pes dels teixits avaluats entre els dos grups analitzats (Figura 52).

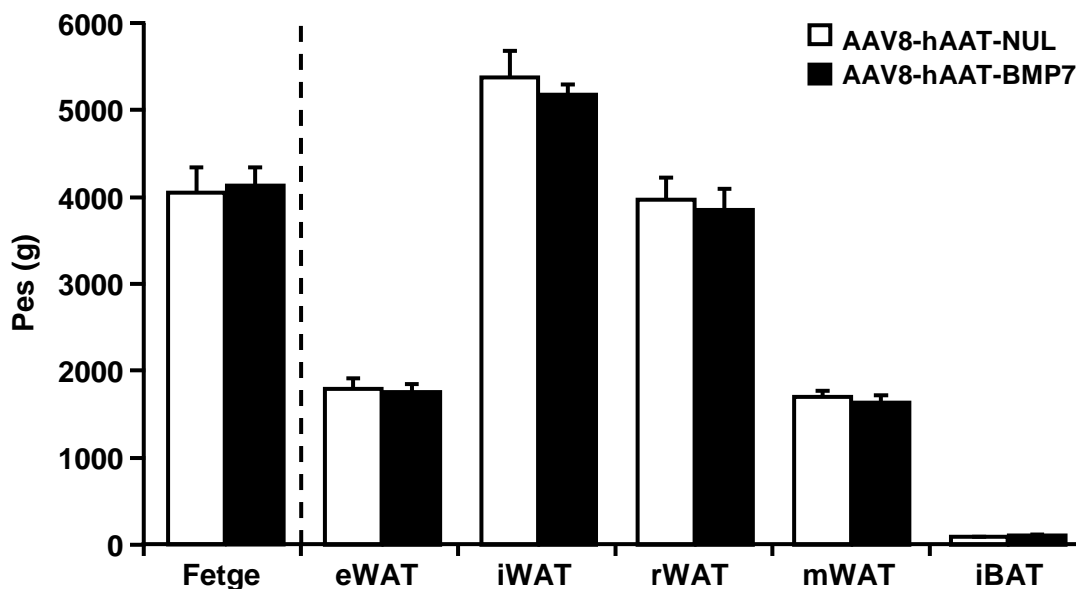


Figura 52. Pesos dels teixits. Ratolins ob/ob mascles d'11 setmanes d'edat es van tractar per via intravenosa amb 5×10^{11} vg dels vectors virals AAV8-hAAT-BMP7 o AAV8-hAAT-NUL i 19 setmanes post-AAV es va mesurar el pes de eWAT, iWAT, rWAT, mWAT, iBAT i fetge. Els resultats s'expressen com la mitjana \pm EEM. $n=8-10$ animals per grup.

2.2. Anàlisi de l'adipogènesi en els teixits adiposos blanc i marró

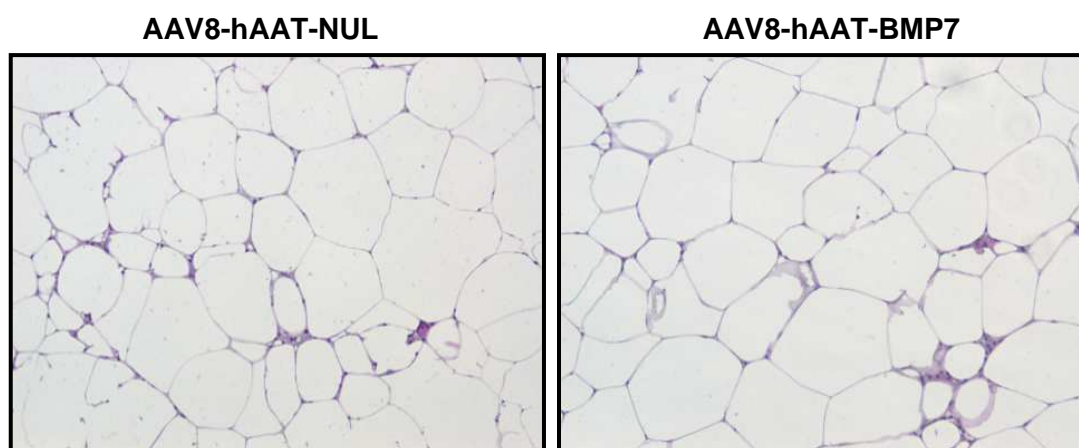
En la Part-IB i IC es va observar que l'administració local a l'eWAT de BMP7 induïa un augment de la hiperplàsia dels teixits adiposos blancs. Per aquest motiu es va determinar si també es produïa en el teixit adipós blanc i marró després de l'administració intravenosa dels vectors AAV8-hAAT-BMP7, amb el qual s'assolien uns nivells circulants de BMP7 del mateix ordre.

2.2.1. Anàlisi de l'adipogènesi en el teixit adipós blanc epididimal

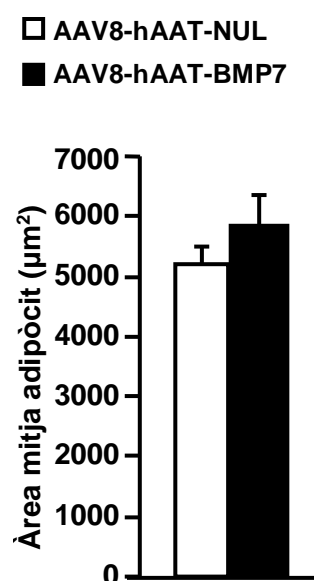
En primer lloc es va realitzar una tinció d'hematoxilina/eosina de seccions d'eWAT per a analitzar la morfologia del teixit, però no es van observar diferències en la mida dels adipòcits entre els grups AAV8-hAAT-BMP7 i AAV8-hAAT-NUL (Figura 53A). La quantificació de l'àrea mitjana i la distribució de l'àrea dels adipòcits va confirmar aquesta observació (Figura 53B-C), ja que els animals que sobreexpressaven *BMP7* presentaven una mida d'adipòcits similar a la dels ratolins administrats amb AAV8-hAAT-NUL.

A continuació, per tal de confirmar que no s'activava l'adipogènesi a l'eWAT, es van analitzar els nivells d'expressió de gens reguladors d'aquest procés i de gens activats en els adipòcits madurs. Com era d'esperar després dels resultats de l'anàlisi histològic, no es van observar canvis en els gens que regulen l'adipogènesi (Figura 54A) ni en gens induïts en l'estadi d'adipòcits madurs, a excepció de la disminució de l'expressió d'*ATGL*, enzim clau en la degradació de triglicèrids al WAT (Figura 54B).

A



B



C

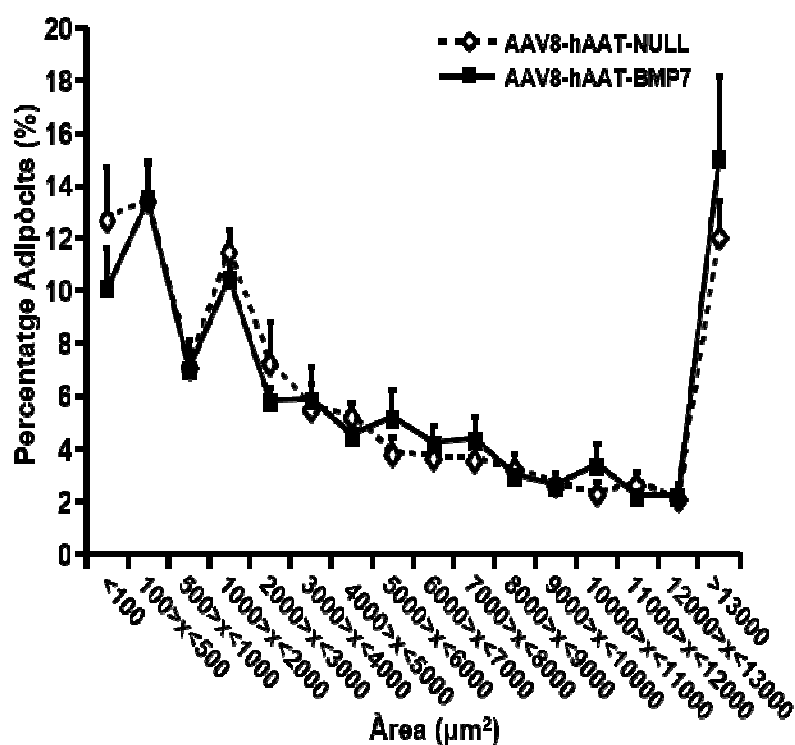


Figura 53. Anàlisi de la morfologia, àrea mitja i distribució dels adipòcits per àrea del teixit adipós blanc epididimal. Ratolins ob/ob 19 setmanes post-administració intravenosa amb 5×10^{11} vg dels vectors virals AAV8-hAAT-BMP7 o AAV8-hAAT-NUL. (A) Tinció hematoxilina/eosina en seccions d'eWAT, Magnificació original x200. (B) Àrea mitjana dels adipòcits blancs en l'eWAT. (C) Distribució de freqüències de l'àrea dels adipòcits en els mateixos grups experimentals. Els resultats s'expressen com la mitjana \pm EEM. n=8-10 animals per grup.

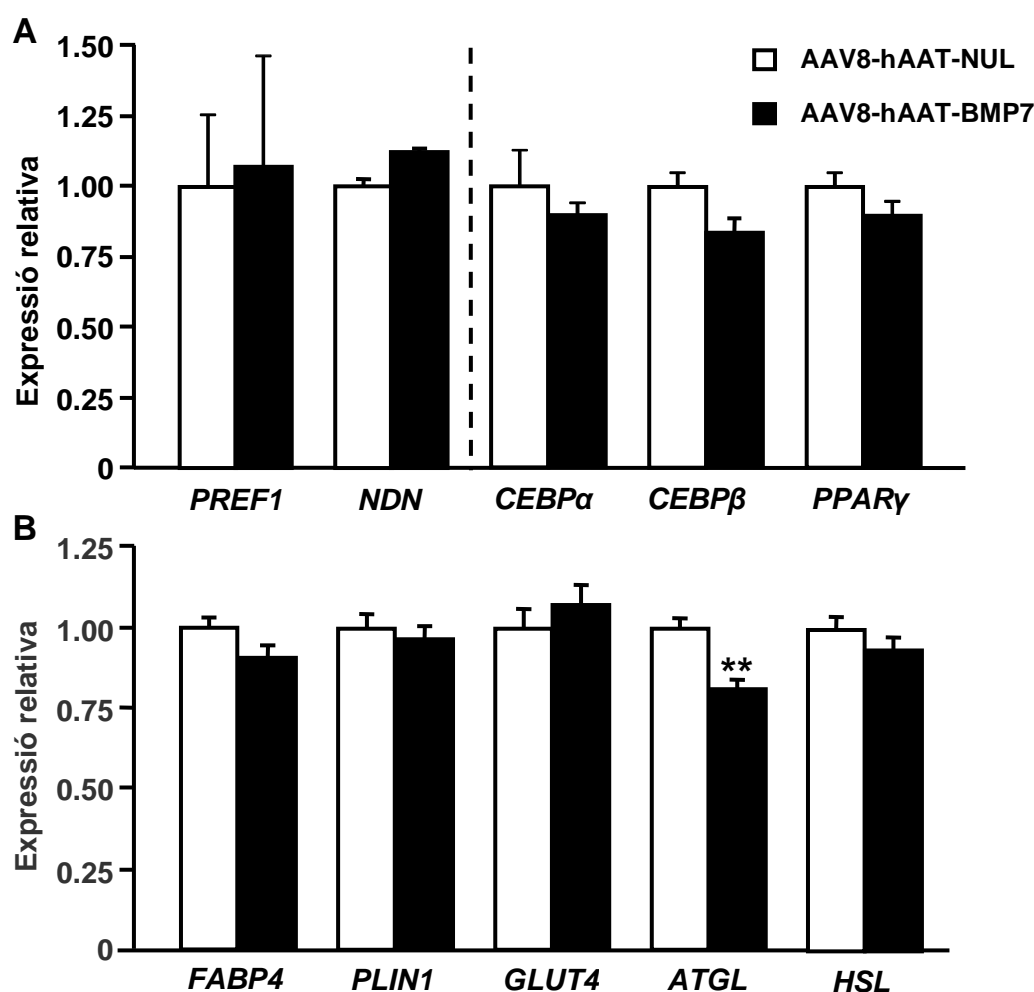


Figura 54. Nivells d'expressió de gens reguladors de l'adipogènesi i gens marcadors d'adipòcits madurs en eWAT. (A-C) Anàlisi per RT-PCR dels nivells d'expressió en l'eWAT de gens repressors (PREF1 i NDN) i inductors (CEBPβ, CEBPα i PPARγ) de la diferenciació d'adipòcits (A) i gens marcadors d'adipòcits madurs (B). Tots els anàlisis es van dur a terme 19 setmanes post-administració intravenosa de 5×10^{11} vg d'AAV8-hAAT-BMP7 o AAV8-hAAT-NUL en ratolins ob/ob d'11 setmanes d'edat. Els resultats s'expressen com la mitjana \pm EEM. n= 8-10 animals per grup. **p<0.01 vs AAV8-hAAT-NUL.

Aquests resultats confirmaven que tot i presentar nivells circulants de BMP7 similars als dels animals administrats intra-eWAT, aquests no eren suficients per induir el procés d'adipogènesi en l'eWAT. Tot suggerint que era necessari uns nivells locals del factor molt elevats per induir aquest procés.

2.2.2. Anàlisi de l'adipogènesi en el teixit adipós blanc inguinal

També es va analitzar la morfologia de l'iWAT mitjançant la tinció de seccions del teixit amb hematoxilina/eosina. Tal i com s'havia observat en l'eWAT, no es van detectar canvis en la mida dels adipòcits entre els dos grups experimentals analitzats (Figura 55A).

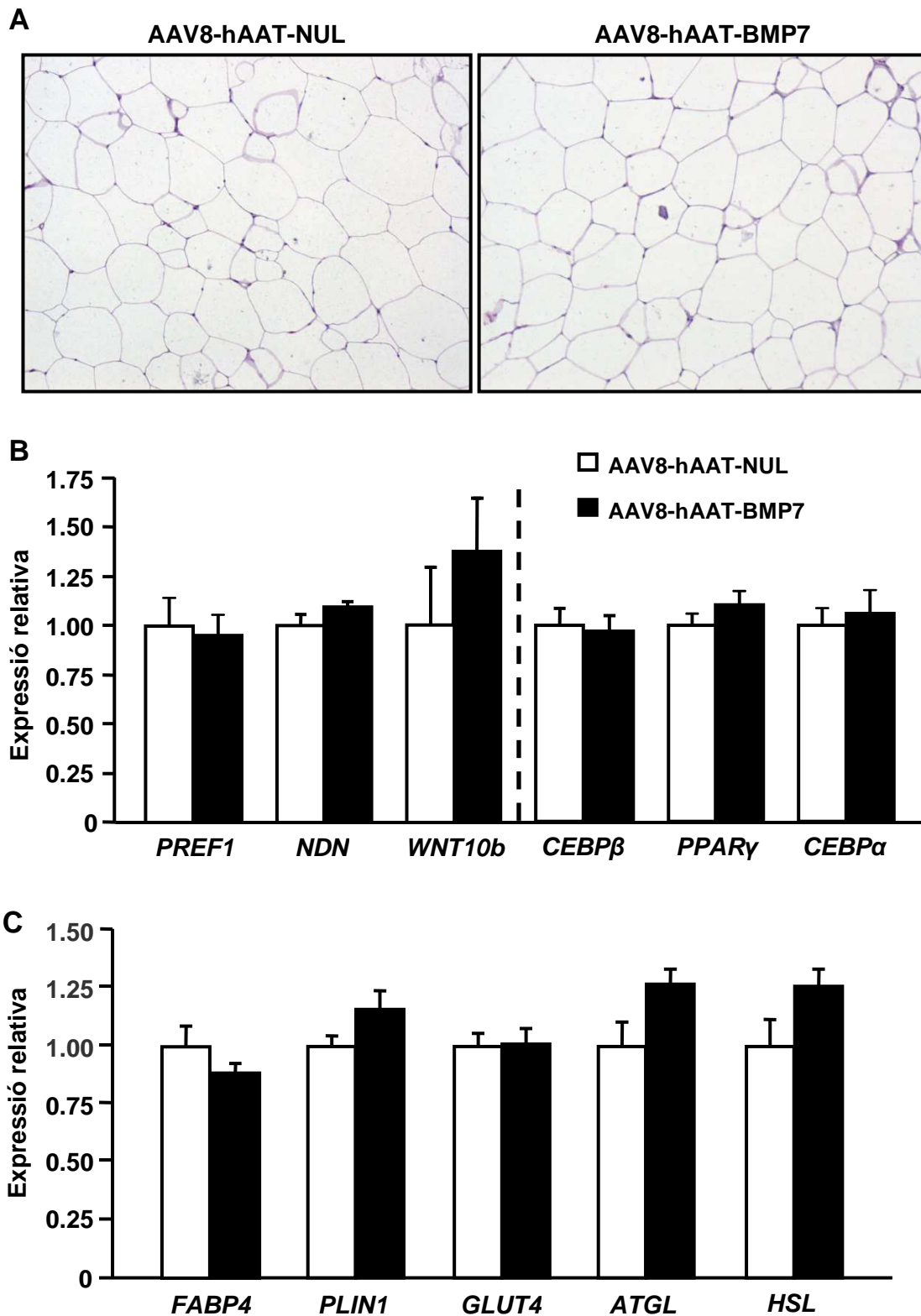


Figura 55. Morfologia del teixit adipós inguinal i expressió de gens involucrats en l'adipogènesi i de gens marcadors d'adipòcits madurs. (A-C) Anàlisi en l'iWAT d'ob/ob 19 setmanes post-administració de 5×10^{11} vg/animal dels vectors AAV8-hAAT-NUL o AAV8-hAAT-BMP7 mitjançant tinció hematoxilina/eosina (magnificació original x200) (A), RT-PCR per gens reguladors de l'adipogènesi: *PREF1*, *NDN*, *WNT10b*, *CEBPβ*, *CEBPα* i *PPARγ* (B), i gens d'adipòcits madurs: *FABP4*, *PLIN1*, *GLUT4*, *ATGL* i *HSL* (C). Els resultats s'expressen com la mitjana \pm EEM. n=8-10 animals per grup.

Seguidament es van quantificar els nivells d'expressió de gens involucrats en l'adipogènesi del teixit adipós com *PREF1*, *NDN* i *WNT10b*, gens codificants per inhibidors de la diferenciació, i *CEBPβ*, *CEBPα* i *PPARγ*, gens inductors del procés (Figura 55B). Alhora, també es va determinar l'expressió de gens propis dels adipòcits madurs com *FABP4*, *PLIN1*, *GLUT4*, *ATGL* i *HSL* (Figura 55C). En cap de les determinacions esmentades anteriorment es van observar canvis entre els dos grups experimentals analitzats (Figura 55B-C).

Per tant, tot i l'increment dels nivells circulants de BMP7 mitjançant el tractament amb AAV8-hAAT-BMP7, no es produïa la inducció de l'adipogènesi de l'eWAT o l'iWAT. Aquestes observacions es contraposaven al que s'havia observat en la Part-IB i IC, on l'administració intra-eWAT dels vectors AAV8-CAG-BMP7-dmiRT promovia la reducció de la mida dels adipòcits en els teixits adiposos blancs gràcies a la inducció de la maquinària de l'adipogènesi (Figures 38-41). Per tant, aquest resultat suggerien que el responsable de l'adipogènesi en els dipòsits adiposos blancs era l'acció paracrina/autocrina de BMP7 que es sobreexpressava localment en aquests teixits.

2.2.3. Anàlisi de l'adipogènesi en el teixit adipós marró interescapular

Anteriorment s'havia descrit que el cultiu de precursors d'adipòcits amb BMP7 induïa la seva determinació i diferenciació cap a adipòcits marrons madurs (Tseng et al., 2008). Per tant, es va analitzar la morfologia del iBAT i es va quantificar l'expressió de gens reguladors de l'adipogènesi en general com *CEBPβ*, *CEBPα*, *PPARγ*, *PREF1* i *NDN*, així com també específicament de l'adipogènesi del teixit adipós marró com *PRDM16*. No es van observar canvis aparents en la morfologia del teixit (Figura 56A) ni en els gens involucrats en l'adipogènesi del teixit adipós marró (Figura 56B).

A més, es van quantificar els nivells d'expressió de gens marcadors d'adipòcits madurs com *FABP4*, *PLIN1*, *GLUT4*, *ATGL* i *HSL*, i tampoc es van observar canvis estadísticament significatius en l'expressió de cap d'aquests factors (Figura 56C).

Aquests resultats eren semblants als obtinguts mitjançant l'administració local a l'eWAT d'AAV8-CAG-BMP7-dmiRT (Figura 42). Per tant, els resultats semblaven indicar que els nivells circulants de BMP7 que s'obtenien mitjançant ambdues aproximacions de transferència gènica de BMP7 al teixit adipós blanc o al fetge no eren suficients per a induir *in vivo* l'adipogènesi dels adipòcits marrons mediada per BMP7.

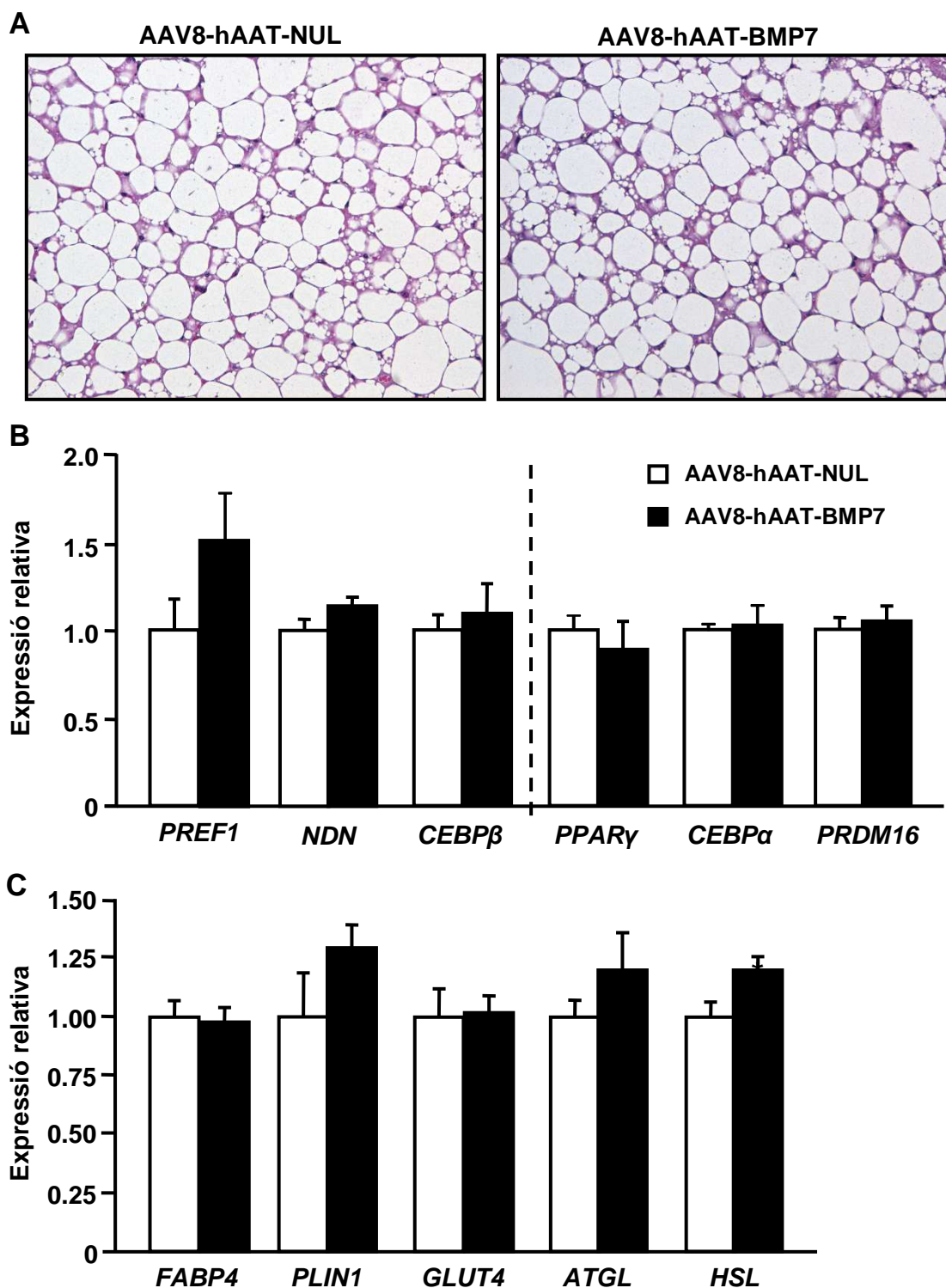


Figura 56. Morfologia del teixit adipós marró interescapular i expressió de gens involucrats en l'adipogènesi i de gens marcadors d'adipòcits madurs. (A-C) Anàlisi de l'iBAT de ratolins *ob/ob* d'19 setmanes post-administració de 5×10^{11} vg/animal dels vectors AAV8-hAAT-NUL o AAV8-hAAT-BMP7 mitjançant tinció hematoxilina/eosina (magnificació original x200) **(A)**, per RT-PCR de gens reguladors de l'adipogènesi com *PREF1*, *NDN*, *WNT10b*, *CEBPβ*, *CEBPα*, *PPARγ*, *PRDM16* **(B)**, i de gens característics d'adipòcits madurs com *FABP4*, *PLIN1*, *GLUT4*, *ATGL* i *HSL* **(C)**. Els resultats s'expressen com la mitjana \pm EEM. n= 8-10 animals per grup.

2.3. Anàlisi de l'activació i la biogènesi mitocondrial en el teixit adipós marró

L'augment dels nivells circulants de BMP7 *in vitro* (Townsend et al., 2012; Tseng et al., 2008) o el cultiu d'adipòcits marrons *in vitro* (Townsend et al., 2013; Tseng et al., 2008) és capaç d'activar el BAT induint la termogènesi i la biogènesi mitocondrial. Per tant, donat els nivells circulants de BMP7 en el nostre estudi, es va analitzar si es modificava l'expressió de gens que participen en aquests processos tals com: gens termogènics (*UCP1* i *CIDEA*), regulador de la biogènesi mitocondrial (*PGC1 α*) i transportadors d'àcids grassos (*CD36* i *CPT1 α*) (Figura 56).

Tot i l'increment dels nivells circulants obtinguts mitjançant el tractament amb AAV8-hAAT-BMP7, no es van observar canvis entre grups en cap dels gens analitzats (Figura 56). Aquests resultats eren similars als obtinguts en la Part-IC mitjançant el tractament intra-eWAT amb AAV8-CAG-BMP7-dmiRT (Figura 43). Per tant, semblava que els nivells circulants de BMP7 obtinguts per ambdós tractaments no eren suficientment elevats per induir l'activació del teixit adipós marró.

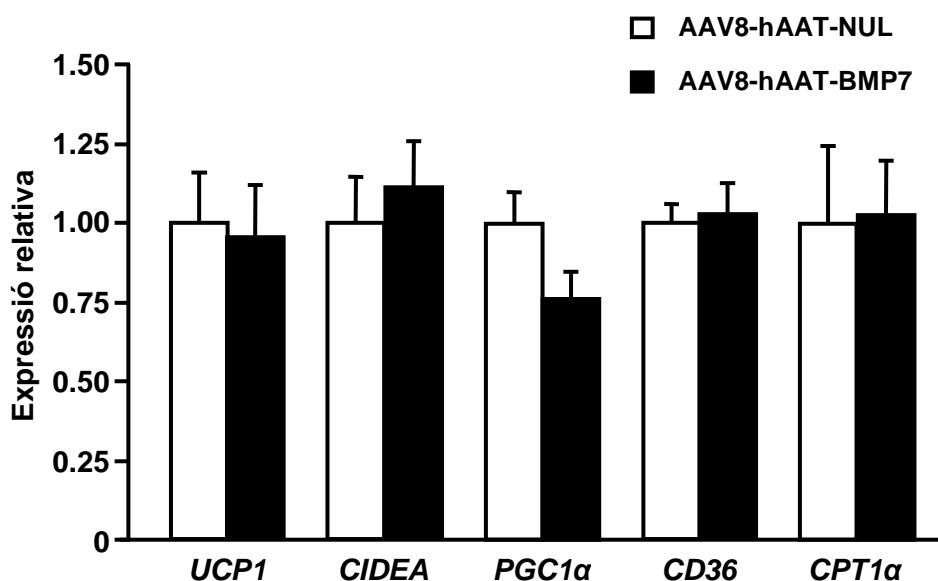


Figura 57. Nivells d'expressió de gens involucrats en l'activitat del teixit adipós marró. Anàlisi per RT-PCR de l'expressió dels gens *UCP1*, *CIDEA*, *PGC1 α* , *CD36* i *CPT1 α* en l'iBAT d'ob/ob administrats intravenosament amb 5×10^{11} vg/animal dels vectors AAV8-hAAT-BMP7 o AAV8-hAAT-NUL. Els resultats s'expressen com la mitjana \pm EEM. n= 8-10 animals per grup.

2.4. Determinació de la inflamació al teixit adipós blanc

La inflamació és un clar indicador de l'estat dels teixits durant l'obesitat, per això es va analitzar la inflamació de l'eWAT dels ratolins ob/ob tractats amb AAV8-

hAAT-BMP7 mitjançant l'anàlisi immunohistoquímica de seccions d'aquest teixit amb anticossos contra MAC2, marcador de macròfags (Figura 58A), i la quantificació mitjançant RT-PCR de marcadors específics de macròfags com *F4/80* i *CD68* (Figura 58B). Tot i que sí que es va observar la disminució dels nivells d'expressió de *CD68* en els animals tractats amb AAV8-hAAT-BMP7, no es van determinar canvis clars en l'expressió de *F4/80* ni en el marcatge de MAC2 entre grups (Figura 58A-B).

D'acord amb les observacions obtingudes amb el tractament amb AAV8-hAAT-BMP7, mitjançant el qual no es produïen canvis en el teixit adipós blanc a nivell d'adipogènesi ni d'inflamació, tampoc es van observar canvis en els nivells circulants d'adiponectina entre grups (Figura 58C).

