



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Evaluación de nanomateriales basados en óxido de cerio como nueva estrategia terapéutica frente las alteraciones metabólicas asociadas a la obesidad

Marina Parra Robert

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

CLÍNIC
BARCELONA
Hospital Universitari

**EVALUACIÓN DE NANOMATERIALES BASADOS EN ÓXIDO DE CERIO
COMO NUEVA ESTRATEGIA TERAPÉUTICA
FRENTE LAS ALTERACIONES METABÓLICAS ASOCIADAS A LA OBESIDAD**

Memoria de tesis doctoral presentada por

MARINA PARRA ROBERT

para optar al grado de Doctora por la Universitat de Barcelona

Trabajo realizado bajo la dirección del **Dr. Gregori Casals Mercadal**

Servicio de Bioquímica y Genética Molecular, Centro de Diagnóstico Biomédico

Hospital Clínic

y tutoría del **Dr. Wladimiro Jiménez Povedano**

Servicio de Bioquímica y Genética Molecular, Centro de Diagnóstico Biomédico

Departamento de Biomedicina, Facultad de Medicina

Hospital Clínic - Universitat de Barcelona

Programa de Doctorado de Medicina e Investigación Traslacional

Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud

Universitat de Barcelona

Octubre 2021



UNIVERSITAT DE BARCELONA

Dr. Gregori Casals Mercadal

Dr. Wladimiro Jiménez Povedano

HACEN CONSTAR

Que tras la revisión de la memoria: "***Evaluación de nanomateriales basados en óxido de cerio como nueva estrategia terapéutica frente las alteraciones metabólicas asociadas a la obesidad***", presentada por la doctoranda Marina Parra Robert, para optar al grado de Doctora por la Universitat de Barcelona, la encontramos conforme para ser presentada, defendida en acto público y juzgada por el Tribunal que al efecto se designe.

Barcelona, 14 de Octubre de 2021

Fdo. Gregori Casals Mercadal

Fdo. Wladimiro Jiménez Povedano

Als meus pares i a l'Arnau

AGRADECIMIENTOS

Han passat ja uns quants anys des de l'inici de la tesi doctoral i per fi hem arribat al final. Em refereixo en plural ja que sense en primer lloc el director de la tesi, el Dr. Gregori Casals, no hagués arribat fins aquí. Gràcies per l'oportunitat, la paciència i la dedicació. També m'agradaria agrair al tutor, el Dr. Jiménez, per comptar amb mi al grup i pel suport durant tots aquest anys, i a tot el grup d'investigació pel seu recolzament i ajuda constant: Manuel, Guillermo, Pedro, Meritxell, Silvia, Jordi, Irene... Mil gràcies també a l'Eudald Casals i la Muling Zeng per la seva inestimable ajuda. I sense oblidar a les tècnics d'Hormonal, que tant de temps hem compartit al laboratori durant els experiments de la tesi.

En aquest camí ple d'aprenentatge, entre experiments fructífers i d'altres de fallits, hores i més hores dedicades, la tesi ha estat realitzada paral·lelament amb la tasca d'especialista. Per això no voldria oblidar-me de donar les gràcies a la resta de companys amb els quals he compartit dia a dia aquest viatge: a la Dra. Brunet pel seu suport i consells, a tots els companys del Servei BGM, i en especial, de la Secció de Farmacologia i Toxicologia i de la Secció d'Hormones, al grup de guàrdies, a les coordinadores, a les secretaries... Moltes gràcies a tots.

M'agradaria donar les gràcies també a les meves amigues i amics pels ànims en aquesta aventura com a doctoranda i pels bons moments i riures quan els necessitava.

I per últim, però no menys important, un agraïment especial a la meva família, la tesi també ha estat possible gràcies a vosaltres. Als meus pares pels valors inculcats, l'esforç, la perseverança i l'entusiasme, gràcies infinites per estar al meu costat. Als meus germans, per ser una dosi d'energia positiva. A la meva segona família, a la Maria José i al Jordi, per tractar-me com una filla més i recolzar-me en tots els reptes. I a l'Arnau, gràcies per tot, per estar sempre, per perseguir noves metes junts i ser l'estrella que sempre brilla.

Esta tesis se ha realizado en el grupo de Investigación traslacional en nuevas estrategias terapéuticas y diagnósticas en enfermedades hepáticas del Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS) y en el Servicio de Bioquímica y Genética Molecular del Centro de Diagnóstico Biomédico del Hospital Clínic de Barcelona.

Los trabajos incluidos en la presente tesis doctoral han sido financiados por el Instituto de Salud Carlos III (PI19/00774 y PI15/00077, Dr. Gregori Casals).

ÍNDICE

I. LISTADO DE ABREVIATURAS.....	15
II. ARTÍCULOS.....	19
III. INTRODUCCIÓN	23
1. Obesidad	25
1.1. Definición	25
1.2. Epidemiología.....	28
1.3. Patogénesis	30
1.4. Diagnóstico.....	36
1.5. Estrategias terapéuticas.....	38
2. Dislipemia.....	42
2.1. Definición	42
2.2. Epidemiología.....	43
2.3. Patogénesis	43
2.4. Diagnóstico.....	47
2.5. Estrategias terapéuticas.....	48
3. MAFLD	51
3.1. Definición	51
3.2. Epidemiología.....	54
3.3. Patogénesis	56
3.4. Diagnóstico.....	59
3.5. Estrategias terapéuticas.....	61
4. Modelos experimentales de obesidad	62
5. Nanopartículas de óxido de cerio.....	65
5.1. Propiedades y mecanismo de acción	67
5.2. Comparación frente otras estrategias terapéuticas	69
5.3. Efectos clínicos en las patologías de estudio	70
5.4. Estudios <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> en obesidad	71
5.5. Nanopartículas de óxido de cerio recubiertas de sílice mesoporosa.....	72
IV. HIPÓTESIS.....	75
V. OBJETIVOS.....	81
VI. MÉTODOS Y RESULTADOS.....	85

ARTÍCULO 1	87
<i>Beyond the scavenging of reactive oxygen species (ROS): direct effect of cerium oxide nanoparticles in reducing fatty acids content in an in vitro model of hepatocellular steatosis.</i>	
ARTÍCULO 2	113
<i>Mesoporous silica coated CeO₂ nanozymes with combined lipid-lowering and antioxidant activity induce long-term improvement of the metabolic profile in obese Zucker rats.</i>	
VII. DISCUSIÓN.....	153
VIII. CONCLUSIONES.....	169
IX. BIBLIOGRAFÍA.....	173
X. ANEXOS	185
ANEXO 1. Otras publicaciones relacionadas con la tesis doctoral	187
ANEXO 2. Comunicaciones a congresos relacionadas con la tesis doctoral	189

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Comorbilidades asociadas a la obesidad.....	26
Figura 2. Desarrollo de complicaciones asociadas a la obesidad a partir del exceso de adiposidad.....	27
Figura 3. Evolución de la prevalencia de obesidad en España entre el 1975 y el 2015.....	28
Figura 4. Prevalencia de la obesidad por zona geográfica.....	29
Figura 5. Factores biológicos, ambientales y societales que contribuyen a la obesidad.....	31
Figura 6. Control del apetito y la saciedad.....	33
Figura 7. Mecanismos centrales y periféricos implicados en el control del peso corporal.....	34
Figura 8. Disfunción del tejido adiposo asociada a la obesidad y que participa en la inflamación, resistencia a la insulina, dislipemia, MAFLD y otras características del síndrome metabólico. .	35
Figura 9. Interacción entre tejido adiposo, músculo e hígado en la obesidad: contribución al desarrollo de inflamación y resistencia a la insulina.....	36
Figura 10. Alteración del metabolismo lipídico en la obesidad.....	44
Figura 11. Activación del receptor TLR4 por el ácido palmítico y vía de señalización.....	46
Figura 12. Papel del ácido palmítico en la inducción de la resistencia a insulina a través de la activación de macrófagos.....	47
Figura 13. Espectro dinámico de la MAFLD.....	52
Figura 14. Teoría de los múltiples impactos en la progresión clínica de la MAFLD.....	57
Figura 15. Lipotoxicidad, inflamación y estrés oxidativo en la patogénesis de la MAFLD.....	58
Figura 16. Mecanismos moleculares que participan en el metabolismo lipídico hepático asociado a la MAFLD.....	59
Figura 17. Características metabólicas principales de las ratas Zucker obesas (fa/fa).....	65
Figura 18. Esquema sobre la interrelación entre estrés oxidativo e inflamación que tiene lugar en la obesidad y otras enfermedades frecuentes.....	66

Figura 19. Imagen por microscopía electrónica de transmisión (TEM) de las CeO ₂ NPs utilizadas en este trabajo.	66
Figura 20. Mecanismo de acción antioxidante de las CeO ₂ NPs.	67
Figura 21. Imagen por microscopía electrónica de transmisión (TEM) de las CeO ₂ @mSiO ₂ utilizadas en este trabajo.	73
Figura 22. Esquema del metabolismo de los ácidos grasos.	89
Figura 23. Efecto del peróxido de hidrógeno (H ₂ O ₂) sobre la viabilidad celular.	90

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Riesgo relativo de desarrollar complicaciones asociadas con la obesidad	26
Tabla 2. Categorías del estado ponderal según los criterios de la OMS.	37
Tabla 3. Farmacoterapia de la obesidad	41
Tabla 4. Perfil lipídico en pacientes con alteración metabólica	43
Tabla 5. Farmacoterapia de la dislipemia	50
Tabla 6. Modelos monogénicos de obesidad en roedores	64

I. LISTADO DE ABREVIATURAS

Apo B: Apolipoproteína B

CE: Ésteres de colesterol

CeO₂: Óxido de cerio

CeO₂@mSiO₂: Nanopartículas de óxido de cerio recubiertas de sílice mesoporosa

CeO₂NPs: Nanopartículas de óxido de cerio

CETP: Proteína de transferencia de éster de colesterol

CHC: Carcinoma hepatocelular

cHDL: Colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad

cLDL: Colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad

CT: Colesterol total

ELOVL5: Elongasa de ácidos grasos de cadena larga tipo 5

ELOVL6: Elongasa de ácidos grasos de cadena larga tipo 6

FADS1: Δ5 desaturasa

FADS2: Δ6 desaturasa

GC-MS: Cromatografía de gases – espectrometría de masas

GLP-1: Péptido similar al glucagón tipo 1

H₂O₂: Peróxido de hidrógeno

HDL: Lipoproteínas de alta densidad

ICP-MS: Espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente

IDL: Lipoproteínas de densidad intermedia

IMC: Índice de masa corporal

LDL: Lipoproteínas de baja densidad

LDN: Lipogénesis *de novo*

LPL: Lipoproteína lipasa

MAFLD: Enfermedad del hígado graso asociada con disfunción metabólica (*Metabolic Associated Fatty Liver Disease*)

MCD: Dieta deficiente en metionina y colina

mSiO₂: Sílice mesoporosa

NAFLD: Hígado graso no alcohólico (*Non-Alcoholic Fatty Liver Disease*)

NASH: Esteatohepatitis

Listado de abreviaturas

NEFA: Ácidos grasos no esterificados

NF- κ B: factor nuclear kappaB

OA: Ácido oleico

PA: Ácido palmítico

PC: Fosfatidilcolina

PCSK9: Propoteína convertasa
subtilisina/kexina 9

PE: Fosfatidiletanolamina

ROS: Especies reactivas de oxígeno

SCD1: Esteroil-CoA desaturasa

sdLDL: LDL pequeñas y densas (*small dense*
LDL)

TEM: Microscopía electrónica de
transmisión

TG: Triglicéridos

TLR4: Receptor tipo Toll 4

TNF- α : Factor de necrosis tumoral α

VLDL: Lipoproteínas de muy baja densidad

II. ARTÍCULOS

Tesis en formato de compendio de artículos

La tesis consta de dos artículos:

Parra-Robert M*, Casals E*, Massana N, Zeng M, Perramón M, Fernández-Varo G, Morales-Ruiz M, Puntos V, Jiménez W, Casals G. Beyond the scavenging of reactive oxygen species (ROS): direct effect of cerium oxide nanoparticles in reducing fatty acids content in an in vitro model of hepatocellular steatosis. *Biomolecules*. 2019;9(9):425. IF (2019): 4,082. (Q2) Biochemistry & Molecular Biology.

Parra-Robert M*, Zeng M*, Shu Y, Fernández-Varo G, Perramón M, Desai D, Chen J, Guo D, Zhang X, Morales-Ruiz M, Rosenholm JM, Jiménez W, Puntos V, Casals E, Casals G. Mesoporous silica coated CeO₂ nanozymes with combined lipid-lowering and antioxidant activity induce long-term improvement of the metabolic profile in obese Zucker rats. *Nanoscale*. 2021;13(18): 8452–8466. Epub 2021 Apr 14. IF (2020): 7,790. (Q1) Materials Science, Multidisciplinary.

*Ambos autores contribuyeron igualmente en estos trabajos.

III. INTRODUCCIÓN

1. Obesidad

1.1. Definición

La obesidad es una enfermedad metabólica crónica caracterizada por un exceso o acumulación anormal de grasa corporal. Actualmente constituye un problema de salud pública debido al elevado impacto socio sanitario y económico asociado a la obesidad y sus comorbilidades.

Presentar obesidad constituye un factor de riesgo de enfermedades metabólicas, cardiovasculares, respiratorias, gastrointestinales, genitourinarias y reproductivas, y cáncer, entre otras. La obesidad está estrechamente relacionada con el desarrollo de síndrome metabólico y comorbilidades, incluyendo dislipemia, diabetes mellitus tipo 2, hipertensión, hígado graso, infarto de miocardio, ictus, demencia, apnea del sueño, depresión, osteoartritis y varios tipos de cáncer (**Figura 1**) (1–3). Específicamente, presentar obesidad incrementa el riesgo cardiovascular a través del aumento de presión arterial, glucosa, triglicéridos (TG) y colesterol LDL (cLDL), y reducción del colesterol HDL (cHDL) (4). En conjunto, las complicaciones de la obesidad son consecuencia de la remodelación del tejido adiposo, la cual da lugar a inflamación crónica y daño tisular, y contribuye a la disfunción multiorgánica (3). Por otro lado, la presencia de obesidad está relacionada con una menor calidad de vida, desempleo, baja productividad y afectación social (2,5,6).

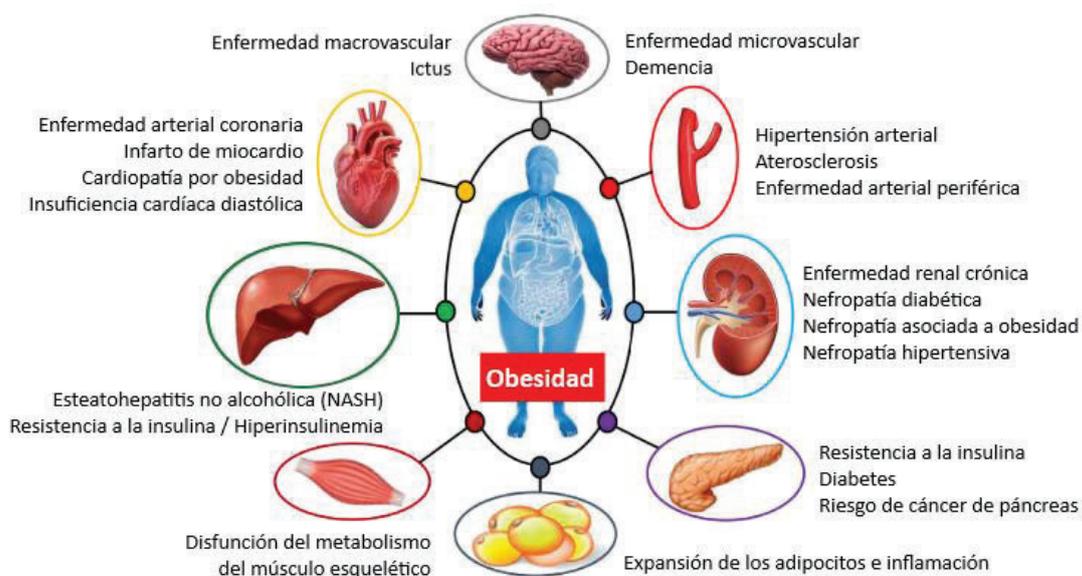


Figura 1. Comorbilidades asociadas a la obesidad.

Figura adaptada de Cardillo & Barton, 2021 (3).

De entre todas las complicaciones anteriormente citadas, se le atribuye a la obesidad un mayor riesgo relativo de desarrollar complicaciones metabólicas como la dislipemia, resistencia a la insulina y diabetes mellitus (**Tabla 1**) (7).

Riesgo relativo >3	Riesgo relativo 2-3	Riesgo relativo 1-2
Dislipemia	Enfermedad coronaria	Cáncer
Resistencia a la insulina	Hipertensión	- mama (mujeres posmenopáusicas)
Diabetes mellitus	Osteoartritis	- endometrio
Colelitiasis	Hiperuricemia y gota	- colon
Apnea del sueño		Alteraciones hormonales reproductivas
Disnea		Síndrome del ovario poliquístico
		Infertilidad
		Dolor de espalda
		Complicaciones en la anestesia
		Complicaciones obstétricas

Tabla 1. Riesgo relativo de desarrollar complicaciones asociadas con la obesidad.