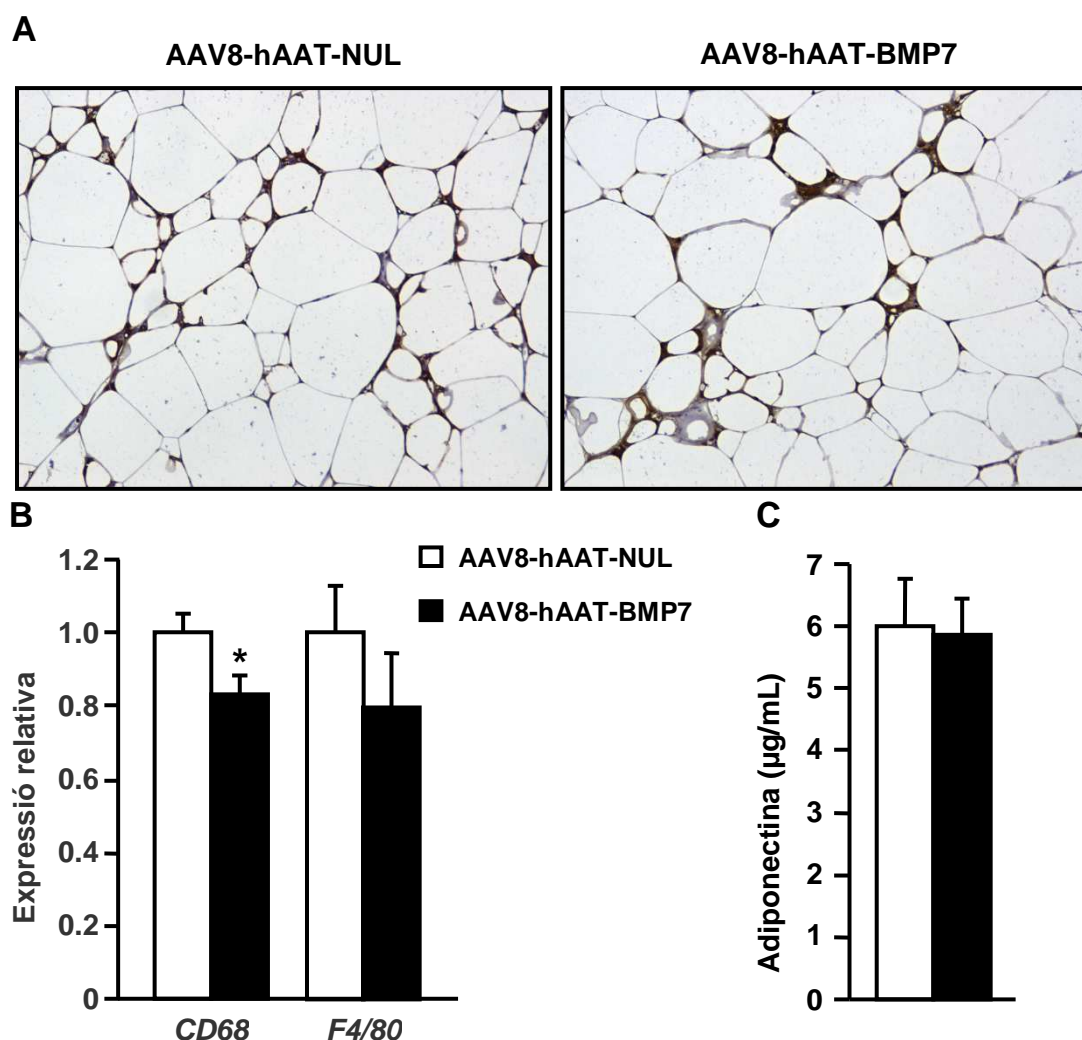


Figura 58. Avaluació de la inflamació del teixit adipós blanc epididimal i dels nivells d'adiponectina en sèrum. (A) Tinció immunohistoquímica contra Mac2 (marró) en seccions d'eWAT de ratolins ob/ob 19 setmanes post-administració intravenosa de 5×10^{11} vg/animal dels vectors AAV8-hAAT-NUL o AAV8-hAAT-BMP7. Magnificació original x200. (B) Anàlisi per RT-PCR dels nivells d'expressió en l'eWAT de *CD68* i *F4/80*. (C) Nivells d'adiponectina en sèrum en els mateixos grups experimentals. Els resultats s'expressen com la mitjana \pm EEM. n= 8-10 animals per grup. * $p < 0.05$ vs AAV8-hAAT-NUL.

2.5. Anàlisi del fetge

Donat que la sobreexpressió de *BMP7* mediada pels vectors AAV es produeix específicament al fetge i que aquest és un teixit metabòlicament molt rellevant, es va analitzar la seva morfologia. En primer lloc es va examinar l'acumulació de greix mitjançant tinció d'hematoxilina/eosina en una secció del fetge, però no es van observar diferències entre grups (Figura 59A). Posteriorment, es va determinar el nivell del contingut de triglicèrids en el fetge. Tot i ser estadísticament superiors en el grup d'animals tractats amb AAV8-hAAT-BMP7 respecte al grup AAV8-hAAT-NUL, aquesta diferència era poc significativa, ja que no es correlacionava ni amb un augment del pes del teixit ni amb un aparent augment de l'acumulació de greix a nivell morfològic (Figura 59B). Per tant, els ratolins *ob/ob* tractats amb AAV8-hAAT-BMP7 no mostraven cap millora en el contingut de greix al fetge en comparació amb els *ob/ob* controls.

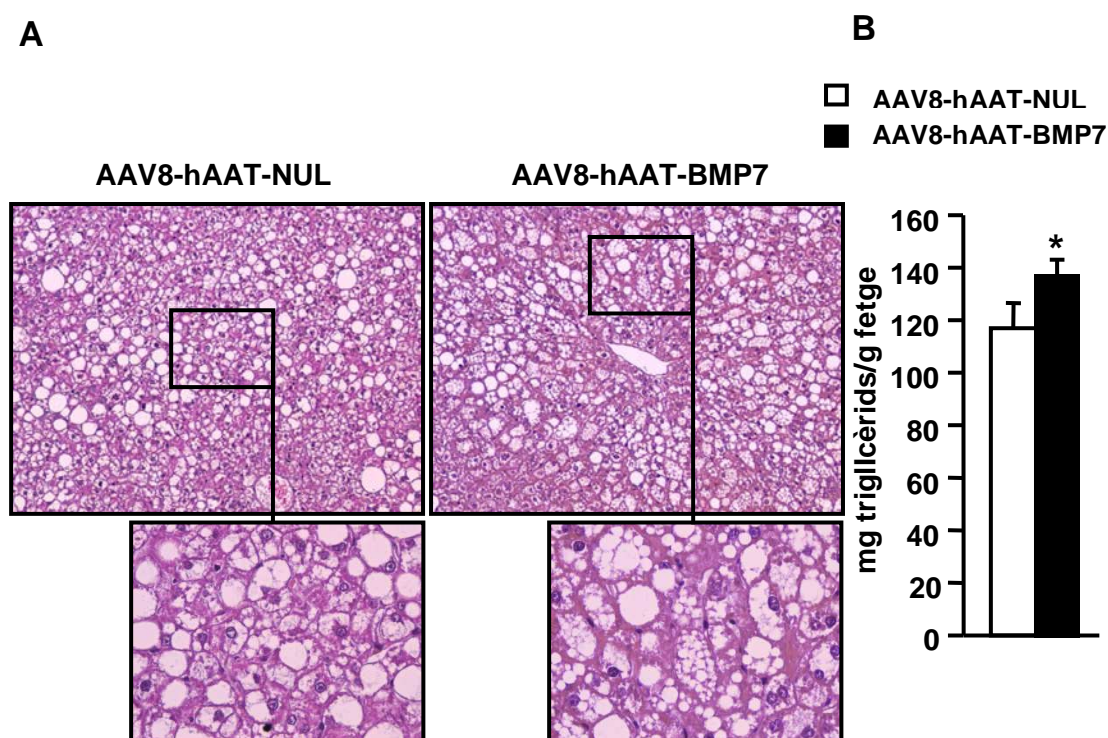


Figura 59. Anàlisi de la morfologia i del contingut de triglicèrids en el fetge. (A) Tinció hematoxilina/eosina en seccions de fetge de ratolins *ob/ob* 19 setmanes post-administració intravenosa de 5×10^{11} vg/animal dels vectors AAV8-hAAT-NUL o AAV8-hAAT-BMP7. Magnificació original x100 i x400(inset). (B) Contingut de triglicèrids en el fetge. Els resultats s'expressen com la mitjana \pm EEM. n= 8-10 animals per grup. * $p < 0.05$ vs AAV8-hAAT-NUL.

A continuació també es van examinar els nivells de macròfags en el fetge mitjançant l'anàlisi immunohistoquímic contra MAC2 (Figura 60A), i la quantificació mitjançant RT-PCR de l'expressió de marcadors específics de macròfags com *F4/80* i *CD68* (Figura 60B-C). Tampoc es va observar cap canvi en el nivell d'inflamació del fetge dels ratolins tractats amb AAV8-hAAT-BMP7 en relació amb els administrats amb AAV8-hAAT-NUL (Figura 60A-C).

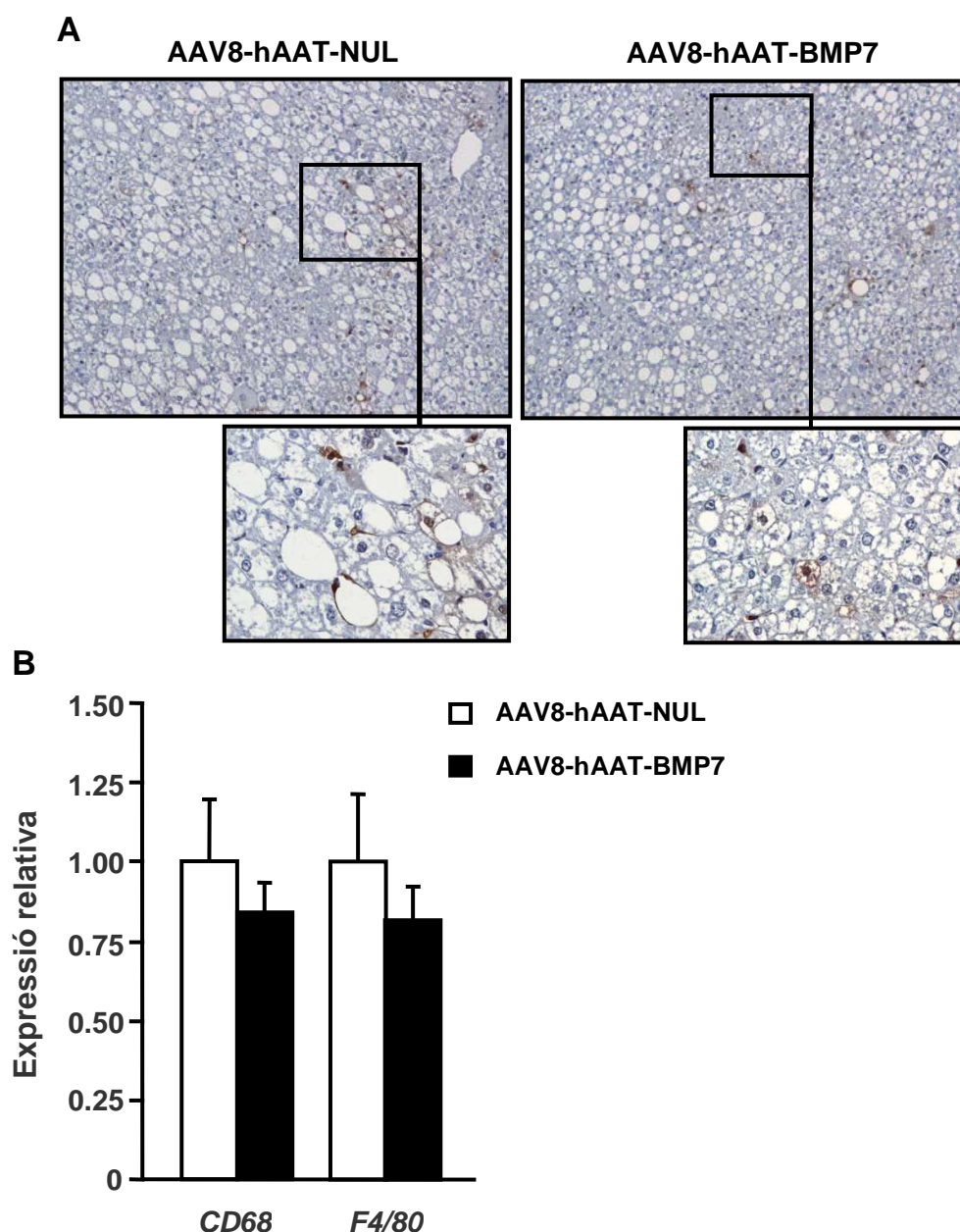


Figura 60. Avaluació de la inflamació al fetge. (A) Tinció immunohistoquímica contra Mac2 (marró) en seccions d'eWAT de ratolins ob/ob 19 setmanes post-administració intravenosa de 5×10^{11} vg/animal dels vectors AAV8-hAAT-NUL o AAV8-hAAT-BMP7. Les fletxes indiquen les cèl·lules Mac2⁺. Magnificació original x200. (B) Anàlisi per RT-PCR dels nivells d'expressió en fetge de *CD68* i *F4/80*. Els resultats s'expressen com la mitjana \pm EEM, n=8-10 animals per grup.

Els resultats de l'anàlisi del fetge indicaven que tot i augmentar els nivells d'expressió local en aquest teixit i els nivells circulants de BMP7, no es produïa una disminució en l'acumulació de greix. Aquests resultats suggerien que la reducció dels triglicèrids i la inflamació al fetge observada en la Part-IC (Figura 45-46) podria ser el resultat de l'augment de la capacitat del teixit adipós blanc per expandir-se, i la consegüent reducció de l'acumulació de greix ectòpic en teixits com el fetge.

2.6. Anàlisi de paràmetres sèrics i test de sensibilitat a la insulina i tolerància a la glucosa

En els experiments descrits en la Part-IB i IC es va observar que es produïen canvis en la sensibilitat a la insulina (Figura 47) induïts per la sobreexpressió de *BMP7* al teixit adipós blanc i també molt probablement per l'augment dels nivells circulants d'aquest factor. En contraposició, a l'estudi del tractament amb AAV8-hAAT-BMP7 no s'observaven canvis en el teixit adipós dels ratolins ob/ob. Per això, quan es va mesurar la glicèmia i la insulinèmia en alimentació i en condicions de dejú, no es van observar canvis en aquests paràmetres en cap de les condicions (Figura 61A-C). També es van quantificar els triglicèrids a nivell sistèmic i en aquest cas tampoc es van observar diferències entre grups (Figura 61D).

Finalment, es va avaluar la sensibilitat a la insulina i la tolerància a la glucosa mitjançant el test de tolerància a la insulina i el test de tolerància a la glucosa. Tot i no haver-se observat canvis en el teixit adipós ni el fetge, es va produir una millora en la sensibilitat a la insulina en els animals tractats amb AAV8-hAAT-BMP7 (Figura 61E). No obstant, no es van observar canvis en la tolerància a la glucosa entre els animals administrats amb AAV8-hAAT-BMP7 o AAV8-hAAT-NUL (Figura 61F).

Aquests resultats indicaven que tot i no observar canvis en el teixit adipós ni el fetge dels animals tractats amb AAV8-hAAT-BMP7, l'augment dels nivells circulants de BMP7 millorava la sensibilitat a la insulina dels animals.

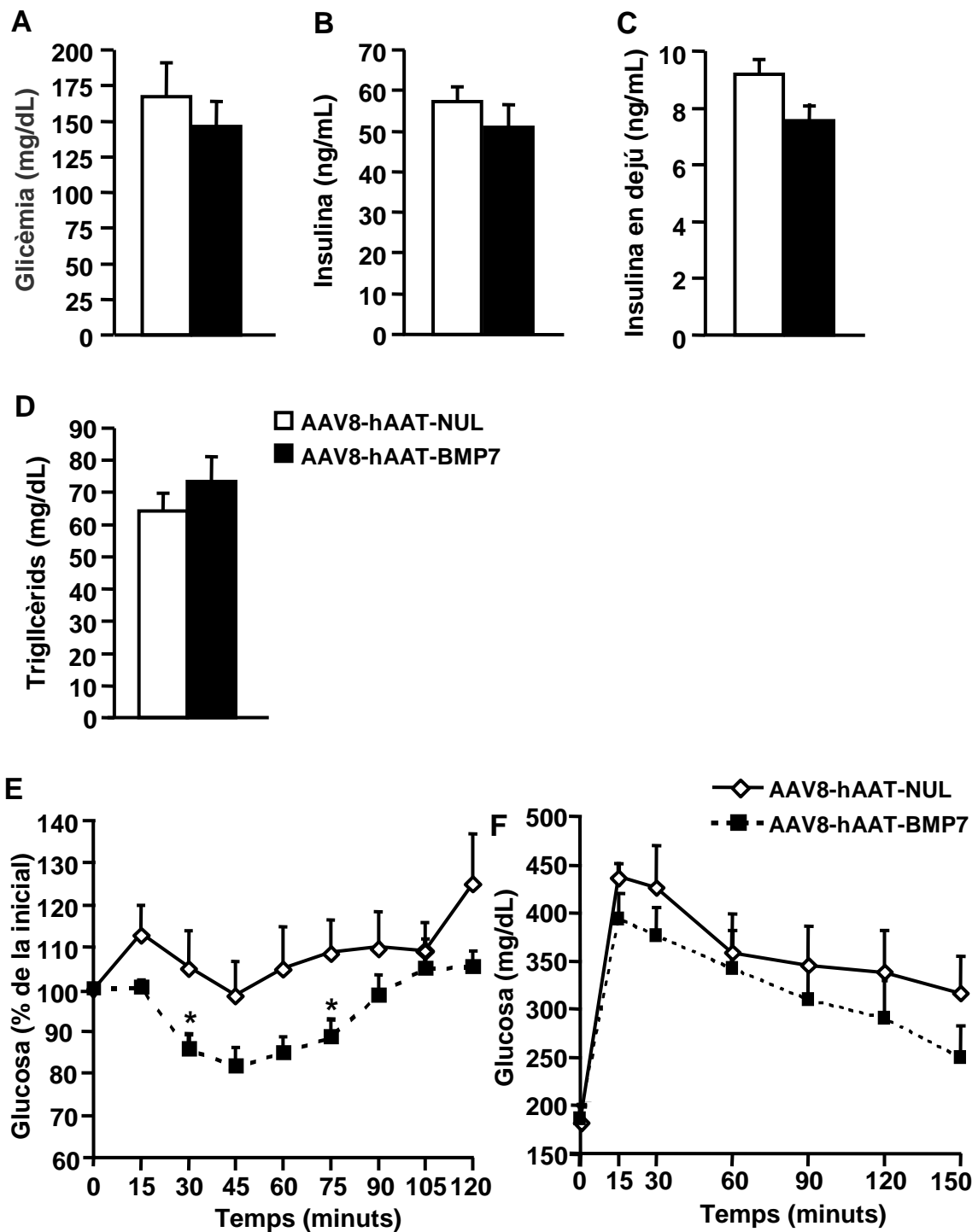


Figura 61. Avaluació dels paràmetres sèrics i de la sensibilitat a la insulina i la tolerància a la glucosa. Ratolins ob/ob mascles d'11 setmanes d'edat es van tractar per via intravenosa amb 5×10^{11} vg/animal dels vectors AAV8-hAAT-NUL o AAV8-hAAT-BMP7. Es va mesurar **(A)** la glucèmia i **(B)** la insulinèmia en alimentació 19 setmanes post-AAV. **(C)** Nivells d'insulina en dejú 10 setmanes post-AAV. **(D)** Nivells circulants de triglicèrids 19 setmanes post-AAV. **(E)** Test de tolerància a la insulina (ITT) 8 setmanes post-AAV. **(F)** Test de tolerància a la glucosa (GTT) (1 g glucosa/kg) 10 setmanes post-AAV. Dades representades com mitjana \pm EEM. $n=8-10$. * $p < 0.05$ vs AAV8-hAAT-NUL.

El tractament amb AAV8-hAAT-BMP7 a la dosi de 5×10^{11} genomes virals per animal no va resultar en una millora en l'adipogènesi i la inflamació del teixit adipós blanc, tampoc va causa canvis en l'acumulació de greix i inflamació del fetge, ni en els nivells d'insulina circulants, tal i com s'havia observat mitjançant l'administració local intra-eWAT de l'AAV8-CAG-BMP7-dmiRT. Això semblava indicar que aquests efectes es devien a l'acció paracrina/autocrina de BMP7 específicament per l'expressió al teixit adipós blanc. D'altra banda, tant l'administració intra-eWAT com per via intravenosa de vectors AAV-BMP7 promovia una millora de la sensibilitat a la insulina, que semblava ser degut en part a l'augment dels nivells circulants de BMP7.

A més, tot i que l'administració intravenosa d'AAV8-hAAT-BMP7 a la dosi de 5×10^{11} genomes virals per animal induïa l'augment dels nivells circulants de BMP7, no es reduïa el pes dels animals, ni incrementava l'activitat termogènica del teixit adipós marró. Aquests resultats suggerien que probablement era necessari augmentar els nivells circulants de BMP7 per poder exercir un efecte antidiabètic i antiobesogènic a llarg termini, tal i com s'havia observar prèviament en estudis a curt termini de tractament de ratolins ob/ob amb Ad-BMP7 (Townsend et al., 2012).

**Part-II. Avaluació dels efectes de nivells circulants
elevats de BMP7**

Donat que l'augment dels nivells circulants de BMP7 en els estudis anteriors portaven a una millora de la sensibilitat a la insulina, però no contrarestaven completament la malaltia, en la segona part d'aquesta tesi doctoral es va decidir estudiar els efectes de nivells circulants molt elevats de BMP7 en l'obesitat i la resistència a la insulina.

1. ESTUDI DE DOSI RESPOSTA

Amb l'objectiu de determinar si d'administració de dosis més elevades de vectors AAV8-hAAT-BMP7 podien mediar nivells sèrics de la proteïna similars als descrits en la bibliografia que indueixen efecte terapèutic (Townsend et al., 2012), es va procedir a realitzar un estudi a curt termini mitjançant l'administració intravenosa de diferents dosis de vectors AAV8-hAAT-BMP7 en ratolins C57BL/6 de 8 setmanes d'edat. Amb aquesta finalitat, es va administrar sistèmicament per la vena de la cua el vector AAV8-hAAT-BMP7 a la dosi de 10^{12} , 5×10^{12} i 10^{13} genomes virals per animal, per tal d'incrementar els nivells circulants de BMP7. El vector viral AAV8-hAAT-NUL es va administrar a la dosi més elevada, 10^{13} genomes virals per animal, com a control. A continuació, es va fer un seguiment durant 3 setmanes, al final del qual es van determinar els nivells circulants de BMP7 (Figura 62).

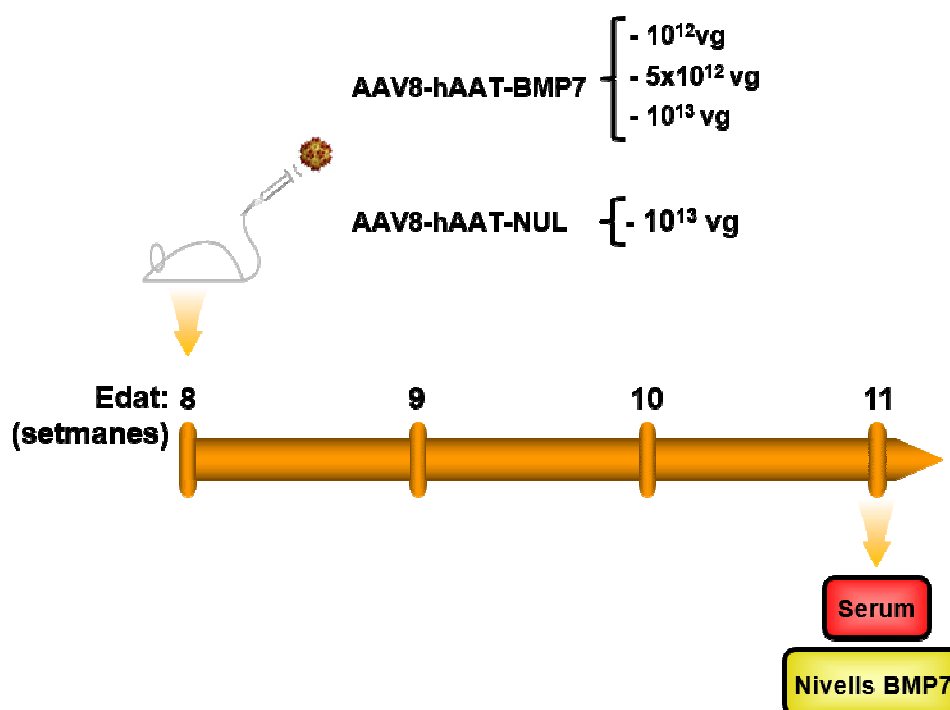


Figura 62. Disseny experimental. Ratolins C57BL/6 de 8 setmanes d'edat es van tractar per via intravenosa amb dosis de 10^{12} , 5×10^{12} i 10^{13} vg/animal dels vectors AAV8-hAAT-BMP7 o 10^{13} vg/animal del vector AAV8-hAAT-NUL. Els animals es van sacrificar a les 3 setmanes post-AAV i es va extreure sèrum per mesura nivells de la proteïna BMP7, ALT i AST.

1.1. Nivells sèrics de BMP7

Un cop sacrificats els animals 3 setmanes després de l'administració de diferents dosis dels vectors AAV8-hAAT-BMP7 o AAV8-hAAT-NUL, es van determinar els nivells sèrics de BMP7 mitjançant ELISA. Els animals administrats amb els vectors AAV8-hAAT-BMP7 presentaven un augment considerable dels nivells sèrics de BMP7, mentre que els animals administrats amb AAV8-hAAT-NUL mostraven nivells no detectables de la proteïna en sèrum (Figura 63). Els animals tractats amb 10^{12} vg de vector AAV8-hAAT-BMP7 presentaven nivells de BMP7 del voltant de 20000 pg/mL (Figura 63), mentre que els ratolins tractats amb dosis de 5×10^{12} i 10^{13} vg presentaven 150000 i 300000 pg/mL, respectivament (Figura 63). Totes les dosis testades donaven lloc a nivells circulants de BMP7 molt superiors als mediats per la dosi anteriorment utilitzada en la Part-ID en que es van administrat vectors AAV8-hAAT-BMP7 a la dosi de 5×10^{11} vg/animal (Figura 51). A més, es va observar que les dosis d'AAVs de 5×10^{12} i 10^{13} vg/animal mediaven uns nivells circulants de BMP7 de l'ordre dels descrits en els estudis a curt termini després de l'administració intravenosa de l'Ad-BMP7 en ratolins obesos induïts per la dieta i ratolins ob/ob i que era del voltant de 300000 pg/mL (Townsend et al., 2012).

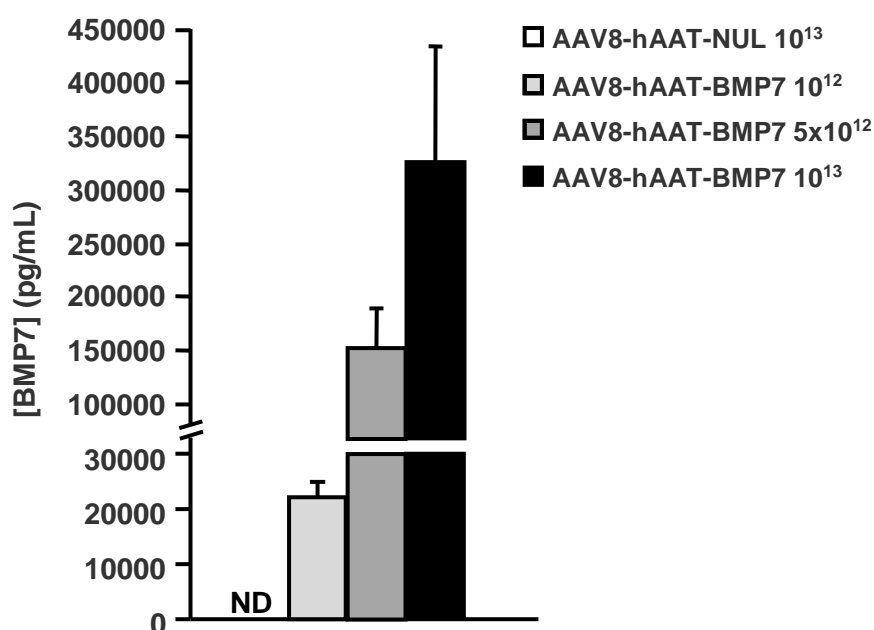


Figura 63. Nivells sèrics de BMP7. Ratolins C57BL/6 de 8 setmanes d'edat es van tractar per via intravenosa amb dosis de 10^{12} , 5×10^{12} i 10^{13} vg/animal dels vectors AAV8-hAAT-BMP7 i 10^{13} vg/animal del vector AAV8-hAAT-NUL. Quantificació dels nivells sèrics de BMP7 3 setmanes post-AAV. Els resultats s'expressen com la mitjana \pm EEM. n=8-10 animals/grup. ND: No detectat.

1.2. Avaluació del dany hepàtic

Per determinar si l'administració sistèmica dels vectors AAV8-hAAT-BMP7 a dosis elevades induïa dany hepàtic, es van mesurar 3 setmanes post-injecció els nivells circulants de les transaminases, Aspartat Aminotransferasa (AST) i Alanina Aminotransferasa (ALT), principals marcadors de dany hepàtic (Chen et al., 2015). Cap dels dos marcadors de dany hepàtic analitzats va mostrar variacions entre els grups tractats amb AAV8-hAAT-BMP7 o AAV8-hAAT-NUL respecte el control sense injectar (Figura 64). Aquests resultats indicaven que tot i que la dosis d'AAV administrada era molt elevada, no causava dany hepàtic.

L'administració intravenosa dels vectors AAV8-hAAT-BMP7 a la dosi de 5×10^{12} vg per animal era la més baixa que permetia assolir nivells circulants de BMP7 de l'ordre dels aconseguits per administració intravenosa de dosis elevades d'Ad-BMP7 (Townsend et al., 2012) sense induir dany hepàtic. Per aquest motiu, es va utilitzar aquesta dosi com a dosi més alta per a tractar ratolins C57BL/6 que havien estat prèviament alimentats amb HFD, model d'obesitat i resistència a la insulina.

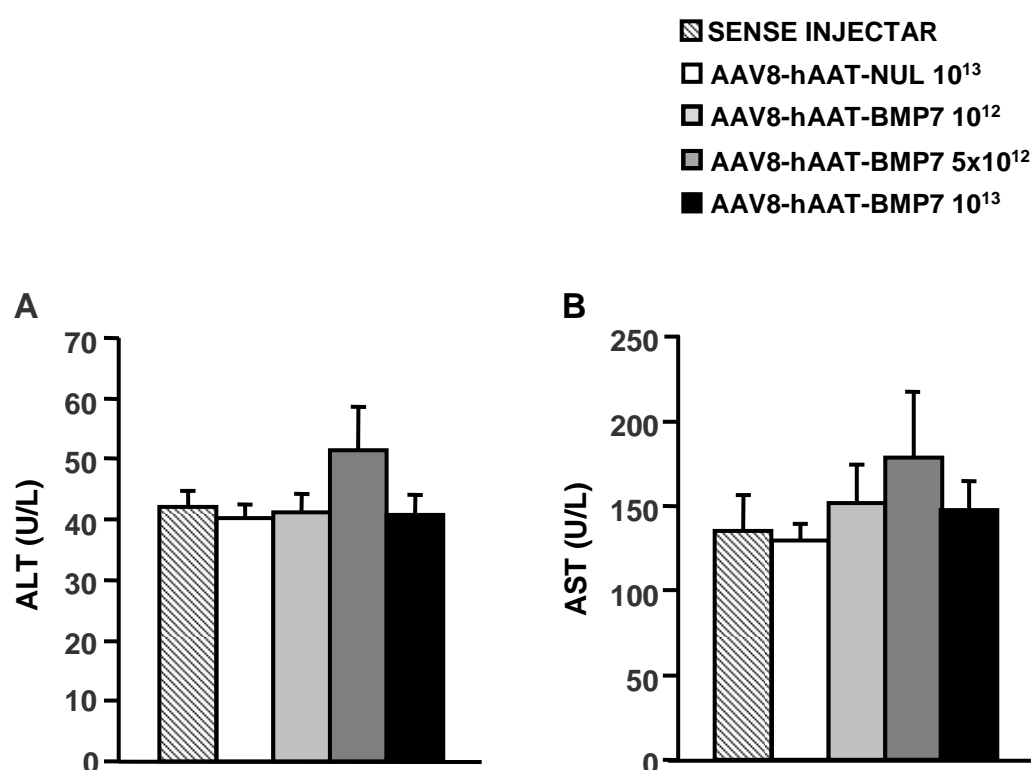


Figura 64. Nivells sèrics de marcadors de dany hepàtic. Ratolins C57BL/6 de 8 setmanes d'edat es van tractar per via intravenosa amb dosis de 10^{12} , 5×10^{12} i 10^{13} vg/animal dels vectors AAV8-hAAT-BMP7 i 10^{13} vg/animal del vector AAV8-hAAT-NUL. Quantificació dels nivells sèrics (A) d'ALT i (B) d'AST 3 setmanes post-AAV. Els resultats s'expressen com la mitjana \pm EEM. n=8-10 animals/grup.

2. ESTUDI DELS EFECTES A LLARG TERMINI DE NIVELLS CIRCULANTS ELEVATS DE BMP7 EN RATOLINS ALIMENTATS AMB DIETA ALTA EN LÍPIDS

Per tal d'avaluar els efectes antidiabètics i antiobesogènics de nivells circulants elevats de BMP7 es va fer servir animals C57BL/6 de 8 setmanes que van ser alimentats amb HFD. Posteriorment, a les 6 setmanes des de l'inici de la dieta, es va realitzar l'administració dels vectors AAV8-hAAT-BMP7 per via intravenosa a dosis de 10^{12} , 2.5×10^{12} i 5×10^{12} vg per animal. El vector AAV8-hAAT-NUL es va administrar a la dosi de 5×10^{12} vg per animal com a control negatiu. A més, es va mantenir un grup tractat amb 5×10^{12} vg per animal del vector AAV8-hAAT-NUL alimentat amb dieta estàndard com a control de la HFD. Així doncs, es va fer un seguiment setmanal del pes, glucèmia i ingesta dels animals i es van dur a terme proves metabòliques com la determinació del gast energètic, el test de la tolerància a la insulina (ITT) i el test de tolerància a la glucosa (GTT) per tal d'avaluar si l'augment dels nivells circulants de BMP7 mitjançant la sobreexpressió al fetge de *BMP7* mediada pel vector AAV8-hAAT-BMP7 era capaç de prevenir l'augment de pes i/o millorar la sensibilitat a la insulina (Figura 65).

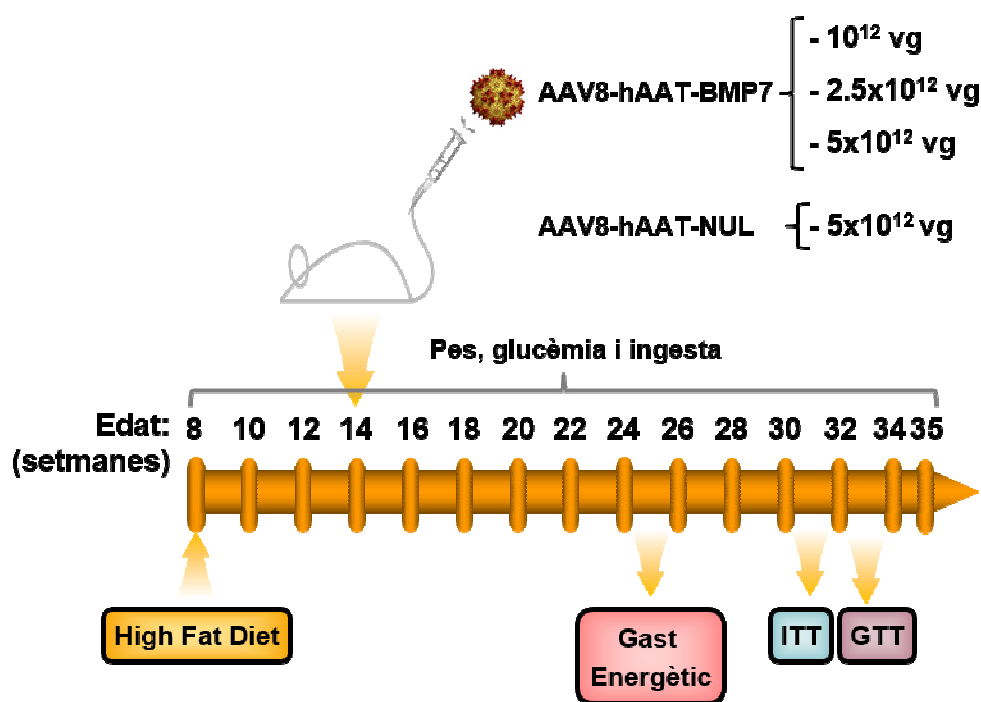


Figura 65. Disseny experimental. Ratolins mascles C57BL/6 de 8 setmanes d'edat es van alimentar amb HFD i es van administrar a les 14 setmanes d'edat per via intravenosa amb dosis de 10^{12} , 2.5×10^{12} i 5×10^{12} vg/animal dels vector virals AAV8-hAAT-BMP7 i 5×10^{12} vg/animal del vector AAV8-hAAT-NUL. Els animals es van sotmetre a un seguiment setmanal del pes, ingesta d'aliments i glucèmia. A les 17 setmanes post-AAV es va avaluar el gast energètic. Posteriorment a les 17 i 19 setmanes post-AAV es va realitzar un ITT i un GTT, respectivament. Els animals segueixen en seguiment.

2.1. Avaluació de seguiment del pes i ingesta d'aliments i determinació dels nivells circulants de BMP7

Es va avaluar el pes dels animals alimentats amb HFD i tractats amb vectors AAV8-hAAT-BMP7 versus els tractats amb vectors AAV8-hAAT-NUL alimentant amb chow o HDF (Figura 66A). Els animals administrats per via intravenosa amb dosis de 10^{12} vg, 2.5×10^{12} vg o 5×10^{12} vg de vectors AAV8-hAAT-BMP7 van mostrar una reducció del seu pes corporal fins assolir un pes similar al grup control alimentat amb chow i administrat amb el vector AAV8-hAAT-NUL (Figura 66A). Cal destacar que la disminució del pes es va dur a terme d'una forma més pronunciada entre la setmana 7 i 10 en el cas dels animals administrats amb 2.5×10^{12} vg i 5×10^{12} vg de vectors AAV8-hAAT-BMP7, mentre que el grup administrat amb 10^{12} vg del vector AAV8-hAAT-BMP7 va reduir el seu pes més pronunciadament entre les setmanes 11 i 13 (Figura 66A). Els canvis observats en el pes corporal eren causats parcialment per la reducció de la ingesta d'aliments dels grups alimentat amb HFD administrats amb AAV8-hAAT-BMP7 respecte al grup AAV8-hAAT-NUL (Figura 66B). Els animals tractats amb AAV8-hAAT-BMP7 el qual presentaven una ingesta similar a la grup AAV8-hAAT-NUL alimentat amb chow (Figura 66B).

Posteriorment, a les 12 setmanes d'edat, es van determinar els nivells de BMP7 en sèrum dels animals C57BL/6 alimentats amb HFD i administrats amb 10^{12} , 2.5×10^{12} i 5×10^{12} vg/animal del vector AAV8-hAAT-BMP7, i 5×10^{12} vg/animal del vector AAV8-hAAT-NUL. Els animals administrats amb AAV8-hAAT-BMP7 presentaven nivells de BMP7 en sèrum molt elevats, mentre que els animals administrats amb AAV8-hAAT-NUL presentaven nivells no detectables de la proteïna (Figura 66C). Així mateix, la dosi de 10^{12} vg/animal d'AAV8-hAAT-BMP7 promovia nivells de BMP7 aproximadament de la meitat que els aconseguits mitjançant les dosis de 2.5×10^{12} i 5×10^{12} vg/animal (Figura 66C). No es van observar diferències en els nivells dels animals tractats amb 2.5×10^{12} i 5×10^{12} vg/animal, suggerint que aquestes dues dosis ja eren molt elevades i s'assolia el màxim de transducció del fetge en animals alimentats amb dieta alta en lípids.

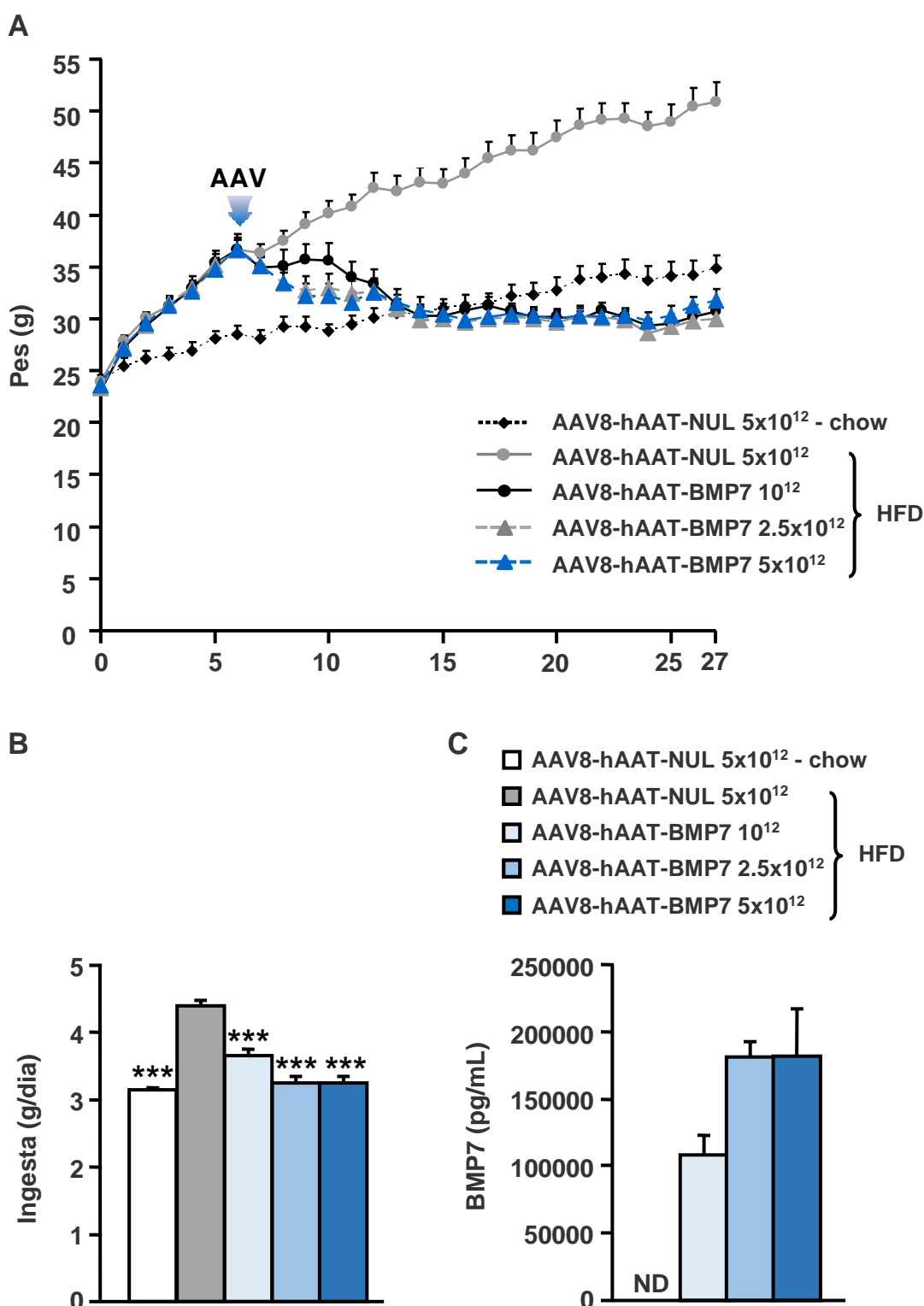


Figura 66. Evolució del pes, ingesta d'aliments i nivells sèrics de BMP7. Ratolins mascles C57BL/6 de 8 setmanes d'edat es van alimentar amb HFD i es van administrar a les 14 setmanes d'edat per via intravenosa amb dosis de 10^{12} , 2.5×10^{12} i 5×10^{12} vg/animal dels vector virals AAV8-hAAT-BMP7 i 5×10^{12} vg/animal del vector AAV8-hAAT-NUL. **(A)** Evolució del pes en grams (g). **(B)** Mitjana de la ingesta d'aliments diària en g/dia es el període post-AAV. **(C)** Nivells sèrics de BMP7 a les 6 setmanes post-AAV. Els resultats s'expressen com la mitjana \pm EEM. $n=8-10$ animals/grup. ND: No detectat. *** $P < 0.001$ vs AAV8-hAAT-BMP7 alimentat amb HFD.

2.2. Avaluació de la despesa energètica

Donat l'efecte en la pèrdua de pes observat mitjançant l'administració intravenosa del vector AAV8-hAAT-BMP7, es va analitzar el gast energètic d'aquest animals. Específicament, es va avaluar la despesa energètica mitjançant calorimetria indirecta en els animals alimentats amb dieta alta en lípids i tractats amb vectors AAV8-hAAT-BMP7 en relació amb els tractats amb vectors AAV8-hAAT-NUL alimentant amb chow o HDF (Figura 67). Els animals administrats per via intravenosa amb dosis de 10^{12} vg i 2.5×10^{12} vg de vectors AAV8-hAAT-BMP7 van mostrar un consum d'O₂, una producció de CO₂ i un gast energètic més elevat que el grup AAV8-hAAT-NUL alimentant amb HFD i similar al del grup AAV8-hAAT-NUL alimentant amb chow (Figura 67A-C). D'altra banda, els animals administrats per via intravenosa amb la dosi de 5×10^{12} vg de vectors AAV8-hAAT-BMP7 van mostrar un consum d'O₂, una producció de CO₂ i un gast energètic més elevat que els grups AAV8-hAAT-NUL alimentants amb HFD i chow (Figura 67A-C).

2.3. Avaluació de la sensibilitat a la insulina

A continuació es va mesurar la glucèmia en condicions de dejú i alimentació (Figura 68A,C). Tot i que no es van observar variacions en la glucèmia en alimentació a les 23 setmanes (Figura 68A), els grups administrats amb els vectors AAV8-hAAT-BMP7 presentaven una lleugera reducció de la glucèmia en dejú a les 25 setmanes a la dosi de 2.5×10^{12} vg (Figura 68C).

També es va realitzar el test de tolerància a la insulina a les 23 setmanes, amb el qual es va observar que tots els animals tractats amb qualsevol de les dosis del vector AAV8-hAAT-BMP7 presentaven una sensibilitat a la insulina molt millorada respecte al grup AAV8-hAAT-NUL alimentat amb HFD (Figura 68B).

A més a més, es va avaluar la tolerància a la glucosa a les 25 setmanes. Es va observar una millora de la tolerància a la glucosa en els animals tractats amb 10^{12} vg, 2.5×10^{12} vg o 5×10^{12} vg del vector AAV8-hAAT-BMP7 respecte al grup AAV8-hAAT-NUL alimentat amb HFD (Figura 68D).

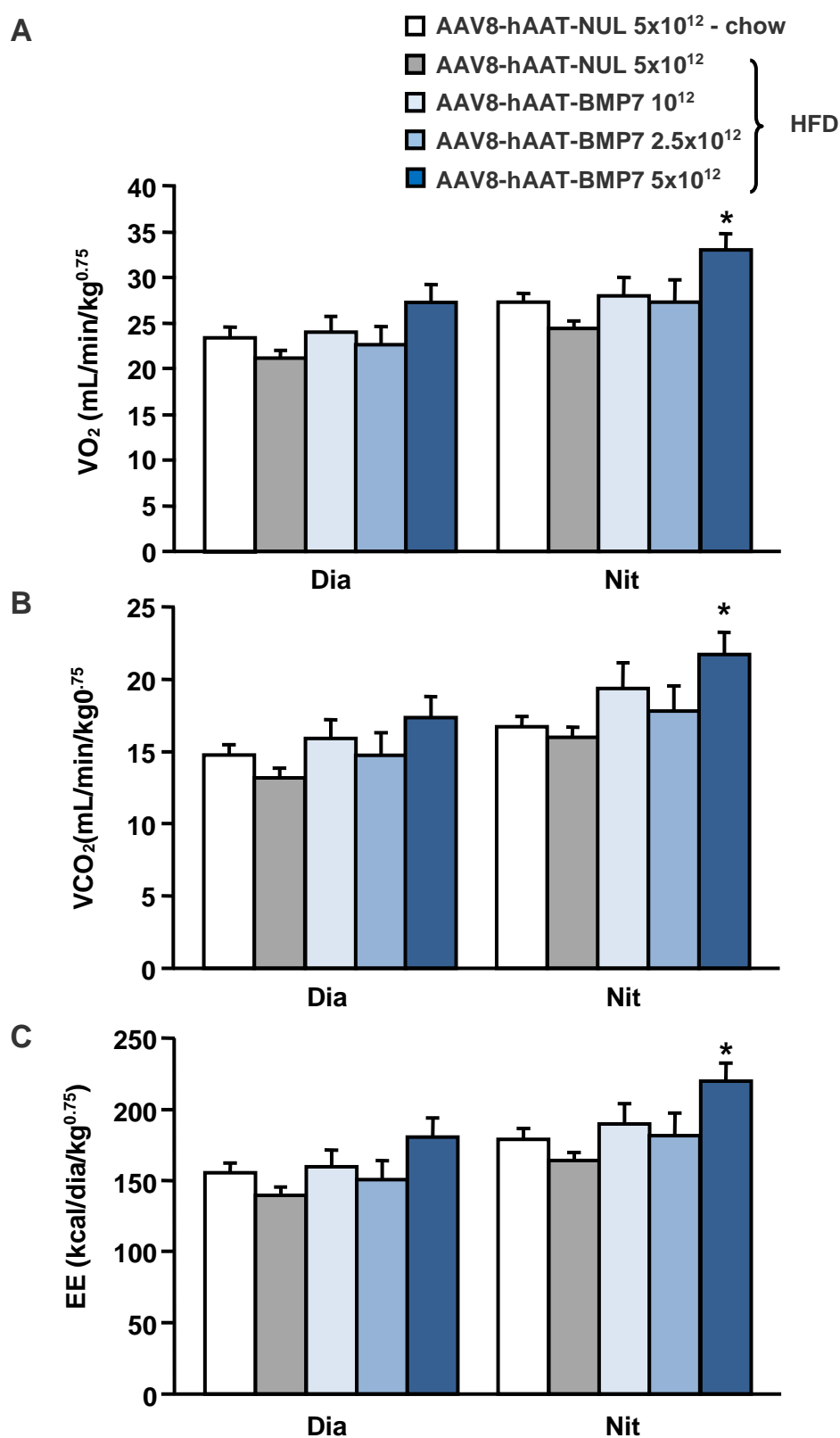


Figura 67. Anàlisi de la despesa energètica per calorimetria indirecta. (A-C) Anàlisi del gast energètic 11 setmanes post-AAV mitjançant calorimetria indirecta en ratolins mascles C57BL/6 alimentats amb HFD i administrats a les 14 setmanes d'edat per via intravenosa amb dosis de 10¹², 2.5x10¹² i 5x10¹² vg/animal dels vector virals AAV8-hAAT-BMP7 i 5x10¹² vg/animal del vector AAV8-hAAT-NUL. Determinació del consum d'O₂ durant el dia i la nit en mL/min/Kg^{0.75} **(A)**. Determinació de la producció de CO₂ durant el dia i la nit en mL/min/Kg^{0.75} **(B)**. Determinació del gast energètic (*energy expenditure*) durant el dia i la nit en Kcal/dia/Kg^{0.75} **(C)**. Els resultats s'expressen com la mitjana ± EEM. n=8-9 animals/grup. *p<0.05 vs AAV8-hAAT-NUL en HFD.

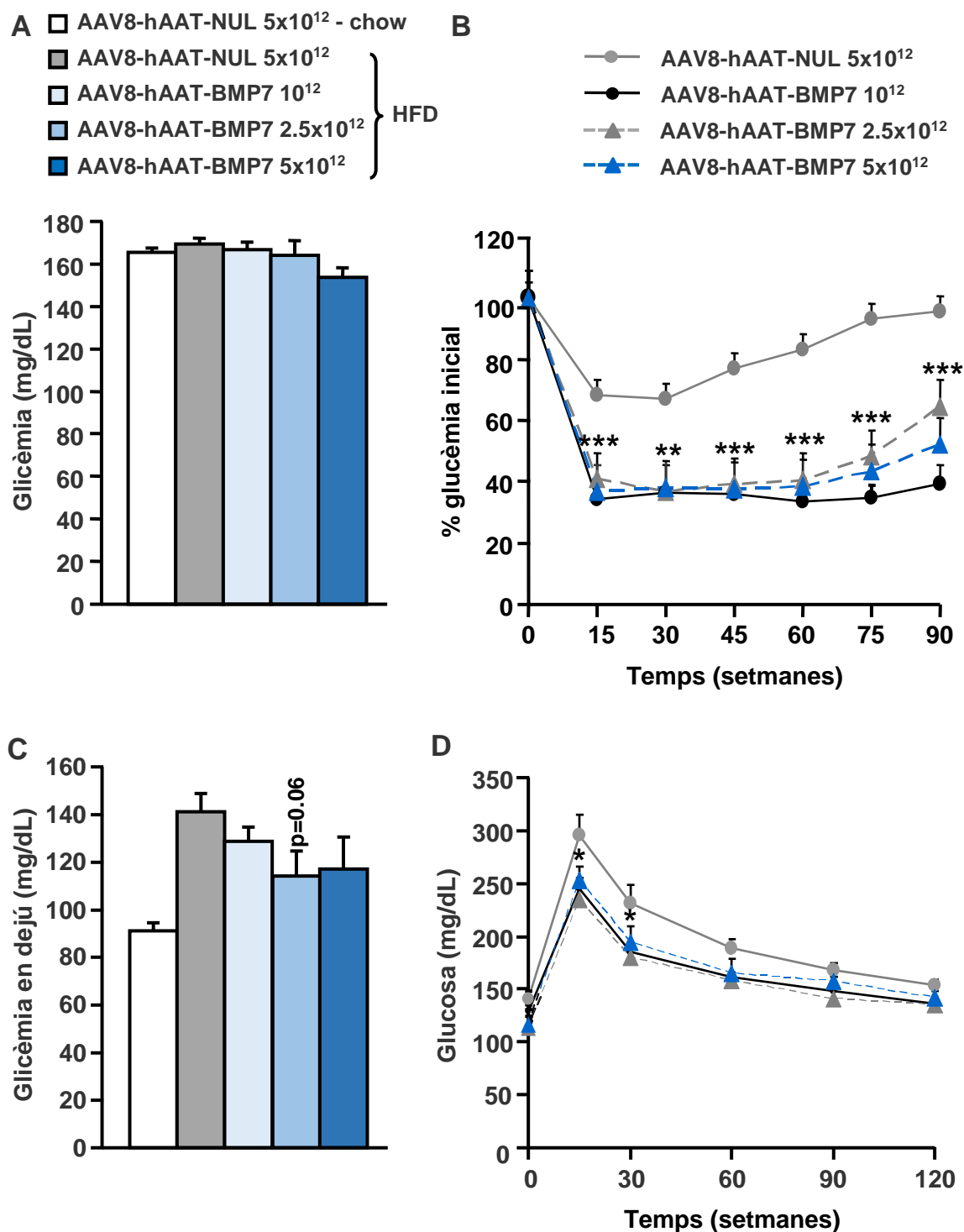


Figura 68. Avaluació de la glucèmia, la sensibilitat a la insulina i la tolerància a la glucosa. Ratolins mascles C57BL/6 de 8 setmanes d'edat es van alimentar amb HFD i es van administrar a les 14 setmanes d'edat per via intravenosa amb dosis de 10^{12} , 2.5×10^{12} i 5×10^{12} vg/animal dels vector virals AAV8-hAAT-BMP7 i 5×10^{12} vg/animal del vector AAV8-hAAT-NUL. Determinació de la glucèmia **(A)** en alimentació i **(B)** en dejú a les 17 i 19 setmanes post-AAV, respectivament. **(B)** Test de tolerància a la insulina (ITT) 17 setmanes post-AAV. **(F)** Test de tolerància a la glucosa (GTT) (1 g glucosa/kg) 19 setmanes post-AAV. Dades representades com mitjana \pm EEM. $n=8-10$. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ vs AAV8-hAAT-NUL.

Per tant, l'administració via intravenosa de dosis d'entre 10^{12} vg i 5×10^{12} de vectors AAV8-hAAT-BMP7 en animals prèviament alimentats amb HFD va donar lloc a nivells molt elevats de BMP7 en circulació. Això va induir una important reducció del pes dels animals a nivells similars als animals controls alimentats amb dieta estàndard. Aquesta baixada de pes es donava gràcies a la reducció de la ingesta d'aliments, possiblement causada per l'efecte central de BMP7, i l'increment de la despesa energètica probablement degut a l'activació del teixit adipós marró. Tot això donava lloc a una millora de la sensibilitat a la insulina i la tolerància a la glucosa (Figura 69).

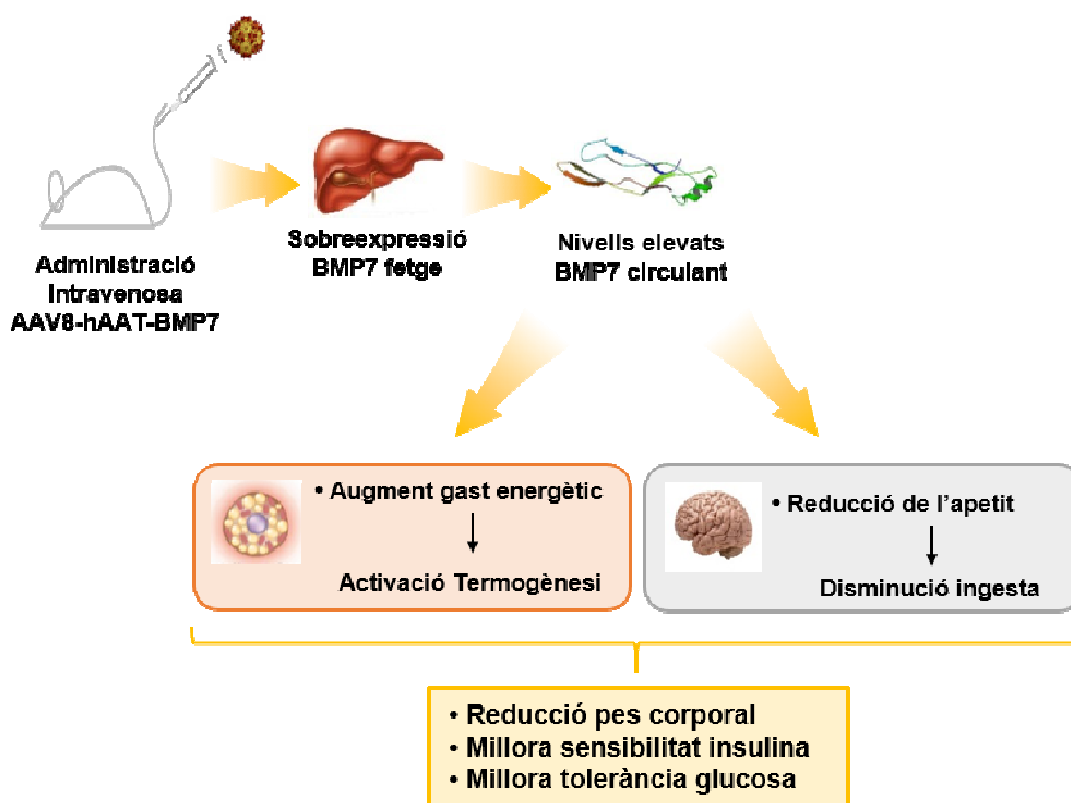


Figura 69. Esquema dels efectes de l'administració intravenosa dels vectors AAV8-hAAT-BMP7. L'administració intravenosa del vector AAV8-hAAT-BMP7 va promoure la sobreexpressió de BMP7 al fetge. Això va provocar l'augment dels nivells circulants de BMP7 que van induir una pronunciada baixada de pes deguda probablement als seus efectes a nivell central, que mediaven la reducció de l'apetit. D'altra banda, també es va observar un increment de la despesa energètica que podria anar lligat a una inducció de la termogènesi al teixit adipós marró. A més a més, tot això provocava una millora a la sensibilitat a la insulina i la tolerància a la glucosa en aquests animals.

Aquests estudi encara està *on going*, un cop es finalitzi es podrà valorar si s'està activant veritablement el teixit adipós marró i/o s'està produint el *browning* del teixit adipós blanc subcutani. D'altra banda, també es podrà discernir si dosis tant elevades de BMP7 en circulació també indueixen l'adipogènesi del teixit adipós blanc.

V. DISCUSSIÓ

L'obesitat i la diabetis tipus 2 són malalties metabòliques molt complexes i estretament relacionades. Ambdues patologies han assolit proporcions epidèmiques tant en els països desenvolupats com en vies de desenvolupament. Tot i això, els tractaments actuals disponibles per a la DT2 i l'obesitat es basen en teràpies farmacològiques complexes que presenten efectes secundaris i no suposen una cura real de la malaltia. Per tal de superar aquests inconvenients, cal desenvolupar noves aproximacions preventives o curatives per a la DT2 i l'obesitat. En aquest sentit, la transferència gènica ofereix una nova eina per a l'estudi i el tractament d'aquestes malalties.

L'obesitat és causada principalment pel desequilibri mantingut en el temps entre la ingesta i la despesa d'energia. La despesa energètica representa la suma de l'energia total consumida per a mantenir la funció normal de les cèl·lules i els òrgans, el metabolisme, l'activitat física i la termogènesi (Spiegelman & Flier, 2001). D'acord amb estudis recents, l'activació del teixit adipós marró i el *browning* del teixit adipós blanc estan vinculats amb una reducció de l'obesitat i una millora de la sensibilitat a la insulina tant en rosegadors com en humans (Agudo et al., 2008; Casellas et al., 2006; George et al., 2002). Concretament, s'ha establert una relació inversa entre l'activitat del BAT i el IMC (Cypess et al., 2009; van Marken Lichtenbelt et al., 2009) i també entre l'activitat del BAT i la glicèmia en humans (Timmons et al., 2009). A més, tant en humans com en ratolins, s'ha descrit que l'exposició al fred, que incrementa l'activitat del teixit adipós marró i el *browning* del teixit adipós blanc, està associada a una reducció del pes corporal i a la millora de la sensibilitat a la insulina (Yoneshiro et al., 2015). Per tant, el teixit adipós marró s'ha convertit en una potencial diana terapèutica per al tractament de l'obesitat i la diabetis tipus 2. En aquest sentit, l'augment dels nivells circulants de la proteïna morfogenètica òssia 7 és capaç d'induir l'activitat termogènica del teixit adipós marró en models murins d'obesitat i resistència a la insulina (Boon et al., 2013; Schulz et al., 2011; Townsend et al., 2012; Tseng et al., 2008).

A més, el BMP7 s'ha descrit com un factor necessari per l'adipogènesi del teixit adipós marró, capaç de determinar cèl·lules mare mesenquimals al llinatge adipogènic i diferenciar preadipòcits a adipòcits marrons madurs *in vitro* (Tseng et al., 2008), però no s'ha comprovat si succeeix el mateix *in vivo*. D'altra banda, altres BMPs, com BMP4 o BMP2, han estat identificats com a inductors de l'adipogènesi dels adipòcits blancs. No obstant, fins al moment no s'ha estudiat si el BMP7 podria tenir també un paper semblant en l'adipogènesi del teixit adipós blanc i així contribuir a millorar la sensibilitat a la insulina.