Tabla adaptada de WHO, 2000 (7).

La causa común de todas las complicaciones de la obesidad es el exceso de adiposidad (**Figura 2**). Esta actuará mediante la sobreproducción de citoquinas, el incremento de lípidos, el aumento de la actividad simpática y del sistema renina-angiotensina-aldosterona, y el estrés mecánico que conlleva el exceso de tejido adiposo (8).

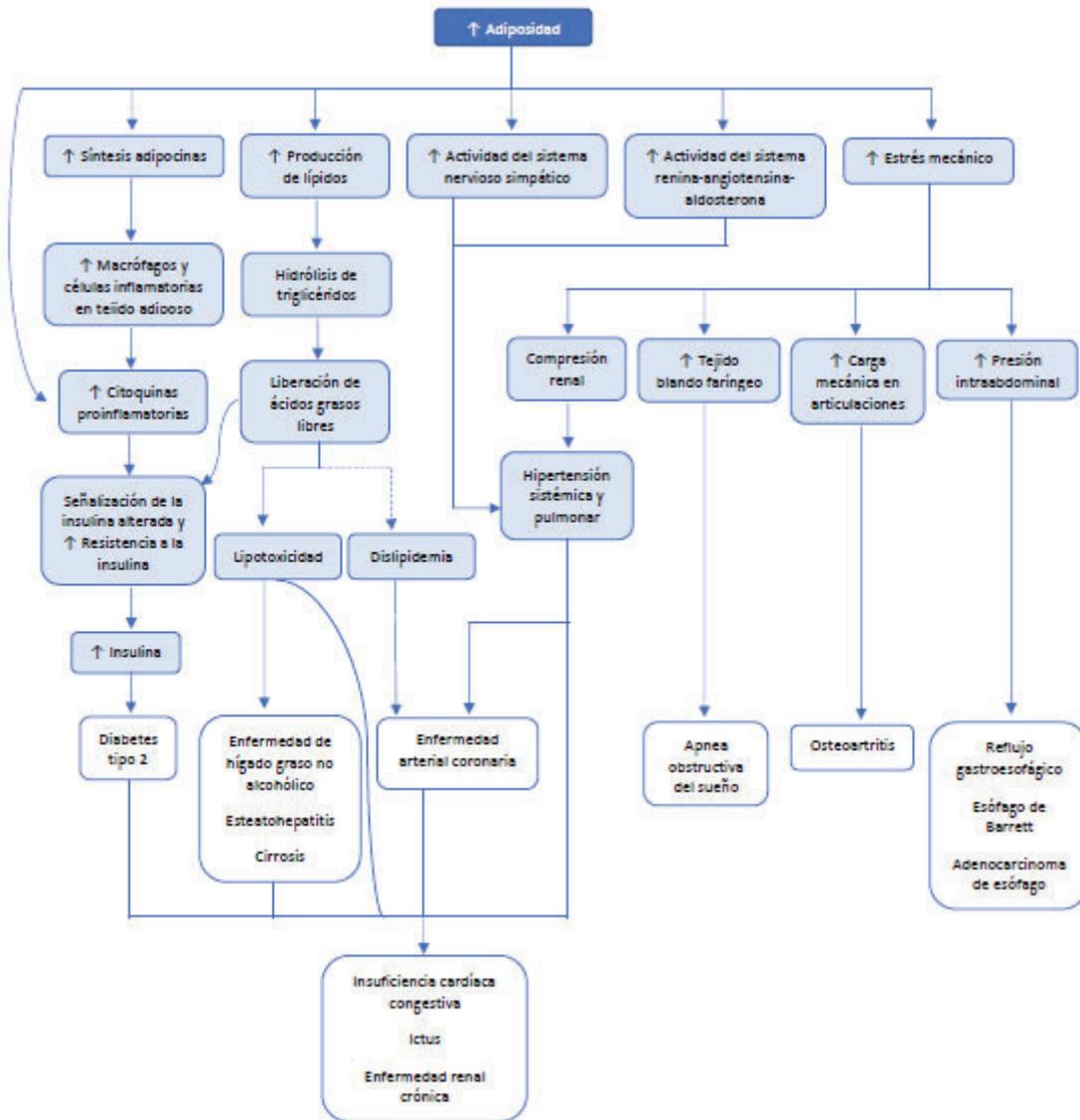


Figura 2. Desarrollo de complicaciones asociadas a la obesidad a partir del exceso de adiposidad.

Figura adaptada de Heymsfield & Wadden, 2017 (8).

Cabe destacar la implicación de la obesidad y sus complicaciones metabólicas dentro del conjunto denominado síndrome metabólico. El síndrome metabólico se define por la presencia de obesidad central junto con al menos dos de los siguientes factores: TG elevados (≥ 150 mg/dL o dislipemia en tratamiento), cHDL reducido (< 40 mg/dL en hombres, < 50 mg/dL en mujeres, o bien dislipemia en tratamiento), presión arterial elevada (sistólica ≥ 130 mm Hg, diastólica ≥ 85 mm Hg, o hipertensión en tratamiento), y glucosa en ayunas elevada (≥ 100 mg/dL o diagnóstico previo de diabetes tipo 2) (9). Dicho esto, desde la visión global de las

alteraciones metabólicas asociadas a la obesidad, la presente tesis doctoral se centrará en la obesidad y en las comorbilidades metabólicas tales como la dislipemia y el hígado graso.

1.2. Epidemiología

La obesidad constituye un problema de salud pública, considerándose actualmente una pandemia. Según datos de la OMS, la obesidad mundial se ha triplicado desde el año 1975 al 2016. En 2016 más de 1,9 billones de adultos (≥ 18 años) presentaban sobrepeso, de estos más de 650 millones eran obesos. Estos datos representan que el 39% de la población adulta tenían sobrepeso y el 13% obesidad. De especial relevancia es el incremento de la prevalencia de obesidad y sobrepeso en niños y adolescentes, la cual representa una prevalencia del 18% en 2016 (10).

En España la prevalencia de sobrepeso y obesidad en adultos el año 2016 era mayor a la media mundial, del 62% y 24%, respectivamente, siendo mayor la prevalencia en hombres (25%) que en mujeres (23%). La prevalencia de obesidad en España ha aumentado más del doble en los últimos 40 años (1975-2015) (**Figura 3**) (11).

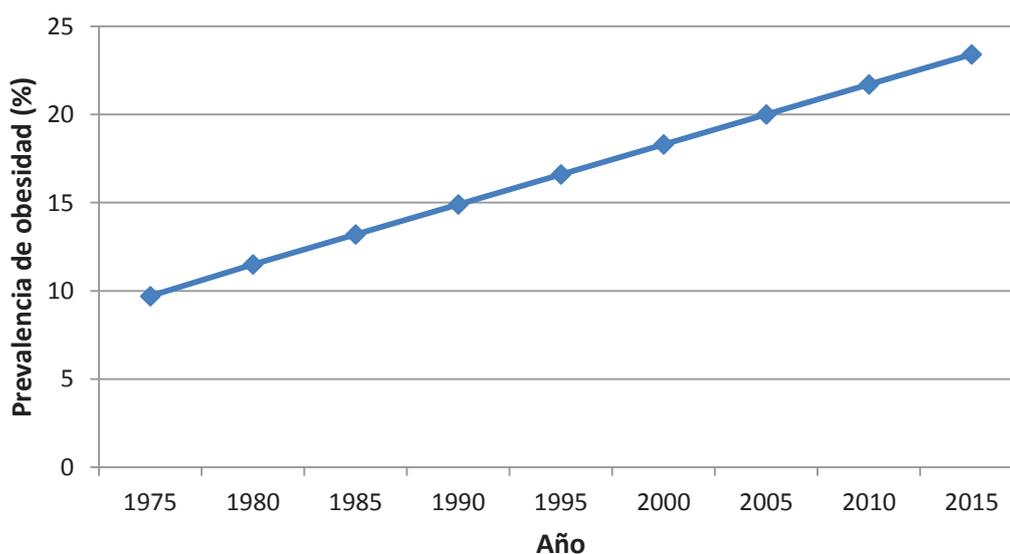


Figura 3. Evolución de la prevalencia de obesidad en España entre el 1975 y el 2015 (11).

A nivel mundial el predominio de obesidad se sitúa, de mayor a menor prevalencia, en las islas del océano Pacífico (Nauru, Islas Cook, Palau, Samoa, etc.) (45% - 61%), Kuwait (38%), USA (36%), Jordania (36%), Arabia Saudí (35%), Qatar (35%), seguido de Libia, Turquía, Lebanon, Egipto, Emiratos Árabes, Bahamas, Nueva Zelanda, Iraq y Fiji (30-<35%). En el rango de 20-25% de obesidad, donde se encuentra España, encontramos la mayoría de países europeos, a excepción de Turquía (32%), Malta (29%), UK (28%), y de Hungría, Lituania, Israel, República Checa y Andorra (éstas últimas del 26%) (Figura 4) (11).

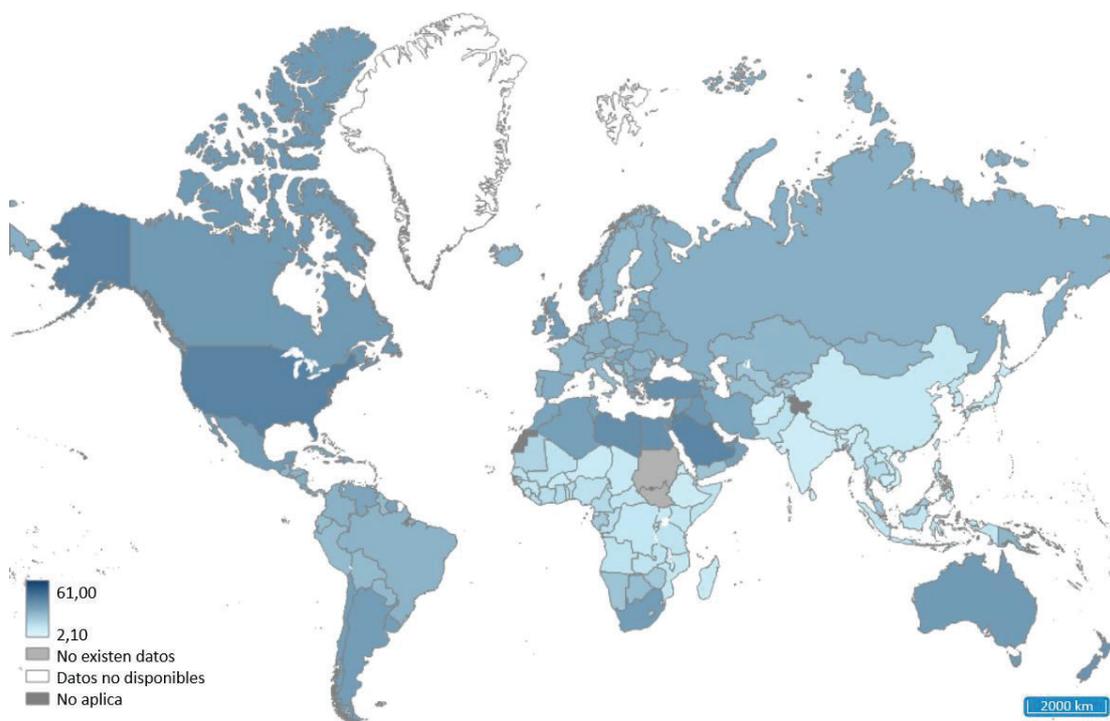


Figura 4. Prevalencia de la obesidad por zona geográfica.

Datos del año 2016. Figura adaptada de WHO The Global Health Observatory (11).

Estos datos conllevan directa e indirectamente un elevado coste asociado a la obesidad y a sus comorbilidades. Según la Organización para la Cooperación y Desarrollo Económico (OCDE), las enfermedades relacionadas con el sobrepeso abarcan 417 millones del gasto sanitario en España, comportando el 9,7 % del gasto en salud, el cual es superior a la media de la OCDE y de la Unión Europea. Esto repercute a la ciudadanía en 265 € adicionales de impuestos al año (12).

Introducción

Globalmente hoy en día la mayoría de población mundial vive en países donde el sobrepeso y la obesidad causa una mayor mortalidad que el peso insuficiente (10). Dada la actual pandemia de obesidad, son necesarias estrategias de prevención y tratamientos eficaces para reducir la carga sanitaria y económica asociada a la obesidad y a sus comorbilidades.

1.3. Patogénesis

La obesidad se produce por un desequilibrio del balance energético, debido a una mayor ingesta calórica comparado con el gasto energético. La interacción de distintos factores biológicos, ambientales y sociales resultará en el desarrollo de obesidad (**Figura 5**). Dichos factores dan lugar a la desregulación de la ingesta alimentaria, del metabolismo y del grado de actividad física, que contribuyen a un balance energético positivo crónico típico de la obesidad. El incremento de prevalencia de obesidad se ha relacionado con cambios en el estilo de vida de la población, basados en un mayor predominio de comida procesada, alimentos ricos en azúcares y grasas, con un alto contenido energético y bajo contenido en fibra, y acompañados de un estilo de vida más sedentario. Entre los impulsores del ambiente obesogénico se encuentra la “Westernización” del estilo de vida de la población, el papel de la industria alimentaria y la rápida revolución en el suministro alimentario, que comportó que el gasto energético no se adaptara al rápido incremento de ingesta calórica (5).

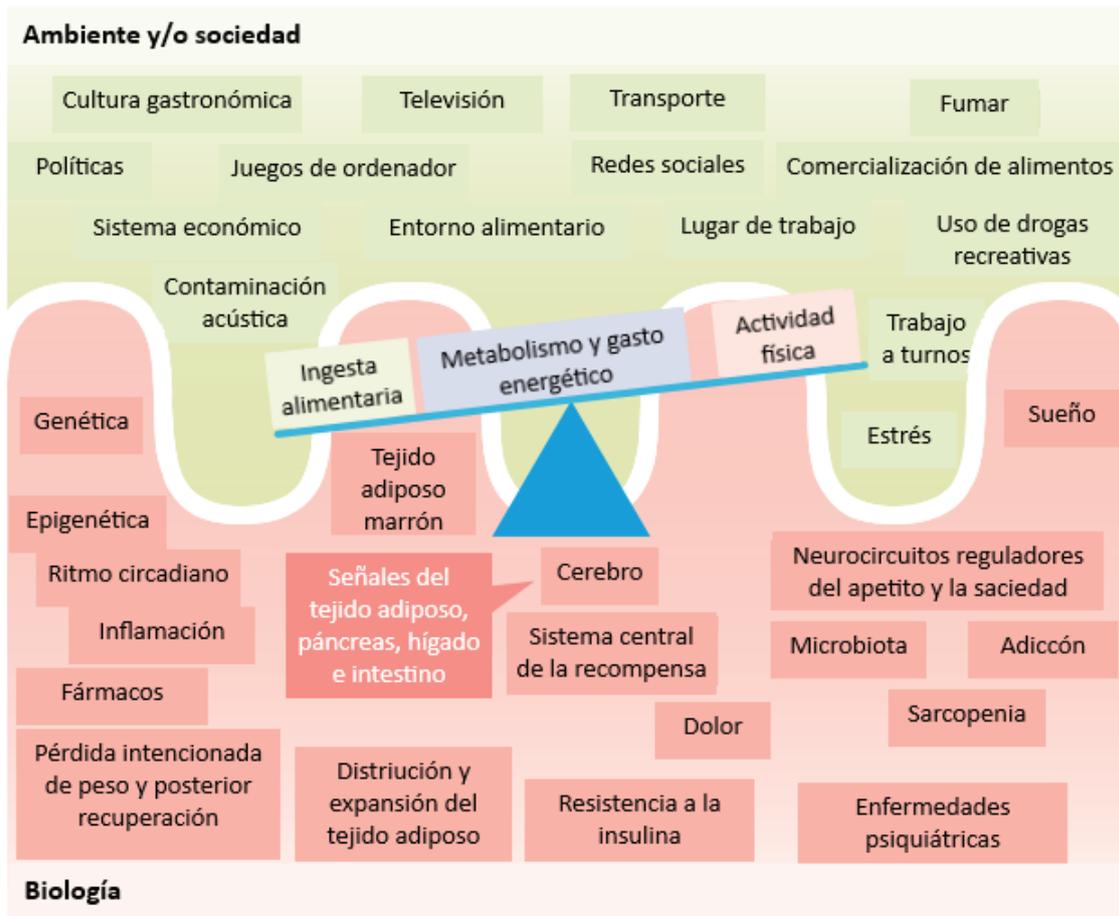


Figura 5. Factores biológicos, ambientales y sociales que contribuyen a la obesidad.

Figura adaptada de Blüher, 2019 (5).

En global, son los factores individuales, tales como la predisposición genética o la regulación central y periférica del apetito, los que condicionan la susceptibilidad a desarrollar obesidad, la cual tiene lugar en un ambiente obesogénico condicionado por factores socioeconómicos (5).