Recentment, el nostre grup ha demostrat que els vectors de teràpia gènica AAV poden ser utilitzats per a dirigir una expressió eficient i a llarg termini de transgens en el teixit adipós (Jimenez et al., 2013). En concret, els vectors AAV8 i AAV9 permeten una elevada transducció del teixit adipós blanc epididimal quan són administrats localment (Jimenez et al., 2013). A més, donat que el teixit adipós blanc és un òrgan amb una elevada funció endocrina, aquest és capaç de secretar una gran varietat de factors (Bays et al., 2008). Per tant, la seva transducció amb vectors virals AAVs permetria augmentar els nivells circulants de la proteïna d'interès gràcies a l'elevada capacitat secretora dels adipòcits blancs (Jimenez et al., 2013). El BMP7 es produeix de manera endògena en diversos teixits, incloent el teixit adipós blanc i marró, pel que una estratègia de transferència gènica d'aquest factor seria transduir el teixit adipós blanc perquè produís BMP7 i també el secretes. Aquest tipus d'estratègia permetria augmentar la producció de la proteïna localment i així estudiar els efectes de BMP7 en aquest teixit.

Per tot això, en aquesta tesi doctoral es va desenvolupar una estratègia de transferència gènica del factor BMP7 al teixit adipós blanc amb vectors AAV administrats intra-eWAT en diferents models murins d'obesitat i de resistència a la insulina per tal d'avaluar, per una banda, la seva capacitat per mediar l'adipogènesi del teixit adipós blanc i marró per l'augment local de l'expressió de BMP7, i per l'altra els seus efectes antiobesogènics i antidiabètics gràcies a l'augment dels nivells circulants a llarg termini.

Tot i que l'administració intra-eWAT de vectors AAV8 o AAV9 que codifiquen per un gen sota el control del promotor ubic CAG permet una eficient transducció de diversos teixits adiposos, altres teixits perifèrics també es veuen transduïts, principalment el fetge i el cor (Jimenez et al., 2013). Això podria ser degut a la combinació de dos factors: d'una banda, la capacitat dels vectors AAV8 i AAV9 de creuar barreres endotelials i assolir el torrent sanguini (Zincarelli et al., 2008); i de l'altra, la densitat vascular del teixit adipós epididimal (Konstantinova et al., 2004; Lammert et al., 2003; Olsson et al., 2006). Així, una part dels vectors AAV administrats localment el teixit adipós blanc epididimal és capaç d'assolir el torrent sanguini i transduir altres teixits pels quals presenta un elevat tropisme, com és el cas del fetge (Bish et al., 2008; Inagaki et al., 2006; Nakai et al., 2005) i el cor (Pacak et al., 2006). Convé destacar que la transducció d'aquests teixits a partir d'una administració local intra-eWAT és molt menor en comparació als nivells assolits a partir d'una administració intravenosa (Jimenez et al., 2013).

Una manera d'aconseguir que l'expressió del transgen dirigida pels vectors AAV estigui limitada als adipòcits és l'ús de promotors específics de teixit, com la versió reduïda del promotor aP2, format pel promotor basal i l'*enhancer* adipòcit específic de l'aP2 (mini-aP2). No obstant, l'expressió dirigida per aquest promotor és més dèbil en comparació amb promotors ubics com el CAG (Jimenez et al., 2013). Una alternativa disponible per a restringir l'expressió del transgen al teixit d'interès és l'ús de la tecnologia dels microRNAs (miRNAs). L'expressió gènica del constructe contingut en el vector AAV pot ser modulada post-transcripcionalment mitjançant l'addició de seqüències diana de miRNAs en la part 3'-UTR. En concret, per inhibir selectivament l'expressió del transgen en un teixit no desitjat, cal incorporar la seqüència diana d'un miRNA (miRT) específic d'aquell teixit i que el miRNA en qüestió estigui altament expressat en aquell teixit. La seqüència diana pot ser reconeguda pel miRNA endògen del teixit i d'aquesta manera es produeix la degradació del transcrit impedint la seva traducció (Kelly et al., 2009). D'acord amb això, estudis del perfil d'expressió dels miRNAs han revelat l'existència de miRNAs que són altament expressats de manera selectiva en un teixit (Shingara et al., 2005). Entre ells es troba el miRNA específic de fetge miR122a (Chang et al., 2004; Lagos-Quintana et al., 2002), i el miRNA específic de cor miRNA1 (Shingara et al., 2005).

En primer lloc, en aquest estudi es va mesurar l'expressió dels miRNAs 122a i 1 en els teixits d'interès del ratolí C57BL/6. La quantificació realitzada dels nivells endògens de miRNA122a al fetge, i de microRNA1 al cor, respectivament, va confirmar la seva expressió en aquests teixits. Respecte als teixits adiposos, no es va detectar expressió en el teixit adipós blanc epididimal de cap dels miRs mentre que en l'iBAT només es va observar una lleugera expressió del miR1 esperable per compartir llinatge cel·lular amb les cèl·lules musculars (Walden et al., 2009). Per tant, es va confirmar la utilització de les seqüències diana dels miRNAs 122a i 1 en ratolí per a restringir selectivament l'expressió del transgen a fetge i cor sense afectar al teixit adipós blanc.

L'administració intra-eWAT dels vectors AAV8-CAG-GFP-dmiRT o AAV9-CAG-GFP-dmiRT va permetre observar una clara disminució de la producció de proteïna GFP al fetge i al cor en comparació amb els animals administrats amb el vector sense les seqüències diana dels miRNAs (AAV8-CAG-GFP o AAV9-CAG-GFP), fins a nivells pràcticament iguals als observats amb l'ús del promotor específic de teixit mini-aP2. En canvi, l'expressió al teixit adipós no es va veure alterada per la presència d'aquestes seqüències, respecte als nivells obtinguts en els animals administrats amb AAV8-CAG-GFP o AAV9-CAG-GFP. Així doncs, en aquest treball s'ha validat l'ús de les seqüències

diana dels miR122a i miR1 en un vector AAV administrat localment al teixit adipós blanc epididimal de ratolins per a reduir l'expressió gènica en cor i fetge sense afectar als nivells de producció de proteïna d'interès als adipòcits. Posteriorment, també es va avaluar l'efecte dels miRTs mitjançant l'administració intravenosa dels vectors AAV9-CAG-GFP-dmiRT i es van observar efectes semblants (Jimenez et al., 2013), fet que ratificava aquesta estratègia de transferència gènica.

Un cop validada l'estratègia de transferència gènica a teixit adipós, es van generar vectors AAV que codificaven pel CDS murí de BMP7 optimitzat sota el control del promotor ubic CAG i la regulació de les seqüències dmiRT (miRT122a i miRT1). L'administració local d'aquests vectors a l'eWAT de ratolins C57BL/6 alimentats amb dieta estàndard o alta en lípids i de ratolins ob/ob va augmentar significativament els nivells d'expressió de BMP7 al teixit adipós així com els nivells circulants de aquest factor. Els animals C57BL/6 alimentats amb dieta HFD tractats amb els vectors AAV-CAG-BMP7-dmiRT no van modificar el seu pes corporal mentre que el ratolins ob/ob el van augmentar degut a l'expansió dels dipòsits adiposos blancs. Aquesta diferència entre models podria ser deguda a que en el cas del experiment amb ratolins C57BL/6, es va voler avaluar la prevenció de l'obesitat i l'administració dels vectors es va produir quan els animals encara no eren obesos. Pel contrari, els ratolins ob/ob són un model genètic d'obesitat establerta més extrem i l'administració dels vectors AAV es va realitzar en animals marcadament obesos. Altres models animals com el *knockout* (KO) pel receptor X de pregnan (PXR) també presentaven diferències si el KO es duia a terme en un *background* genètic C57BL/6 o en animals ob/ob. Concretament, el KO en C57BL/6 alimentat amb dieta HFD presentava una reducció del pes corporal molt marcada, mentre que no s'observaven diferències de pes en el KO en ratolins ob/ob (He et al., 2013).

En analitzar els teixits adiposos morfològicament, es va observar que tant en els ratolins C57BL/6 alimentats amb dieta estàndard o alta en lípids com en els ratolins ob/ob la mida mitjana dels adipòcits blancs era considerablement més petita, i la distribució de la seva àrea es veia modificada respecte a la del grup tractat amb els vectors AAV-NUL, havent més percentatge d'adipòcits petits i menys adipòcits grans en el grup tractat amb els vectors AAV codificants per BMP7. En els animals ob/ob, l'augment dels nivells d'expressió de gens que participen en el procés d'adipogènesi, tals com *CEBP α* o *PPAR γ* (principal regulador de l'adipogènesi (Tontonoz et al., 2008)), així com de gens que s'expressen en adipòcits madurs i que actuen en processos propis d'aquest estadi com la lipogènesi, va confirmar un augment de l'adipogènesi en els

teixits adiposos en els que *BMP7* estava sobreexpressat. A més, nombrosos gens que presenten regions reguladores que contenen llocs d'unió per *PPAR γ* i que tenen papers clau en la lipogènesi i la sensibilitat a la insulina com *LPL*, *GLUT4*, *FABP4* o *FAS* (Takahashi et al., 2013; Tontonoz et al., 1994), entre d'altres, mostraven un augment de la seva expressió en el grup experimental administrat amb AAV8-CAG-BMP7-dmiRT. Per tant, aquest resultat indicarien que l'expansió del teixit adipós blanc es va produir mitjançant un procés de hiperplàsia i no d'hipertròfia. Cal recalcar que és la primera vegada que es demostra la capacitat de *BMP7* d'induir l'adipogènesi del teixit adipós blanc *in vivo*. En canvi, sí que s'havia demostrat el rol de *BMP7* en l'adipogènesi del teixit adipós marró, com a factor capaç de determinar cèl·lules mare mesenquimals al llinatge adipogènic i diferenciar preadipòcits a adipòcits marrons madurs *in vitro* (Tseng et al., 2008; H. Zhang et al., 2010) (Figura 70).

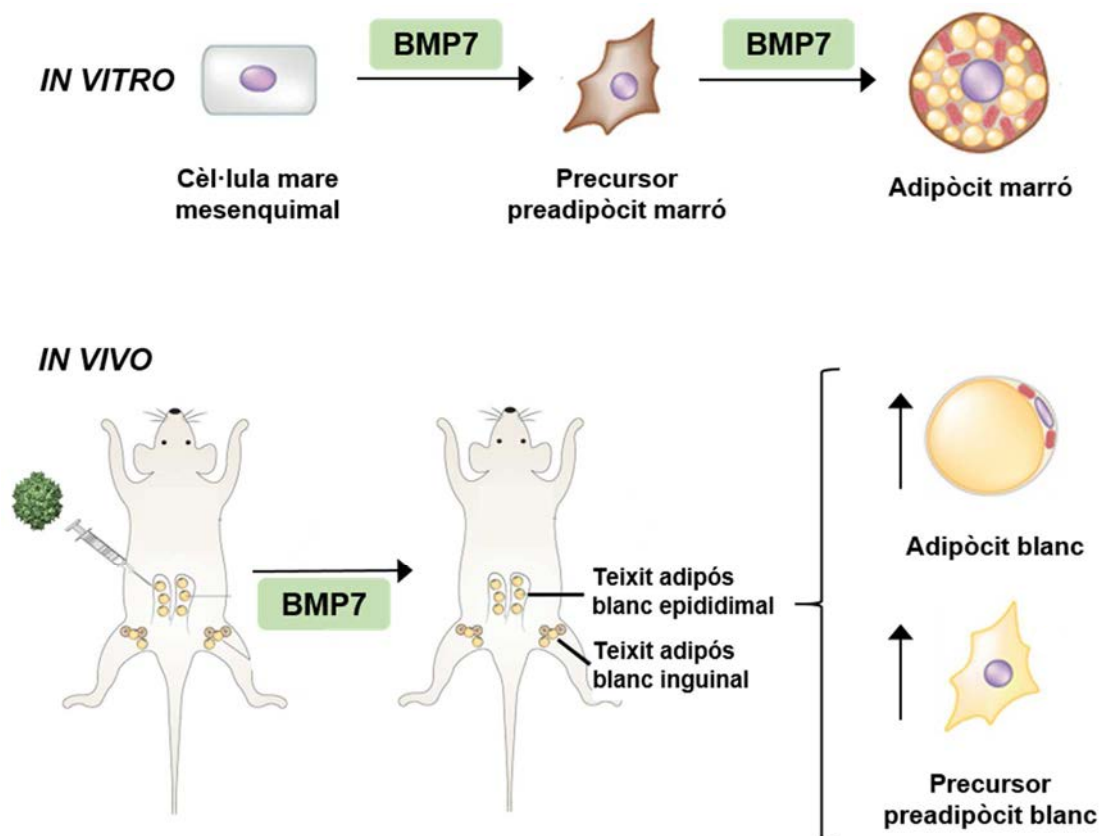


Figura 70. Efecte del *BMP7* en l'adipogènesi *in vitro* i *in vivo*. *In vitro* el *BMP7* és capaç de dirigir les cèl·lules mare mesenquimals cap al lligatge d'adipòcits marrons i pot induir la diferenciació de preadipòcits marrons a adipòcits marrons. D'altra banda, els nostres resultats demostraven que l'administració intra-eWAT de vectors AAV codificant per *BMP7* induïen l'adipogènesi a l'eWAT i l'iWATs, augmentant la presència d'adipòcits blancs madurs i de precursors adipocitaris en aquests teixits.

Tot i que no es van observar canvis en la glucèmia entre els animals tractats amb vectors AAV-NUL o vectors AAV-CAG-BMP7-dmiRT, degut a que la disminució de la mida dels adipòcits està vinculada a una millora en la sensibilitat a la insulina (Choe et al., 2016; Kahn et al., 2006; Lee et al., 2014; Pellegrinelli et al., 2016), es van determinar els nivells circulants d'aquesta hormona. En l'experiment de prevenció en el que es van administrar els vectors AAV-CAG-BMP7-dmiRT en ratolins C57BL/6 i posteriorment es van alimentar els animals amb dieta estàndard o HFD, es va observar una tendència a disminuir els nivells de la insulina en els animals alimentats en HFD. En el cas de l'experiment amb ratolins ob/ob, els animals tractats amb els vectors AAV-CAG-BMP7-dmiRT van mostrar una menor insulinèmia tant en alimentació com en dejú. A més a més, la tolerància a la insulina es veia notablement millorada en aquest grup experimental.

D'altra banda, s'ha descrit en la bibliografia que l'expansió del teixit adipós mitjançant hiperplàsia també contribueix a la disminució de la inflamació de aquest teixit i a l'augment dels nivells d'adiponectina en sèrum (Choe et al., 2016; Kahn et al., 2006; Lee et al., 2014; Pellegrinelli et al., 2016), però aquest fenomen no es produeix de manera inversa, és a dir, els models en els que es redueix la inflamació del teixit adipós no indueixen la hiperplàsia d'aquest teixit (Kitade et al., 2012). L'adiponectina és secretada exclusivament pels adipòcits i promou l'emmagatzematge preferencial dels triglicèrids en el teixit adipós (Kim et al., 2007). A més, la inflamació i els nivells d'adiponectina, estant directament i inversament relacionats, respectivament, amb la resistència a la insulina (Paniagua et al., 2016; Qi et al., 2009). Els ratolins ob/ob injectats amb els vectors AAV8-CAG-BMP7-dmiRT localment al teixit adipós epididimal van mostrar una reducció de la inflamació, evidenciada per un menor nombre d'estructures *crown-like*, la disminució de l'expressió de marcadors de macròfags a l'eWAT i l'augment dels nivells circulants d'adiponectina.

D'altra banda, el pes del fetge dels ratolins ob/ob administrats intra-eWAT amb els vectors AAV8-CAG-BMP7-dmiRT no va augmentar tot i que el pes dels animals i dels seus depòsits adiposos sí que es veia incrementat. L'anàlisi morfològic del teixit i la quantificació del contingut hepàtic de triglicèrids van corroborar una disminució en l'acumulació de greix ectòpic al fetge d'aquests animals. Com a conseqüència, la inflamació del fetge també es va veure disminuïda en aquest grup experimental, confirmant així que l'acumulació de greix al fetge correlaciona amb la inflamació del teixit i la resistència a la insulina, tal com està àmpliament descrit a la bibliografia (Bard-Chapeau et al., 2005; Chiang et al., 2009; Erion et al., 2009; Gutiérrez-Juárez et al.,

2006; Marchesini et al., 1999; Schenk et al., 2008; Shoelson et al., 2007). En paral·lel a l'expansió del teixit adipós i a la disminució de la esteatosis hepàtica, els animals administrats amb AAV8-CAG-BMP7-dmiRT van mostrar menors nivells de triglicèrids en sèrum.

Per tant, la millora de la sensibilitat a la insulina observada en els ratolins ob/ob administrats intra-eWAT amb els vectors AAV8-CAG-BMP7-dmiRT es va deure en part a l'expansió hiperplàsica del teixit adipós, que va reduir la mida dels adipòcits, la inflamació de aquest teixit i va activar l'expressió de PPAR γ , principal actor de l'adipogènesi, i dels seus gens diana, i en conseqüència, també va reduir la inflamació i acumulació de lípids en el fetge.

L'obesitat lligada a una expansió del teixit adipós saludable mitjançant hiperplàsia pot tenir efectes antidiabètics ja que permet l'emmagatzematge de greix excedent (àcids grassos lliures) en el teixit adipós que, de no ser així, causarien toxicitat en altres teixits més sensibles a aquesta acumulació de greix, com ara el fetge o els músculs, participants actius del metabolisme (Kim et al., 2007; Kusminski et al., 2012). Un model clar d'aquesta teoria és el ratolí ob/ob deficient pels receptors X del fetge α i β (*LOKO mice*). Aquest ratolí KO també presenta un augment del pes vinculat a l'expansió del teixit adipós i no del fetge, presentant el fetge d'aquests animals menys inflammat i amb menor contingut de triglicèrids que el d'un ob/ob (Beaven et al., 2013). A més, el teixit adipós dels ratolins ob/ob *LOKO* també presenta un increment en l'expressió de gens adipogènics, marcadors d'adipòcits madurs i lipogènics (Beaven et al., 2013). Aquest model animal també exhibeix una millora de la sensibilitat a la insulina tal i com s'ha observat en els ratolins ob/ob tractats intra-eWAT amb vectors AAV8-CAG-BMP7-dmiRT en aquesta tesi doctoral.

L'expansió saludable del teixit adipós banc també s'ha descrit en altres models animals com el transgènic específic de teixit adipós de la proteïna de membrana mitocondrial mitoNEET (Kusminski et al., 2012). Aquest model animal presenta un pronunciat increment del pes lligat a un augment de l'adipogènesi i una disminució de la inflamació del teixit adipós blanc (Kusminski et al., 2012). A més, també experimenta un augment dels nivells circulants d'adiponectina i una reducció de l'acumulació de greix al fetge, el que juntament amb els efectes al teixit adipós provoca una millora de la sensibilitat a la insulina global (Kusminski et al., 2012), de manera similar al fenotip observat en el nostre model de transferència gènica de BMP7 mitjançant l'administració intra-eWAT de vectors AAV en ratolins ob/ob.

Un altre dels models caracteritzats per a la millora de la sensibilitat a la insulina vinculada a una disminució de la mida del adipòcits són els tractament antidiabètics amb tiazolidinediones (TZD) (Nolan et al., 1994). Les TZD són lligands de PPAR γ que indueixen una millora de la sensibilitat a la insulina mitjançant la seva acció al teixit adipós que permet emmagatzemar més triglicèrids sense que augmentin els nivells de àcids grassos lliures al torrent sanguini, reduint l'acumulació de greix ectòpic a altres teixits com el fetge, i disminuint l'alliberament de citocines pro-inflamatòries (Boden et al., 2005; Chao et al., 2000; Tontonoz et al., 2008). Tot i això, molts estudis mostren que les TZDs promouen un augment del pes ja que hi ha una clara expansió del teixit adipós blanc i de la retenció de líquids (Soccio et al., 2014). En el nostre model de transferència gènica de BMP7 al teixit adipós blanc en ratolins ob/ob es produeix l'augment dels nivells d'expressió de PPAR γ al teixit adipós blanc tot emulant els efectes beneficiosos de les TZDs. Altres models que també indueixen l'augment dels nivells de PPAR γ , com el KO adipós específic per la *cullin4B* (CUL4B), una lligasa que promou la poliubiquitinació i posterior degradació de PPAR γ , mostren augment del pes corporal, inducció de d'adipogènesi i lipogènesi del teixit adipós, reducció de la inflamació i millora de la sensibilitat a la insulina (Li et al., 2017), tal i com van mostrar els ratolins ob/ob administrats intra-eWAT amb AAV8-CAG-BMP7-dmiRT.

D'altra banda, s'ha descrit que l'augment pronunciat dels nivells circulants de BMP7 *in vivo* (Tseng et al., 2008) o el cultiu d'adipòcits marrons amb BMP7 (Schulz et al., 2011) indueixen l'activació dels adipòcits marrons, augmentant la β -oxidació i els nivells d'expressió de gens de transport de àcids grassos lliures i de la cadena de transport electrònica. En els nostres experiments de transferència de BMP7 al teixit adipós blanc mitjançant vectors AAV, no es van observar canvis generalitzats en l'expressió dels gens participants d'aquests processos en el teixit adipós marró, tot evidenciant la no activació d'aquest teixit. A més, altres estudis han observat que el BMP7 pot induir el *browning* d'adipòcits blancs provinents del teixit adipós blanc subcutani, però aquest fenomen tampoc es va observar en el WAT dels animals que sobreexpressaven localment BMP7. Aquest fet podria ser degut a que no es van augmentar suficientment els nivells circulants de BMP7 ja que els efectes antiobesogènics i antidiabètics descrits a la bibliografia mediat per aquest factor es van observar en animals amb nivells circulants molt més elevats (Townsend et al., 2012; Tseng et al., 2008). Alternativament, també podria ser degut a que els nivells d'expressió de BMP7 localment a l'iBAT no van ser prou elevats.

Altres factors, com l'adiponectina o WISP2 (*WNT1 Inducible Signaling Pathway Protein 2*) també han mostrat efectes paracris/autocrins al teixit adipós, a més dels efectes endocrins per a l'increment dels seus nivells circulants (Dadson et al., 2011; Grünberg et al., 2017). Per aquest motiu es va decidir fer una administració sistèmica amb AAV8-hAAT-BMP7, perquè el fetge fos el productor i secretor a la circulació del factor i així valorar si els efectes observats mitjançant l'administració local es devien a un efecte paracrí/autocrí del BMP7 al teixit adipós blanc.

L'administració intravenosa de 5×10^{11} vg dels vectors AAV8-hAAT-BMP7 en ratolins ob/ob va donar lloc a uns nivells de BMP7 en sèrum del mateix ordre que els obtinguts mitjançant l'administració intra-eWAT de 10^{12} vg dels vectors AAV8-CAG-BMP7-dmiRT. Contràriament al que s'havia observat amb l'administració local a l'eWAT, no es va modificar el pes dels animals, ni el pes dels seus teixits adiposos ni del fetge. D'acord amb aquests resultats, en el teixit adipós blanc no es van observar canvis a nivell d'inflamació o d'adipogènesi, ni en la mida o distribució dels adipòcits, ni en l'expressió de gens participants del procés o de gens marcadors d'adipòcits madurs. Tampoc es van observar canvis en els nivells d'adiponectina circulant ni es va activar el teixit adipós marró. A més, el fetge, teixit diana de l'estratègia de transferència gènica i productor del BMP7, no es va veure afectat a nivell de contingut de triglicèrids ni d'inflamació. Així mateix, els nivells d'insulina no van variar en alimentació ni en dejú, tot i que sí que es va observar una millora de la sensibilitat a la insulina en els ratolins ob/ob administrats amb AAV8-hAAT-BMP7.

Aquests resultats van corroborar que els efectes observats al teixit adipós blanc i al fetge per la transferència gènica de BMP7 al teixit adipós blanc mitjançant vectors AAVs eren mediat per l'acció paracrina/autocrina del factor dins del propi teixit, i no per l'augment dels nivells circulants de la proteïna. Altrament, la millora de la sensibilitat a la insulina observada era deguda per una banda a la expansió hiperplàsica d'aquest teixit, i per l'altra, a l'augment dels nivells circulants de BMP7.

Donat que s'ha descrit que l'administració intravenosa de vectors adenovirals codificants per BMP7 és capaç de provocar una pronunciada disminució de pes i l'activació del teixit adipós marró a partir de nivells sèrics de BMP7 molt superiors als obtinguts en els experiments anteriorment descrits d'aquesta tesi (Townsend et al., 2012), es va decidir fer un estudi amb diferents dosis per a determinar quina era la quantitat de vector AAV8-hAAT-BMP7 necessària per a obtenir nivells sèrics similars als descrits en la bibliografia. Es va realitzar un estudi a curt termini on es va determinar que la dosi

més baixa que mediava els nivells desitjats de nivells circulants de BMP7 sense produir dany hepàtic (Chen et al., 2015) era 5×10^{12} vg d'AAV8-hAAT-BMP7 per animal.

Amb les premisses obtingudes amb els experiments anteriors es va decidir fer un estudi de reversió d'obesitat i resistència a la insulina a llarg termini mitjançant l'administració de diferents dosis d'AAV8-hAAT-BMP7 en ratolins C57BL/6 alimentats prèviament amb HFD, les quals estaven compreses entre 5×10^{11} i 5×10^{12} vg dels vectors AAV8-hAAT-BMP7 per animal (és a dir, compreses entre la dosi emprada als experiments anteriors d'aquesta tesi i la dosi seleccionada en l'estudi de dosi resposta). Concretament, es van administrar per via intravenosa 10^{12} , 2.5×10^{12} i 5×10^{12} vg dels vectors AAV8-hAAT-BMP7 per animal. Els animals administrats amb aquestes dosis van mostrar un increment molt elevat dels nivells circulants de BMP7 i una marcada reducció del pes corporal. Aquesta reducció va ser menys pronunciada a l'inici de l'experiment en els animals administrats amb 10^{12} vg/animal d'AAV8-hAAT-BMP7, mentre que els grups administrats amb les dosis de 2.5×10^{12} i 5×10^{12} vg/animal van perdre la major part del pes durant les 4 setmanes post-AAV, tot evidenciant un efecte dosi-resposta. Aquest efecte dosi-resposta també s'observa en altres compostos que disminueixen el guany de pes, com Melin-2 (Sanchis et al., 1997), o que redueixen la glucèmia, com l'anàleg de GLP-1 dulaglutide (Grunberger et al., 2012). La disminució del pes es va moderar quan el pes dels animals administrats amb els vectors AAV8-hAAT-BMP7 es va reduir fins igualar el pes del grup AAV8-hAAT-NUL alimentat amb dieta estàndard. Aquesta és una dada molt important, ja que altres intervencions àmpliament utilitzades pel tractament de l'obesitat com el bypass gàstric, aconsegueixen reduir el pes corporal, però només al voltant del 15% dels pacients aconsegueix no patir sobrepès a llarg termini (Lager et al., 2017). Aquesta reducció del pes corporal va anar lligada a una disminució de la ingesta d'aliments dosi dependent, que corroborava l'efecte central de BMP7 descrit a la bibliografia (Townsend et al., 2012) i a un augment de la despesa energètica, essent aquest increment especialment pronunciat amb la dosi de 5×10^{12} vg/animal.

A més, els animals tractats amb dosis de 10^{12} , 2.5×10^{12} i 5×10^{12} vg/animal del vector AAV8-hAAT-BMP7 van millorar la sensibilitat a la insulina i la tolerància a la glucosa respecte als animals administrats amb vectors AAV8-hAAT-NUL.

En conclusió, segons les dades obtingudes a la Part II dels Resultats d'aquesta tesi doctoral, l'administració intravenosa de dosis elevades de vectors AAV8-hAAT-BMP7 capaces d'induir nivells molt elevats de BMP7 en circulació seria una potencial estratègia

terapèutica per al tractament de l'obesitat i la DT2. Els vectors AAV han demostrat ser una eina molt útil per manipular genèticament el fetge d'animals petits i grans així com d'humans *in vivo* i presenten clars avantatges davant l'ús d'altres tipus de vectors. Nombrosos estudis experimentals i clínics han documentat els AAVs, en contraposició amb altres tipus de vectors com els adenovirus, com a vectors amb un potencial proinflamatori molt lleu degut a la seva incapacitat per a desencadenar respostes immunitàries innates de manera eficient (McCaffrey et al., 2008; Stilwell et al., 2004). En concret, els vectors AAV8 no semblen ser neutralitzats per antisèrum dirigit contra altres serotips d'AAV, i només nivells baixos d'anticossos neutralitzants contra AAV8 han estat detectats en subjectes humans sans (Calcedo et al., 2009; Gao et al., 2002). Això suggereix que respostes immunes aïllades com les que s'han observat al fetge després d'administrar vectors AAV2 per via intravenosa (Manno et al., 2006) estarien minimitzades amb l'ús de vectors AAV8. De fet, altres estudis ja han demostrat que l'administració intravascular de vectors AAV8 no comporta inflamació en el fetge o en el teixit adipós (Jimenez et al., 2013). A més a més, quan s'administra un AAV amb tropisme pel fetge, es media tolerància contra el transgen codificat per l'AAV (Mingozzi et al., 2011), disminuint així el risc d'una possible resposta immunitària.

D'altra banda, l'expressió eficient i a llarg termini proporcionada per una sola administració dels vectors AAV (Buchlis et al., 2012) suposa un gran avantatge respecte altres teràpies. Per exemple, el tractament amb proteïna recombinant BMP7 necessita un elevat nombre de readministacions, ja que la proteïna presenta una ràpida degradació. A més, el cost de producció de les proteïnes recombinants és un desavantatge respecte la teràpia gènica amb AAVs (Sierra-García et al., 2016).

En resum, en els resultats d'aquesta tesi doctoral s'ha descrit un nou efecte autocri/paracrí de BMP7 en el teixit adipós blanc que media la inducció de l'adipogènesi, facilitant l'expansió del teixit mitjançant hiperplàsia i en conseqüència, redueix la inflamació i millora la sensibilitat a la insulina. D'altra banda, s'ha establert que l'augment elevat dels nivells circulants de BMP7 mitjançant l'administració intravenosa dels vectors AAV8-hAAT-BMP7 promou una reducció del pes corporal d'animals obesos a llarg termini, gràcies a la disminució de la ingesta d'aliments i a l'increment del consum energètic. A més, també provoca una millora de la sensibilitat a la insulina i de la tolerància a la glucosa, tot evidenciant el seu potencial com a possible teràpia per al tractament de la DT2 i l'obesitat.

No obstant, abans de poder avançar cap a la clínica amb una aproximació de teràpia gènica basada en BMP7 s'haurien d'estudiar els possibles efectes adversos derivats de l'expressió a llarg termini de nivells tant elevats de BMP7.

VI. CONCLUSIONS

1. Els ratolins C57BL/6 presentaven nivells elevats d'expressió del miRNA122a al fetge, i del miRNA1 al cor, i nivells indetectables al teixit adipós blanc.
2. L'administració intra-eWAT del vectors AAV-CAG-GFP-dmiRT va permetre obtenir nivells elevats de proteïna GFP en aquest teixit i marginals al fetge i cor.
3. Tant els ratolins C57BL/6 alimentats amb HFD com els ratolins ob/ob tractats intra-eWAT amb vectors AAV-CAG-BMP7-dmiRT van mostrar un augment de l'adipogènesi del WAT i una reducció de la mida dels adipòcits blancs.
4. Els ratolins ob/ob administrats intra-eWAT amb vectors AAV8-CAG-BMP7-dmiRT presentaven un increment del pes corporal tot i tenir disminuït el greix ectòpic al fetge, degut a l'expansió per hiperplàsia del WAT.
5. La sobreexpressió de BMP7 localment al WAT va resultar en una disminució de la inflamació en aquest teixit i en el fetge de ratolins ob/ob.
6. Els ratolins ob/ob administrats intra-eWAT amb vectors AAV8-CAG-BMP7-dmiRT van mostrar una disminució de la insulinèmia, un augment dels nivells circulants d'adiponectina i una millora en la sensibilitat a la insulina.
7. Els ratolins ob/ob tractats per via intravenosa amb 5×10^{11} vg de vectors AAV8-hAAT-BMP7 presentaven un increment en els nivells circulants de BMP7 i una millora de la sensibilitat a la insulina sense afectar l'adipogènesi del WAT, la inflamació, els nivells d'adiponectina ni l'acumulació de greix al fetge.
8. Nivells circulants molt elevats de BMP7 van promoure la disminució del pes corporal, la reducció de la ingesta d'aliments i l'augment de la despesa energètica en ratolins C57BL/6 alimentats amb HFD.
9. Els ratolins amb nivells circulants elevats de BMP7 presentaven una millora de la sensibilitat a la insulina i de la tolerància a la glucosa.
10. Per tant, d'una banda s'ha mostrat que la sobreexpressió de BMP7 al WAT media un nou efecte autocri/paracrí inductor de l'adipogènesi en aquest teixit. I d'altra banda, s'ha establert que nivells circulants elevats de BMP7 promouen la reducció del pes corporal a llarg termini i milloren la sensibilitat a la insulina i la tolerància a la glucosa, tot evidenciant el seu potencial com a possible teràpia per al tractament de l'obesitat i la resistència a la insulina.

VII. MATERIALS I MÈTODES

1. MATERIALS

1.1 Animals

En els estudis d'aquesta tesi doctoral es van utilitzar ratolins C57BL/6J_{OlaHsd} o B6.V-Lepob/_{OlaHsd} (Harlan Teklad, Barcelona, Espanya) mascles de 8 i 11 setmanes d'edat respectivament. Els ratolins van ser estabulats en instal·lacions lliures de patògens (SER-CBATEG), en condicions de temperatura ($22^{\circ}\text{C} \pm 2$) i llum controlades (cicles de 12 hores de llum i 12 hores de foscor), i alimentats *ad libitum*, és a dir, sense restringir-los l'accés al menjar, amb una dieta estàndard (2018S Teklad Global; Harlan Teklad, Madison, Wisconsin, EEUU) o alta en lípids (TD.88137 Teklad Global; Harlan Teklad, Madison, Wisconsin, EEUU).

Per a la presa de mostres, els animals van ser anestesiats mitjançant anestèsics inhalatoris (Isoflurano, IsoFlo[®], Abbott Animal Health, Illinois, EEUU) i van ser eutanasiats per decapitació. Les mostres de sang i teixits van ser preses pel matí i immediatament van ser conservades en formol (teixits) o congelades amb N₂ líquid i guardades a -80°C (sangs i teixits). Tots els procediments experimentals van ser aprovats pel Comitè d'Ètica i d'Experimentació Animal i Humana de la Universitat Autònoma de Barcelona (UAB).

1.2. Soques bacterianes

Les soques *E.coli XL2Bue* (Stratagene-Agilent technologies, Santa Clara, CA, EEUU) es van emprar per obtenir els diferents constructes plasmídics utilitzats en aquest treball. Tots els plasmidis contenen el gen de selecció de resistència a l'ampicil·lina. El cultiu bacterià es va fer créixer en medi LB sòlid (Miller's LB Broth, Conda, Madrid, Espanya) amb 2 % d'agar i 50 µg/mL d'ampicil·lina.

1.3. Anticossos

Les mostres de teixits van ser fixades amb una solució tamponada de formol al 4%, incloses en blocs de parafina i posteriorment es van obtenir seccions de 2-3 µm per a realitzar la incubació amb els anticossos o les tincions corresponents. Els anticossos i reactius utilitzats per a la detecció de proteïnes mitjançant tècniques immunohistoquímiques o western blot van ser els següents:

	Reactivitat	Espècie	Proveïdor
Immunohistoquímica			
Anti-Mac2	Ratolí	rat	Cederlane CL8942AP
Anti-GFP	Ratolí	Cabra	Abcam ab6673
Western Blot			
Anti-GFP	Ratolí	Cabra	Abcam ab6673
Anti-tubulina	Ratolí	Conill	Abcam ab4074
Anti-conill/HRP	Conill	Porc	DAKO P0217
Anti-cabra/HRP	Cabra	Conill	DAKO P0449

1.4. Reactius

Els reactius de biologia molecular es van obtenir de les cases comercials Roche (Roche Diagnostics Corp., IN, EEUU), Invitrogen Corporation (actualment Life Technologies) (San Diego, CA, EEUU), Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, EEUU), Amersham Biosciences (Piscataway, NJ, EEUU), Sigma (St.Louis, MO, EEUU), Promega Corporation (Madison, WI, EEUU), BASF (Barcelona, Espanya), Qiagen (Hilden, Alemanya), QBIogen (actualment MP Biomedicals) (Irvine, CA, EEUU) i Fermentas (St. Leon-Rot, Alemanya). Els medis de cultiu i els antibiòtics es van obtenir de PAA (Pasching, Austria) i el sèrum (FBS) de Gibco (Invitrogen, Life Technologies).

1.5. Plasmidis

Els plasmidis utilitzats en aquest estudi es resumeixen en la següent taula:

Nom	Promotor	Gen d'interès	PolyA
pAAV-CAG-GFP	CAG	GFP	β -globina de conill
pAAV-CAG-NUL	CAG	-	β -globina de conill
pAAV-mini/aP2-GFP-WPRE	mini/aP2	GFP	β -globina de conill
pAAV-CAG-GFP-miRT122a	CAG	GFP - miRT122a	β -globina de conill
pAAV-CAG-GFP-miRT1	CAG	GFP - miRT1	β -globina de conill
pAAV-CAG-GFP-dmiRT	CAG	GFP - miRT122a miRT1	β -globina de conill
pAAV-hAAT-moBMP7	hAAT	moBMP7	β -globina de conill
pAAV-hAAT-null	hAAT	-	β -globina de conill
pAAV-CAG-moBMP7-dmiRT	CAG	moBMP7 - miRT122a miRT1	β -globina de conill

mo: seqüència murina optimitzada

El promotor CAG és un promotor híbrid format pel promotor de la β -actina de pollastre i per l'*enhancer* del Citomegalovirus, que presenta una expressió ubiqua.

Les estratègies de clonatge utilitzades per a la generació dels diferents plasmidis es resumeixen en la taula següent:

Nom	Estratègia de clonatge	
pAAV-mini/aP2-GFP-WPRE		CBATEG
pAAV-CAG-NUL		CBATEG
pAAV-hAAT-NUL		CBATEG
pAAV-CAG-GFP	vector	pAAV-CAG-GFP-WPRE (CBATEG) digerit amb NotI i Bsu36I.
pAAV-CAG-GFP-miRT122a	vector	pAAV-CAG-GFP-WPRE (CBATEG) digerit amb NotI i Bsu36I.
	insert	pMA-miRT122a digerit amb PvuI.
pAAV-CAG-GFP-miRT1	vector	pAAV-CAG-GFP-WPRE (CBATEG) digerit amb NotI i Bsu36I.
	insert	pMA-miRT1 digerit amb PvuI.
pAAV-CAG-GFP-dmiRT	vector	pAAV-CAG-GFP-WPRE (CBATEG) digerit amb NotI i Bsu36I.
	insert	pMA-dmiRT digerit amb PvuI.
pAAV-hAAT-moBMP7	vector	pGG2-hAAT-oCre (CBATEG) digerit amb MluI i XhoI.
	insert	pMA-RQ-BMP7 digerit amb XhoI i SmaI.
pAAV-CAG-moBMP7-dmiRT	vector	pAAV-CAG-GFP-dmiRT digerit amb HincII i XhoI.
	insert	pMA-RQ-BMP7 digerit amb XhoI i SmaI.

mo: seqüència murina optimitzada

2. MÈTODES

2.1. Tècniques bàsiques de DNA

2.1.1. Preparació del DNA plasmídic

Per a l'obtenció de petites quantitats de DNA plasmídic (3-4 µg) es van realitzar *minipreparacions (minipreps)* segons el protocol de lisi alcalina originalment descrit per Bionboim i col·laboradors (Birnboim et al., 1979). A partir de 1.5 mL de medi de cultiu (LB amb l'antibiòtic corresponent) es degrada la paret bacteriana per acció de l'enzim lisozim, seguida d'una lisi alcalina i de la precipitació selectiva del DNA genòmic i proteïnes desnaturalitzants amb una solució d'acetat de potassi a pH àcid. El RNA bacterià és degradat per l'addició de l'enzim RNAsa.

D'altra banda, l'obtenció de grans quantitats de DNA es va realitzar mitjançant *maxipreparacions (maxipreps)*, a partir de les quals s'obté com a màxim 1 mg de plasmidi de DNA, o *megapreparacions (megapreps)* per a obtenir un màxim de 2.5 mg de plasmidi de DNA, a partir de 200 ó 500 mL de medi de cultiu, respectivament. El mètode està basat igualment en la lisi alcalina, però la purificació de DNA, en aquest cas, es va realitzar mitjançant columnes d'adsorció *PureYield™ Plasmid MaxiPrep System* (Promega Corporation) per les *maxipreps*, i *EndoFree Plasmid Mega Kit* (Qiagen) per les *megapreps*.

2.1.2. Digestió del DNA amb enzims de restricció

Cada enzim de restricció requereix unes condicions de reacció específiques de pH, força iònica i temperatura. En cada cas, es van seguir les instruccions de la casa comercial (New England Biolabs, Roche, Promega o Fermentas). En general, el DNA va ser digerit amb una unitat d'enzim per µg de DNA en el tampó subministrat pel fabricant durant una hora a la temperatura òptima de cada enzim. El producte de la reacció va ser analitzat en gels d'agarosa. Quan el DNA havia de ser digerit amb 2 o més enzims de restricció, les digestions es van dur a terme conjuntament sempre que les condicions del tampó i temperatura fossin compatibles. Si els enzims tenien diferents requeriments, després de la primera digestió el DNA era purificat de les sals i de l'enzim a través del *GeneJET® Gel Extraction kit* (Thermo SCIENTIFIC) segons les instruccions del fabricant. El DNA era eluït en 30 µL amb el tampó d'elució subministrat pel fabricant.

2.1.3. Desfosforilació de fragments de DNA

El DNA plasmídic, un cop digerit, pot tornar a re-ligar. Aquest procés es pot evitar mitjançant l'eliminació dels residus fosfats de l'extrem 5' del vector. Per a la desfosforilació es va utilitzar 1 unitat de fosfatasa alcalina per 1-5 µg de DNA (FastAP™ *Thermosensitive Alkaline Phosphatase*, Fermentas) en el tampó comercial 1X. La reacció de desfosforilació es va realitzar durant 10 minuts a 37°C. Posteriorment, es va inactivar l'enzim a 74°C durant 5 minuts per evitar qualsevol interacció de la fosfatasa en la reacció de la lligació.

2.1.4. Generació d'extrems roms de fragments de DNA

En els casos on l'acció de l'enzim de restricció va deixar els extrems cohesius i es necessitaven extrems roms pel clonatge, el fragment digerit va ser tractat amb l'enzim *Klenow Fragment* (Fermentas). En presència de la doble cadena de DNA i deoxinucleòsids trifosfats (dNTPs), la DNA polimerasa reomple l'extrem generat per l'enzim de restricció protuberant (activitat polimerasa 5'→3' o 3'→5'). En absència de dNTPs, l'enzim elimina l'extrem 3' protuberant mitjançant la seva acció exonucleasa (3'→5'), en canvi, no té activitat exonucleasa 5'→3'. La reacció es va dur a terme seguint les instruccions de la casa comercial.

2.1.5. Construcció de molècules híbrides: lligació

La construcció de molècules híbrides de DNA a partir de diferents fragments, procediment conegut com lligació, es va dur a terme mitjançant l'acció de l'enzim lligasa. Els fragments de DNA d'interès es van barrejar a diferents ràtios de vector i d'insert (1:5, 1:10, 1:20) amb l'enzim DNA Lligasa del bacteriòfag T4 (New England Biolabs) i el tampó corresponent segons el protocol establert per la casa comercial. Els productes resultants de la lligació van ser transformats en cèl·lules competents *E.coli* de la soca XL2-blue (Stratagene-Agilent technologies, Santa Clara, CA, EEUU).

2.1.6. Transformació en cèl·lules competents *E.coli* XL2-blue

El plasmidi de DNA va ser introduït a cèl·lules bacterianes competents mitjançant l'electroporació. Es van emprar 40 µL de cèl·lules *E.coli* XL2-blue (2×10^{10} cèl·lules/mL), prèviament descongelades en gel, on es va afegir 1 µL (aproximadament 10 ng) de la reacció de lligació del DNA o de DNA control directament a les cèl·lules competents. Després de la incubació en gel durant 5 minuts, les cèl·lules van ser electroporades a 2500 V amb un electroporador (Bio-Rad). Posteriorment, es van diluir en 100 µL de LB,

es van sembrar en plaques amb LB amb ampicil·lina i es van incubar a 37°C O/N (durant tota la nit).

Al matí següent es van fer créixer les colònies de bacteris obtingues i posteriorment es va extreure el DNA de les colònies recombinants. Mitjançant l'ús d'enzims de restricció es va analitzar la presència de les molècules híbrides de DNA.

2.1.7. Obtenció del DNA i purificació

El gel d'electroforesi d'agarosa és el mètode estàndard utilitzat per separar, identificar i purificar els fragments de DNA. Per a separar fragments de DNA d'entre 0.2 i 7 Kb es van utilitzar gels d'agarosa a l'1 %. Per separar fragments <0.2 kb es van utilitzar gels d'agarosa al 2 %. La visualització del DNA en el gel es va aconseguir mitjançant l'addició de baixes concentracions de Bromur d'Etidi fluorescent al gel (0.5 µg/mL), el qual s'intercala entre les dues cadenes del DNA. La presència de DNA es va visualitzar utilitzant llum ultraviolada (UV) de baixa longitud d'ona (310 nm) a través d'un transil·luminador i un sistema de càmeres (Syngene). Com a marcador de mida molecular de DNA es va utilitzar el *GeneRuler* 1 Kb i/o *GeneRuler* 100 pb (Thermo Scientific).

Els gels d'agarosa es van preparar dissolvent l'agarosa en tampó d'electroforesi 1X TAE (Trisacetate pH 8.3, 40 mM i EDTA 1 mM) amb 0.5 µg/ml de Bromur d'Etidi. Les mostres es van carregar al gel amb 1X tampó de càrrega (Fermentas) i van córrer amb el tampó d'electroforesi 1X TAE a 80 V. Per tal d'obtenir i purificar el fragment de DNA d'interès del gel d'agarosa, es va utilitzar *GeneJET™ Gel Extraction kit* (Fermentas). El DNA va ser quantificat a l'espectrofotòmetre Nanodrop 1000 (Thermo Fisher Scientific Inc., EEUU).

2.2. Cèl·lules eucariotes en cultiu

2.2.1. Cèl·lules HEK293

Les cèl·lules HEK293 són cèl·lules embrionàries de ronyó humà que presenten el gen adenoviral E1 de l'Ad5 integrat de forma estable en el genoma cel·lular. Aquestes cèl·lules van ser utilitzades per a l'amplificació dels vectors virals i per a la comprovació *in vitro* de l'expressió dels plasmidis generats. Es van mantenir en medi de cultiu DMEM (PAA) amb 2 mM de Glutamina, suplementat amb FBS al 10% (inactivat per calor) en

un incubador ajustat al 8.5 % de CO₂ i a 37°C. Quan tenien una confluència del 70 %, les cèl·lules van ser tripsinitzades i plaquejades a diferents dilucions.

2.2.2. Cèl·lules C2C12

La línia cel·lular C2C12 (ATCC) prové d'una línia immortalitzada de mioblasts de ratolí. El manteniment de les cèl·lules es va realitzar en medi DMEM (PAA) amb 2µM de Glutamina i suplementat amb FBS (*Fetal Bovine Serum*) al 10 % (inactivat per calor). Per induir la seva diferenciació a miotubs, es va utilitzar el mateix medi de cultiu però suplementat amb HS (*Horse Serum*, PAA) al 2 % (inactivat per calor) enlloc de FBS al 10 %. En ambdós casos es van cultivar a l'incubador a 37°C i al 8.5 % de CO₂. Aquestes cèl·lules es van utilitzar per a l'expressió d'elevades quantitats de microRNA1.

2.2.3. Transfecció de DNA en cèl·lules en cultiu

Per a dur a terme l'anàlisi d'expressió *in vitro* dels constructes obtinguts es van realitzar transfeccions dels plasmidis a diferents línies cel·lulars (HEK293, C2C12).

Per a aquesta finalitat es va utilitzar la tècnica de transfecció amb Lipofectamina (Lipofectamine™2000, Invitrogen), la qual es basa en la formació d'un complex Lipofectamina-DNA per tal d'afavorir l'entrada del DNA a la cèl·lula. La proporció de Lipofectamina/DNA utilitzada va ser de 10 µL de Lipofectamina (1mg/mL) per 4 µg de DNA per plaques de 6 pous. En el moment de la transfecció, les cèl·lules HEK293 i C2C12 estaven al 70-80 % de confluència. Al cap de 6h post-transfecció, es va canviar el medi de les cèl·lules C2C12 per medi de diferenciació DMEM (PAA) amb 2mM de Glutamina i suplementat amb HS (*Horse Serum*, PAA) al 2 % (inactivat per calor). El cultiu de les cèl·lules es va interrompre a les 24-48h post-transfecció, en el cas de les HEK293, i als 6 dies post-transfecció i inducció del procés de diferenciació, en el cas de les cèl·lules C2C12, per a l'anàlisi de les mostres.

2.3. Producció, purificació i titulació dels vectors virals adenoassociats

2.3.1. Producció i purificació

Les partícules infectives de vectors virals AAV8 i AAV9 es van generar en cultius cel·lulars HEK293 cultivats en *Roller Bottles* (RB) mitjançant un protocol de triple transfecció (Ayuso et al., 2010) que implica la utilització de 3 plasmidis. Aquest protocol, basat en la precipitació dels virus mitjançant polietilenglicol (PEG) i ultracentrifugació

amb gradients de CsCl, permet eliminar pràcticament el contingut de càpsides buides i disminuir les impureses proteiques, augmentant d'aquesta manera la puresa de la preparació viral final, la qual cosa resulta en nivells de transducció *in vivo* més elevats (Ayuso et al., 2010).

La co-transfecció de cada RB es va dur a terme en 30 mL de fosfat càlcic amb 150 µg del DNA plasmídic d'interès (amb les seqüències ITR i el casset d'expressió corresponent), juntament amb 150 µg del plasmidi accessori rep2/cap8 o rep2/cap9 (plasmidi d'expressió codificant per les proteïnes de la càpsida proteica de les partícules virals i per les proteïnes necessàries per la replicació viral; Plasmid Factory) i 150 µg del plasmidi *helper* pWEAD (plasmidi d'expressió codificant per a les proteïnes adenovirals necessàries; Plasmid Factory).

Un total de 10 RB per cada vector es van utilitzar per a la producció viral. Quaranta-vuit hores post-transfecció, es van recollir i centrifugar les cèl·lules a 2500 g durant 10 min. El medi de cultiu es va guardar a 4°C. El *pellet* cel·lular es va reconstituir en TMS (50 mM TrisHCl, 150 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, pH 8.0) i es va sonicar per lisar les cèl·lules i alliberar els virus del seu interior. El lisat es va centrifugar a 2500 g durant 30 min, i el sobrenedant d'aquesta centrifugació es va afegir al medi de cultiu prèviament guardat a 4°C. A continuació, les partícules virals es van precipitar mitjançant una incubació de 15h en PEG 8000 al 8% (Sigma) a 4°C. Passat aquest període, els vectors es van precipitar per centrifugació a 4000 g durant 30 min. Aquest nou *pellet*, el qual contenia els vectors virals tant del medi de cultiu com de les cèl·lules, va ser reconstituït amb TMS, tractat amb benzonasa (Merck) durant 1h a 37°C i finalment centrifugat a 10000 g durant 10 min. El sobrenedant resultant es va carregar en tubs de 37.5 ml *Ultra clear* (Beckman) que contenien un gradient discontinu de CsCl de densitat 1.5 (5 mL) i 1.3 g/ml (10 mL). A continuació, van ser centrifugats durant 17h a 27000 rpm en un rotor SW28 (Beckman). Les bandes de virus van ser recollides mitjançant agulles de 18 G i es van transferir a tubs *Ultra clear* de 12.5 mL. La resta del tub de 12.5 mL es va emplenar amb CsCl a 1.379 g/mL per tal de generar un gradient continu. Aquests tubs es van centrifugar a 38000 rpm en un rotor SW40Ti (Beckman) durant 48h. Finalment, es van recollir i dialitzar les bandes corresponent a les partícules virals plenes mitjançant una membrana de 10 KDa (*Slide-A-Lyzer Dialysis Products*, Pierce), i posteriorment es van filtrar mitjançant filtres de 0.22 µm (Millipore).

2.3.2. Titulació de genomes virals

Els genomes virals dels AAV8 i AAV9 van ser determinats per PCR quantitativa adequant el protocol descrit per l'AAV2, AAV8 i AAV9 *Reference Standard Material* (Lock et al., 2010) als vectors utilitzats en aquest estudi. La quantificació de cada vector es va fer en paral·lel amb un vector de referència de concentració coneguda per garantir la validesa dels resultats. Com a corba estàndard es va fer servir un plasmidi linealitzat i quantificat mesurant l'absorbància a 260 nm.

Per a assegurar que el títol del vector viral no se sobreestimava degut a la presència de plasmidis de DNA restants de la transfecció a la preparació viral final, es va realitzar un tractament amb DNAsa previ a la quantificació. Només els genomes encapsidats són resistents a la digestió amb DNAsa. Es van afegir 5 µl de cada preparació del vector viral en 5 µL de tampó de DNAsa 10X (130 mM Tris-HCl, 50 mM MgCl₂, 1.2 mM CaCl₂, pH 7.5), 1 µL de DNAsa (10 U/µL) i 36 µl d'aigua Milli-Q. La digestió es va incubar 60 min a 37°C. Després de la digestió, les mostres es van diluir per a obtenir un valor d'amplificació dins del rang de la corba estàndard.

La reacció de quantificació consistia en una incubació inicial de 10 min a 95°C (que permet l'activació de la polimerasa i la desnaturalització de les càpsides virals, permetent l'alliberament del genomes), seguida de 40 cicles de 30 s a 95°C (desnaturalització) i 30s a 60°C (*annealing* i *elongació*).

Cada reacció de TaqMan contenia en un volum final de 10 µL:

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

Els *primers* utilitzats en la quantificació dels genomes virals dels AAV hibridaven a la zona comú del polyA (intró β-globina):

Forward: 5' CTTGAGCATCTGACTTCTGGCTAAT 3'

Reverse: 5' GGAGAGGAGGAAAAATCTGGCTAG 3'

Sonda: 5' CCGAGTGAGAGACACAAAAAATTCCAACAC 3'

El títol viral assignat va ser el resultat de la mitjana de tres quantificacions realitzades en dies diferents:

Vector viral	Títol (vg/mL)
AAV9-CAG-GFP	6.1×10^{12}
AAV9-CAG-GFP-miRT122a	3.5×10^{12}
AAV9-CAG-GFP-miRT1	8.1×10^{13}
AAV9-CAG-GFP-dmiRT	1.2×10^{13}
AAV9-aP2-GFP-WPRE	1.8×10^{13}
AAV8-CAG-GFP-dmiRT	2.2×10^{13}
AAV9-NUL	7.6×10^{13}
AAV9-BMP7-dmiRT	3.2×10^{13}
AAV8-CAG-null	6.3×10^{13}
AAV8-CAG-BMP7-dmiRT	4.1×10^{13}
AAV8-hAAT-null	1.4×10^{14}
AAV8-hAAT-BMP7	8.5×10^{13}

2.3.3. Quantificació de les partícules virals per tinció de plata

L'anàlisi de les preparacions virals per electroforesi de proteïnes SDS-PAGE i la posterior tinció amb nitrat de plata permet la quantificació de les càpsides virals, que comparat amb el valor de genomes virals obtinguts per RT-PCR, permet calcular el percentatge de càpsides buides en cada preparació (relació: partícules virals / genomes virals). A més a més, aquest mètode permet visualitzar al gel el grau de contaminació de proteïnes no virals que podrien afectar l'eficiència de transducció *in vivo*.

El volum apropiat del vector d'interès, del vector de referència (control utilitzat també en la quantificació per RT-PCR) i de diferents dilucions del vector K208 (de concentració coneguda i utilitzat com a corba estàndard), es van barrejar amb el tampó 4x Novex® Tris-Glycine LDS Sample Buffer (Invitrogen) i 10X NuPAGE Sample Reducing Agent

(Invitrogen) fins a un volum final de 20 μ L. Després de 5 minuts d'ebullició, les mostres es van carregar en un gel del 10 % *Bis-Tris Gel 1.5mm 15 well* (Invitrogen) i es van córrer a 120 V durant 2 hores. Les proteïnes del gel van ser fixades amb una barreja de Milli-Q H₂O/etanol/àcid acètic. A continuació, el gel es va sensibilitzar amb una barreja de Na₂S₂O₃/Acetat de sodi/etanol/H₂O Milli-Q. Finalment, el gel es va tenyir amb nitrat de plata i les bandes es van revelar fent servir una barreja de Na₂CO₃/Formaldehid/H₂O Milli-Q.

El títol de partícules virals es va obtenir per densitometria. A partir de la intensitat de la VP3 de cada dilució del vector K208 es va generar una corba estàndard per quantificar les partícules virals de les diferents preparacions.

2.4. Injecció *in vivo* dels vectors virals i plasmídics

2.4.1. Administració local al teixit adipós blanc

Els animals es van anestesiar mitjançant una injecció intraperitoneal de ketamina (100 mg/kg) i xilacina (10 mg/kg). Es va afaitar la zona ventral del ratolí, i a continuació es va realitzar una laparotomia per tal d'exposar el teixit adipós blanc epididimal. Els vectors AAV es van resuspendre en 200 μ L de solució salina amb 0.001 % Pluronic F68 i es van injectar directament al teixit adipós epididimal. Es van realitzar dues administracions de 50 μ L a cada dipòsit greixós (una propera al testicle i l'altre a la zona mitjana del dipòsit). L'abdomen es va ruixar amb solució salina estèril i es va suturar la paret abdominal i la pell. Els ratolins es van deixar recuperar de l'anestèsia en una manta calefactora per evitar la pèrdua de temperatura.

2.4.2. Administració sistèmica

La quantitat necessària de solució d'AAV es va diluir en un volum final de 200 μ L de solució salina amb 0.001% Pluronic F68 i es va administrar a la vena lateral de la cua sense exercir pressió en el moment de la injecció. Abans de l'administració, els animals van ser exposats sota una llum d'infraroig de 250 W (Philips) durant uns minuts per dilatar els vasos sanguinis i facilitar la visualització i l'accés a la vena de la cua. Es van col·locar els animals en un *restrainter* de plàstic (Harvard Apparatus) per immobilitzar-los i facilitar la injecció.

2.4.3. Administració hidrodinàmica

L'administració hidrodinàmica per la vena de la cua es va realitzar com s'ha descrit anteriorment (Liu et al., 1999). El plasmidi de DNA es va diluir en una solució salina en volum (mL) igual al 10 % del pes corporal mitjà (g) dels animals i es va injectar a la vena lateral de la cua mitjançant xeringues de 5 mL acoblades a agulles de 30 G (BD) en menys de 5 segons. Abans de la injecció, els animals van ser exposats sota una llum d'infraroig de 250 W (Philips) durant uns minuts per a dilatar els vasos sanguinis i facilitar la visualització i l'accés a la vena de la cua. Es van col·locar els animals en un *rastrainer* de plàstic (Harvard Apparatus) per a immobilitzar-los i facilitar la injecció.

2.5. Anàlisi d'expressió del mRNA per RT-PCR

2.5.1. Extracció de RNA total

Les mostres de teixits per a l'obtenció de RNA total van ser obtingudes dels animals acabats de sacrificar i van ser ràpidament congelades en nitrogen líquid. Els teixits congelats van ser homogeneïtzats mitjançant la utilització d'un politró (Polytron® MICCRA-KIT D-9, ART Prozess & Labortechnik GmbH & Co. KG, Mülheim, Alemanya) amb 1 ml de la solució TriPure Isolation Reagent (Roche) i, seguint el protocol comercial de purificació de RNA en columna de Rneasy Mini Kit de QIAGEN (Cat.No.74104, QIAGEN, Invitrogen), es va obtenir el RNA total. El mateix protocol inclou un tractament amb DNases.

Totes les mostres van ser tractades en les columnes de purificació amb DNase (RNase-Free DNase Set proporcionat amb les columnes, Qiagen), que després de ser rentades amb el *buffer* subministrat pel fabricant, van ser eluïdes amb 30 µl d'aigua destil·lada lliure de RNases (DEPC). Finalment, la concentració de RNA obtinguda es va determinar mitjançant l'ús d'un Nanodrop (ND-1000, ThermoCientific).

2.5.2. Síntesi de cDNA

Un µg de RNA total va ser retrotranscrit a cDNA utilitzant el *Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit* (Roche) seguint les instruccions del fabricant. Oligo-dT i oligonucleòtids hexàmers aleatoris van ser utilitzats com a *primers* en la reacció juntament amb la presència d'un inhibidor de RNases.