Aunque se conoce la importancia de la base genética de la obesidad por estudios familiares (13), se estima mediante estudios de asociación genómica (*genome-wide association studies*, GWAS) que las variantes genéticas asociadas a obesidad solo contribuyen a una pequeña proporción de la variabilidad del índice de masa corporal (IMC) (6%–11%) (14), por lo que se sugiere que la base genética incrementa el riesgo de desarrollar obesidad en presencia de condiciones ambientales obesogénicas (15). En la mayoría de los individuos, la predisposición genética a la obesidad presenta una base poligénica por el efecto adicional de variantes en

Introducción

múltiples genes. Sin embargo, un bajo porcentaje es debido a causas monogénicas y sobre todo en la obesidad con inicio en la infancia. Entre los genes identificados, la mayoría se localizan en el sistema de la leptina-melanocortina, la cual interviene en la regulación de la ingesta de alimentos y el balance energético: leptina (*Lep*), receptor de la leptina (*Lepr*), receptor de la melanocortina 4 (*Mc4r*), proteína accesoria del receptor de melanocortina 2 (*Mrap2*), prohormona convertasa 1 (*Pcsk1*) y proopiomelanocortina (*Pomc*), entre otros (16).

En la etiopatogenia de la obesidad también tiene lugar una desregulación homeostática y hedónica del balance energético. A nivel homeostático o fisiológico, el apetito/saciedad está regulado mediante mecanismos centrales, es decir, neuronas que expresan péptidos orexigénicos y anorexigénicos, y mecanismos periféricos. Entre las señales periféricas de origen gastrointestinal que regulan la saciedad incluyen las hormonas colecistoquinina (CCK), péptido similar al glucagón tipo 1 (GLP-1), péptido YY (PYY), entre otras, en cambio el apetito está promovido por hormonas como la ghrelina. Además, en la regulación del balance energético también intervienen señales periféricas procedentes del tejido adiposo, como la leptina y la adiponectina, y de las células beta pancreática como la insulina (1,17) **(Figura 6)**. Todas estas señales periféricas hormonales actúan sobre el sistema nervioso central, específicamente sobre el núcleo del tracto solitario del tronco cerebral y el núcleo arcuato del hipotálamo. En este último se sitúan neuronas orexígenas y anorexígenas que desencadenan una respuesta neuronal, dando lugar a cambios en la respuesta alimentaria y en el gasto energético. En individuos sanos, en condiciones de balance energético negativo, se produce una reducción de las concentraciones plasmáticas de leptina (hormona anorexígena secretada por el tejido adiposo) que conduce a la activación de neuronas orexígenas que expresan el neuropéptido Y (NPY) y la proteína relacionada con el Agouti (AGRP) y a la inhibición de neuronas anorexígenas que expresan proopiomelanocortina (POMC), siendo el resultado final un aumento de la ingesta y una disminución del gasto energético; y en condiciones de balance energético positivo se produce el proceso contrario (6) **(Figura 7)**. En la obesidad se altera este

mecanismo de control neuroendocrino que regula el apetito, afectando al gasto y la ingesta energética. Específicamente, la obesidad se caracteriza por una reducción de la señalización serotoninérgica y dopaminérgica a nivel cerebral y una desregulación del *feedback* nutricional que incluye la reducción del gusto y olfato, la atenuación postprandial de la disminución de ghrelina y aumento de las hormonas anorexigénicas, el aumento de las concentraciones plasmáticas y resistencia a la leptina e insulina, la disminución de concentraciones de adiponectina, así como la contribución de la microbiota intestinal y de los ritmos circadianos (16). A nivel hedónico, hormonas como la leptina, ghrelina e insulina se han implicado en el circuito cerebral de la recompensa a la comida, producido por alimentos apetecibles ricos en azúcares y grasas (17,18).

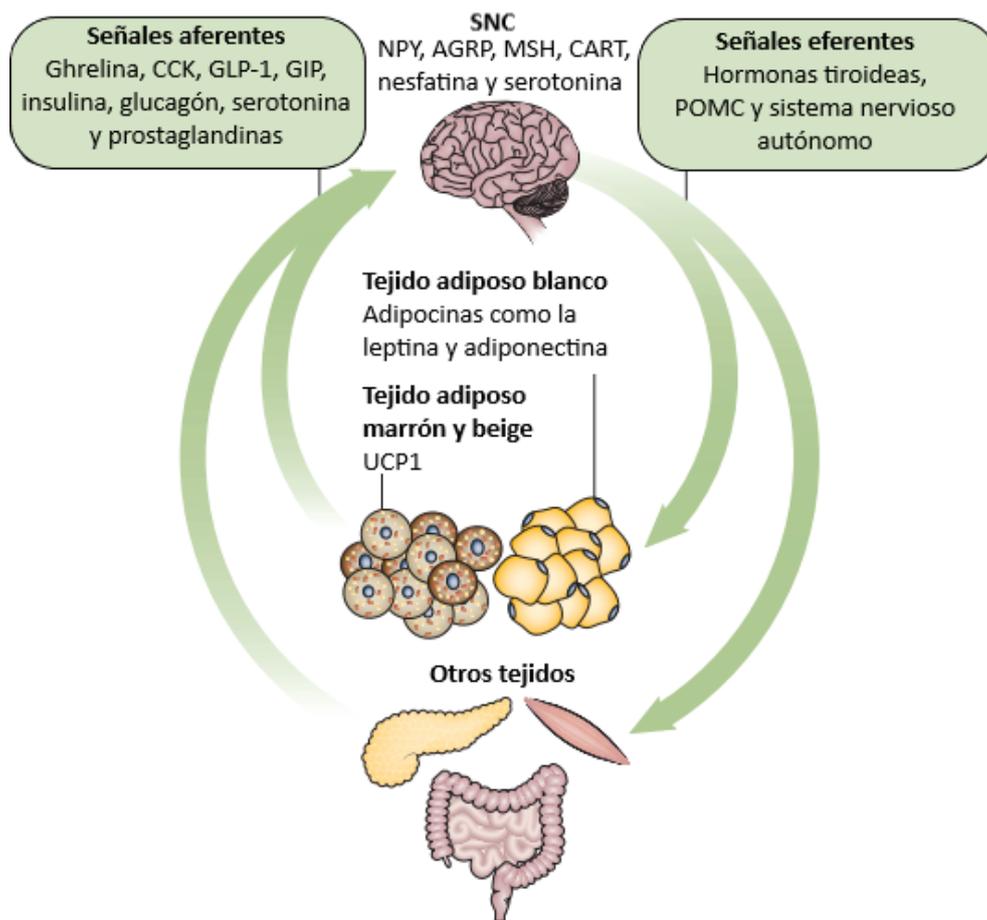


Figura 6. Control del apetito y la saciedad.

Figura adaptada de González-Muniesa et al., 2017 (1). AGRP, proteína relacionada con el Agouti; CART, transcripción regulada de cocaína y anfetamina; CCK, colecistoquinina; GIP,

polipéptido insulínico dependiente de glucosa; GLP-1, péptido similar al glucagón tipo 1; MSH, hormona estimulante de melanocitos; NPY, neuropéptido Y; POMC, proopiomelanocortina; SNC, sistema nervioso central; UCP1, termogenina.

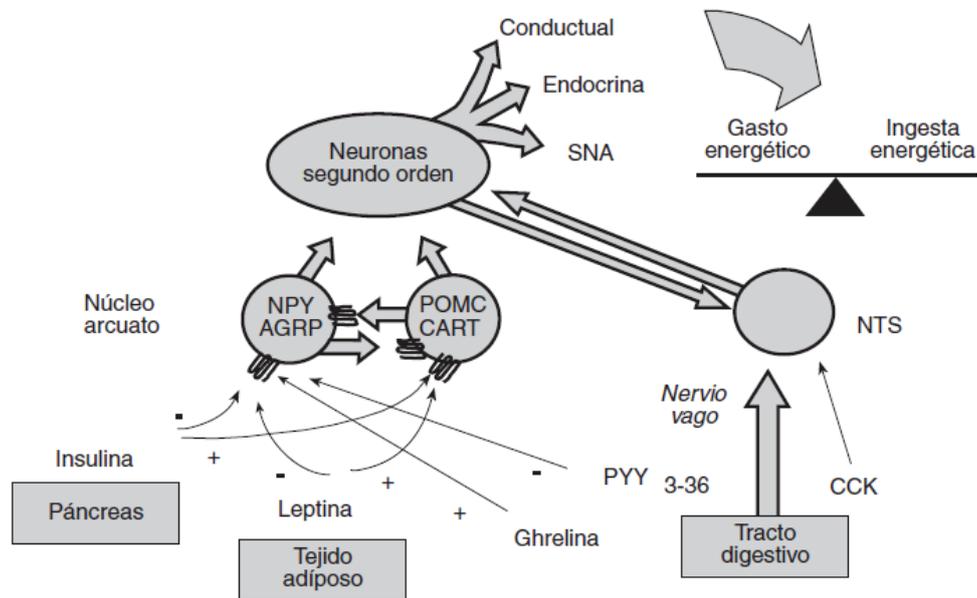


Figura 7. Mecanismos centrales y periféricos implicados en el control del peso corporal (6). AGRP, proteína relacionada con el Agouti; CART, transcripción regulada de cocaína y anfetamina; CCK, colecistoquinina; NPY, neuropéptido Y; NTS, núcleo del tracto solitario, POMC, proopiomelanocortina; PYY, péptido YY; SNA, sistema nervioso autónomo.

Por último, tanto la obesidad como las complicaciones asociadas más frecuentes están relacionadas a nivel celular y molecular con la presencia de inflamación crónica de bajo grado y estrés oxidativo (19–22). El exceso de grasa corporal en la obesidad da lugar una disfunción del tejido adiposo caracterizado por hiperplasia e hipertrofia de los adipocitos, secreción de adipocinas y citoquinas proinflamatorias, e infiltración de macrófagos seguida del cambio de fenotipo de los macrófagos de antiinflamatorio (M2) a proinflamatorio (M1) (Figura 8). Adipocitos y células inmunitarias, predominantemente macrófagos, sobreproducen adipocinas proinflamatorias, tales como el factor de necrosis tumoral α (TNF- α), proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1), interleucina-6 (IL-6), interleucina-18 (IL-18), leptina, resistina, inhibidor del activador del plasminógeno 1(PAI-1) y proteína transportadora de retinol tipo 4 (RBP4), a la

vez que reducen la secreción de adipocinas antiinflamatorias como adiponectina y proteína secretada similar a frizzle número 5 (SFRP5). Asimismo, dichos cambios en el tejido adiposo intervienen en el desarrollo de resistencia a insulina mediante la liberación de ácidos grasos libres, adipocinas, citoquinas proinflamatorias (TNF- α , IL-6), especies reactivas de oxígeno (ROS), además de otros factores y proteínas de señalización, a través de la activación de las vías del factor nuclear kappaB (NF- κ B) y de las quinasas c-Jun N-terminal (JNK), entre otras vías. En última instancia, el exceso de ácidos grasos libres procedentes de la lipólisis del tejido adiposo da lugar a lipotoxicidad e hiperlipidemia y acumulación de grasa ectópica en hígado y músculo esquelético (**Figura 9**) (1,23–27). Según lo anteriormente expuesto, estrés oxidativo e inflamación crónica de bajo grado son mecanismos subyacentes de la obesidad y sus complicaciones metabólicas (resistencia a la insulina, dislipemia e hígado graso).

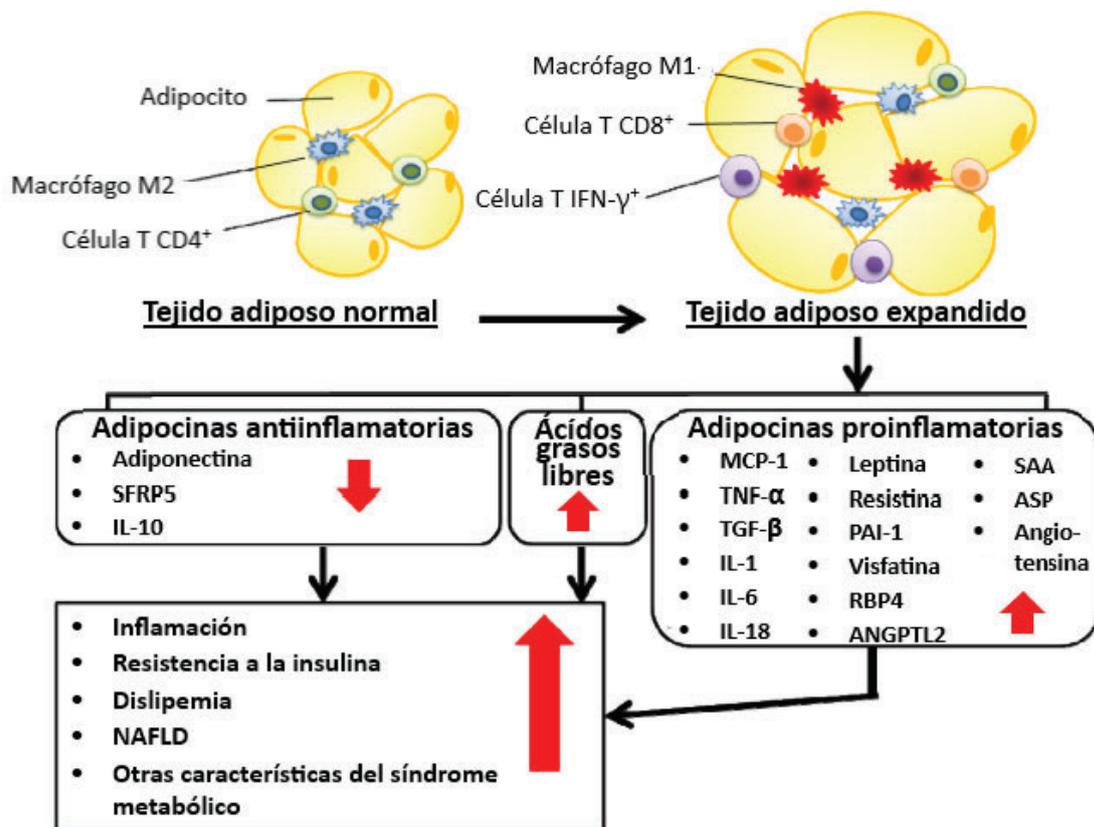


Figura 8. Disfunción del tejido adiposo asociada a la obesidad y que participa en la inflamación, resistencia a la insulina, dislipemia, MAFLD y otras características del síndrome metabólico.

Figura adaptada de Jung & Choi, 2014 (25). ANGPTL2, proteína 2 relacionada con la angiopoyetina; ASP, proteína estimulante de acilación; IL-1, interleucina-1; IL-10, interleucina-10; IL-18, interleucina-18; IL-6, interleucina-6; MCP-1, proteína quimiotáctica de monocitos 1; NAFLD, hígado graso no alcohólico; PAI-1, inhibidor del activador del plasminógeno 1; RBP4, proteína transportadora de retinol tipo 4; SAA, proteína amiloide sérica A; SFRP5, proteína secretada similar a frizzle número 5; TGF- β , factor de crecimiento transformante beta; TNF- α , factor de necrosis tumoral α .

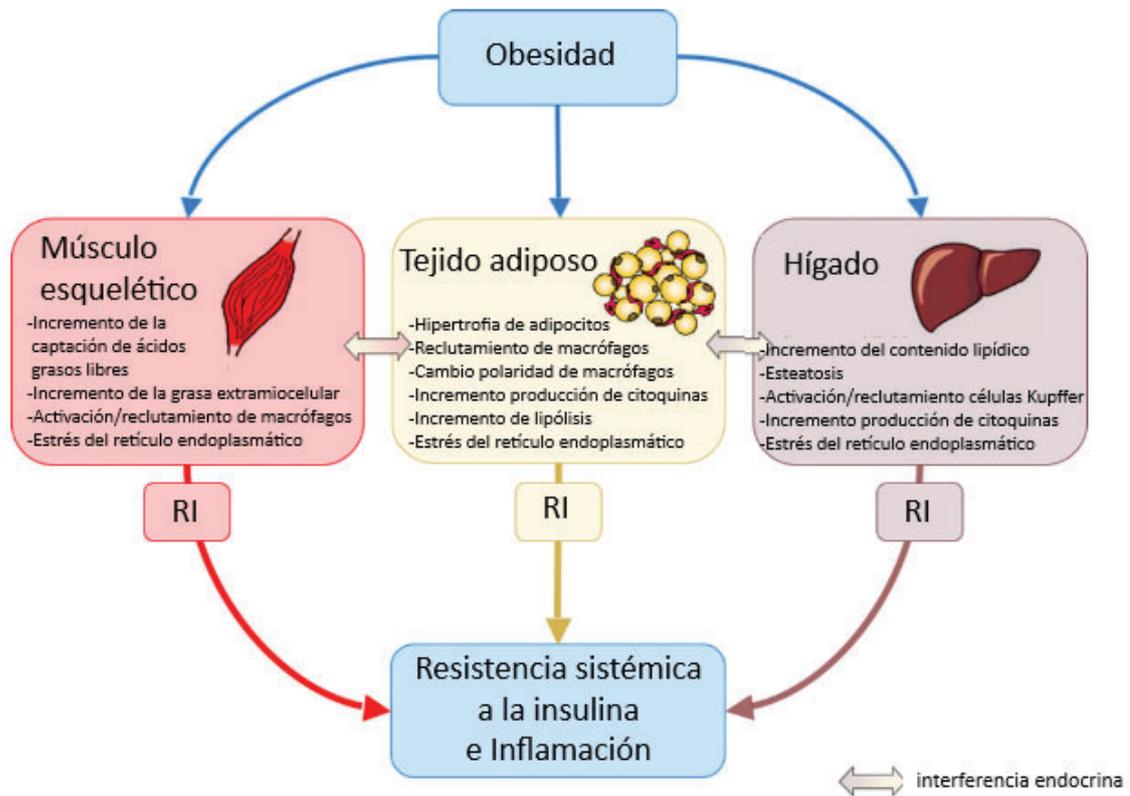


Figura 9. Interacción entre tejido adiposo, músculo e hígado en la obesidad: contribución al desarrollo de inflamación y resistencia a la insulina.