2.5.3. Real Time PCR

La PCR quantitativa o *Real-Time* PCR (RT-PCR) ha esdevingut molt útil en l'anàlisi de l'expressió del mRNA de diversos gens. La RT-PCR es va fer en el LightCycler® 480 (Roche) utilitzant LightCycler® 480 SYBR Green I Master (Roche). A la següent taula es mostren els diferents *primers* de ratolí utilitzats a la RT-PCR:

Gen	Seqüència Forward	Seqüència Reverse
<i>Cd68</i>	GGGGCTCTTGGGAACTACAC	CAAGCCCTCTTTAAGCCCA
<i>F4/80</i>	CTTTGGCTATGGGCTTCCAGTC	GCAAGGAGGACAGAGTTTATC
<i>Ppargc1a</i>	ATACCGCAAAGAGCACGAGAAG	CTCAAGAGCAGCGAAAAGCGTCACAG
<i>Ucp1</i>	GGATTGGCCTCTACGACTCAG	TGTAGGCTGCCCAATGAACA
<i>Cidea</i>	CCTACGACATCCGATGCACA	GTATGTGCCCGCATAGACCA
<i>CPT1α</i>	CTCCGCCTGAGCCATGAAG	CACCAGTGATGATGCCATTCT
<i>Scd1</i>	AAGAGAAGGGCGGAAAACCTG	ATGAAGCACATCAGCAGGAG
<i>Prdm16</i>	CTTAGCCGGAAGTCACAGG	CATTGCATATGCCTCCGGGT
<i>GFP</i>	AAGTTCATCTGCACCACCG	TCCTTGAAGAAGATGGTGCGC
<i>CD36</i>	AGCCTCCTTTCCACCTTTTG	ACGGGGATTCTTTAAGGTC
<i>oBMP7</i>	AGAGCATCAACCCTAAGCTGG	TGTTCTGGGATCTCTGCTTGC
<i>Pref1</i>	CGGGAAATTCTGCGAAATAG	TGTGCAGGAGCATTCTACT
<i>Wnt10b</i>	GGTGGTAACGGAAAACCTGA	GCTCGCAGAAGTCAGGAGAC
<i>CEBPβ</i>	AATCCGGATCAAACGTGGCT	CCCGCAGGAACATCTTTAAGT
<i>CEBPα</i>	AATGGCAGTGTGCACGTCTA	CCCCAGCCGTTAGTGGAAAGAG
<i>Fabp4</i>	ATGAAATCACCGCAGACGAC	TCGACTTCCATCCCCTTC
<i>Slc2a4</i>	TGCCCGAAAGAGTCTAAAGC	TCCGTTTCTCATCCTTCAGC
<i>Plin1</i>	AGTTCACAGCTGCCAATGAG	AGAGGCGATCTTTTCTGGAG
<i>Ndn</i>	CAAGAAAGATCCCCAGGCGT	CTGGGCAGCAAGATTAGCCT
<i>Fasn</i>	GCTGCGGAAACTTCAGGAAA	GAGTTGAGCTGGGTTAGGGT
<i>Acaca</i>	TTCCAGGCACAGTCCTTAGG	GGCCTTGATCATCCAACACC
<i>Acacb</i>	CGGGTGAAGTACATCAAGCG	ACTTGGTGTAGCTTCTCCCC
<i>Pparg</i>	AGGGCGATCTTGACAGGAAA	CGAAACTGGCACCCTTGAAA
<i>LPL</i>	TTCAACCACAGCAGCAAGAC	CTGGATAATGTTGCTGGGCC
<i>Pnpla2</i>	CAACGCCACTCACATCTACG	ACCAGGTTGAAGGAGGGATG
<i>Lipe</i>	AGGACAGGACAGCAAGGTAC	GTTCTTGAGGTAGGGCTCGT
<i>Mlxipl</i>	TCTTCAGCAGTGGGATCCTG	TCAGAAAGGGGTTGGGATCC
<i>Rplpo</i>	TCCACCTTGTCTCCAGTCT	ACTGGTCTAGGACCCGAGAAG
<i>Srebf1</i>	TTCCATTGACAAGGCCATGC	TACCTGGACTGAAGCTGGTG

Cada reacció de RT-PCR (LightCycler® 480 SYBR Green I Master, Roche) contenia 10 µl de volum total:

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

La reacció va consistir en 5 minuts a 95°C per a una desnaturalització inicial i 45 cicles de 4 etapes: desnaturalització (10 segons a 95°C), *annealing* (10 segons a 60°C) amplificació (10 segons a 72°C) i 30 segons a 60°C. Abans de refredar la reacció a 4°C, es va deixar 5 segons a 95°C i 1 minut a 65°C per a determinar la temperatura de *melting*.

Es va utilitzar el mètode *delta-delta-Ct* ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) descrit per Livak (Livak et al., 2001) per a quantificar l'expressió relativa dels gens d'interès. En aquest mètode àmpliament utilitzat, s'assumeix una duplicació òptima de cada cicle de RT-PCR amb una taxa d'amplificació del 100%. Amb aquest mètode, les Cts (indica el nombre de cicles al qual la quantitat del gen diana d'interès és amplificat) del gen d'interès, tant en les mostres de l'assaig com en les mostres de referència, són ajustades en relació a les Cts *housekeeping*, el gen *RPLP0*, per cada una de les mostres. El valor resultant servirà per a determinar la diferència d'expressió.

2.6. Anàlisi d'expressió dels miRNA per RT-PCR

2.6.1. Extracció de miRNA dels teixits

Per a l'aïllament de miRNA, els teixits es van disgregar mecànicament amb un politró (Polytron[®] MICCRA-KIT D-9, ART Prozess & Labortechnik GmbH & Co. KG, Mullheim, Alemanya) amb la solució de lisi seguint les instruccions del *kit* comercial miRVana[™] miRNA Isolation Kit (Ambion by Life Technologies, Madrid, Espanya). Aquest *kit* es basa en una extracció orgànica del RNA seguida d'una purificació amb filtres i solucions de rentat específiques proporcionades per la casa comercial.

2.6.2. Síntesi de cDNA

El RNA obtinguts va ser diluït fins a una concentració de 5 ng/μL dels quals 2 μL van ser retrotranscrits a cDNA utilitzant el miRCURY LNA[™] Universal RT microRNA PCR - Universal cDNA synthesis kit II (Exiqon, Vedbaek, Dinamarca) seguint les instruccions del fabricant.

2.6.3. Real Time PCR

A la RT-PCR dels miRNA, a diferència del mRNA anteriorment esmentat, es va utilitzar ExiLENT SYBR[®] Green Master mix (Exiqon, Vedbaek, Dinamarca). Cada reacció de RT-PCR (ExiLENT SYBR[®] Green Master mix, Exiqon) contenia 10 μL de volum total:

Reacció ExiLENT SYBR® Green

5 µL PCR Master mix

1 µL primer mix

4 µL cDNA (dil. 1/80)

La reacció que es va seguir segons les instruccions de la casa comercial. Els resultats obtinguts de les Cts van ser processats tal i com s'explica en l'apartat 2.5.3 de Materials i Mètodes, però en aquest cas es va utilitzar un gen normalitzat *housekeeping* diferent, el U6.

2.7. Extracció i anàlisi de proteïnes**2.7.1. Extracció de proteïnes**

Les proteïnes totals es van obtenir mitjançant homogeneïtzació dels fragments de teixit congelats, d'uns 100 mg, en 1 mL de tampó d'homogeneïtzació, fent servir un politró (Polytron® MICCRA-KIT D-9, ART Prozess & Labortechnik GmbH & Co. KG, Mullheim, Alemanya). Els extractes es centrifugaven 5 minuts a 12.000 g a 4°C per precipitar el debris cel·lular.

Tampó d'homogeneïtzació: 50 mM Tris-HCl ph 7.5, 0.27 M sacarosa, 1mM EGTA, 1mM EDTA, 50 mM NaF, 10 mM β-glicerolfosfat sòdic, 5 mM tampó fosfat 1% Triton X-100. Just abans de fer servir, es van afegir inhibidors de proteases al tampó d'homogeneïtzació (una patilla per cada 10 ml de tampó, *Complete Mini EDTA-free protease inhibitor cocktail tablets*, Roche Diagnostics GMBH, Germany).

A partir de la solució es va determinar la concentració de proteïnes de l'extracte mitjançant el mètode BCA. La resta d'extracte de proteïnes es va guardar a -20°C fins a la seva propera utilització.

2.7.2. Determinació de la concentració de proteïnes

Per tal de determinar la concentració de proteïnes dels diferents extractes es va utilitzar el mètode de BCA (BCA Protein Assay Reagent, Thermo Scientific) seguint les instruccions de la casa comercial. Aquest mètode es basa en la reducció del Cu²⁺ en Cu⁺ per la proteïna en un medi alcalí detectat per un canvi colorimètric altament sensible. Breument, es va barrejar els components del reactiu BCA en una proporció 1:50, per

altra banda, es van diluir les mostres (1:5) amb H₂O-miliQ. En una placa de 96 pous transparent es van afegir 10 µL de mostra amb 190 µL del reactiu de BCA a cada un dels pous. Es van incubar 30 minuts a 37°C i es va realitzar una lectura de l'absorbància a 565 nm. A partir de la comparació amb una recta patró generada amb BSA (Albúmina 2 µg/µl) i successives dilucions es realitzaren els càlculs per a obtenir la concentració de proteïna de les mostres.

2.7.3. Anàlisi de l'expressió de proteïnes mitjançant Western Blot

2.7.3.1. Electroforèsi en gels de poliacrilamida (SDS-PAGE)

L'anàlisi de l'expressió de proteïnes es va realitzar mitjançant l'electroforèsi dels diferents extractes proteics en gels de poliacrilamida al 10%, en presència de SDS. El gel de poliacrilamida SDS-PAGE es formà a partir de la fusió de dos gels. El primer gel és el de compactació o *stacking*, el qual contenia un 3.9% de poliacrilamida i contenia els pous a on es dipositaven les mostres. El segon, es tracta del gel separador o *resolving*, aquest contenia un 10% de poliacrilamida i s'hi donava la separació de les proteïnes. Els diferents extractes proteics es descongelaven en gel. La quantitat de proteïnes a carregar es va barrejar amb 1/5 volum de tampó de càrrega Laemli 5X (Tampó fosfat 20 mM, Glicerol 20%, SDS 4%, 2-β-mercaptoetanol 2% i blau de bromofenol com a colorant). Un cop preparades les mostres, les proteïnes es desnaturalitzaren a 90°C durant 2 minuts, es posaven en gel i es carregaren al gel SDS-PAGE. El tampó utilitzat per a l'electroforèsi fou el següent: Tris base 5 mM, Glicina 192 mM, SDS 0.1% (pes/volum). L'electroforèsi es va realitzar a 50 V (volts) mentre les mostres creuaven el gel de compactació, i posteriorment a 80 V quan es trobaven ja en el gel separador. A l'electroforèsi es van utilitzar el marcador de pes molecular per proteïnes Spectra Multicolor Broad Range (Thermo Scientific).

2.7.3.2. Transferència de proteïnes a membranes i immunodetecció

L'electrotransferència de les proteïnes des del gel a les membranes de PVDF (Hyperbond-P, Amersham Biosciences) es va realitzar amb l'aparell Transblot model 2051 de LKB/Pharmacia, a 100 V durant dues hores a 4°C en un tampó d'electrotransferència (Tris 25 mM, Glicina 150 mM, Metanol 20%). Després de la transferència les membranes es bloquejaven amb TBS-T (Tris-HCl 25 mM, NaCl 137 mM, Tween20 0.1%) amb un 5% de llet desnatada en pols i pH 7.4, o bé TBS-T amb un 5% de BSA, depenent del protocol de l'anticòs a utilitzar. El bloqueig es va realitzar durant 1 hora en agitació a temperatura ambient. Posteriorment, les membranes es van

incubar amb els anticossos primaris diluïts (1/1000) en la mateixa solució utilitzada al bloqueig. La incubació es va realitzar en agitació suau a 4°C durant tota la nit. L'endemà les membranes es van rentar amb TBS-T 0.1% (3 rentats de 5 minuts) i es van incubar durant 1 hora, en agitació suau i a temperatura ambient, amb els corresponents anticossos secundaris, conjugats amb la peroxidasa i diluïts (1/20000) en la mateixa solució que s'havia utilitzat en el bloqueig. Finalment les membranes es van rentar de nou amb TBS-T 0.1% (3 rentats de 5 minuts). La immunodetecció es va realitzar mitjançant el producte comercial ECL+ Western Blotting analysis System (Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, Alemanya) seguint el protocol del fabricant. La membrana tractada amb ECL+ es va exposar en el film fotogràfic High performance chemiluminescence film (GE Healthcare Limited, 28906835) per tal de visualitzar la senyal.

Els anticossos primaris utilitzats en aquest treball estan detallats a l'apartat 1.3. de Materials i Mètodes. Les bandes obtingudes van ser quantificades per densitometria i analitzades amb el programari ImageJ.

2.8. Determinació del consum d'aliments

El consum d'aliments o ingesta, tant en dieta estàndard com en dieta alta en lípids, es va determinar fent la mitjana per gàbia, essent tots els animals de cada gàbia del mateix grup. La quantitat de menjar ingerit es va obtenir mitjançant la diferència entre la quantitat inicialment afegida a la gàbia i la quantitat romanent, cada 7 dies. El resultat es va expressar com la ingesta d'aliments en grams per dia i animal.

2.9. Determinació de paràmetres sèrics

El sèrum es va obtenir a partir de mostres de sang obtingudes per la cua, o bé, a partir de la decapitació dels ratolins en els estudis a temps final. En tots dos casos, la sang va ser recollida en tubs no heparinitzats i es va deixar durant 1h a 4°C. Posteriorment, es va centrifugar 10 minuts a 12000 g a 4°C per a l'obtenció del sèrum, el qual es va mantenir congelat a -80°C fins al moment de la determinació dels diferents paràmetres.

2.9.1. Glucosa

Els nivells de glucosa sèrica es van determinar a partir d'una gota de sang procedent de la cua dels ratolins, mitjançant el sistema Glucometer Elite™ (Bayer, Leverkusen, Alemanya).

2.9.2. Insulina

La insulina circulant es va determinar a partir de 5 µl de sèrum mitjançant un assaig immunoenzimàtic Ultra Sensitive Mouse Insulin ELISA (Crystal Chem, 90080), seguint les instruccions del fabricant. Aquest mètode té un límit de detecció màxim de 64 ng/mL.

2.9.3. Adiponectina

L'adiponectina circulant es va determinar a partir de 5 µl de sèrum mitjançant un assaig immunoenzimàtic Mouse Adiponectin ELISA (Crystal Chem, 80569), seguint les instruccions del fabricant. Aquest mètode té un límit de detecció màxim de 1 ng/mL.

2.9.4. BMP7

Els nivells circulants de BMP7 van ser determinats mitjançant un assaig immunoenzimàtic en 50 µl de sèrum utilitzant el Human BMP7 ELISA (R&D Systems, DBP700), seguint les instruccions del fabricant. El nivell de detecció màxim del kit és de 2000 pg/mL.

2.9.5. Triglicèrids

Els nivells de triglicèrids en el sèrum van ser determinats per espectrofotometria utilitzant un *kit* comercial GPO-PAP (Horiba-ABX, Montpellier, França) i l'aparell autoanalitzador PENTRA 400 (Horiba-ABX, Montpellier, França). És un mètode basat en la reacció enzimàtica GPO-PAP descrita per Fossati (Fossati et al., 1982) on el cromogen quinoneimina (PAP) és obtingut a partir de la reacció del p-clorofenol i 4-aminoantipirina catalitzada per la glicerol kinasa, el glicerol-3-fosfat oxidasa (GPO) i la peroxidasa.

2.9.6. Àcids grassos lliures

Els nivells d'àcids grassos lliures no esterificats es van determinar espectrofotomètricament utilitzant un producte comercial NEFA C (Wako Chemicals, Neuss, Alemanya) i l'autoanalitzador PENTRA 400 (ABX Diagnostics, Montpellier, França). El mètode es basa en la reacció enzimàtica de l'acil-CoA sintetasa i l'acil-Co oxidasa.

2.10. Determinació del contingut de triglicèrids hepàtics

Els triglicèrids es van extreure del teixit seguint el mètode de *Folch* fent servir una barreja de cloroform:metanol (2:1) (Folch et al., 1957). Per fer-ho, fragments congelats de fetge d'aproximadament 100mg es van pesar i homogeneïtzar en 15 mL de cloroform:metanol (2:1). Les fases lipídiques i aquoses es van separar mitjançant l'addició de 3 mL de H₂SO₄ al 0.05% i es van mantenir tota la nit a 4°C. Un cop separades les fases, es va eliminar la fase superior mitjançant una pipeta Pasteur i es va recuperar 1mL de la fase inferior lipídica en un tub de vidre de 5 mL. Posteriorment es va afegir 1mL d'una solució de cloroform/TRITÓ X-100 a l'1% i es va incubar en un bany a 90°C per evaporar el cloroform, tot eliminant les restes de la fase aquosa romanents. Per concentrar la mostra, es va afegir cloroform per les parets del tub de vidre i es va tornar a escalfar a 90°C per evaporar el cloroform. Aquesta operació es repetir varis cops fins que queda tot a baix. Un cop el sediment estava completament sec i concentrat, es va resuspendre en 500 µL de H₂O miliQ en un bany a 37°C, i posteriorment es va homogeneïtzar totalment amb l'ajuda d'una pipeta i/o per agitació. Un cop resuspeses, es va determinar la quantitat de triglicèrids i es va expressar en mil·ligrams de triglicèrids per pes de teixit.

2.11. Test de tolerància a la glucosa

El test de tolerància a la glucosa es va utilitzar per a comprovar si els ratolins eren capaços de respondre correctament a una sobrecàrrega de glucosa. Els animals escollits per a la realització del test es van dejunar 16 hores abans. Passades les hores de dejú es va determinar la glucèmia basal a partir d'una gota de sang de la vena de la cua mitjançant el sistema Glucometer Elite®. Posteriorment, se'ls va injectar intraperitonealment una dosi de 1 g de glucosa/Kg de pes. A partir d'aquest moment, es van realitzar extraccions de gotes de sang seriadades als 15 i 30 minuts després de la injecció de la glucosa i, posteriorment, cada 30 minuts fins a les 2.5 hores de l'inici del test per tal de determinar l'evolució de la glucèmia al llarg del temps. Durant aquest procés els animals no van tenir accés ni al menjar ni a l'aigua. Els resultats de les glucèmies es van expressar en mg/dL en els diferents punts de l'experiment.

2.12. Test de tolerància a la insulina

El test de tolerància a la insulina es va utilitzar per a comprovar si els ratolins eren capaços de respondre correctament a una sobrecàrrega de insulina, quantificant així la seva sensibilitat a la insulina. Immediatament després de treure el menjar als animals, es va determinar la seva glucèmia basal a partir d'una gota de sang de la vena de la cua mitjançant el sistema Glucometer Elite[®]. Posteriorment, es va injectar intraperitonealment una dosi de 0.75U de insulina/Kg de pes. A partir d'aquest moment es van realitzar extraccions de gotes de sang seriades cada 15 minuts després de la injecció de la glucosa fins a les 2 hores des de l'inici del test per tal de determinar l'evolució de la glucèmia al llarg del temps. Durant aquest procés els animals no van tenir accés ni al menjar ni a l'aigua. Els resultats es van expressar com el percentatge dels nivells circulants de glucosa en els diferents punts de l'experiment, respecte els nivells basals previs a l'administració de l'hormona.

2.13. Anàlisi immunohistoquímica del teixit adipós, cor i fetge

Després de sacrificar els animals, el eWAT, el iWAT, el iBAT, el fetge i/o el cor es van fixar en formol durant 24-48 hores a 4°C, posteriorment es van incloure en parafina i es van tallar en seccions de 2-3µm. Els talls histològics es van desparafinar (2 rentats amb Xilol 10 minuts, 2 rentats amb etanol 100% 5 minuts i 2 rentats d'etanol 96% 5 minuts) i es van tenyir amb hematoxilina/eosina o es van incubar durant tota la nit a 4°C amb els anticossos primaris corresponents contra GFP (1/300). Les mostres de fluorescència es van incubar amb els corresponents anticossos secundaris (1/300). Les seccions van ser incubades amb DAPI (Sigma-Aldrich) per al marcatge fluorescent dels nuclis. Per dur a terme la tinció primer es van tenyir els talls amb hematoxilina, es van rentar i posteriorment es van tractar amb eosina. A continuació es van deshidratar les mostres i es van muntar els portaobjectes. Els talls histològics es van visualitzar al microscopi (Nikon Eclipse 90i). Es van captar imatges en diferents camps de les diverses seccions de cada teixit mitjançant una videocàmera (Nikon DS-Fi1) connectada al monitor.

2.13.1. Determinació de l'àrea mitja dels adipòcits

A partir dels talls histològics d'eWAT tenyits amb hematoxilina/eosina, es va realitzar un estudi morfomètric per quantificar l'àrea del adipòcits i la seva distribució mitjana per mida. Es van prendre imatge de 6 camps per dos talls per animal a 100X.

Mitjançant l'analitzador d'imatges (analySIS 3.0; Soft Imaging System, Center Valley, PA, EEUU) es va determinar l'àrea en μm^2 dels adipòcits sencers presents al camp. A partir de les dades obtingudes, es va calcular l'àrea mitjana dels adipòcits per grup i la distribució de la mida d'aquests en un histograma com a percentatge del número total d'adipòcits comptats per cada categoria de mida.

2.14. Anàlisi estadística

Els resultats es van expressar com a la mitja \pm Error Estàndard de la Mitja (EEM). La comparació dels resultats es va realitzar mitjançant el test *t de Student* de dades no aparellades o a través de la taula ANOVA de dos factors.

VIII. BIBLIOGRAFIA

- Adams, Andrew C., T Coskun, A R. Rovira, M A. Schneider, D W. Raches, R Micanovic, H A. Bina, J D. Dunbar, and A Kharitononkov. 2012. Fundamentals of FGF19 & FGF21 Action in Vitro and in Vivo. *PLoS ONE* 7 (5).
- Agudo, J., Ayuso, E., Jimenez, V., Salavert, A., Casellas, A., Tafuro, S., Bosch, F. (2008). IGF-I mediates regeneration of endocrine pancreas by increasing beta cell replication through cell cycle protein modulation in mice. *Diabetologia*, 51(10), 1862–72.
- Ahmadian M, Y Wang and S Sul. 2010. Lipolysis in Adipocytes. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*.
- Algire C, D Medrikova and S Herzig. 2013. “White and Brown Adipose Stem Cells: From Signaling to Clinical Implications.” *Biochimica et Biophysica Acta* 1831 (5): 896–904.
- Almind, K., & Kahn, C. R. (2004). Genetic determinants of energy expenditure and insulin resistance in diet-induced obesity in mice. *Diabetes*, 53(12), 3274–3285.
- American Diabetes Association. 2016. Classification and Diagnosis of Diabetes. *Diabetes Care* 39 suplem (January): 13–22.
- Arch, J R. S. 2008. The Discovery of Drugs for Obesity, the Metabolic Effects of Leptin and Variable Receptor Pharmacology: Perspectives from β 3-Adrenoceptor Agonists. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 378 (2). Springer-Verlag: 225–40.
- Armani A, C Mammi, V Marzolla, M Calanchini, A Antelmi, G M C Rosano, A Fabbri, and M Caprio. 2010. “Cellular Models for Understanding Adipogenesis, Adipose Dysfunction, and Obesity.” *Journal of Cellular Biochemistry*.
- Ashcroft F M, and P Rorsman. 2012. Diabetes Mellitus and the Beta Cell: The Last Ten Years. *Cell* 148 (6): 1160–71.
- Ayuso E, F Mingozzi, and F Bosch. 2010a. Production, Purification and Characterization of Adeno-Associated Vectors. *Current Gene Therapy* 10 (6): 423–36.
- Ayuso, E, F Mingozzi, J Montane, X Leon, X M Anguela, V Haurigot, S Edmonson 2010b. High AAV Vector Purity Results in Serotype- and Tissue-Independent Enhancement of Transduction Efficiency. *Gene Therapy* 17 (4): 503–10.
- Bachman, E S, H Dhillon, C Y Zhang, S Cinti, A C Bianco, B K Kobilka, B B Lowell 2002. betaAR Signaling Required for Diet-Induced Thermogenesis and Obesity Resistance. *Science (New York, N.Y.)* 297 (5582): 843–45.
- Balakrishnan B, and G R Jayandharan 2014. Basic Biology of Adeno-Associated Virus (AAV) Vectors Used in Gene Therapy. *Current Gene Therapy* 14 (2): 86–100.
- Barbatelli, G, I Murano, L Madsen, Q Hao, M Jimenez, K Kristiansen, J P Giacobino, R De Matteis, and S Cinti. 2010. The Emergence of Cold-Induced Brown Adipocytes in Mouse White Fat Depots Is Determined Predominantly by White to Brown Adipocyte Transdifferentiation. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* 298: E1244–53.
- Barbera, M J, A Schluter, N Pedraza, R Iglesias, F Villarroya, and M Giralt. 2001. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Alpha Activates Transcription of the Brown Fat Uncoupling Protein-1 Gene. A Link between Regulation of the Thermogenic and Lipid Oxidation Pathways in the Brown Fat Cell. *The Journal of Biological Chemistry* 276 (2). American Society for Biochemistry and Molecular Biology: 1486–93.
- Bard-Chapeau, E. A., Hevener, A. L., Long, S., Zhang, E. E., Olefsky, J. M., & Feng, G.-S. (2005). Deletion of *Gab1* in the liver leads to enhanced glucose tolerance and improved hepatic insulin action. *Nature Medicine*, 11(5), 567–571.
- Bargut T C, M Barbosa, and C A Mandarim-de-Lacerda. 2016a. Brown Adipose Tissue: Updates in Cellular and Molecular Biology. *Tissue and Cell*.

- Bargut T C, A C Alves, V Souza-Mello, C A Mandarim-de-Lacerda, and M B Aguila. 2016b. Mice Fed Fish Oil Diet and Upregulation of Brown Adipose Tissue Thermogenic Markers. *European Journal of Nutrition* 55 (1). Springer Berlin Heidelberg: 159–69.
- Bays, H. E., González-Campoy, J. M., Bray, G. A., Kitabchi, A. E., Bergman, D. A., Schorr, A. B., Henry, R. R. (2008). Pathogenic potential of adipose tissue and metabolic consequences of adipocyte hypertrophy and increased visceral adiposity. *Expert Review of Cardiovascular Therapy*, 6(3), 343–368.
- Beaven, S. W., Matveyenko, A., Wroblewski, K., Chao, L., Wilpitz, D., Hsu, T. W., Tontonoz, P. (2013). Reciprocal Regulation of Hepatic and Adipose Lipogenesis by Liver X Receptors in Obesity and Insulin Resistance. *Cell Metabolism* (Vol. 18).
- Bell, P., Wang, L., Chen, S.-J., Yu, H., Zhu, Y., Nayal, M., ... Wilson, J. M. (2016). Effects of Self-Complementarity, Codon Optimization, Transgene, and Dose on Liver Transduction with AAV8. *Human Gene Therapy Methods*, 27(6), 228–237.
- Berglund, E D, C Y Li, H A Bina, S G Lynes, M D Michael, A B Shanafelt, A Kharitonov, and D H Wasserman. 2009. Fibroblast Growth Factor 21 (FGF21) Controls Glycemia via Regulation of Hepatic Glucose Flux and Insulin Sensitivity. *Endocrinology* 150 (9): 4084–93.
- Bertot L C and L A Adams. 2016. “The Natural Course of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *International Journal of Molecular Sciences* 17 (5).
- Billings L K, and J C Florez. 2010. The Genetics of Type 2 Diabetes: What Have We Learned from GWAS?” *Annals of the New York Academy of Sciences* 1212: 59–77.
- Birkenfeld A L, and G I Shulman. 2014. Nonalcoholic Fatty Liver Disease, Hepatic Insulin Resistance, and Type 2 Diabetes. *Hepatology* 59 (2): 713–23.
- Birnboim, H. C., & Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research*, 7(6), 1513–23.
- Bish, L. T., Morine, K., Sleeper, M. M., Sanmiguel, J., Wu, D., Gao, G., Sweeney, H. L. (2008). Adeno-Associated Virus (AAV) Serotype 9 Provides Global Cardiac Gene Transfer Superior to AAV1, AAV6, AAV7, and AAV8 in the Mouse and Rat. *Human Gene Therapy*, 19(12), 1359–1368.
- Black, H. 2003. The Burden of Cardiovascular Disease: Following the Link from Hypertension to Myocardial Infarction and Heart Failure. *American Journal of Hypertension* 16 (9): 4–6.
- Brown, B. D., Gentner, B., Cantore, A., Colleoni, S., Amendola, M., Zingale, A., Naldini, L. (2007). Endogenous microRNA can be broadly exploited to regulate transgene expression according to tissue, lineage and differentiation state. *Nature Biotechnology*, 25(12), 1457–1467.
- Boden, G., Homko, C., Mozzoli, M., Showe, L. C., Nichols, C., & Cheung, P. (2005). Thiazolidinediones Upregulate Fatty Acid Uptake and Oxidation in Adipose Tissue of Diabetic Patients. *Diabetes*, 54(3).
- Boon M R., S A A van den Berg, Y Wang, J van den Bossche, S Karkampouna, M Bauwens, M De Saint-Hubert. 2013. BMP7 Activates Brown Adipose Tissue and Reduces Diet-Induced Obesity Only at Subthermoneutrality. *PLoS ONE* 8 (9).
- Booth A, A Magnuson, J Fouts, and M T. Foster. 2016. Adipose Tissue: An Endocrine Organ Playing a Role in Metabolic Regulation. *Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation* 26 (1): 25–42.
- Boström P, J Wu, M P Jedrychowski, A Korde, L Ye, J C Lo, K A Rasbach. 2012. A PGC1- α -Dependent Myokine That Drives Brown-Fat-like Development of White Fat and Thermogenesis. *Nature* 481 (7382). NIH Public Access: 463–68.

- Brondani L De Almeida, T S Assmann, G C Kullmann, J L Gross, L H Canani, and D Crispim. 2012. The Role of the Uncoupling Protein 1 (UCP1) on the Development of Obesity and Type 2 Diabetes Mellitus. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia E Metabologia* 56 (4): 215–25.
- Buchlis, G., Podsakoff, G. M., Radu, A., Hawk, S. M., Flake, A. W., Mingozi, F., & High, K. A. (2012). Factor IX expression in skeletal muscle of a severe hemophilia B patient 10 years after AAV-mediated gene transfer. *Blood*, 119(13).
- Buller, R M, J E Janik, E D Sebring, and J A Rose. 1981. Herpes Simplex Virus Types 1 and 2 Completely Help Adenovirus-Associated Virus Replication. *Journal of Virology* 40 (1): 241–47.
- Büning H, L Perabo, O Coutelle, S Quadts-Humme, and M Hallek. 2008. Recent Developments in Adeno-Associated Virus Vector Technology. *The Journal of Gene Medicine* 10 (7): 717–33.
- Butler A E, J Janson, S Bonner-Weir, R Ritzel, R A Rizza, and P C Butler. 2003. Beta-Cell Deficit and Increased Beta-Cell Apoptosis in Humans with Type 2 Diabetes. *Diabetes* 52 (January): 102–10.
- Calcedo, R., Vandenberghe, L. H., Gao, G., Lin, J., & Wilson, J. M. (2009). Worldwide Epidemiology of Neutralizing Antibodies to Adeno-Associated Viruses. *The Journal of Infectious Diseases*, 199(3), 381–390.
- Cao Z, R M. Umek, and S L. McKnight. 1991. Regulated Expression of Three C/EBP Isoforms during Adipose Conversion of 3T3-L1 Cells. *Genes and Development* 5 (9): 1538–52.
- Carreira A C Oliveira, W F Zambuzzi, M C Rossi, R A Filho, M C Sogayar, and J M Granjeiro. 2015. Bone Morphogenetic Proteins: Promising Molecules for Bone Healing, Bioengineering, and Regenerative Medicine. In *Vitamins and Hormones*, 99:293–322.
- Casto, B.C., R.W. Atchison, and W.McD. Hammon. 1967. Studies on the Relationship between Adeno-Associated Virus Type I (AAV-1) and Adenoviruses. *Virology* 32 (1): 52–59.
- Castracane, V. D., & Henson, M. C. (2007). The Obese (*ob/ob*) Mouse and the Discovery of Leptin. In V. D. Castracane & M. C. Henson (Eds.), *Leptin* (pp. 1–9). Boston, MA: Springer US.
- Cawthorn W P., E L. Scheller, and O A. MacDougald. 2012. Adipose Tissue Stem Cells: The Great WAT Hope. *Trends in Endocrinology and Metabolism*.
- Cedikova M, M Kripnerová, J Dvorakova, P Pitule, M Grundmanova, V Babuska, D Mullerova, and J Kuncova. 2016. Mitochondria in White, Brown, and Beige Adipocytes. *Stem Cells International*.
- Cerf M E. 2015. High Fat Programming of Beta Cell Compensation, Exhaustion, Death and Dysfunction. *Pediatric Diabetes* 16 (2): 71–78.
- Chang, J., Nicolas, E., Marks, D., Sander, C., Lerro, A., Buendia, M. A., Taylor, J. M. (2004). miR-122, a mammalian liver-specific microRNA, is processed from hcr mRNA and may downregulate the high affinity cationic amino acid transporter CAT-1. *RNA Biology*, 1(2), 106–13.
- Chao, L., Marcus-Samuels, B., Mason, M. M., Moitra, J., Vinson, C., Arioglu, E., Reitman, M. L. (2000). Adipose tissue is required for the antidiabetic, but not for the hypolipidemic, effect of thiazolidinediones. *The Journal of Clinical Investigation*, 106(10), 1221–8.
- Chen H C, and R V Farese. 2002. Determination of Adipocyte Size by Computer Image Analysis. *Journal of Lipid Research* 43: 986–89.

- Cheng D. 2005. Prevalence, Predisposition and Prevention of Type II Diabetes. *Nutrition & Metabolism* 2 (1): 29.
- Chen, B.-D., He, C.-H., Chen, X.-C., Pan, S., Liu, F., Ma, X., Gao, X.-M. (2015). Targeting transgene to the heart and liver with AAV9 by different promoters. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 42(10), 1108–1117.
- Chiang, S.-H., Bazuine, M., Lumeng, C. N., Geletka, L. M., Mowers, J., White, N. M., Saltiel, A. R. (2009). The Protein Kinase IKK ϵ Regulates Energy Balance in Obese Mice. *Cell*, 138(5), 961–975.
- Choe, S. S., Huh, J. Y., Hwang, I. J., Kim, J. I., & Kim, J. B. 2016. Adipose Tissue Remodeling: Its Role in Energy Metabolism and Metabolic Disorders. *Frontiers in Endocrinology* 7 (April). *Frontiers*: 30.
- Chubinskaya S, B Kumar, C Merrihew, K Heretis, D C. Rueger, and K E. Kuettner. 2002. Age-Related Changes in Cartilage Endogenous Osteogenic Protein-1 (OP-1). *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease* 1588 (2): 126–34.
- Chun T H. 2012. Peri-Adipocyte ECM Remodeling in Obesity and Adipose Tissue Fibrosis. *Adipocyte* 1 (2): 89–95.
- Chung S S, J S Lee, M K, B Y Ahn, H S Jung, H M Lee, J W Kim, and K S Park. 2012. Regulation of Wnt/ β -Catenin Signaling by CCAAT/Enhancer Binding Protein β During Adipogenesis. *Obesity* 20 (3): 482–87.
- Chusyd D E, D Wang, D M Huffman, and T R Nagy. 2016. Relationships between Rodent White Adipose Fat Pads and Human White Adipose Fat Depots. *Frontiers in Nutrition* 3: 10.
- Cinti S. 2006. The Role of Brown Adipose Tissue in Human Obesity. *Nutrition, Metabolism, and Cardiovascular Diseases : NMCD* 16 (8): 569–74.
- Cinti S, K. Almind, M. Manieri, W. I. Sivitz, S. Cinti, C. R. Kahn, R. Atit, et al. 2012. The Adipose Organ at a Glance. *Disease Models & Mechanisms* 5 (5): 588–94.
- Coskun T, H A. Bina, M A. Schneider, J D. Dunbar, C C. Hu, Y C, D E. Moller, and A Kharitonov. 2008. Fibroblast Growth Factor 21 Corrects Obesity in Mice. *Endocrinology* 149 (12): 6018–27.
- Cotugno, G., Annunziata, P., Barone, M. V., Karali, M., Banfi, S., & Auricchio, A. (2012). Impact of Age at Administration, Lysosomal Storage, and Transgene Regulatory Elements on AAV2/8-Mediated Rat Liver Transduction. *PLoS ONE*, 7(3), e33286.
- Cousin, B, S Cinti, M Morroni, S Raimbault, D Ricquier, L Pénicaud, and L Casteilla. 1992. Occurrence of Brown Adipocytes in Rat White Adipose Tissue: Molecular and Morphological Characterization. *Journal of Cell Science* 103 (Pt 4): 931–42.
- Cristancho A G, and M A Lazar. 2011. Forming Functional Fat: A Growing Understanding of Adipocyte Differentiation. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 12 (11): 722–34.
- Cypess A M., S Lehman, G Williams, I Tal, D Rodman, A B. Goldfine, F C. Kuo. 2009. Identification and Importance of Brown Adipose Tissue in Adult Humans. *New England Journal of Medicine* 360 (15): 1509–17.
- Dadson, K., Liu, Y., & Sweeney, G. (2011). Adiponectin action: a combination of endocrine and autocrine/paracrine effects. *Frontiers in Endocrinology*, 2, 62.
- Dattatreya Murty, B, E Roux, C Horbinski, P L Kaplan, L A Robak, H N Beck, P Lein, D Higgins, and V Chandrasekaran. 2001. Cerebrospinal Fluid Contains Biologically Active Bone Morphogenetic Protein-7. *Experimental Neurology* 172 (2): 273–81.

- Davidoff A M, J T. Gray, C Y.C. Ng, Y Zhang, J Zhou, Y Spence, Y Bakar, and A C. Nathwani. 2005. Comparison of the Ability of Adeno-Associated Viral Vectors Pseudotyped with Serotype 2, 5, and 8 Capsid Proteins to Mediate Efficient Transduction of the Liver in Murine and Nonhuman Primate Models. *Molecular Therapy* 11 (6): 875–88.
- DeFronzo, R A. 1988. Lilly Lecture 1987. The Triumvirate: Beta-Cell, Muscle, Liver. A Collusion Responsible for NIDDM. *Diabetes*.
- DeFronzo R A. 2004. Pathogenesis of Type 2 Diabetes Mellitus. *The Medical Clinics of North America* 88 (4): 787--835, ix.
- DeFronzo R A, E Ferrannini, and D C Simonson. 1989. Fasting Hyperglycemia in Non-Insulin-Dependent Diabetes Mellitus: Contributions of Excessive Hepatic Glucose Production and Impaired Tissue Glucose Uptake. *Metabolism* 38 (4): 387–95.
- Deyle D R, and D W Russell. 2009. Adeno-Associated Virus Vector Integration. *Current Opinion in Molecular Therapeutics* 11 (4): 442–47.
- Dimas A S, V Lagou, A Barker, J W Knowles, R Mägi, M F Hivert, A Benazzo. 2014. Impact of Type 2 Diabetes Susceptibility Variants on Quantitative Glycemic Traits Reveals Mechanistic Heterogeneity. *Diabetes* 63 (6): 2158–71.
- Divoux, A., and K. Clément. 2011. Architecture and the Extracellular Matrix: The Still Unappreciated Components of the Adipose Tissue. *Obesity Reviews* 12 (501).
- Dudley, A. T., K. M. Lyons, and E. J. Robertson. 1995. A Requirement for Bone Morphogenetic Protein-7 during Development of the Mammalian Kidney and Eye. *Genes and Development* 9 (22): 2795–2807.
- Dupuis J, C Langenberg, I Prokopenko, R Saxena, N Soranzo, A U Jackson, E Wheeler. 2010. New Genetic Loci Implicated in Fasting Glucose Homeostasis and Their Impact on Type 2 Diabetes Risk. *Nature Genetics* 42 (2). NIH Public Access: 105–16.
- Elsen M, S Raschke, N Tennagels, U Schwahn, T Jelenik, M Roden, T Romacho, and J Eckel. 2014. BMP4 and BMP7 Induce the White-to-Brown Transition of Primary Human Adipose Stem Cells. *American Journal of Physiology. Cell Physiology* 306 (21): C431-40.
- Erion, D. M., Ignatova, I. D., Yonemitsu, S., Nagai, Y., Chatterjee, P., Weismann, D., Shulman, G. I. (2009). Prevention of Hepatic Steatosis and Hepatic Insulin Resistance by Knockdown of cAMP Response Element-Binding Protein. *Cell Metabolism* (Vol. 10).
- Fajas L. 2003. Adipogenesis: A Cross-Talk between Cell Proliferation and Cell Differentiation. *Annals of Medicine* 35 (2): 79–85.
- Farmer S R. 2006. Transcriptional Control of Adipocyte Formation. *Cell Metabolism*.
- Ferrari, F K, T Samulski, T Shenk, and R J Samulski. 1996. Second-Strand Synthesis Is a Rate-Limiting Step for Efficient Transduction by Recombinant Adeno-Associated Virus Vectors. *Journal of Virology* 70 (5): 3227–34.
- Fisher F F., Sandra Kleiner, Nicholas Douris, Elliott C. Fox, Rina J. Mepani, Francisco Verdeguer, Jun Wu, et al. 2012. FGF21 Regulates PGC-1 α And Browning of White Adipose Tissues in Adaptive Thermogenesis. *Genes and Development* 26 (3): 271–81.
- Folch J., Lees, M., & Sloane Stanley, G. H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *The Journal of Biological Chemistry*, 226(1), 497–509.
- Fossati, P., & Prencipe, L. (1982). Serum triglycerides determined colorimetrically with an enzyme that produces hydrogen peroxide. *Clinical Chemistry*, 28(10).

- Frontini A, and S Cinti. 2010. Distribution and Development of Brown Adipocytes in the Murine and Human Adipose Organ. *Cell Metabolism*.
- Frühbeck G, S Becerril, N Sáinz, P Garrastachu, and M J Garcia-Velloso. 2009. BAT: A New Target for Human Obesity? *Trends in Pharmacological Sciences* 30 (8): 387–96.
- Gaal L F V, I L Mertens, and C E De Block. 2006. Mechanisms Linking Obesity with Cardiovascular Disease. *Nature* 444 (7121): 875–80.
- Gao G P, M R Alvira, L Wang, R Calcedo, J Johnston, and J M Wilson. 2002. Novel Adeno-Associated Viruses from Rhesus Monkeys as Vectors for Human Gene Therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (18). National Academy of Sciences: 11854–59.
- Geisler, A., & Fechner, H. (2016). MicroRNA-regulated viral vectors for gene therapy Core tip: Post-transcriptional microRNA-induced suppression of gene expression is a simple new, highly efficient technology to restrict transgene expression to a specific tissue. It is based on the insertion of a target sequence for a cell-specifically expressed microRNA, typically into the 3' untranslated region of a transgene expression. *World J Exp Med*, 6(2), 37–54.
- George, M., Ayuso, E., Casellas, A., Costa, C., Devedjian, J. C., & Bosch, F. (2002). Beta cell expression of IGF-I leads to recovery from type 1 diabetes. *The Journal of Clinical Investigation*, 109(9), 1153–63.
- Gesta S, Y H. Tseng, and C. R Kahn. 2007. Developmental Origin of Fat: Tracking Obesity to Its Source. *Cell*. doi:10.1016/j.cell.2007.10.004.
- Giordano A, A Frontini, and S Cinti. 2016. Convertible Visceral Fat as a Therapeutic Target to Curb Obesity. *Nature Reviews. Drug Discovery* 15 (6): 405–24.
- Gregg E W, N Sattar, and M K Ali. 2016. The Changing Face of Diabetes Complications. *The Lancet. Diabetes & Endocrinology* 4 (6): 537–47.
- Grunberger, G., Chang, A., Garcia Soria, G., Botros, F. T., Bsharat, R., & Milicevic, Z. (2012). Monotherapy with the once-weekly GLP-1 analogue dulaglutide for 12 weeks in patients with Type 2 diabetes: dose-dependent effects on glycaemic control in a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Diabetic Medicine*, 29(10), 1260–1267.
- Grünberg, J. R., Hoffmann, J. M., Hedjazifar, S., Nerstedt, A., Jenndahl, L., Elvin, J., Smith, U. (2017). Overexpressing the novel autocrine/endocrine adipokine WISP2 induces hyperplasia of the heart, white and brown adipose tissues and prevents insulin resistance. *Scientific Reports*, 7, 43515.
- Guerra C, P Navarro, A M Valverde, M Arribas, J Brüning, L P Kozak, C R Kahn, and M Benito. 2001. Brown Adipose Tissue – Specific Insulin Receptor Knockout Shows Diabetic Phenotype without Insulin Resistance. *The Journal of Clinical Investigation* 108 (8): 1205–13.
- Guilherme A, J V Virbasius, V Puri, and M P Czech. 2008. Adipocyte Dysfunctions Linking Obesity to Insulin Resistance and Type 2 Diabetes. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 9 (5): 367–77.
- Guo L, X Li, and Q Qun Tang. 2015. Transcriptional Regulation of Adipocyte Differentiation: A Central Role for CCAAT/ Enhancer-Binding Protein (C/EBP) β . *Journal of Biological Chemistry*.
- Gustafson B, S Hedjazifar, S Gogg, A Hammarstedt, and U Smith. 2015. Insulin Resistance and Impaired Adipogenesis. *Trends in Endocrinology and Metabolism*.

- Gutiérrez-Juárez, R., Pocai, A., Mulas, C., Ono, H., Bhanot, S., Monia, B. P., & Rossetti, L. (2006). Critical role of stearoyl-CoA desaturase-1 (SCD1) in the onset of diet-induced hepatic insulin resistance. *The Journal of Clinical Investigation*, 116(6), 1686–95.
- Harper, J A, K Dickinson, and M D Brand. 2001. Mitochondrial Uncoupling as a Target for Drug Development for the Treatment of Obesity. *Obesity Reviews* 2 (4): 255–65.
- He, J., Gao, J., Xu, M., Ren, S., Stefanovic-Racic, M., O'Doherty, R. M., & Xie, W. (2013). PXR Ablation Alleviates Diet-Induced and Genetic Obesity and Insulin Resistance in Mice. *Diabetes*, 62(6).
- Hirata, R K, and D W Russell. 2000. Design and Packaging of Adeno-Associated Virus Gene Targeting Vectors. *Journal of Virology* 74 (10): 4612–20.
- Honek J, S Lim, C Fischer, H Iwamoto, T Seki, and Y Cao. 2014. Brown Adipose Tissue, Thermogenesis, Angiogenesis: Pathophysiological Aspects. *Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation* 19 (1): 5–11.
- Hu, F B, J E Manson, M J Stampfer, G Colditz, S Liu, C G Solomon, and W C Willett. 2001. Diet, Lifestyle, and the Risk of Type 2 Diabetes Mellitus in Women. *The New England Journal of Medicine* 345 (11): 790–97.
- Huang, H., Song, T., Li, X., Hu, L., He, Q., Liu, M., Lande, M D, and Tang, Q. (2009). BMP signaling pathway is required for commitment of C3H10T1 / 2 pluripotent stem cells to the adipocyte lineage. *PNAS*, 106(31), 12670–75.
- Huang W, T McMurphy, X Liu, C Wang, and L Cao. 2016. Genetic Manipulation of Brown Fat via Oral Administration of an Engineered Recombinant Adeno-Associated Viral Serotype Vector. *Molecular Therapy* 24 (6): 1–8.
- Hurtado Del Pozo C, G Vesperinas-García, M Á Rubio, R Corripio-Sánchez, A J. Torres-García, M J Obregon, and R María Calvo. 2011. ChREBP Expression in the Liver, Adipose Tissue and Differentiated Preadipocytes in Human Obesity. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1811 (12): 1194–1200.
- Inagaki, K., Fuess, S., Storm, T. A., Gibson, G. A., Mctiernan, C. F., Kay, M. A., & Nakai, H. (2006). Robust systemic transduction with AAV9 vectors in mice: efficient global cardiac gene transfer superior to that of AAV8. *Molecular Therapy*, 14(1), 45–53.
- International Diabetes Federation 2015. IDF Diabetes Atlas 7th Edition. [Idf.org](http://idf.org). doi:10.1289/image.ehp.v119.i03.
- Ishibashi, J, and P Seale. 2010. Beige Can Be Slimming. *Science* 328 (5982): 1113–14.
- Ishida W, T Hamamoto, K Kusanagi, K Yagi, M Kawabata, K Takehara, T. K Sampath, M Kato, and K Miyazono. 2000. Smad6 Is a Smad1/5-Induced Smad Inhibitor. Characterization of Bone Morphogenetic Protein-Responsive Element in the Mouse Smad6 Promoter. *Journal of Biological Chemistry* 275 (9): 6075–79.
- James, W P T. 2008. The Epidemiology of Obesity: The Size of the Problem. *Journal of Internal Medicine*.
- Janský, L. 1995. Humoral Thermogenesis and Its Role in Maintaining Energy Balance. *Physiological Reviews* 75 (2).
- Jansson P A, A Larsson, U Smith, and P Lönnroth. 1994. Lactate Release from the Subcutaneous Tissue in Lean and Obese Men. *Journal of Clinical Investigation* 93 (1): 240–46.
- Jimenez M, B Léger, K Canola, L Lehr, P Arboit, J Seydoux, A P Russell, J P Giacobino, P Muzzin, and F Preitner. 2002. $\beta_1 / \beta_2 / \beta_3$ -Adrenoceptor Knockout Mice Are Obese and Cold-Sensitive but Have Normal Lipolytic Responses to Fasting. *FEBS Letters* 530 (1–3): 37–40.

- Jimenez V, S Muñoz, E Casana, C Mallol, I Elias, C Jambrina, A Ribera, T Ferre, S Franckhauser, and F Bosch. 2013. In Vivo AAV-Mediated Genetic Engineering of White and Brown Adipose Tissue in Adult Mice. *Diabetes* 62 (22): 1–12.
- Johnson, A. M. F., & Olefsky, J. M. (2013). The Origins and Drivers of Insulin Resistance. *Cell*, 152(4), 673–684.
- Jopling, C. L., Yi, M., Lancaster, A. M., Lemon, S. M., & Sarnow, P. (2005). Modulation of Hepatitis C Virus RNA Abundance by a Liver-Specific MicroRNA. *Science*, 309(5740).
- Kahn, S. E., Hull, R. L., & Utzschneider, K. M. (2006). Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature*, 444(7121), 840–846.
- Kajimura S, P Seale, and B M. Spiegelman. 2010. Transcriptional Control of Brown Fat Development. *Cell Metabolism*.
- Kajimura S, B M. Spiegelman, and P Seale. 2015. Brown and Beige Fat: Physiological Roles beyond Heat Generation. *Cell Metabolism*.
- Kang, W. J., Cho, Y. L., Chae, J. R., Lee, J. D., Ali, B. A., Al-Khedhairi, A. A., ... Kim, S. (2012). Dual optical biosensors for imaging microRNA-1 during myogenesis. *Biomaterials*, 33(27), 6430–6437.
- Karaderi T, A W Drong, and C M Lindgren. 2015. Insights into the Genetic Susceptibility to Type 2 Diabetes from Genome-Wide Association Studies of Obesity-Related Traits. *Current Diabetes Reports* 15 (10): 83.
- Karali, M., Manfredi, A., Puppo, A., Marrocco, E., Gargiulo, A., Allocca, M. Auricchio, A. (2011). MicroRNA-Restricted Transgene Expression in the Retina. *PLoS ONE*, 6(7), e22166.
- Kasim N B, H Z Huri, S R Vethakkan, L Ibrahim, and B M Abdullah. 2016. Genetic Polymorphisms Associated with Overweight and Obesity in Uncontrolled Type 2 Diabetes Mellitus. *Biomarkers in Medicine* 10 (4): 403–15.
- Kattenhorn L M, C H. Tipper, L Stoica, D S. Geraghty, T L. Wright, K. R Clark, and S C. Wadsworth. 2016. Adeno-Associated Virus Gene Therapy for Liver Disease. *Human Gene Therapy* 27 (12) 947–61.
- Kelly, E. J., & Russell, S. J. (2009). MicroRNAs and the Regulation of Vector Tropism. *Molecular Therapy*, 17(3), 409–416.
- Kershaw E E, M Schupp, H Guan, N P Gardner, M A Lazar, and J S Flier. 2007. PPARgamma Regulates Adipose Triglyceride Lipase in Adipocytes in Vitro and in Vivo. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* 293 (6): E1736-45.
- Kessler, E, K Takahara, L Biniaminov, M Brusel, and D S Greenspan. 1996. Bone Morphogenetic Protein-1: The Type I Procollagen C-Proteinase. *Science (New York, N.Y.)* 271 (5247): 360–62.
- Kharitononkov A, T L. Shiyanova, A Koester, A M. Ford, R Micanovic, E J. Galbreath, G E. Sandusky, et al. 2005. FGF-21 as a Novel Metabolic Regulator. *Journal of Clinical Investigation* 115 (6): 1627–35.
- Kim, J.-Y., van de Wall, E., Laplante, M., Azzara, A., Trujillo, M. E., Hofmann, S. M., Scherer, P. E. (2007). Obesity-associated improvements in metabolic profile through expansion of adipose tissue. *The Journal of Clinical Investigation*, 117(9), 2621–37.
- Kitade, H., Sawamoto, K., Nagashimada, M., Inoue, H., Yamamoto, Y., Sai, Y., Ota, T. (2012). CCR5 Plays a Critical Role in Obesity-Induced Adipose Tissue Inflammation and Insulin Resistance by Regulating Both Macrophage Recruitment and M1/M2 Status. *Diabetes*, 61(7).

- Konstantinova, I., & Lammert, E. (2004). Microvascular development: learning from pancreatic islets. *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, 26(10), 1069–75.
- Kopecky J, G Clarke, S Enerbäck, B Spiegelman, and L P. Kozak. 1995. Expression of the Mitochondrial Uncoupling Protein Gene from the α P2 Gene Promoter Prevents Genetic Obesity. *Journal of Clinical Investigation* 96 (6): 2914–23.
- Koppen A, and E Kalkhoven. 2010. Brown vs White Adipocytes: The PPAR γ Coregulator Story. *FEBS Letters*.
- Kotterman M A, and D V Schaffer. 2014. Engineering Adeno-Associated Viruses for Clinical Gene Therapy. *Nature Reviews. Genetics* 15 (7): 445–51.
- Kurokawa, N, E H Young, Y Oka, H Satoh, N J Wareham, M S Sandhu, and R J F Loos. 2008. The ADRB3 Trp64Arg Variant and BMI: A Meta-Analysis of 44833 Individuals. *Int J Obes* 32 (8). Macmillan Publishing Group: 1240–49.
- Kusminski, C. M., Holland, W. L., Sun, K., Park, J., Spurgin, S. B., Lin, Y., Scherer, P. E. (2012). MitoNEET-driven alterations in adipocyte mitochondrial activity reveal a crucial adaptive process that preserves insulin sensitivity in obesity. *Nature Medicine*, 18(10), 1539–1549.
- Kusminski C M, P E Bickel, and P E Scherer. 2016. Targeting Adipose Tissue in the Treatment of Obesity-Associated Diabetes. *Nature Publishing Group* 15 (9): 639–60.
- Lager, C. J., Esfandiari, N. H., Subauste, A. R., Kraftson, A. T., Brown, M. B., Cassidy, R. B., Oral, E. A. (2017). Milestone Weight Loss Goals (Weight Normalization and Remission of Obesity) after Gastric Bypass Surgery: Long-Term Results from the University of Michigan. *Obesity Surgery*, 1–8.
- Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Yalcin, A., Meyer, J., Lendeckel, W., & Tuschl, T. (2002). Identification of Tissue-Specific MicroRNAs from Mouse. *Current Biology (Vol. 12)*.
- Lammert, E., Gu, G., McLaughlin, M., Brown, D., Brekken, R., Murtaugh, L. C., Melton, D. A. (2003). Role of VEGF-A in vascularization of pancreatic islets. *Current Biology: CB*, 13(12), 1070–4.
- Lee, Y.-H., Mottillo, E. P., & Granneman, J. G. (2014). Adipose tissue plasticity from WAT to BAT and in between. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1842(3), 358–369
- Li, P., Song, Y., Zan, W., Qin, L., Han, S., Jiang, B., Gong, Y. (2017). Lack of CUL4B in Adipocytes Promotes PPAR γ -Mediated Adipose Tissue Expansion and Insulin Sensitivity. *Diabetes*, 66(2).
- Lindström, P. (2007). The Physiology of Obese-Hyperglycemic Mice [ob/ob mice]. *The Scientific World JOURNAL*, 7, 666–685.
- Lisowski L, S S Tay, and I E Alexander. 2015. Adeno-Associated Virus Serotypes for Gene Therapeutics. *Current Opinion in Pharmacology* 24: 59–67.
- Liu, F., Song, Y. K., & Liu, D. (1999). Hydrodynamics-based transfection in animals by systemic administration of plasmid DNA. *Gene Therapy*, 6(7), 1258–1266.
- Liu X, D Magee, C Wang, T McMurphy, A Slater, M Durning, and L Cao. 2014. Adipose Tissue Insulin Receptor Knockdown via a New Primate-Derived Hybrid Recombinant AAV Serotype. *Molecular Therapy. Methods & Clinical Development* 1 (October 2013): 1–9.
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2 $^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods*, 25(4), 402–408.

- Lock, M., Alvira, M., Vandenberghe, L. H., Samanta, A., Toelen, J., Debysen, Z., & Wilson, J. M. (2010). Rapid, simple, and versatile manufacturing of recombinant adeno-associated viral vectors at scale. *Human Gene Therapy*, 21(10), 1259–71.
- Loher H, R Kreis, C Boesch, and E Christ. 2016. The Flexibility of Ectopic Lipids. *International Journal of Molecular Sciences*.
- Lyons K M., B L M Hogan, and E J. Robertson. 1995. Colocalization of BMP7 and BMP2 RNAs Suggests That These Factors Cooperatively Mediate Tissue Interactions during Murine Development. *Mechanisms of Development* 50 (1): 71–83.
- Ma X, P Lee, D J. Chisholm, and D E. James. 2015. Control of Adipocyte Differentiation in Different Fat Depots; Implications for Pathophysiology or Therapy. *Frontiers in Endocrinology*.
- MacDonald R A. 1961. "Lifespan" of liver cells. Autoradio-graphic study using tritiated thymidine in normal, cirrhotic, and partially hepatectomized rats. *Archives of Internal Medicine* 107 (3). American Medical Association: 335.
- Manno C S, V R Arruda, G F Pierce, B Glader, M Ragni, J Rasko, M C Ozelo. 2006. Successful Transduction of Liver in Hemophilia by AAV-Factor IX and Limitations Imposed by the Host Immune Response. *Nature Medicine* 12 (3). Nature Publishing Group: 342–47.
- Manson S R, P F. Austin, Q Guo, and K H. Moore. 2015. Chapter Three – BMP-7 Signaling and Its Critical Roles in Kidney Development, the Responses to Renal Injury, and Chronic Kidney Disease. In *Vitamins & Hormones*, 99:91–144.
- Marchesini, G., Brizi, M., Morselli-Labate, A. M., Bianchi, G., Bugianesi, E., McCullough, A. J., Melchionda, N. (1999). Association of nonalcoholic fatty liver disease with insulin resistance. *The American Journal of Medicine*, 107(5), 450–455.
- Marken L, W D van, J W Vanhommerig, N M Smulders, J M a F L Drossaerts, G J Kemerink, N D Bouvy, P Schrauwen, and G J J Teule. 2009. Cold-Activated Brown Adipose Tissue in Healthy Men. *N Engl J Med* 360 (15): 1500–1508.
- Martino A T, R W. Herzog, I Anegon, and O Adjali. 2011. Measuring Immune Responses to Recombinant AAV Gene Transfer. *Methods in Molecular Biology* 807: 259–72.
- McCaffrey, A. P., Fawcett, P., Nakai, H., McCaffrey, R. L., Ehrhardt, A., Pham, T.-T. T., Kay, M. A. (2008). The Host Response to Adenovirus, Helper-dependent Adenovirus, and Adeno-associated Virus in Mouse Liver. *Molecular Therapy*, 16(5), 931–941.
- McCarty, D M, P E Monahan, and R J Samulski. 2001. Self-Complementary Recombinant Adeno-Associated Virus (scAAV) Vectors Promote Efficient Transduction Independently of DNA Synthesis. *Gene Ther* 8 (16): 1248–54.
- McCarty D M, S M Young, and R J Samulski. 2004. Integration of Adeno-Associated Virus (AAV) and Recombinant AAV Vectors. *Annual Review of Genetics* 38: 819–45.
- McGarry, J Denis. 2002. Banting Lecture 2001: Dysregulation of Fatty Acid Metabolism in the Etiology of Type 2 Diabetes. *Diabetes* 51 (1): 7–18.
- Miao, Carol H., Kazuo Ohashi, Gijsbert A. Patijn, Leonard Meuse, Xin Ye, Arthur R. Thompson, and Mark A. Kay. 2000. Inclusion of the Hepatic Locus Control Region, an Intron, and Untranslated Region Increases and Stabilizes Hepatic Factor IX Gene Expression in Vivo but Not in Vitro. *Molecular Therapy* 1 (6): 522–32.
- Michael W King. 2017. Adipose Tissue: Fat Metabolism, Adipokines, Inflammation. [Themedicalbiochemistrypage.org](http://themedicalbiochemistrypage.org). <http://themedicalbiochemistrypage.org/adipose-tissue.php>.

- Mingozi, F., & High, K. A. (2011). Therapeutic in vivo gene transfer for genetic disease using AAV: progress and challenges. *Nat Rev Genet*, 12(5), 341–355.
- Mingozi, F, and K A. High. 2013. Immune Responses to AAV Vectors: Overcoming Barriers to Successful Gene Therapy. *Blood*.
- Miyazono K, Y Kamiya, and M Morikawa. 2010. Bone Morphogenetic Protein Receptors and Signal Transduction. *Journal of Biochemistry*.
- Modica S, and C Wolfrum. 2013. Bone Morphogenic Proteins Signaling in Adipogenesis and Energy Homeostasis. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*.
- Moon Y S, C M Smas, K Lee, J A Villena, K Kim, E J Yun, and H S Sul. 2002. Mice Lacking Paternally Expressed Pref-1 / Dlk1 Display Growth Retardation and Accelerated Adiposity. *Molecular and Cellular Biology* 22 (15): 5585–92.
- Morigny P, M Houssier, E Mouisel, and D Langin. 2016. Adipocyte Lipolysis and Insulin Resistance. *Biochimie* 125 (June): 259–66.
- Morris, Ap, Bf Voight, and Tm Teslovich. 2012. Large-Scale Association Analysis Provides Insights into the Genetic Architecture and Pathophysiology of Type 2 Diabetes. *Nature Genetics* 44 (9): 981–90.
- Moseti D, A Regassa, and W K Kim. 2016. Molecular Regulation of Adipogenesis and Potential Anti-Adipogenic Bioactive Molecules. *International Journal of Molecular Sciences*.
- Mount J D, R W. Herzog, D. M Tillson, S A. Goodman, N Robinson, M L. McClelland, D Bellinger. 2002. Sustained Phenotypic Correction of Hemophilia B Dogs with a Factor IX Null Mutation by Liver-Directed Gene Therapy. *Blood* 99 (8): 2670–76.
- Mueller T D., and J Nickel. 2012. Promiscuity and Specificity in BMP Receptor Activation. *FEBS Letters*.
- Muise E S, B Azzolina, D W Kuo, M El-Sherbeini, Y Tan, X Yuan, J Mu, J R Thompson, J P Berger, and K K Wong. 2008. Adipose Fibroblast Growth Factor 21 Is up-Regulated by Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma and Altered Metabolic States. *Molecular Pharmacology* 74 (2): 403–12.
- Nakai, H., Fuess, S., Storm, T. A., Muramatsu, S., Nara, Y., & Kay, M. A. (2005). Unrestricted hepatocyte transduction with adeno-associated virus serotype 8 vectors in mice. *Journal of Virology*, 79(1), 214–24.
- Naldini, L. 2015. Gene Therapy Returns to Centre Stage. *Nature* 526 (7573): 351–60.
- Naumer, M., F. Sonntag, K. Schmidt, K. Nieto, C. Panke, N. E. Davey, R. Popa-Wagner, and J. A. Kleinschmidt. 2012. Properties of the Adeno-Associated Virus Assembly-Activating Protein. *Journal of Virology* 86 (23): 13038–48.
- Nayerossadat N, P Ali, and T Maedeh. 2012. Viral and Nonviral Delivery Systems for Gene Delivery. *Advanced Biomedical Research* 1 (1): 27.
- Nishimura R, K Hata, F Ikeda, T Matsubara, K Yamashita, F Ichida, and T Yoneda. 2003. The Role of Smads in BMP Signaling. *Frontiers in Bioscience : A Journal and Virtual Library* 8: s275-84.
- Nolan, J. J., Ludvik, B., Beerdsen, P., Joyce, M., & Olefsky, J. (1994). Improvement in Glucose Tolerance and Insulin Resistance in Obese Subjects Treated with Troglitazone. *New England Journal of Medicine*, 331(18), 1188–1193.
- Nolan C J, P Damm, and M Prentki. 2011. Type 2 Diabetes across Generations: From Pathophysiology to Prevention and Management. In *The Lancet*, 378:169–81.