Figura adaptada de de Luca & Olefsky, 2008 (27). RI, resistencia a la insulina.

1.4. Diagnóstico

La obesidad se define por un aumento de grasa corporal. La medición directa de la grasa corporal se realiza por métodos poco accesibles y difíciles de incorporar a la práctica diaria, por lo que se recurre a estimaciones de la grasa corporal a partir de datos antropométricos como el IMC. No obstante el diagnóstico únicamente basado en el IMC presenta limitaciones al no identificar la distribución ni funcionalidad de la grasa corporal. Por este motivo, diferentes sociedades han propuesto el término “Enfermedad crónica basada en la adiposidad” (*Adiposity-based chronic disease; ABCD*) y plantean una nueva clasificación diagnóstica que

incluya la fisiopatología, el grado de adiposidad, el riesgo para la salud y el nivel de gravedad de las complicaciones(28).

El IMC, peso (kg) dividido por altura al cuadrado (m^2), se utiliza para determinar el estado ponderal y clasificar los grados de obesidad (2). En adultos, la obesidad se diagnostica con un $IMC \geq 30 \text{ kg/m}^2$ y la presencia de sobrepeso con un IMC entre 25 - 29,9 kg/m^2 (**Tabla 2**). El IMC es de utilidad para estimar la prevalencia de obesidad a nivel poblacional. Sin embargo, no constituye una medida de la grasa corporal ni de su distribución corporal, por lo que puede no ser aplicable en todos los individuos y/o poblaciones (7).

Categoría	IMC (kg/m^2)
Peso insuficiente	< 18,5
Normopeso	18,5 – 24,9
Sobrepeso o pre-obesidad	25,0 – 29,9
Obesidad grado 1	30,0 – 34,9
Obesidad grado 2	35,0 – 39,9
Obesidad grado 3	$\geq 40,0$

Tabla 2. Categorías del estado ponderal según los criterios de la OMS (7).
IMC, índice de masa corporal.

Los individuos con un exceso de grasa intraabdominal presentan un mayor riesgo de enfermedad metabólica y cardiovascular. Por este motivo se utiliza la medida del perímetro abdominal o circunferencia de la cintura como indicador de la grasa visceral intraabdominal para identificar aquellos pacientes con obesidad y un alto riesgo de comorbilidades cardiometabólicas (7). En población de origen europeo la obesidad central se define con una circunferencia de cintura $\geq 94 \text{ cm}$ en hombres y $\geq 80 \text{ cm}$ en mujeres (29). Si la circunferencia de cintura es $\geq 102 \text{ cm}$ en hombres y $\geq 88 \text{ cm}$ en mujeres, existe un mayor riesgo relativo de diabetes, hipertensión arterial y enfermedad cardiovascular (6).

En el examen físico del paciente se recomienda medir el peso y altura, para el cálculo del IMC anteriormente mencionado, medir la circunferencia de la cintura y presión arterial, así como

Introducción

evaluar la presencia e contribución de comorbilidades asociadas a la obesidad (diabetes, hipertensión, dislipemia, enfermedades cardiovasculares, respiratorias y articulares, MAFLD, alteraciones del sueño, etc). Además es importante recoger la historia clínica completa del paciente obeso: antecedentes familiares, hábitos alimentarios y de actividad física, cronología del peso corporal, presencia de depresión o alteraciones emocionales, determinantes genéticos, hormonales, psicosociales o farmacológicos que pueden contribuir a la obesidad, tratamientos previos y las expectativas y motivaciones al cambio (2,6,28).

El diagnóstico se complementa con la determinación analítica de glucemia, perfil lipídico, función hepática, renal y tiroidea, metabolismo del calcio y del hierro, proteína C reactiva, y una evaluación cardiovascular y/o pruebas de imagen o funcionales en caso que sean necesarias para el diagnóstico de las complicaciones asociadas a la obesidad (2,6,28,30).

Por último, aunque la determinación de la composición corporal por métodos diferentes al antropométrico no es requisito para el diagnóstico de la obesidad, en la práctica clínica puede ser una herramienta útil para medir la eficacia del tratamiento. Entre las técnicas que se pueden utilizar se encuentran métodos de imagen (absorciometría con rayos X de doble energía), densitometría (pletismografía por desplazamiento de aire) y el análisis de impedancia bioeléctrica (1,2).

1.5. Estrategias terapéuticas

El tratamiento de la obesidad está basado en la reducción de peso mediante modificaciones del estilo de vida del paciente, farmacoterapia y/o procedimientos quirúrgicos (2,31,32).

El objetivo de pérdida de peso debe ser realista e individualizado con la finalidad de promover la reducción del peso y su mantenimiento a largo plazo. Según las guías europeas (2,33) para el manejo de la obesidad aconsejan una pérdida de peso del 5-15% del peso total en un periodo de 6 meses o bien 0,5-1,0 kg/semana. Con este objetivo se implementarán cambios en el estilo

de vida del paciente, mediante introducción de una alimentación hipocalórica pautada, un incremento de la actividad física y una modificación de la conducta del paciente. Los cambios de la dieta implementados buscan reducir la ingesta en 500-1000 kcal/día. Las dietas centradas en un macronutriente, como las dietas bajas en grasas, bajas en carbohidratos o con alto contenido proteico, no han demostrado ser más eficaces que una dieta hipocalórica equilibrada, excepto en las dietas con bajo contenido glucémico a corto plazo. En nuestro entorno, se recomienda la dieta mediterránea hipocalórica, la cual ha demostrado reducir los eventos cardiovasculares (28,34). Por otro lado, se recomienda incorporar ejercicio aerobio moderado, al menos 150 min/semana, combinado con 1-3 sesiones/semana de ejercicios de resistencia. Para conseguir una mayor eficacia del tratamiento dietético/ejercicio se puede complementar con terapias cognitivas conductuales y/o soporte psicológico por parte de los especialistas correspondientes.

El tratamiento farmacológico se añade en aquellos pacientes con un IMC ≥ 30 kg/m² o con un IMC ≥ 27 kg/m² y comorbilidades asociadas (2,35). Se debe evaluar la eficacia del tratamiento a los 3 meses: si se ha producido una pérdida de peso $>5\%$ en pacientes no diabéticos o $>3\%$ en pacientes diabéticos se recomienda continuar el tratamiento, en cambio en los no-respondedores se aconseja su interrupción (2). En la **Tabla 3** se muestran las opciones farmacológicas disponibles en Europa y Estados Unidos (2,36). Entre los mecanismos de acción de la farmacoterapia destacan la reducción de la absorción de grasas de la dieta (orlistat), la supresión del apetito a través de la activación de distintas vías centrales (lorcaserina, fentermina/topiramato, bupropion/naltrexona), y la analogía del péptido anorexígeno GLP-1 (liraglutida). Específicamente, en Europa se encuentran comercializados orlistat, liraglutida y la combinación bupropión/naltrexona (28,33). Recientemente este año 2021 la FDA ha aprobado la utilización de la semaglutida para el tratamiento de la obesidad, aunque en Europa solo está aprobada para el tratamiento de la diabetes tipo 2. Otras opciones farmacológicas se están evaluando en ensayos clínicos para el tratamiento de la obesidad, tales como tesofensina,

Introducción

bupropión/zonisamida, exenatida, cetilistat, beloranib, RM-493, KD026, y etabonato de remoglifozina (17).

Adicionalmente, en aquellos pacientes con un IMC ≥ 40 kg/m² o con un IMC $\geq 35,0$ kg/m² y comorbilidades asociadas, el tratamiento se puede complementar con opciones quirúrgicas (2,28,35). La cirugía bariátrica mejora las alteraciones metabólicas en pacientes obesos, consiguiendo una remisión de la diabetes a corto y medio plazo, por este motivo las guías clínicas europeas y americanas también consideran la cirugía bariátrica como opción terapéutica en pacientes con un IMC 30,0 - 34,9 kg/m² y diabetes tipo 2 (2,35).

También es importante considerar en el manejo del paciente obeso el tratamiento de aquellas alteraciones metabólicas y comorbilidades asociadas: dislipemia, diabetes tipo 2, hipertensión, apnea del sueño, osteoartritis y afectaciones psicosociales derivadas de la obesidad (2).

Cabe recordar que la obesidad es una enfermedad prevenible, por lo que serán de vital importancia aquellas intervenciones que motiven cambios conductuales (educación, promoción de la salud, márketing social e iniciativas para un estilo de vida más sano) y estrategias de prevención mediante acciones legales, regulatorias y/o políticas para reducir las causas principales de obesidad (por ejemplo, impuestos en las bebidas azucaradas o prohibición de la publicidad de alimentos no saludables dirigida a población infantil) (5).

Por último, dado la complejidad de factores biológicos, ambientales y sociales que contribuyen a la obesidad son necesarios no solo cambios a nivel individual y social, sino también tratamientos eficaces y seguros para los pacientes obesos. Sin embargo, las estrategias terapéuticas actuales muestran una baja efectividad y/o efectos adversos indeseables y la cirugía bariátrica no está exenta de riesgos (37,38). Por este motivo son necesarias nuevas estrategias terapéuticas centradas, no solo en la pérdida de peso, sino también en la normalización de las alteraciones metabólicas asociadas.

Fármaco	Aprobación	Mecanismo de acción	Advertencias y precauciones	Contraindicaciones	Efectos adversos
Orlistat	FDA y EMA	Inhibidor de lipasas gastrointestinales	Hepatitis, fallo hepático (raro), se recomienda coadministrar complejos multivitamínicos	Embarazo, lactancia, síndrome de malabsorción crónico, colestasis	Disminución de la absorción de vitaminas liposolubles, esteatorrea, urgencia fecal
Lorcaserina	FDA	Agonista selectivo 5-HT _{2c}	Síndrome serotoninérgico, deterioro cognitivo, depresión, valvulopatía, hipoglucemia, priapismo	Embarazo, lactancia, utilizar con precaución con IMAO, ISRS y IRSN	Dolor de cabeza, náuseas, boca seca, mareo, fatiga, estreñimiento
Fentermina/ Topiramato	FDA	Liberación de noradrenalina (fentermina) y modulación del GABA (topiramato)	Toxicidad fetal, miopatía aguda, deterioro cognitivo, acidosis metabólica, hipoglucemia	Embarazo, lactancia, glaucoma, hipertiroidismo, utilizar con precaución con IMAO	Insomnio, boca seca, estreñimiento, parestesia, mareo, disgeusia
Bupropión/ Naltrexona	FDA y EMA	Inhibidor de la recaptación de dopamina y noradrenalina (bupropión) y antagonista opioide (naltrexona)	Toxicidad fetal, mayor riesgo de convulsiones, glaucoma, hepatotoxicidad	Hipertensión no controlada, convulsiones, anorexia nerviosa y bulimia, abstinencia de drogas y alcohol, utilizar con precaución con IMAO	Nauseas, estreñimiento, dolor de cabeza, vómitos, mareo
Liraglutida	FDA y EMA	Agonista GLP-1	Pancreatitis aguda, colecistitis aguda	Historia de cáncer medular de tiroides o MEN tipo 2	Náuseas, vómitos, pancreatitis
Semaglutida	FDA	Agonista GLP-1	Pancreatitis aguda, retinopatía diabética	Historia de cáncer medular de tiroides o MEN tipo 2	Náuseas, diarrea, vómitos, pancreatitis

Tabla 3. Farmacoterapia de la obesidad.

Tabla adaptada de Yumuk et al., 2015 (2), modificada con la reciente aprobación de la semaglutida (36). 5-HT_{2c}, receptor 2c de la serotonina; EMA, Agencia Europea del Medicamento; FDA, Administración de Alimentos y Medicamentos; GLP-1, péptido similar al glucagón tipo 1; IMAO, inhibidores de la monoaminoxidasa; IRSN, inhibidores de la recaptación de serotonina y noradrenalina; ISRS, inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina; MEN, neoplasia endocrina múltiple.

2. Dislipemia

2.1. Definición

La dislipemia asociada a la obesidad se caracteriza por el aumento de las concentraciones plasmáticas de TG y ácidos grasos libres, la reducción del colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad (cHDL) junto con disminución de su función anti-aterogénica, y concentraciones normales o ligeramente elevadas de colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad (cLDL) junto con un incremento de LDL pequeñas y densas (sdLDL, *small dense* LDL) (39,40).

La presencia de dislipemia está estrechamente asociada a un mayor riesgo de enfermedad cardiovascular. Concentraciones elevadas de cLDL están relacionadas con un incremento del riesgo cardiovascular, tanto por la cantidad de cLDL como por el tiempo de exposición a éste, debido a que la apolipoproteínas B (Apo B) típicas de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) favorecen la formación de la placa aterosclerótica. Por este motivo, el objetivo terapéutico será mantener baja la concentración de cLDL y otras lipoproteínas-Apo B para minimizar la progresión de las placas ateroscleróticas (41). En cambio, el cHDL ejerce un efecto protector a nivel cardiovascular (42).

Aunque en esta tesis hablaremos de la dislipemia asociada a la obesidad, cabe recordar que también puede estar presente en individuos con peso normal. En este caso el perfil lipídico se diferenciará del paciente obeso por el ligero incremento de TG y leve reducción de cHDL junto con el predominio de cLDL elevado (**Tabla 4**) (39).

	Normopeso	Obesidad
CT	↔	↔
cLDL	↑	↔/↑
cHDL	↓	↓↓
TG	↑	↑↑
sdLDL	↑	↑

Tabla 4. Perfil lipídico en pacientes con alteración metabólica.

Tabla adaptada de Vekic et al., 2019 (39).

cHDL, colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad; cLDL, colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad; CT, colesterol total; sdLDL, LDL pequeñas y densas (*small dense* LDL); TG, triglicéridos.

2.2. Epidemiología

Según datos de la OMS, el 2008 el 56,1% de la población española mayor de 25 años presentaba concentraciones elevadas de colesterol total (CT) (≥ 5 mmol/l), siendo mayor la prevalencia en hombres que en mujeres (58,9% respecto 52,9%)(11).

Los pacientes con obesidad presentan una mayor de prevalencia de dislipemia comparado con individuos normopesos. En el estudio NHANES realizado de 2007-2010 en Estados Unidos reportaban una mayor prevalencia de dislipemia en pacientes con obesidad (49,7%), seguido de sobrepeso (44,2%) y normopeso (28,6%). Además, la prevalencia de dislipemia en pacientes obesos era mayor comparado con otros factores de riesgo cardiovascular: la mitad de pacientes obesos tenían dislipemia, mientras solo el 35,7% presentaba hipertensión y el 18,5% diabetes (43).

2.3. Patogénesis

En pacientes obesos, la hipertrigliceridemia característica de la dislipemia es producida por la liberación de abundantes ácidos grasos libres procedentes de la lipólisis del tejido adiposo, que serán conducidos al hígado para la síntesis de TG (**Figura 10**). A nivel hepático, se produce la acumulación de TG y sobreproducción de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL). Las VLDL compiten con los quilomicrones por la lipoproteína lipasa (LPL), dando lugar a un incremento

Introducción

de TG remanentes, es decir, lipoproteínas de densidad intermedia (IDL) y LDL, que son transportadas al hígado. En la obesidad la lipólisis estará alterada, debido a una menor expresión de LPL en tejido adiposo y músculo esquelético. El incremento de TG también induce un incremento del intercambio de ésteres de colesterol (CE) y TG entre VLDL, lipoproteínas de alta densidad (HDL) y LDL a través la proteína de transferencia de éster de colesterol (CETP), disminuyendo la cHDL. Por último, se produce un incremento de las sdLDL por la acción de la lipasa hepática, la cual reduce el contenido de TG y fosfolípidos de las LDL (4).