- O'Neill, S M, C Hinkle, S-J Chen, A Sandhu, R Hovhannisyan, S Stephan, W R Lagor, R S Ahima, J C Johnston, and M P Reilly. 2014. Targeting Adipose Tissue via Systemic Gene Therapy. *Gene Therapy* 21 (7): 653–61.
- O'dea, K. 1984. Marked Improvement in Carbohydrate and Lipid Metabolism in Diabetic Australian Aborigines After Temporary Reversion to Traditional Lifestyle. *Diabetes* 33 (6): 596 - 603.
- Ohno H, K Shinoda, K Ohyama, L Z Sharp, and S Kajimura. 2013. EHMT1 Controls Brown Adipose Cell Fate and Thermogenesis through the PRDM16 Complex. *Nature* 504 (7478): 163–67.
- Ohno H, K Shinoda, B M Spiegelman, and S Kajimura. 2012. PPAR γ Agonists Induce a White-to-Brown Fat Conversion through Stabilization of PRDM16 Protein. *Cell Metabolism* 15 (3): 395–404.
- Okuno, A., Tamemoto, H., Tobe, K., Ueki, K., Mori, Y., Iwamoto, K., Kadowaki, T. (1998). Troglitazone increases the number of small adipocytes without the change of white adipose tissue mass in obese Zucker rats. *The Journal of Clinical Investigation*, 101(6), 1354–61.
- Olsson, R., & Carlsson, P.-O. (2006). The pancreatic islet endothelial cell: emerging roles in islet function and disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 38(5–6), 710–4.
- Osborn, O., & Olefsky, J. M. (2012). The cellular and signaling networks linking the immune system and metabolism in disease. *Nature Medicine*, 18(3), 363–74.
- Oxburgh L. 2009. Control of the Bone Morphogenetic Protein 7 Gene in Developmental and Adult Life. *Current Genomics* 10 (4): 223–30.
- Ozkaynak, E, D C Rueger, E A Drier, C Corbett, R J Ridge, T K Sampath, and H Oppermann. 1990. "OP-1 cDNA Encodes an Osteogenic Protein in the TGF-Beta Family." *Embo J* 9 (7): 2085–93.
- Pacak, C. A., Mah, C. S., Thattaliyath, B. D., Conlon, T. J., Lewis, M. A., Cloutier, D. E., Byrne, B. J. (2006). Recombinant Adeno-Associated Virus Serotype 9 Leads to Preferential Cardiac Transduction In Vivo. *Circulation Research*, 99(4).
- Paniagua J A. 2016. Nutrition, Insulin Resistance and Dysfunctional Adipose Tissue Determine the Different Components of Metabolic Syndrome. *World Journal of Diabetes* 7 (19): 483.
- Park, JH, HJ Kang, S Kang, JE Lee, J Hur, K Ge, E Mueller, H Li, B C Lee, and SB Lee. 2013. A Multifunctional Protein, EWS, Is Essential for Early Brown Fat Lineage Determination. *Developmental Cell* 26 (4): 393–404.
- Payne V A, W S Au, C E Lowe, S M Rahman, J E Friedman, S O'Rahilly, and J J Rochford. 2010. C/EBP Transcription Factors Regulate SREBP1c Gene Expression during Adipogenesis. *The Biochemical Journal* 425 (1): 215–23.
- Peirce, V, S Carobbio, and A Vidal-Puig. 2014. The Different Shades of Fat. *Nature* 510 (7503): 76–83.
- Pellegrinelli, V., Carobbio, S., & Vidal-Puig, A. (2016). Adipose tissue plasticity: how fat depots respond differently to pathophysiological cues. *Diabetologia* 59 (6). Springer Berlin Heidelberg: 1075–88.
- Petrovic N, T B. Walden, I G. Shabalina, J A. Timmons, B Cannon, and J Nedergaard. 2010. Chronic Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ (PPAR γ) Activation of Epididymally Derived White Adipocyte Cultures Reveals a Population of Thermogenically Competent, UCP1-Containing Adipocytes Molecularly Distinct from Classic Brown Adipocytes. *Journal of Biological Chemistry* 285 (10): 7153–64.

- Pilkis, S J, and, D K Granner. 1992. Molecular Physiology of the Regulation of Hepatic Gluconeogenesis and Glycolysis. *Annual Review of Physiology* 54 (1): 885–909.
- Pischon T, Boeing H, Hoffmann K, Bergmann M and Riboli E. 2008. General and abdominal adiposity and risk of death in Europe. *N Engl J Med*. Nov 13;359(20):2105-20
- Pond C M. 1992. An Evolutionary and Functional View of Mammalian Adipose Tissue. *The Proceedings of the Nutrition Society* 51 (3): 367–77.
- Quan W, E K Jo, and M S Lee. 2013. Role of Pancreatic β Cell Death and Inflammation in Diabetes. *Diabetes, Obesity and Metabolism* 15 141–51.
- Qi, L., Saberi, M., Zmuda, E., Wang, Y., Altarejos, J., Zhang, X., Montminy, M. (2009). Adipocyte CREB Promotes Insulin Resistance in Obesity. *Cell Metabolism*, 9(3), 277–286.
- Rajakumari S, J Wu, J Ishibashi, H W Lim, A H Giang, K J Won, R R. Reed, and P Seale. 2013. EBF2 Determines and Maintains Brown Adipocyte Identity. *Cell Metabolism* 17 (4): 562–74.
- Reaven, G M, C Hollenbeck, C Y Jeng, M S Wu, and Y D I Chen. 1988. Measurement of Plasma Glucose, Free Fatty Acid, Lactate, and Insulin for 24 H in Patients with NIDDM. *Diabetes* 37 (8): 1020–24.
- Rehman A G, M Tyson, M Egger, R F Heller, and M Zvahlen. 2008. Body-Mass Index and Incidence of Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis of Prospective Observational Studies. *The Lancet* 371 (9612): 569–78.
- Rocha-Rodrigues S, A Rodríguez, A M. Gouveia, I O. Gonçalves, S Becerril, B Ramírez, J Beleza, G Frühbeck, A Ascensão, and J Magalhães. 2016. Effects of Physical Exercise on Myokines Expression and Brown Adipose-like Phenotype Modulation in Rats Fed a High-Fat Diet. *Life Sciences* 165: 100–108.
- Rodgers, R John, Matthias H Tschöp, and John P H Wilding. 2012. Anti-Obesity Drugs: Past, Present and Future. *Disease Models & Mechanisms* 5 (5): 621–26.
- Romano, G. 2006. The Controversial Role of Adenoviral-Derived Vectors in Gene Therapy Programs: Where Do We Stand? *Drug News & Perspectives* 19 (2): 99.
- Rosen, Evan D., and Bruce M. Spiegelman. 2014. What We Talk about When We Talk about Fat. *Cell*.
- Rosen, Evan D, and Ormond a MacDougald. 2006. Adipocyte Differentiation from the inside Out. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 7 (12): 885–96.
- Rosenwald M, A Perdikari, T Rüllicke, and C Wolfrum. 2013. Bi-Directional Interconversion of Brite and White Adipocytes. *Nature Cell Biology* 15 (6): 659–67.
- Rouet, P, G Raguenez, F Tronche, M Yaniv, C N'Guyen, and J P Salier. 1992. A Potent Enhancer Made of Clustered Liver-Specific Elements in the Transcription Control Sequences of Human Alpha 1-Microglobulin/bikunin Gene. *The Journal of Biological Chemistry* 267 (29): 20765–73.
- Ruan H, N Hacohen, T R Golub, L Van Parijs, and H F Lodish. 2002. Tumor Necrosis Factor- α Suppresses Adipocyte-Specific Genes and Activates Expression of Preadipocyte Genes in 3T3-L1 Adipocytes. *Diabetes* 51 (5): 1319-1336.
- Ruzo, A., Marcó, S., García, M., Villacampa, P., Ribera, A., Ayuso, E., ... Bosch, F. (2012). Correction of Pathological Accumulation of Glycosaminoglycans in Central Nervous System and Peripheral Tissues of MPSIIIA Mice Through Systemic AAV9 Gene Transfer. *Human Gene Therapy*, 23(12), 1237–1246.

- Sampath, T. K., J. E. Coughlin, R. M. Whetstone, D. Banach, C. Corbett, R. J. Ridge, E. Ozkaynak, H. Oppermann, and D. C. Rueger. 1990. Bovine Osteogenic Protein Is Composed of Dimers of OP-1 and BMP-2A, Two Members of the Transforming Growth Factor- β Superfamily. *Journal of Biological Chemistry* 265 (22): 13198–205.
- Samulski, R. J., K. I. Berns, M. Tan, and N. Muzyczka. 1982. Cloning of Adeno-Associated Virus into pBR322: Rescue of Intact Virus from the Recombinant Plasmid in Human Cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 79 (6): 2077–81.
- Sanchez-Gurmaches J, C M Hung, C A. Sparks, Y Tang, H Li, and D A. Guertin. 2012. PTEN Loss in the Myf5 Lineage Redistributes Body Fat and Reveals Subsets of White Adipocytes That Arise from Myf5 Precursors. *Cell Metabolism* 16 (3): 348–62.
- Sanchis, D., Balada, F., Picó, C., Grasa, M. ., Virgili, J., Farrerons, C., Alemany, M. (1997). Rats Receiving the Slimming Agent Oleoyl-Estrone in Liposomes (Merlin-2) Decrease Food Intake but Maintain Thermogenesis. *Archives of Physiology and Biochemistry*, 105(7), 663–672.
- Sattar N, and J M R Gill. 2014. Type 2 Diabetes as a Disease of Ectopic Fat? *BMC Medicine* 12 (1): 123.
- Scallan C D., H Jiang, T Liu, S Patarroyo-White, J M. Sommer, S Zhou, L B. Couto, and G F. Pierce. 2006. Human Immunoglobulin Inhibits Liver Transduction by AAV Vectors at Low AAV2 Neutralizing Titers in SCID Mice. *Blood* 107 (5): 1810–17.
- Schenk, S., Saberi, M., Olefsky, J. M., O'Brien, K. D., Heinecke, J. W., Shi, X., & Zhai, Q. (2008). Insulin sensitivity: modulation by nutrients and inflammation. *The Journal of Clinical Investigation*, 118(9), 2992–3002.
- Schulz T J., and Y H Tseng. 2013. Systemic Control of Brown Fat Thermogenesis: Integration of Peripheral and Central Signals." *Annals of the New York Academy of Sciences* 1302 (1): 35–41.
- Schulz, T J, T L Huang, T T Tran, H Zhang, K L Townsend, J L Shadrach, M Cerletti 2011. Identification of Inducible Brown Adipocyte Progenitors Residing in Skeletal Muscle and White Fat. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (1): 143–48.
- Seale P, B Bjork, W Yang, S Kajimura, S Chin, S Kuang, A Scimè. 2008. PRDM16 Controls a Brown Fat/skeletal Muscle Switch. *Nature* 454 (7207): 961–67.
- Seale P, H M Conroe, J Estall, S Kajimura, A Frontini, J Ishibashi, P Cohen, S Cinti, and B M. Spiegelman. 2011. Prdm16 Determines the Thermogenic Program of Subcutaneous White Adipose Tissue in Mice. *Journal of Clinical Investigation* 121 (1): 96–105.
- Seale P, S Kajimura, W Yang, S Chin, L M. Rohas, M Uldry, G Tavernier, D Langin, and B M. Spiegelman. 2007. Transcriptional Control of Brown Fat Determination by PRDM16. *Cell Metabolism* 6 (1): 38–54.
- Shen W J, Z Yu, S Patel, D Jue, L F Liu, and F B. Kraemer. 2011. Hormone-Sensitive Lipase Modulates Adipose Metabolism through PPAR γ . *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1811 (1): 9–16.
- Shingara, J., Keiger, K., Shelton, J., Laosinchai-Wolf, W., Powers, P., Conrad, R., Labourier, E. (2005). An optimized isolation and labeling platform for accurate microRNA expression profiling. *RNA (New York, N.Y.)*, 11(9), 1461–70.
- Shoelson, S. E., Herrero, L., & Naaz, A. (2007). Obesity, Inflammation, and Insulin Resistance. *Gastroenterology*, 132(6), 2169–2180.

- Sierra-Garcia G D, R Castro-Rios, A Gonzalez-Horta, J Lara-Arias, and A Chavez-Montes. 2016. Proteínas Morfogenéticas óseas (BMP): Aplicación Clínica Para Reconstrucción de Defectos En Hueso. *Gaceta Medica de Mexico*.
- Smith, R J, David M Nathan, S A Arslanian, L Groop, R A Rizza, and J I Rotter. 2010. Individualizing Therapies in Type 2 Diabetes Mellitus Based on Patient Characteristics: What We Know and What We Need to Know. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 95 (4): 1566–74.
- Smorlesi, A., A. Frontini, A. Giordano, and S. Cinti. 2012. “The Adipose Organ: White-Brown Adipocyte Plasticity and Metabolic Inflammation.” *Obesity Reviews* 13 (SUPPL.2): 83–96.
- Snyder R O, M Audit, and J D Francis. 2011. rAAV Vector Product Characterization and Stability Studies. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 807: 405–28.
- Soccio, R. E., Chen, E. R., & Lazar, M. A. (2014). Thiazolidinediones and the Promise of Insulin Sensitization in Type 2 Diabetes. *Cell Metabolism*, 20(4), 573–591.
- Spiegelman, B. M., & Flier, J. S. (2001). Obesity and the Regulation of Energy Balance. *Cell*, 104(4), 531–543.
- Sramkova D, Krejbichova S, Vcelak J, Vankova M, Samalikova P, Hill M, Kvasnickova H, Dvorakova K, Vondra K, Hainer V, Bendlova B. 2007. The UCP1 Gene Polymorphism A-3826G in Relation to DM2 and Body Composition in Czech Population. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 115 (5): 303–7.
- Srivastava, A, E W Lusby, and K I Berns. 1983. Nucleotide Sequence and Organization of the Adeno-Associated Virus 2 Genome. *Journal of Virology* 45 (2): 555–64.
- Stilwell, J. L., & Samulski, R. J. (2004). Role of Viral Vectors and Virion Shells in Cellular Gene Expression. *Molecular Therapy*, 9(3), 337–346.
- Strissel K J, G V Denis, and B S Nikolajczyk. 2014. Immune Regulators of Inflammation in Obesity-Associated Type 2 Diabetes and Coronary Artery Disease. *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes, and Obesity* 21 (5): 330–38.
- Student, K A., R. Y. Hsu, and M. D. Lane. 1980. Induction of Fatty Acid Synthetase Synthesis in Differentiating 3T3-L1 Preadipocytes. *Journal of Biological Chemistry* 255 (10): 4745–50.
- Stumvoll M, B J Goldstein, and T W Van Haefen. 2005. Type 2 Diabetes: Principles of Pathogenesis and Therapy. In *Lancet*, 365:1333–46.
- Suenaga M, N Kurosawa, H Asano, Y Kanamori, T Umemoto, H Yoshida, M Murakami, H Kawachi, T Matsui, and M Funaba. 2013. Bmp4 Expressed in Preadipocytes Is Required for the Onset of Adipocyte Differentiation. *Cytokine* 64 (1): 138–45.
- Surwit, R. S., Feinglos, M. N., Rodin, J., Sutherland, A., Petro, A. E., Opara, E. C., ... Rebuffe-Scrive, M. (1995). Differential effects of fat and sucrose on the development of obesity and diabetes in C57BL/6J and A/J mice. *Metabolism*, 44(5), 645–651.
- Surwit, R. S., Wang, S., Petro, a E., Sanchis, D., Raimbault, S., Ricquier, D., ... Sciences, B. (1998). Diet-induced changes in uncoupling proteins in obesity-prone and obesity-resistant strains of mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(7), 4061–4065.
- Sweetman, D., Goljanek, K., Rathjen, T., Oustanina, S., Braun, T., Dalmay, T., & Münsterberg, A. (2008). Specific requirements of MRFs for the expression of muscle specific microRNAs, miR-1, miR-206 and miR-133. *Developmental Biology*, 321(2), 491–499.

- Takahashi, Y., Shinoda, A., Furuya, N., Harada, E., Arimura, N., Ichi, I., Sato, R. (2013). Perilipin-Mediated Lipid Droplet Formation in Adipocytes Promotes Sterol Regulatory Element-Binding Protein-1 Processing and Triacylglyceride Accumulation. *PLoS ONE*, 8(5).
- Tanaka, M, S Endo, T Okuda, a N Economides, D M Valenzuela, a J Murphy, E Robertson, et al. 2008. Expression of BMP-7 and USAG-1 (a BMP Antagonist) in Kidney Development and Injury. *Kidney International* 73: 181–91.
- Tang Q Q, and M. D Lane. 1999. Activation and Centromeric Localization of CCAAT/enhancer-Binding Proteins during the Mitotic Clonal Expansion of Adipocyte Differentiation. *Genes and Development* 13 (17): 2231–41.
- Tang QQ and Lane MD. 2012. Adipogenesis: From Stem Cell to Adipocyte. *Annu Rev Biochem.* 2012;81:715-36.
- Tang Y, M Wallace, J Sanchez-Gurmaches, W Y Hsiao, H Li, P L Lee, S Vernia, C M Metallo, and D A Guertin. 2016. Adipose Tissue mTORC2 Regulates ChREBP-Driven de Novo Lipogenesis and Hepatic Glucose Metabolism. *Nature Communications* 7: 11365.
- Taylor, R. 2008. Pathogenesis of Type 2 Diabetes: Tracing the Reverse Route from Cure to Cause. *Diabetologia* 51 (10): 1781–89.
- Tchernof A, and J-P Després. 2013. Pathophysiology of Human Visceral Obesity: An Update. *Physiological Reviews* 93 (1): 359–404.
- Tchkonia T, T Thomou, Y Zhu, I Karagiannides, C Pothoulakis, M D Jensen, and J L Kirkland. 2013. Mechanisms and Metabolic Implications of Regional Differences among Fat Depots. *Cell Metabolism*.
- Timmons J, K Wennmalm, O Larsson, T B Walden, T Lassmann, N Petrovic, D L Hamilton. 2007. Myogenic Gene Expression Signature Establishes That Brown and White Adipocytes Originate from Distinct Cell Lineages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (11): 4401–6.
- Timmons JA, Pedersen BK. 2009. The Importance of Brown Adipose Tissue. *New England Journal of Medicine* 361 (4). Massachusetts Medical Society: 415–21.
- Tontonoz P, E Hu, and B M. Spiegelman. 1994. Stimulation of Adipogenesis in Fibroblasts by PPARgamma2, a Lipid-Activated Transcription Factor. *Cell* 79 (7): 1147–56.
- Tontonoz P, and B M Spiegelman. 2008. Fat and beyond: The Diverse Biology of PPARgamma. *Annual Review of Biochemistry* 77: 289–312.
- Townsend K L, R Suzuki, T L Huang, E Jing, T J Schulz, K Lee, C M Taniguchi. 2012. Bone Morphogenetic Protein 7 (BMP7) Reverses Obesity and Regulates Appetite through a Central mTOR Pathway. *The FASEB Journal* 7: 1–10.
- Townsend K L, D An, M D Lynes, T L Huang, H Zhang, L J Goodyear, and Y H Tseng. 2013. Increased Mitochondrial Activity in BMP7-Treated Brown Adipocytes, Due to Increased CPT1- and CD36-Mediated Fatty Acid Uptake. *Antioxidants and Redox Signaling*, Jul 20;19(3):243-57
- Trayhurn P, C Drevon, and J Eckel. 2011. Secreted Proteins from Adipose Tissue and Skeletal Muscle - Adipokines, Myokines and Adipose/muscle Cross-Talk. *Archives of Physiology and Biochemistry* 117 (2): 47–56.
- Trepel, M., Körbelin, J., Spies, E., Heckmann, M. B., Hunger, A., Fehse, B., ... Michelfelder, S. (2015). Treatment of multifocal breast cancer by systemic delivery of dual-targeted adeno-associated viral vectors. *Gene Therapy*, 22(10), 840–847.

- Tseng, Y H, A J Butte, E Kokkotou, V K Yechoor, C M Taniguchi, K M Kriauciunas, A M Cypess, et al. 2005. Prediction of Preadipocyte Differentiation by Gene Expression Reveals Role of Insulin Receptor Substrates and Necdin. *Nat Cell Biol* 7 (6): 601–11.
- Tseng Y H, E Kokkotou, T J Schulz, T L Huang, J N Winnay, C M Taniguchi, T T Tran. 2008. New Role of Bone Morphogenetic Protein 7 in Brown Adipogenesis and Energy Expenditure. *Nature* 454 (7207): 1000–1004.
- van Marken Lichtenbelt, W. D., Vanhommerig, J. W., Smulders, N. M., Drossaerts, J. M. a F. L., Kemerink, G. J., Bouvy, N. D., ... Teule, G. J. J. (2009). Cold-activated brown adipose tissue in healthy men. *N Engl J Med*, 360(15), 1500–1508.
- Vegiopoulos A, K Müller-Decker, D Strzoda, I Schmitt, E Chichelnitskiy, A Ostertag, M B Diaz. 2010. Cyclooxygenase-2 Controls Energy Homeostasis in Mice by de Novo Recruitment of Brown Adipocytes. *Science (New York, N.Y.)*.
- Vilà, L., Elias, I., Roca, C., Ribera, A., Ferré, T., Casellas, A., ... Bosch, F. (2014). AAV8-mediated Sirt1 gene transfer to the liver prevents high carbohydrate diet-induced nonalcoholic fatty liver disease. *Molecular Therapy - Methods & Clinical Development*, 1, 14039.
- Vimaleswaran K S, V Radha, S Ghosh, P P Majumder, M R S Rao, and V Mohan. 2010. A Haplotype at the UCP1 Gene Locus Contributes to Genetic Risk for Type 2 Diabetes in Asian Indians (CURES-72). *Metabolic Syndrome and Related Disorders* 8 (1): 63–68.
- Virtanen K A, M E Lidell, J Orava, M Heglind, R Westergren, T Niemi, M Taittonen. 2009. Functional Brown Adipose Tissue in Healthy Adults. *The New England Journal of Medicine* 360 (15): 1518–25.
- Vitali, a., I. Murano, M. C. Zingaretti, A. Frontini, D. Ricquier, and S. Cinti. 2012. The Adipose Organ of Obesity-Prone C57BL/6J Mice Is Composed of Mixed White and Brown Adipocytes. *The Journal of Lipid Research* 53 (4): 619–29.
- Voight B F, L J Scott, V Steinthorsdottir, P Andrew, Y S Aulchenko, G Thorleifsson, L J Mcculloch, and T Ferreira. 2010. Twelve Type 2 Diabetes Susceptibility Loci Identified through Large-Scale Association Analysis. *Nature Genetics* 42 (7): 579–89.
- Vollmar B, and M D. Menger. 2009. The Hepatic Microcirculation: Mechanistic Contributions and Therapeutic Targets in Liver Injury and Repair. *Physiological Reviews* 89 (4).
- Vukicevic, S, M N Helder, and F P Luyten. 1994. Developing Human Lung and Kidney Are Major Sites for Synthesis of Bone Morphogenetic Protein-3 (Osteogenin). *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society* 42 (7): 869–75.
- Walden, T. B., Timmons, J. A., Keller, P., Nedergaard, J., & Cannon, B. (2009). Distinct expression of muscle-specific MicroRNAs (myomirs) in brown adipocytes. *Journal of Cellular Physiology*, 218(2), 444–449.
- Waldén T B, I R Hansen, J a Timmons, B Cannon, and J Nedergaard. 2012. Recruited vs. Nonrecruited Molecular Signatures of Brown, 'brite,' and White Adipose Tissues. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* 302 (1): E19-31.
- Wang L, R Calcedo, T C. Nichols, D A. Bellinger, A Dillow, I M. Verma, and J M. Wilson. 2005. Sustained Correction of Disease in Naive and AAV2-Pretreated Hemophilia B Dogs: AAV2/8-Mediated, Liver-Directed Gene Therapy. *Blood* 105 (8).
- Wang L, H Wang, P Bell, R J McCarter, J He, R Calcedo, L H Vandenberghe, H Morizono, M L Batshaw, and J M Wilson. 2010. Systematic Evaluation of AAV Vectors for Liver Directed Gene Transfer in Murine Models. *Molecular Therapy* 18 (1): 118–25.

- Wang, B., Chandrasekera, P., & Pippin, J. (2014). Leptin- and Leptin Receptor-Deficient Rodent Models: Relevance for Human Type 2 Diabetes. *Current Diabetes Reviews*, 10(2), 131–145.
- Wang Q, M Zhang, M Xu, W Gu, Y Xi, L Qi, B Li, and W Wang. 2015. Brown Adipose Tissue Activation Is Inversely Related to Central Obesity and Metabolic Parameters in Adult Human. *PloS One* Apr 20;10(4):e0123795
- Wang W, and P Seale. 2016. Control of Brown and Beige Fat Development. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 17 (11): 691–702.
- Wang Y, K A Kim, J H Kim, and H S Sul. 2006. Pref-1, a Preadipocyte Secreted Factor That Inhibits Adipogenesis. *The Journal of Nutrition* 136: 2953–2956.
- Whittle A J., S Carobbio, L Martins, M Slawik, E Hondares, M J Vázquez, D Morgan. 2012. BMP8B Increases Brown Adipose Tissue Thermogenesis through Both Central and Peripheral Actions. *Cell* 149 (4): 871–85.
- WHO. 2000. Obesity: Preventing and Managing the Global Epidemic. Report of a WHO Consultation. World Health Organization Technical Report Series. Vol. 894.
- WHO - GLOBAL REPORT ON DIABETES. 2016. ISBN 978: 92–94.
- Winzell, M. S., & Ahrén, B. (2004). The high-fat diet-fed mouse: a model for studying mechanisms and treatment of impaired glucose tolerance and type 2 diabetes. *Diabetes*, 53 Suppl 3(suppl 3), S215--9.
- Wu J, P Boström, L M. Sparks, L Ye, J H Choi, A H Giang, M Khandekar. 2012. Beige Adipocytes Are a Distinct Type of Thermogenic Fat Cell in Mouse and Human. *Cell* 150 (2): 366–76.
- Wu, Z, Y Xie, N L Bucher, and S R Farmer. 1995. Conditional Ectopic Expression of C/EBP Beta in NIH-3T3 Cells Induces PPAR Gamma and Stimulates Adipogenesis. *Genes & Development* 9: 2350–63.
- Xu, J., D. J. Lloyd, C. Hale, S. Stanislaus, M. Chen, G. Sivits, S. Vonderfecht, et al. 2009. Fibroblast Growth Factor 21 Reverses Hepatic Steatosis, Increases Energy Expenditure, and Improves Insulin Sensitivity in Diet-Induced Obese Mice. *Diabetes* 58 (1): 250–59.
- Yeh, W. C., Z. Cao, M. Classon, and S. L. McKnight. 1995. "Cascade Regulation of Terminal Adipocyte Differentiation by Three Members of the C/EBP Family of Leucine Zipper Proteins." *Genes and Development* 9 (2): 168–81. doi:10.1101/gad.9.2.168.
- Yen M, and M B Ewald. 2012. Toxicity of Weight Loss Agents. *Journal of Medical Toxicology* 8 (2): 145–52.
- Yi, S.E., A. Daluiski, R. Pederson, V. Rosen, and K.M. Lyons. 2000. The Type I BMP Receptor BMPRII Is Required for Chondrogenesis in the Mouse Limb. *Development* 127 (3).
- Ylä-Herttua, Seppo. 2012. Endgame: Glybera Finally Recommended for Approval as the First Gene Therapy Drug in the European Union. *Molecular Therapy : The Journal of the American Society of Gene Therapy* 20 (10): 1831–32.
- Yoneshiro, T., & Saito, M. (2015). Activation and recruitment of brown adipose tissue as anti-obesity regimens in humans. *Annals of Medicine*, 47(2), 133–141.
- Zeisberg, M. 2006. Bone Morphogenic Protein-7 and the Kidney: Current Concepts and Open Questions. *Nephrology Dialysis Transplantation* 21 (3). Oxford University Press: 568–73.
- Zhang, G., Budker, V., & Wolff, J. A. (1999). High Levels of Foreign Gene Expression in Hepatocytes after Tail Vein Injections of Naked Plasmid DNA. *Human Gene Therapy*, 10(10), 1735–1737.

- Zhang S, T Fei, L Zhang, R Zhang, F Chen, Y Ning, Y Han, X Feng, A Meng, and Y Chen. 2007. Smad7 Antagonizes Transforming Growth Factor Beta Signaling in the Nucleus by Interfering with Functional Smad-DNA Complex Formation. *Molecular and Cellular Biology* 27 (12): 4488–99.
- Zhang, H., Schulz, T. J., Espinoza, D. O., Huang, T. L., Emanuelli, B., Kristiansen, K., & Tseng, Y.-H. (2010). Cross talk between insulin and bone morphogenetic protein signaling systems in brown adipogenesis. *Molecular and Cellular Biology*, 30(17), 4224–33.
- Zhang, L., Chen, Y., Li, C., Lin, X., Cheng, X., & Li, T. (2014). Protective effects of combined intervention with adenovirus vector mediated IL-10 and IGF-1 genes on endogenous islet β cells in nonobese diabetes mice with onset of type 1 diabetes mellitus. *PloS One*, 9(3), e92616.
- Zhou Z, S Y Toh, Z Chen, K Guo, C P Ng, S Ponniah, S C Lin, W Hong, and P Li. 2003. Cidea-Deficient Mice Have Lean Phenotype and Are Resistant to Obesity. *Nature Genetics* 35 (1): 49–56.
- Zincarelli, C., Soltys, S., Rengo, G., & Rabinowitz, J. E. (2008). Analysis of AAV Serotypes 1–9 Mediated Gene Expression and Tropism in Mice After Systemic Injection. *Molecular Therapy*, 16(6), 1073–1080.
- Zolotukhin, S, Bj Byrne, E Mason, I Zolotukhin, M Potter, K Chesnut, C Summerford, Rj Samulski, and N Muzyczka. 1999. Recombinant Adeno-Associated Virus Purification Using Novel Methods Improves Infectious Titer and Yield. *Gene Therapy* 6: 973–85.