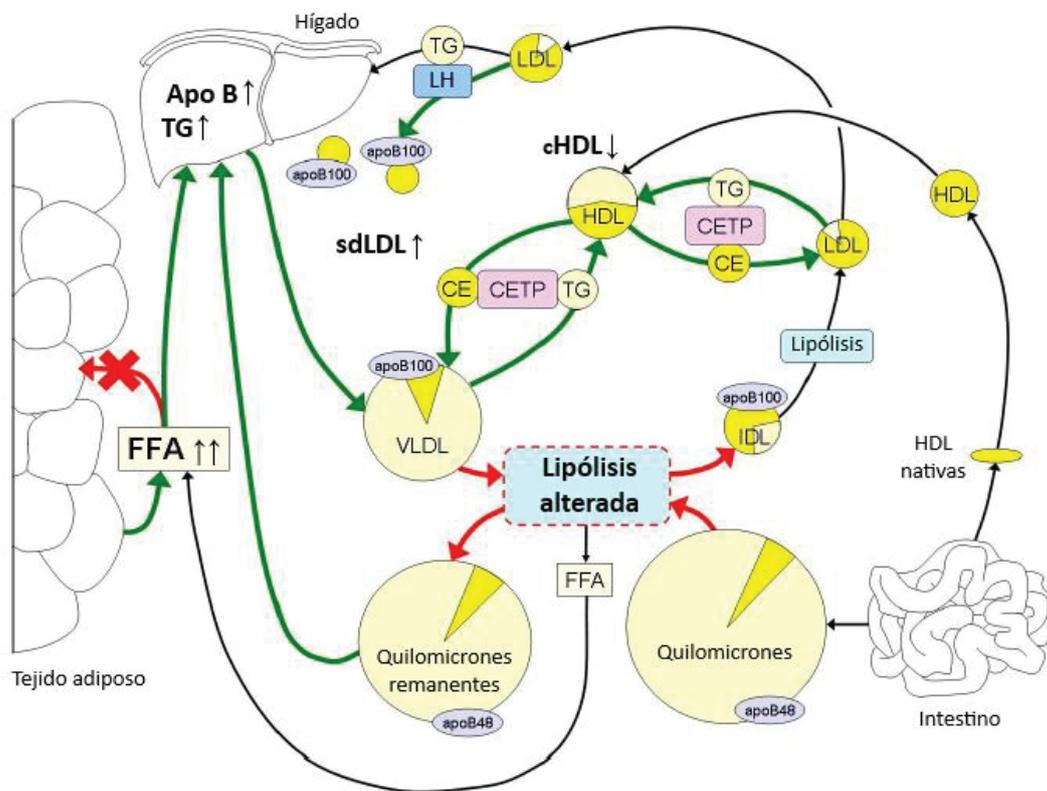


Figura 10. Alteración del metabolismo lipídico en la obesidad.

Figura adaptada de Klop et al., 2013 (4). Apo B, apolipoproteína B; CE, ésteres de colesterol; CETP, proteína de transferencia de éster de colesterol; cHDL, colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad; FFA, ácidos grasos libres (*free fatty acids*); HDL, lipoproteínas de alta densidad; IDL, lipoproteínas de densidad intermedia; LDL, lipoproteínas de baja densidad; LH, lipasa hepática; LPL, lipoproteína lipasa; sdLDL, LDL pequeñas y densas (*small dense LDL*); VLDL, lipoproteínas de muy baja densidad; TG, triglicéridos.

Según lo anteriormente mencionado, la hipertrigliceridemia contribuye a la reducción de las concentraciones de cHDL. No obstante, otras causas implicadas en la disminución de cHDL son

la presencia de inflamación crónica, la alteración de la actividad de CETP e inducción de resistencia a la insulina por parte de los ácidos grasos libres y la disminución de la capacidad de transporte reverso del colesterol debido a la disfunción del tejido adiposo marrón (44).

En el tejido adiposo, además de aumentar la lipólisis, tiene lugar una disfunción de la proteína estimulante de la acilación (ASP o C3adesArg) que puede contribuir a la dislipemia mediante la síntesis y almacenamiento de TG en los adipocitos (4).

En la patogénesis de la dislipemia intervienen las adipocinas y citoquinas secretadas por el tejido adiposo. En concreto, la leptina, TNF- α y IL-6 presentan un efecto lipolítico, y la resistina incrementa la producción de VLDL y disminuye la expresión hepática del receptor LDL. Por otro lado, la adiponectina, cuya concentración está disminuida en la obesidad, promueve la oxidación de los ácidos grasos (39). Otra variable que contribuye al desarrollo de dislipemia en la obesidad es la resistencia a la insulina, producida por el aumento del flujo hepático de ácidos grasos procedentes de la dieta y de la lipólisis del tejido adiposo, así como el aumento de citoquinas proinflamatorias derivadas de los ácidos grasos libres (4). Finalmente la hipertrofia de los adipocitos del tejido adiposo visceral también está asociada con dislipemia, independientemente de la composición corporal y distribución de grasa en pacientes obesos (45).

Por último, cabe destacar el papel del ácido palmítico (PA), ácido graso saturado cuya concentración plasmática está más elevada en pacientes obesos, en la respuesta inflamatoria vía la activación del receptor tipo Toll 4 (TLR4) (**Figura 11**). La activación de TLR4, directamente por el PA o indirectamente por la sobreproducción de lipopolisacárido (LPS), da lugar a la transducción de diversas señales proinflamatorias a través de la inducción de la vía de NF- κ B o la activación del factor regulador de interferón 3 (IRF3). Además, el incremento de PA conlleva la inducción de resistencia a la insulina a través del reclutamiento y activación de los

macrófagos y la sobreproducción de citoquinas proinflamatorias tales como el TNF- α (Figura 12) (46).

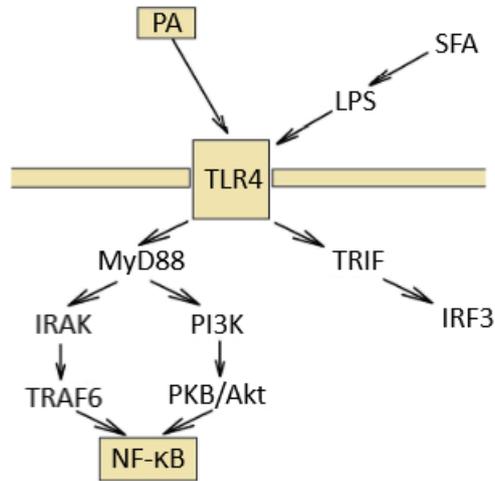


Figura 11. Activación del receptor TLR4 por el ácido palmítico y vía de señalización.

Figura adaptada de Korbecki & Bajdak-Rusinek, 2019 (46). IRAK, cinasa asociada al receptor de IL-1; IRF3, factor regulador de interferón 3; LPS, lipopolisacárido; MyD88, factor de diferenciación mieloide 88; NF- κ B, factor nuclear kappaB; PA, ácido palmítico; PI3K, fosfatidilinositol 3-quinasa; PKB/Akt, RAC-alfa serina / treonina-proteína quinasa; SFA, ácidos grasos saturados; TLR4, receptor tipo Toll 4; TRAF6, factor asociado al receptor de TNF; TRIF, adaptador que contiene el dominio del receptor Toll/IL-1 e induce IFN- β .

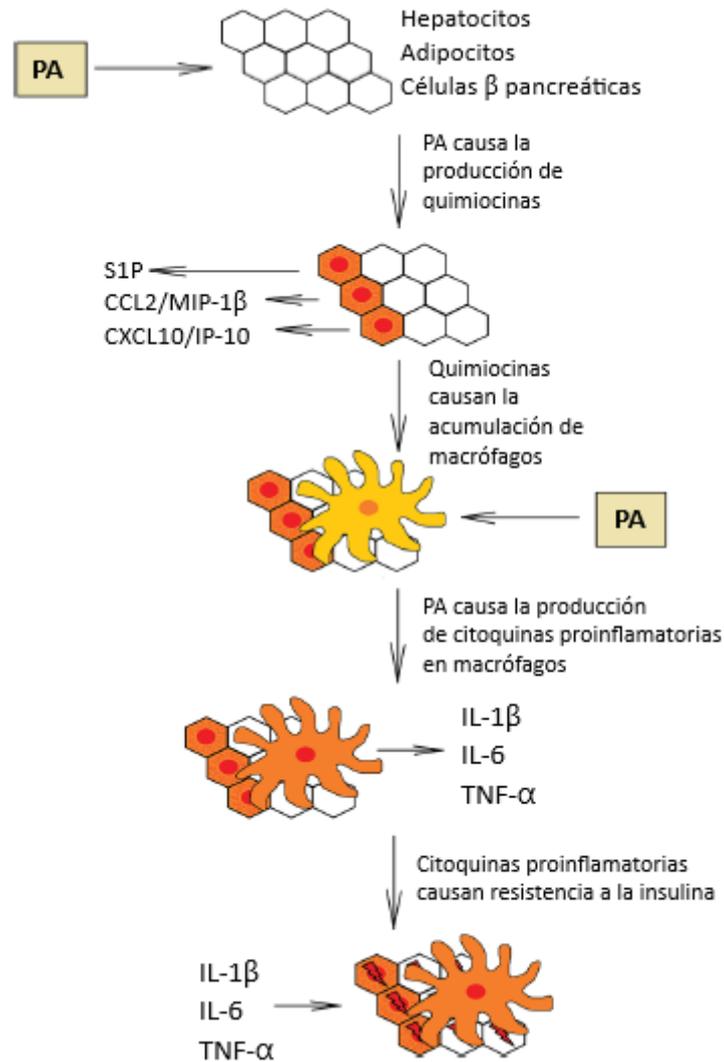


Figura 12. Papel del ácido palmítico en la inducción de la resistencia a insulina a través de la activación de macrófagos.

Figura adaptada de Korbecki & Bajdak-Rusinek, 2019 (46). CCL2/MIP-1β, proteína quimioatractora de monocitos 1/proteína inflamatoria macrofágica-1β; CXCL10/IP-10, ligando 10 de quimiocina con motivo CXC; IL-1β, interleucina-1β; IL-6, interleucina-6; PA, ácido palmítico; S1P, esfingosina-1-fosfato; TNF-α, factor de necrosis tumoral α.

2.4. Diagnóstico

El diagnóstico de la dislipemia se basa en el análisis del perfil lipídico en el laboratorio: TG, CT, cHDL y cLDL.

Con la finalidad de evaluar el riesgo cardiovascular, es de utilidad la determinación de Apo B, presente mayoritariamente en las lipoproteínas VLDL, IDL y LDL, ya que interviene en el inicio y

Introducción

progresión de la aterosclerosis y su cuantificación permite calcular directamente el número de partículas aterogénicas en el plasma. Sin embargo, en la práctica clínica se utiliza la determinación del CT, cHDL y TG, todos ellos utilizados para el cálculo de la concentración de cLDL mediante la fórmula de Friedewald: $cLDL (mg/dl) = CT - cHDL - (TG/5)$. El cLDL calculado presenta una serie de limitaciones debido a la posible acumulación de errores por la determinación de las tres variables, la infraestimación cuando la concentración de TG es elevada y la poca fiabilidad de la fórmula si la muestra no se obtiene en ayunas. Por este motivo también se utiliza la determinación directa del cLDL mediante técnicas enzimáticas o ultra centrifugación (47).

En concreto, en el cálculo del riesgo cardiovascular mediante las tablas SCORE incluyen el CT como factor de riesgo, además de edad, sexo, consumo de tabaco y presión arterial sistólica. En función de la estimación SCORE, el riesgo cardiovascular se clasifica en bajo (<1%), moderado (≥ 1 a <5%), alto (≥ 5 a <10%), y muy alto ($\geq 10\%$). No obstante, la presencia de enfermedad cardiovascular aterosclerótica, diabetes mellitus, enfermedad renal y otros factores de riesgo, contribuyen también el riesgo cardiovascular. En general, presentar un CT > 310 mg/dl (> 8 mmol/l) y cLDL > 190 mg/dl (> 4,9 mmol/l) da lugar a un riesgo cardiovascular alto (47).

En conclusión, para la evaluación de la dislipemia y el riesgo cardiovascular asociado se recomienda el análisis sistemático de CT, cHDL, cLDL y TG. Además, se recomienda la determinación de Apo B como alternativa al cLDL en aquellos pacientes con TG elevados, diabetes, obesidad, síndrome metabólico o con cLDL muy bajo. Por último la cuantificación de lipoproteína A (partícula LDL con apolipoproteína A unida a Apo B), la cual evalúa el riesgo de enfermedad cardiovascular, es aconsejable al menos una vez a la vida para identificar aquellos pacientes con riesgo hereditario de enfermedad cardiovascular aterosclerótica (47).

2.5. Estrategias terapéuticas

El tratamiento de la dislipemia se fundamenta en primer lugar en la modificación del estilo de vida del paciente mediante incorporación de una dieta saludable con bajo contenido en grasas saturadas y rica en alimentos integrales, verduras, frutas y pescado, acompañada de un aumento de la actividad física (47).

En función del riesgo cardiovascular total y la concentración de cLDL y TG se recomienda iniciar la farmacoterapia (**Tabla 5**). El objetivo lipídico del tratamiento farmacológico de la hipercolesterolemia dependerá del riesgo cardiovascular: reducción $\geq 50\%$ del valor basal de cLDL, cLDL < 55 mg/dl y colesterol no-HDL < 85 mg/dl en pacientes con riesgo muy alto; reducción $\geq 50\%$ del valor basal de cLDL, cLDL < 70 mg/dl y colesterol no-HDL < 100 mg/dl en pacientes con riesgo alto; cLDL < 100 mg/dl y colesterol no-HDL < 130 mg/dl en pacientes con riesgo moderado; y cLDL < 116 mg/dl en pacientes con riesgo bajo. El tratamiento farmacológico de la hipercolesterolemia se inicia con estatinas a la dosis máxima recomendada o tolerada, con la finalidad de reducir las concentraciones de cLDL. Si no se cumple el objetivo terapéutico de cLDL se recomienda combinar con ezetimiba, y ante falta de eficacia terapéutica de esta combinación se debería añadir un inhibidor de propteína convertasa subtilisina/kexina 9 (PCSK9). La adición del inhibidor de PCSK9 se recomienda en pacientes con riesgo muy alto de enfermedad cardiovascular o pacientes con hipercolesterolemia familiar con riesgo muy alto que no alcanzan el objetivo terapéutico con la dosis máxima tolerada de estatina y ezetimiba. Además, se puede considerar la asociación estatina y quelante de ácidos biliares si no se logra el objetivo terapéutico. Por otro lado, las estatinas también son el fármaco de primera elección en el tratamiento de la hipertrigliceridemia. En pacientes de alto riesgo en tratamiento con estatinas se debe considerar añadir una suplemento de ácidos grasos poliinsaturados n-3 cuando la concentración de TG se encuentre entre 135-499 mg/dl y la combinación con fibratos cuando cumplen el objetivo de cLDL pero los TG son > 200 mg/dl (47).

Fármaco	Mecanismo de acción	Indicación terapéutica	Efectos adversos
Estatinas	Inhibición de la síntesis de colesterol (inhibidor HMG-CoA reductasa)	Hipercolesterolemia y hipertrigliceridemia	Miopatía, leve aumento alanina aminotransferasa, mayor riesgo disglucemia y DM2, riesgo accidentes cerebrovasculares hemorrágicos. Ajuste de dosis en hepatopatía leve o insuficiencia renal.
Ezetimiba	Inhibidor de la absorción de colesterol	Hipercolesterolemia	Trastornos GI, fatiga.
Quelantes de ácidos biliares (colestiramina, colestipol, colesevelam)	Quelación de los ácidos biliares	Hipercolesterolemia	Trastornos GI: Flatulencia, estreñimiento, dispepsia y náuseas. Reducción de la absorción de vitaminas liposolubles.
Inhibidores PCSK9 (alirocumab, evolocumab)	Inhibición de PCSK9	Hipercolesterolemia	Irritación en el lugar de la inyección subcutánea, síntomas gripales, mayor riesgo DM2, desarrollo de anticuerpos a largo plazo.
Lomitapida	Inhibidor de la MTP (formación de VLDL)	Hipercolesterolemia familiar homocigota	Trastornos GI, aumento de transaminasas hepáticas.
Fibratos (fenofibrato, bezafibrato)	Agonistas del receptor PPAR- α	Hipertrigliceridemia	Trastornos GI, erupciones cutáneas, miopatía, aumento transaminasas hepáticas, colestitis, aumento creatinina y homocisteína séricas.
Ácidos grasos n-3	No está bien conocido. Interacción con PPAR- α y disminución Apo B.	Hipertrigliceridemia	Trastornos GI.

Tabla 5. Farmacoterapia de la dislipemia.

Tabla adaptada de Mach et al., 2020 (47). GI, gastrointestinales; HMG-CoA, 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A; MTP, proteína microsomal de transferencia; PCSK9, prooproteína convertasa subtilisina/kexina 9; PPAR- α , receptor alfa activado del proliferador de peroxisoma.

3. MAFLD

3.1. Definición

La enfermedad del hígado graso asociada con disfunción metabólica (MAFLD; *Metabolic Associated Fatty Liver Disease*), antiguamente nombrada hígado graso no alcohólico (NAFLD; *Non-Alcoholic Fatty Liver Disease*), se considera la manifestación hepática del síndrome metabólico, representando un amplio espectro histopatológico de enfermedad hepática que va desde esteatosis simple (NAFL, *Non-Alcoholic Fatty Liver*) hasta esteatohepatitis (NASH, *Non-Alcoholic Steatohepatitis*), fibrosis, cirrosis y carcinoma hepatocelular (CHC). La esteatosis simple está caracterizada por una acumulación hepatocelular de TG superior al 5% y la esteatohepatitis cursa además de esteatosis con inflamación lobular y *balloning* hepatocelular (48).

La mayoría de pacientes MAFLD presentan solo esteatosis hepática, mientras una minoría desarrolla NASH, la cual conlleva un mayor riesgo de progresión a estadios más avanzados de enfermedad hepática. Los pacientes con NASH pueden evolucionar a fibrosis, cirrosis e incluso presentar CHC (49,50). Mientras un paciente con hígado graso se estima que tarda 14,3 años en progresar un estadio de fibrosis, la misma progresión en un paciente con NASH es de 7,1 años (51). No obstante, la progresión de MAFLD no es lineal e irreversible, sino más bien dinámica y heterogénea, siendo posible una regresión de la enfermedad. **(Figura 13)** (52).

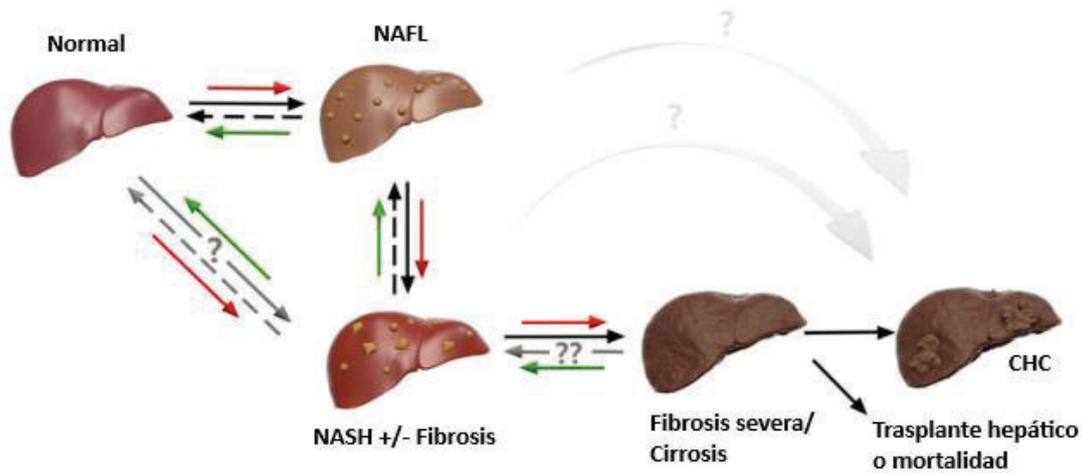


Figura 13. Espectro dinámico de la MAFLD.

Figura adaptada de Moore, 2019 (52). Las flechas de color rojo y verde indican la progresión y regresión de la enfermedad hepática, respectivamente. NAFL, esteatosis simple; NASH, esteatohepatitis; CHC, carcinoma hepatocelular.

El curso clínico de la MAFLD es heterogéneo y está condicionado por múltiples factores que se describen a continuación:

- Edad: Existe una relación entre la edad y una mayor prevalencia de MAFLD y estadio de fibrosis (53), aunque esta asociación puede estar influenciada por la duración de la enfermedad hepática más que específicamente con la edad (54).
- Sexo: El sexo femenino presenta mayor proporción de grasa corporal comparado con el sexo masculino, independientemente de la circunferencia de la cintura (55). Dada la estrecha relación de obesidad y MAFLD, algunos estudios indican un mayor riesgo de MAFLD en mujeres (56). Sin embargo, estudios recientes muestran una mayor prevalencia de MAFLD en el sexo masculino, como es el caso del estudio realizado en población española (57).
- Origen étnico: Los individuos de raza hispánica son más susceptibles a desarrollar MAFLD, seguido de los individuos de raza blanca no-hispánicos y con una menor susceptibilidad los de raza negra de procedencia africana, pudiendo contribuir factores ambientales y también polimorfismos genéticos del gen *Pnpla3* (58).

- Estilo de vida, dieta, microbiota y consumo de alcohol: El sedentarismo, una actividad física reducida y una dieta nutricionalmente pobre se han relacionado con el desarrollo o predisposición a MAFLD. El consumo de fructosa está relacionado con alteraciones de la microbiota intestinal promoviendo MAFLD (59). Por último, el consumo de alcohol, incluso a dosis bajas, está asociado con enfermedad hepática avanzada (60).
- Alteraciones metabólicas: La aparición de MAFLD está estrechamente relacionada con la presencia de obesidad, diabetes mellitus o resistencia a la insulina y síndrome metabólico. La mitad de los pacientes con MAFLD son obesos, el 23% presentan diabetes y el 69% dislipemia. La prevalencia de alteraciones metabólicas asociadas aumenta más en pacientes NASH, los cuales más del 80% son obesos, el 44% son diabéticos y el 72% presentan dislipemia (61). Particularmente, los pacientes con MAFLD presentan casi el doble de riesgo de mortalidad por enfermedad cardiovascular comparado con individuos sanos (62), siendo la enfermedad cardiovascular la causa más frecuente de mortalidad.
- Factores genéticos: La susceptibilidad genética de MAFLD está asociada principalmente a variantes de los genes *Pnpla3* (*patatin-like phospholipase domain-containing 3*) y *Tm6sf2* (*transmembrane 6 superfamily member 2*) (63–65), aunque a lo largo de los últimos años se ha descrito la contribución de otros genes (66).
- Factores epigenéticos: Existe susceptibilidad genética a MAFLD asociada a factores epigenéticos, los cuales se producen por modificación de la expresión de genes debido a factores ambientales. La identificación de estas firmas epigenéticas en el DNA circulante podría conducir a potenciales biomarcadores de progresión de MAFLD, como microRNAs que pueden explicar la discordancia de MAFLD entre gemelos genéticamente idénticos (67) y la metilación del DNA relacionada con el grado de fibrosis (68,69).

Introducción

Por lo tanto, los factores anteriormente mencionados (ambientales y genéticos) así como la microbiota intestinal y el tejido adiposo contribuyen al desarrollo de MAFLD a través de un proceso de inflamación metabólica. Es este estado de inflamación crónica la que está asociada con la aparición en manifestaciones extrahepáticas como la diabetes tipo 2, enfermedades cardiovasculares y disfunción neurocognitiva (70).

3.2. Epidemiología

La globalización de MAFLD incrementa en paralelo con la pandemia de obesidad y constituye la causa más común de enfermedad hepática crónica a nivel mundial, tanto en población adulta como en jóvenes (71).

Globalmente la prevalencia estimada de MAFLD mediante pruebas de imagen es del 25 %. Específicamente Europa presenta una prevalencia estimada de MAFLD del 23,71 %. Mundialmente, la prevalencia presenta diferencias geográficas, siendo similar en Norte América (24,13 %), mayor en Asia, Sud América y Oriente Medio (27,37 %, 30,45 % y 31,79 %, respectivamente) y menor en África (13,48 %) (61).

Específicamente en la Unión Europea, la prevalencia estimada de MAFLD es del 20-30%, con aproximadamente un 3% de pacientes en estadio NASH (61). Sin embargo, la prevalencia de MAFLD puede llegar a variar entre el 5% y el 44% en distintas zonas europeas: 34% en Países Bajos, 27% en Alemania, 26% en Gran Bretaña, 26% en España (57), 23% en Hungría y 20% en Rumanía, entre 4% y 50% en Italia, y entre 15% y 41% en Finlandia (61).

Concretamente en España, Caballería y colaboradores describieron en la provincia de Barcelona una prevalencia de MAFLD del 26%, siendo mayor en los hombres (33%) comparado con las mujeres (20%). Además del sexo masculino, otros factores asociados con MALFD eran la edad, la presencia de síndrome metabólico y resistencia a la insulina y el incremento sérico de alanina aminotransferasa (57).

Las diferencias geográficas en el consumo de alcohol y la prevalencia de hepatitis virales inciden en la distribución de la prevalencia MAFLD. El proyecto HEPAHEALTH, el cual ha estudiado la epidemiología de la enfermedad hepática en 35 países europeos, ha encontrado diferencias geográficas de causalidad: el incremento de cirrosis y CHC está vinculado a un consumo de alcohol excesivo en países del Norte de Europa en cambio la hepatitis vírica es la causa principal en países del Este y Sud de Europa (72).

Por otro lado, también son determinantes en el desarrollo de MAFLD factores de riesgo como la obesidad y diabetes tipo 2. En concreto, la incidencia en Europa se espera que aumente de forma proporcional a la epidemia de obesidad y diabetes tipo 2. Estes y colaboradores han desarrollado un modelo matemático con la finalidad de predecir la carga de la MAFLD en el periodo de 2016-2030 en China, Francia, Alemania, Italia, Japón, España, UK y Estados Unidos. Según este estudio, el aumento de obesidad y diabetes tipo 2 incrementará ligeramente la prevalencia de MAFLD hasta máximo un 30%, ocurriendo el mayor aumento en China. Globalmente, la prevalencia de NASH se estima que incremente entre el 15-56% y la mortalidad y progresión de la enfermedad hepática se estima que se doble con la edad. Según estos datos, en Europa el 2016 la mayor prevalencia de MAFLD se estimaba en Alemania, pero el año 2030 se estima que corresponda a Italia (29.5%). Referente al NASH, el 2016 la mayor proporción de casos se estimaban en Italia (22%), en cambio el año 2030 la mayor prevalencia de NASH se estima que corresponda a España (29.5%). Finalmente, en todos los países estudiados los casos de fibrosis avanzada se prevé que incrementen más que los casos leves (73).

La tendencia de incremento de la prevalencia de MAFLD en paralelo al aumento de la prevalencia mundial de obesidad y diabetes, conlleva no solo una carga clínica asociada de morbilidad y mortalidad sino también económica. Según un estudio realizado Younossi y colaboradores en 2016, se estimaba anualmente en USA más de 12 millones de nuevos casos

Introducción

de NAFL y 600.000 nuevos casos de NASH, con tendencias similares en Europa. En Estados Unidos se estimaba que había más de 64 millones de individuos con NALFD y solo en cuatro países europeos (Francia, UK, Alemania e Italia) alrededor de 52 millones de individuos con NAFLD, lo cual conllevaba una carga económica asociada alrededor de 103 billones de dólares en Estados Unidos y 35 billones de dólares en el conjunto de los cuatro países europeos. Por último, se anticipaba que el año 2025, por el incremento de los costes sanitarios y el aumento de la prevalencia de obesidad, el gasto económico asociado a MAFLD se incrementaría 10 veces (74). Dichos datos anteriormente mencionados muestran la necesidad urgente de implementar medidas para reducir las principales causas de MAFLD y obesidad.

3.3. Patogénesis

El desarrollo y progresión de MAFLD se produce por exposición de los hepatocitos a múltiples impactos, tanto factores ambientales como genéticos, que dan lugar a estrés oxidativo, inflamación, apoptosis y fibrogénesis. Según la teoría de los múltiples impactos, inicialmente la resistencia a la insulina conduce al desarrollo de esteatosis y posteriormente son otros impactos como la inflamación, estrés oxidativo y apoptosis que contribuyen al progreso de MAFLD (**Figura 14**) (75).

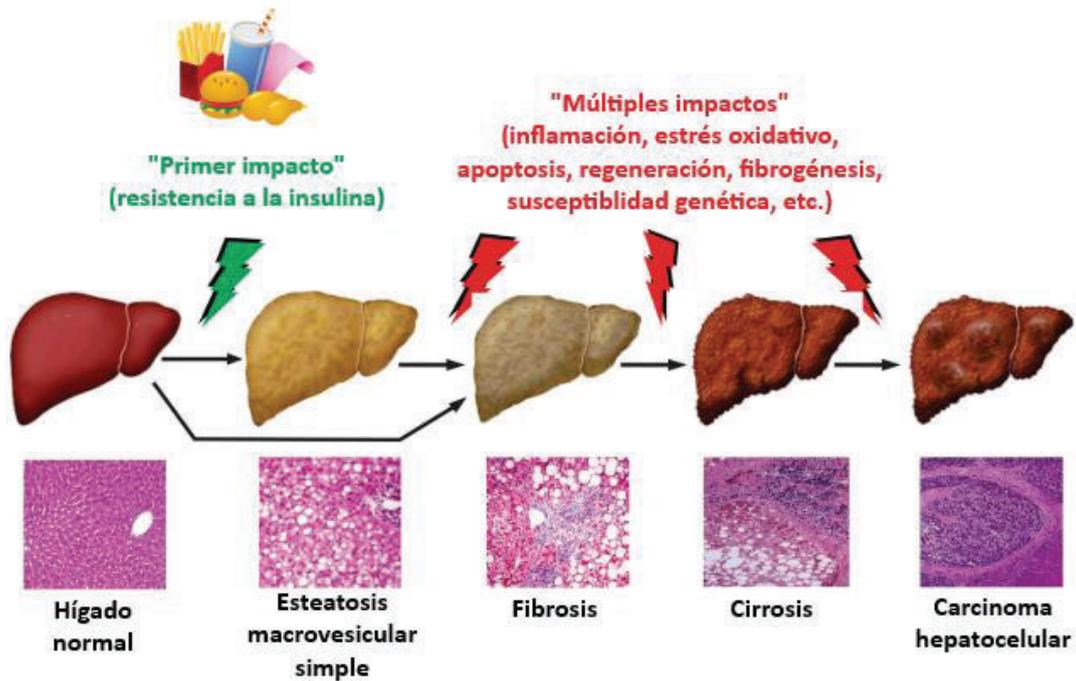


Figura 14. Teoría de los múltiples impactos en la progresión clínica de la MAFLD.

Figura adaptada de Bessone et al., 2019 (75).

Los ácidos grasos acumulados en el hígado proceden de tres vías principales: los ácidos grasos no esterificados (NEFA) procedentes de la lipólisis del tejido adiposo (~60%), la lipogénesis *de novo* (LDN) a partir de los carbohidratos de la dieta (~25%) y los quilomicrones de la dieta (~15%) (76). En condiciones normales, los ácidos grasos hepáticos son oxidados para obtener energía o bien esterificados a TG y exportados a la circulación en forma de VLDL. Cuando se produce un exceso de energía, los TG se almacenan a nivel hepático en forma de gotas lipídicas, dando lugar a lipotoxicidad, sobreproducción de ROS, disfunción mitocondrial y estrés del retículo endoplásmico, además de actuar endotoxinas intestinales y adipocinas del tejido adiposo, todo ello contribuyendo a un incremento de la inflamación hepática y a la activación de las células hepáticas estrelladas y células Kupffer que inician el proceso fibrogénico (**Figura 15**) (52).

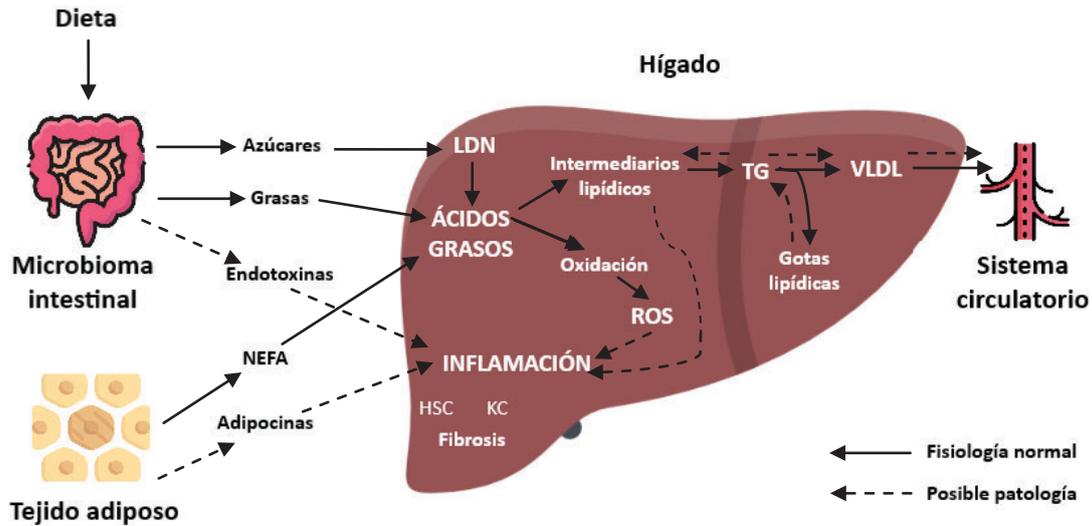


Figura 15. Lipotoxicidad, inflamación y estrés oxidativo en la patogénesis de la MAFLD.

Figura basada en Moore et al., 2019 (52), realizada con imágenes obtenidas de Freepik (Flaticon). KC, células Kupffer (*kupffer cell*); HSC, células hepáticas estrelladas (*hepatic stellate cell*); LDN, lipogénesis *de novo*; NEFA, ácidos grasos no esterificados; ROS, especies reactivas de oxígeno; TG, triglicéridos; VLDL, lipoproteína de muy baja densidad.

Específicamente en los pacientes con MAFLD, los mecanismos moleculares asociados a la alteración del metabolismo lipídico hepático mencionados anteriormente (incremento en la captación de lípidos, aumento de la lipogénesis *de novo*, presencia de disfunción mitocondrial e incremento de estrés oxidativo) conllevan, por consiguiente, una menor beta oxidación mitocondrial y una mayor oxidación vía citocromo y peroxisoma, y finalmente un incremento en la exportación de lípidos (**Figura 16**). El resultado final de dichas alteraciones es un círculo de retroalimentación positiva entre dislipemia crónica y acumulación hepática de lípidos, dando lugar a daño hepático (77).

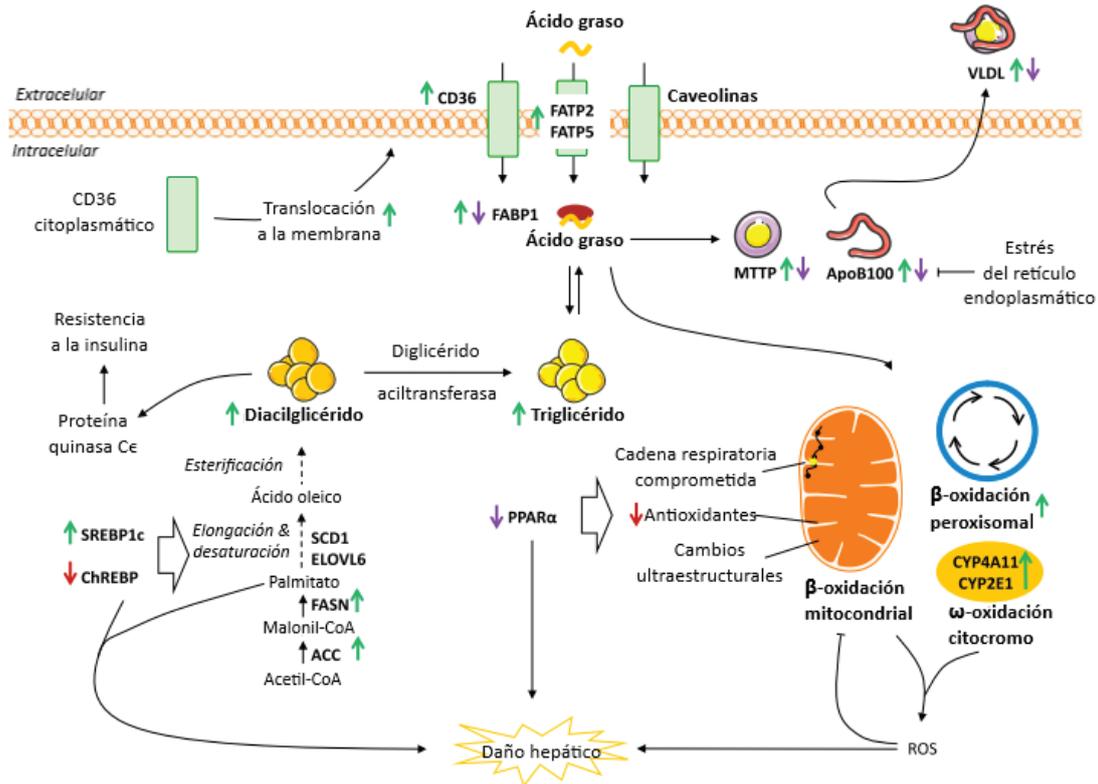


Figura 16. Mecanismos moleculares que participan en el metabolismo lipídico hepático asociado a la MAFLD.

Figura adaptada de Ipsen et al., 2018 (77). Las flechas verdes indican una expresión aumentada, las flechas rojas una expresión disminuida y las de color morado una expresión diferencial entre esteatosis y NASH. ACC, acetil CoA carboxilasa; ApoB100, apolipoproteína B100; CD36, cluster de diferenciación 36; ChREBP, proteína de unión al elemento de respuesta a carbohidratos; ELOVL, elongasa de ácidos grasos de cadena muy larga; FAPB, proteínas de unión a ácidos grasos; FASN, sintasa de ácidos grasos; FATP, proteínas transportadora de ácidos grasos; MTTP, proteínas de transferencia de triglicéridos microsomal; PPAR, receptores activados por proliferadores de peroxisomas; ROS, especies reactivas de oxígeno; SCD1, estearoil-CoA desaturasa 1; SREBP1c, proteínas de unión a elementos reguladores de esteroles; VLDL, lipoproteína de muy baja densidad.

3.4. Diagnóstico

Recientemente se ha introducido la terminología MAFLD que sustituye al término antiguo de NAFLD. MAFLD no requiere la exclusión de otras enfermedades hepáticas para el diagnóstico, como por ejemplo la relacionada con el consumo de alcohol, así describiendo mejor la patogénesis de la enfermedad (78).

El diagnóstico de MAFLD se basa en la detección de esteatosis hepática mediante técnicas de imagen, biomarcadores séricos/índices o histología hepática junto con la presencia de

Introducción

obesidad o sobrepeso, diabetes tipo 2 o evidencia de alteración metabólica, determinada por la presencia de al menos dos de los siguientes factores: aumento de la circunferencia de la cintura (≥ 102 en hombres, ≥ 88 en mujeres, origen caucásico), presión arterial elevada (sistólica ≥ 130 mm Hg, diastólica ≥ 85 mm Hg, o hipertensión en tratamiento), TG elevados (≥ 150 mg/dL o dislipemia en tratamiento), cHDL reducido (< 40 mg/dL en hombres, < 50 mg/dL en mujeres, o bien dislipemia en tratamiento), prediabetes (glucosa en ayunas 100-125 mg/dL o glucosa a las 2 horas post-sobrecarga 140-199 mg/dL o hemoglobina glicada 5,7-6,4%), índice de resistencia a la insulina HOMA (*Homeostasis Model Assesment*) $\geq 2,5$ y proteína C reactiva > 2 mg/L (78).

Según la guía clínica europea, la técnica diagnóstica de primera línea para la esteatosis es la ultrasonografía. Cuando las técnicas de imagen no están disponibles o son difíciles de implementar en la población de estudio, se acepta la utilización de biomarcadores séricos o índices (*Fatty Liver Index (FLI)*, *SteatoTest®*, *NAFLD Liver Fat Score*). No obstante, solo la espectroscopía por resonancia magnética de protones ($^1\text{H-MRS}$) permite una estimación cuantitativa de la esteatosis. Para la evaluación de la fibrosis, se recomiendan métodos no invasivos como biomarcadores (por ejemplo, transaminasas hepáticas) o índices (*NAFLD Fibrosis Score (NAS)*, *Fibrosis-4 (FIB-4)*, *Enhanced Liver Fibrosis (ELF)*, *FibroTest®*) y la elastografía transitoria (*Fibroscan®*), sobre todo en pacientes con bajo riesgo de fibrosis avanzada o cirrosis. En pacientes de alto riesgo se recomienda la confirmación mediante biopsia hepática. La biopsia hepática es el *gold estándar* para el diagnóstico de NASH, aunque se pueden utilizar índices como *NAFLD Activity Score (NAS)* y *Steatosis Activity Fibrosis* para la estandarización de los resultados de pacientes incluidos en ensayos clínicos. Por lo tanto, la biopsia hepática se recomienda en pacientes con MAFLD y clínicamente un riesgo elevado de NASH y/o fibrosis avanzada, o bien cuando el diagnóstico diferencial de esteatosis hepática y la presencia de otras enfermedades hepática crónicas no se puede excluir sin métodos histológicos (79,80).

La mayoría de estudios que evalúan la prevalencia de MAFLD y su distribución geográfica utilizan pruebas de imagen como la ultrasonografía y la resonancia magnética nuclear. Sin embargo, cuando se utilizan como criterios diagnósticos la elevación de las enzimas hepáticas se observa una infraestimación de la prevalencia de la enfermedad hepática (61). Por este motivo, uno de los retos actuales es obtener biomarcadores diagnósticos y pronósticos no invasivos de MAFLD, que sean capaces de estratificar los pacientes y diagnosticar aquellos con mayor riesgo de progresión, a la vez que desarrollar nuevas estrategias terapéuticas que sean eficaces en los distintos estadios de MAFLD (81).

3.5. Estrategias terapéuticas

El tratamiento actual de la MALFD está basado en cambios en la dieta y el estilo de vida del paciente. En pacientes con esteatosis en ausencia de NASH o fibrosis solo se recomienda implementar medidas dietéticas y aumentar la actividad física: restricción calórica, eliminación de comida procesada y productos con un elevado contenido de fructosa, incorporación de la dieta mediterránea, y aumento del ejercicio aerobio y de resistencia. El objetivo del cambio en el estilo de vida del paciente MAFLD es una pérdida de peso del 7-10%, ya que se ha demostrado que mejora la histología y las enzimas hepáticas (79). Se estima que es necesaria una pérdida de peso $\geq 3\%$, $\geq 5\%$ y $\geq 10\%$ para mejorar la esteatosis hepática, la inflamación y la fibrosis, respectivamente (82).

La farmacoterapia se reserva en pacientes con NASH, sobre todo aquellos con fibrosis, y también aquellos pacientes con un alto riesgo de progresión. Tanto la guía europea como la americana recomiendan el uso de pioglitazona y vitamina E para el tratamiento de NASH, con la particularidad que la guía americana recomienda específicamente la vitamina E solo en pacientes con NASH exentos de diabetes en cambio el tratamiento con pioglitazona en NASH acompañada o no de diabetes. Por último, la cirugía bariátrica es una opción terapéutica en

Introducción

aquellos pacientes con MAFLD y obesidad, y el trasplante hepático se reserva solo en aquellos pacientes en estadios terminales con insuficiencia hepática y/o CHC (79,83).

Sin embargo, dado el tratamiento farmacológico limitado y la falta de tratamiento específico de MAFLD, actualmente se están evaluando diversos fármacos como ácido obeticolico, selonsertib, elafibranor, cenicriviroc, resmetirom, MSDC-0602 K, y dapaglifozina, todos ellos en fase III de ensayos clínicos para NASH (84,85). Algunas de estas estrategias terapéuticas en investigación convergen en la búsqueda de un efecto antiinflamatorio, antioxidante y/o actividad sobre el metabolismo lipídico y de la glucosa, características comunes en la patogénesis de la MAFLD (85).

4. Modelos experimentales de obesidad

Entre las diferentes estrategias preclínicas de investigación destacan modelos *in vitro* mediante cultivos celulares o biopsias tisulares, *ex vivo* a partir de tejidos humanos e *in vivo* utilizando modelos animales, siendo estos últimos los más utilizados en la traslación de la investigación básica a la práctica clínica, con la finalidad de evaluar, validar y optimizar nuevas estrategias terapéuticas de forma segura en humanos.

Los animales más utilizados para el estudio de la obesidad son los roedores ya que presentan un equilibrio entre rendimiento científico y mimetismo de la fisiología humana, comparado con el uso de primates, animales grandes y animales no mamíferos. La utilización de ratones y ratas es coste-efectivo al ser animales pequeños, con elevada fecundidad y ciclo de vida corto y además permiten la manipulación genética (86).

Existen diferentes modelos experimentales de obesidad en roedores que se categorizan en modelos nutricionales o genéticos. Idealmente, los modelos de obesidad deben desarrollar las complicaciones metabólicas características (dislipemia, resistencia a la insulina, MAFLD) acompañadas de un estado inflamatorio crónico de bajo grado.

Los modelos de obesidad inducida por la dieta mimetizan la etiología de la obesidad, causada por una hiperfagia acompañada de un estilo de vida sedentario (modelos poligénicos). Entre ellos se encuentran las dietas ricas en grasas, dietas ricas en fructosa, o dietas tipo “Western” o cafetería, que permiten el rápido desarrollo de obesidad junto las alteraciones metabólicas concomitantes. Aunque las dietas ricas en grasas son una de las más utilizadas en roedores, el contenido en grasa que se utiliza es mucho mayor que el que se consume normalmente en humanos. Una dieta normal en roedores contiene un 10% del contenido calórico en forma de grasa y se utiliza como dieta rica en grasa del 45% de la energía en forma de grasa y muy rica en grasa del 60%. Si lo comparamos con humanos que consumen el 30-40% de energía en forma de grasa, una dieta rica en grasa es del 50-60%. Dicho esto, una dieta rica en grasa del 45% en roedores se asemeja más al escenario que tiene lugar en humanos comparado con una dieta del 60% (87). Tan importante es el porcentaje de aporte calórico en forma de grasas como también la composición de ácidos grasos y de azúcares, así como la forma de administración de la dieta. No obstante, las dietas ricas en grasas carecen de la complejidad y variedad de las dietas en humanos, por lo que una alternativa es la dieta de cafetería, basada en alimentos altamente calóricos y apetecibles, la cual además mimetiza la hiperfagia hedónica que tiene lugar en la obesidad en humanos (86).

Los modelos genéticos de obesidad en roedores se basan mayoritariamente en la afectación de la vía de la leptina. Los ratones *ob/ob* (C57BL/6J) presentan mutación en el gen de la leptina, la cual conlleva hiperfagia y reducción del gasto energético, dando lugar a obesidad y alteraciones metabólicas asociadas como hiperinsulinemia y resistencia a la insulina. A diferencia del modelo *ob/ob*, los ratones *db/db* (C57BLKS/J) presentan mutación en el receptor de la leptina. Estos desarrollan obesidad de inicio temprano mediante hiperfagia y reducción del gasto energético (88). De forma similar, las ratas Zucker presentan mutación *missense* en el receptor de la leptina (89) de herencia autosómica recesiva. Las ratas Zucker homocigotas para el alelo *fa* (*fa/fa*) desarrollan obesidad entre la tercera y quinta semana de vida junto con

Introducción

alteraciones metabólicas típicas del síndrome metabólico: resistencia a la insulina, hiperglucemia, hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia, MAFLD, etc. A la semana 14 las ratas Zucker obesas presentan hasta el 40% del peso corporal en forma de grasa (90–92). Las ratas Koletsky o SHROB (*spontaneously hypertensive obese*) son un modelo de síndrome metabólico con hipertensión y sin hiperglucemia debido a una mutación en el receptor de la leptina (93). Las ratas Zucker Diabéticas, a diferencia de las ratas Zucker obesas (fa/fa), presentan diabetes tipo 2 acompañada de obesidad, hiperglucemia de inicio temprano y dislipemia (94). Por último, las ratas OLETF (*Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty*) son un modelo de hiperglucemia de inicio tardío y obesidad leve que da lugar a diabetes tipo 2 de forma similar a la fisiopatología de la enfermedad en humanos (95). Las características metabólicas de los modelos monogénicos de obesidad en roedores se resumen en la **Tabla 6**, pudiendo ser alimentados con dieta estándar y/o rica en grasa (86).

	Obesidad	Hiperglucemia	Resistencia a la insulina	Diabetes tipo 2	Dislipemia
Ratones ob/ob (C57BL/6J)	++	–	++	–	+
Ratones db/db (C57BLKS/J)	++	+	++	+	++
Ratas Zucker Obesas (fa/fa)	++	+	++	–	+
Ratas Zucker Diabéticas	++	++	++	+	++
Ratas Koletsky	++	–	+	–	+
Ratas OLETF	+	+	+	+	+

Tabla 6. Modelos monogénicos de obesidad en roedores.

Tabla adaptada de Kleinert et al., 2018 (86). No se observa (–), ligero (+), severo (++) . OLETF, *Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty*.

En la presente tesis doctoral hemos optado por utilizar el modelo genético de ratas Zucker (**Figura 17**), ya que se asemeja a la fisiopatología típica del síndrome metabólico en humanos (96).

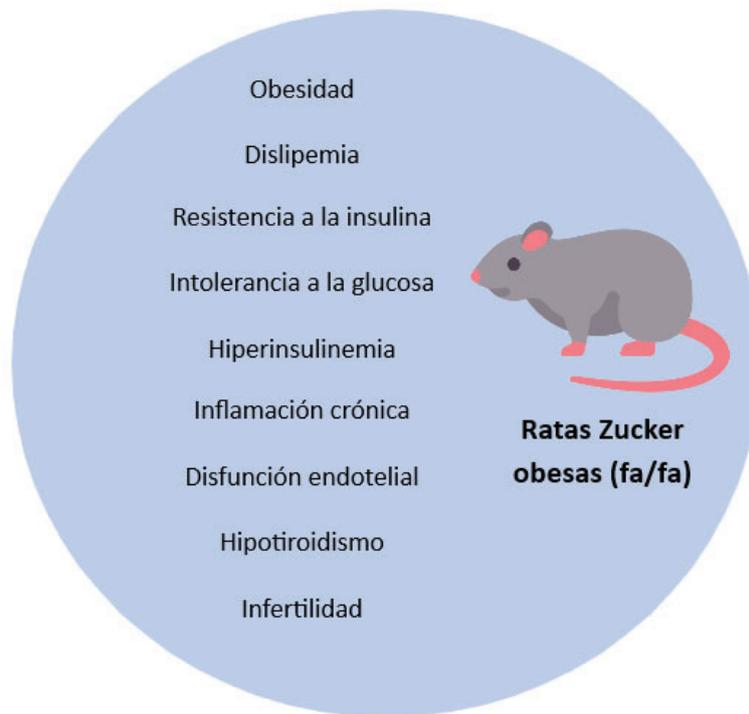


Figura 17. Características metabólicas principales de las ratas Zucker obesas (fa/fa).
Imagen realizada con imágenes obtenidas de Freepik (Flaticon).

5. Nanopartículas de óxido de cerio

La nanomedicina es un campo interdisciplinar que incluye la nanociencia, nanoingeniería y nanotecnología e implica el desarrollo y aplicación de materiales y tecnologías dentro de la escala nanométrica (entre 1 y 100 nm) dentro del ámbito diagnóstico y terapéutico. Actualmente la utilización de nanopartículas (NPs) con fines terapéuticos constituye uno de los pilares más importantes de la nanomedicina, junto con su utilización para la mejora de diagnósticos y en ingeniería de tejidos, en otros (97). Las NPs son partículas de tamaño nanoscópico, orgánicas o inorgánicas, con forma y carga modificables que pueden ser capaces de transportar fármacos o moléculas diagnósticas. El uso de NPs mejora la farmacocinética y biodistribución y permite el transporte dirigido de fármacos a tejidos específicos, células o compartimentos subcelulares (98).

Introducción

En la obesidad y alteraciones metabólicas asociadas se han utilizado estrategias terapéuticas basadas en la actividad antioxidante para interrumpir el circuito de retroalimentación entre estrés oxidativo e inflamación crónica de bajo grado (19–21) (**Figura 18**). En este sentido surge la potencial aplicación de las nanopartículas de óxido de cerio (CeO_2NPs) (**Figura 19**), también nombradas como nanocería, dentro del grupo de los denominados nanomateriales antioxidantes (99) o nanozimas (100).

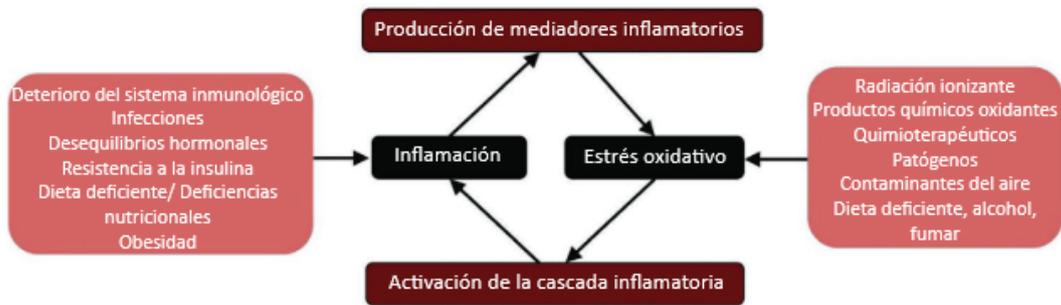


Figura 18. Esquema sobre la interrelación entre estrés oxidativo e inflamación que tiene lugar en la obesidad y otras enfermedades frecuentes.
Figura adaptada de Casals et al., 2020 (101).

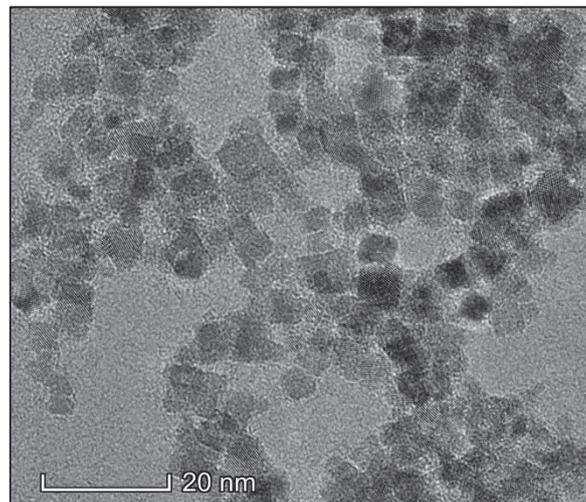


Figura 19. Imagen por microscopía electrónica de transmisión (TEM) de las CeO_2NPs utilizadas en este trabajo.

En el siglo XX el óxido de cerio (CeO_2) se había utilizado ampliamente en la industria petroquímica y automovilística como catalizador (102–104). No fue hasta principios del siglo

XXI cuando se evaluó su utilidad en el ámbito biomédico como agente terapéutico. Rzigalinski y colaboradores en 2003 observaron que CeO₂NPs de menos de 20 nm alargaban la viabilidad de cultivos celulares cerebrales hasta 6-8 meses (105). La actividad antiinflamatoria de las CeO₂NPs se describió en la primera década del siglo XXI (106,107). Desde entonces numerosos estudios evidencian las actividades antioxidantes e antiinflamatorias de las CeO₂NPs que confieren protección a los tejidos frente a la sobreproducción de ROS y mediadores inflamatorios (101).

5.1. Propiedades y mecanismo de acción

Las CeO₂NPs presentan actividad antioxidante ya que participan en distintas reacciones cruzadas entre ROS e inflamación. Debido a la existencia del cerio tanto en estado reducido (Ce⁺³) como oxidado (Ce⁺⁴) y la presencia de vacantes de oxígeno en su estructura cristalina, las CeO₂NPs imitan la actividad de enzimas antioxidantes endógenas como la catalasa (108), superóxido dismutasa (SOD) (109) y peroxidasa (110). Además, los nanomateriales basados CeO₂ presentan una actividad antioxidante autoregenerativa al cambiar de estado de valencia entre Ce³⁺ y Ce⁴⁺, lo cual está asociado con la liberación de oxígeno. Las vacantes de oxígeno de las CeO₂NPs originan centros activos capaces de eliminar los radicales libres (101,111). En la **Figura 20** se resume el mecanismo multienzimático del CeO₂ en la eliminación de ROS (108,109,112):

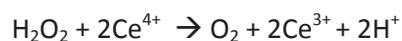
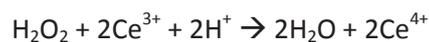
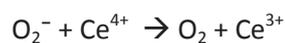
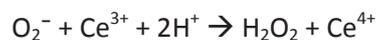


Figura 20. Mecanismo de acción antioxidante de las CeO₂NPs (112).

Introducción

Los nanomateriales de CeO₂ se acumulan de forma pasiva mayoritariamente en hígado y bazo tras su administración intravenosa (101). En concreto, según resultados previos de nuestro grupo, a los 90 minutos tras la administración de CeO₂NPs (0,1 mg/kg) se localizó el 84% del cerio en el hígado (113). Debido a la biodistribución mayoritaria de las CeO₂NPs a hígado, en la presente tesis doctoral hemos utilizado un modelo *in vitro* inicial con células hepáticas HepG2 para valorar la eficacia antioxidante y los efectos sobre el metabolismo lipídico.

En cuanto a la localización celular al administrar CeO₂NPs (~5 nm), existen divergencias entre estudios: se ha detectado tanto en hepatocitos (106), como en células Kupffer junto con la subsecuente retención en células parenquimales (hepatocitos y células hepáticas estrelladas) (114).

Una vez administrados los nanomateriales de CeO₂, estos permanecen al menos un mes en el hígado (111). Específicamente, Oro y colaboradores observaron cómo más del 75% del cerio permanece en el hígado de las ratas fibróticas tras 8 semanas después de la última administración (113). En cuanto a la vía de administración de las CeO₂NPs, la administración intravenosa es la óptima para una mayor acumulación tisular (111), mientras que la mayoría de estudios muestran una muy baja absorción por vía oral (111,115). La vía de eliminación mayoritaria de los nanomateriales de CeO₂ son las heces (111,115).

Tanto el efecto terapéutico como la toxicidad de las CeO₂NPs dependen de la dosis y características de las nanopartículas (morfología, tamaño, concentración, estabilidad, etc). Los nanomateriales de CeO₂ en condiciones fisiológicas presentan toxicidad dosis-dependiente tanto *in vitro* en células hepáticas como *in vivo* (101). Las CeO₂NPs de tamaño ~4 nm, como las que utilizamos en esta tesis doctoral, no presentan toxicidad *in vitro* en células hepáticas HepG2 en un ambiente oxidante (peróxido de hidrógeno, H₂O₂) hasta dosis de 100 µg/mL (113). Hirst y colaboradores mostraron la ausencia de toxicidad hepática en ratones tratados con CeO₂NPs (0,5 mg/kg; 3-5 nm) semanalmente durante dos o cinco semanas por distintas

vías de administración (oral, intravenosa e intraperitoneal) (111). En la literatura, en la mayoría de estudios sobre la eficacia terapéutica *in vitro* e *in vivo*, las CeO₂NPs presentan un tamaño de 4 – 30 nm y utilizan dosis menores (0,1 – 0,5 mg/kg) comparado con los estudios de toxicidad (del orden de decenas y centenas de mg/kg), siendo las vías intravenosa e intraperitoneal las más utilizadas en modelos de enfermedad hepática en roedores (101).

Por último, es de especial relevancia la interacción de las nanopartículas con el medio fisiológico, con pH, fuerza iónica y composición molecular muy distinta al medio de síntesis, lo cual puede conducir a diferentes fenómenos de aglomeración, formación de corona proteica y disolución, que pueden ocurrir de forma simultánea, y determinan la actividad y potencial toxicidad. Estos pueden evitarse mediante modificaciones en la preparación de las nanopartículas, por ejemplo diseñar los nanomateriales con estructura de *core-shell* (núcleo de nanopartículas recubierto de diferentes materiales), o bien prealbuminizar las nanopartículas para evitar la aglomeración y aumentar su estabilidad (101).

5.2. Comparación frente otras estrategias terapéuticas

Existen múltiples antioxidantes naturales que muestran efectos protectores contra las alteraciones metabólicas asociadas a la obesidad como flavonoides, arginina, vitamina C, vitamina E, carotenoides, resveratrol y selenio (116). Además, el consumo de dietas ricas en ácidos grasos monoinsaturados, ácidos grasos poliinsaturados n-3, vitamina C y vitamina E reducen el riesgo de desarrollar enfermedades metabólicas (117). Sin embargo, el consumo de dietas ricas en antioxidantes o la administración de antioxidantes en forma de suplementos presentan resultados controvertidos a nivel clínico en la prevención y tratamiento de enfermedades cardiometabólicas, nombrándose la “paradoja antioxidante” (118–120). Entre las limitaciones de los antioxidantes clásicos se encuentran una vida media corta, actividad antioxidante limitada y biodisponibilidad reducida en el sitio de acción ya que son inactivados después de la reacción redox (101).

Introducción

A diferencia de otros antioxidantes clásicos, las CeO₂NPs presentan una actividad antioxidante autoregenerativa, permanecen un mayor tiempo en los tejidos, actúan solo en situaciones de sobreproducción de ROS (también denominados *ROS buffers*) y se pueden funcionalizar con péptidos o moléculas para controlar su biodistribución y realizar una administración dirigida. Dichas propiedades proporcionan un efecto antioxidante prolongado a dosis bajas. Además, a dosis terapéuticas las CeO₂NPs no presentaron toxicidad a largo plazo, ya que son degradadas a iones Ce³⁺ inocuos y eliminadas del organismo (101).

En la actualidad hay diferentes métodos de preparar CeO₂NPs de diferentes morfologías y estados de superficie, ya sea en medio acuoso o utilizando solventes orgánicos. Pese a que la síntesis en solvente orgánico permite un mayor control de la morfología, para esta tesis hemos optado por un método de síntesis en solución acuosa ya que las síntesis en solventes orgánicos requieren de métodos de purificación y transferencia de fase al medio acuoso para poder ser aplicadas en biología, lo que aumenta el riesgo de toxicidad. Como en el caso de otros óxidos metálicos, para la preparación de las CeO₂NPs se ha seguido un método de precipitación de una sal de Ce (solución de Ce(NO₃)₃ 20 mM) en medio básico (solución de óxido de tetrametilamonio (TMAOH) (60 mM), mezclando ambas soluciones (121). En este método, el TMAOH actúa como agente precipitador del Ce y estabilizante de las CeO₂NPs resultantes.

5.3. Efectos clínicos en las patologías de estudio

Se ha evaluado el potencial terapéutico de las CeO₂NPs en distintas áreas médicas como la oftalmología (122,123), neurología (124–127), cardiología (107), diabetes (128,129), sepsis (130,131) y oncología (132,133).

Los nanomateriales de CeO₂ se han estudiado extensamente en la enfermedad hepática, ya que se acumulan de forma pasiva mayoritariamente en el hígado y el estrés oxidativo interviene en la patogénesis de dicha enfermedad (101,134). Las CeO₂NPs muestran un efecto

protector en modelos de hepatotoxicidad (135,136), de isquemia-reperfusión (137), NASH (138), fibrosis (113), cirrosis (139) y CHC (140,141). El estudio de las CeO₂NPs por parte de nuestro grupo de investigación en los distintos estadios de MAFLD llevó al hallazgo del efecto beneficioso sobre la esteatosis hepática, además de los efectos antiinflamatorios y antioxidantes ya conocidos. Primero en un modelo de fibrosis hepática en ratas tratadas con tetracloruro de carbono (CCl₄) mostraron como las CeO₂NPs presentaban un efecto antiinflamatorio a la vez que reducían la esteatosis e hipertensión portal (113). Seguidamente se evaluó el efecto de las CeO₂NPs en un estadio previo de enfermedad hepática, mediante un modelo de NASH utilizando ratas con dieta deficiente en metionina y colina (MCD). Se observó como las CeO₂NPs a nivel hepático reducían el tamaño y contenido de las gotas lipídicas, disminuían TG y CE y revertían la sobreexpresión de genes relacionados con estrés oxidativo e hígado graso (138). Ante estos resultados se postuló la potencial utilidad de las CeO₂NPs en el tratamiento de las alteraciones metabólicas asociadas a la obesidad.

5.4. Estudios *in vitro* e *in vivo* en obesidad

Aunque las propiedades terapéuticas de las CeO₂NPs en la obesidad y alteraciones metabólicas asociadas son mayoritariamente desconocidas, existen estudios recientes en modelos *in vitro* e *in vivo* que sugieren su potencial terapéutico. A nivel *in vitro*, los nanomateriales de CeO₂ han mostrado ser capaces de inhibir la maduración de células madre mesenquimales a adipocitos (142), y en cultivos celulares de preadipocitos 3T3-L1 reducir la transcripción de mRNA de genes relacionados con la adipogénesis y la acumulación de TG (143). En preadipocitos 3T3-L1 en condiciones proinflamatorias, mediante exposición a lipopolisacárido, las CeO₂NPs han mostrado un efecto reductor sobre la producción de ROS, a la vez que incrementan el contenido de mitocondrias y la expresión de *Adipoq* y *Il10*, regulando la sensibilidad a la insulina y el estrés oxidativo (144).

Introducción

Referente a las propiedades *in vivo* de la nanocería, Rocca y colaboradores mostraron como las CeO₂NPs administradas intraperitonealmente (0,5 mg/kg) en ratas Wistar controles disminuyen el peso y las concentraciones plasmáticas de insulina, leptina, glucosa y TG, y además mejoran la desregulación génica que tiene lugar en el tejido adiposo (143). Kobylak y colaboradores utilizaron un modelo de obesidad inducida por la administración neonatal subcutánea de glutamato monosódico (MSG). El tratamiento oral con CeO₂NPs (1-5 nm; 1 mg/kg) durante 3 meses (2 semanas por mes) muestra la reducción de citoquinas proinflamatorias IL-1 β y IL-12B p40 y el restablecimiento de citoquinas antiinflamatorias IL-4, IL-10 y TGF- β . Además, los ratones presentaron una disminución del peso corporal, del tejido adiposo visceral y los TG hepáticos (145). Por último, en un estudio más reciente, Bubnov y colaboradores evalúan el efecto prebiótico de los nanomateriales de CeO₂. Para ello alimentan durante 3 semanas ratones con dieta rica en grasa para la inducción de obesidad y posteriormente son tratados durante una semana con probióticos vía oral y/o CeO₂NPs (2-5 nm) vía oral e intravenosa (dosis 0,1, 0,01 y 0,001 M). La combinación de probióticos junto con CeO₂NPs reduce la concentración de colesterol sérico y mejora la microbiota intestinal en ratones obesos (146).

5.5. Nanopartículas de óxido de cerio recubiertas de sílice mesoporosa

Las CeO₂NPs tienden a aglomerarse en el medio fisiológico, ya que tiene unas características en términos de pH, fuerza iónica, composición molecular, etc., muy distintas del medio de síntesis de las NPs. Esta aglomeración de las NPs da lugar a la pérdida de sus propiedades e induce respuestas inmunes proinflamatorias no deseadas (101). Por este motivo, entre las estrategias de síntesis para mejorar su estabilidad se encuentra el diseño “core-shell” (núcleo-cap), consistente de un núcleo de nanopartículas de CeO₂ recubierto de diferentes materiales, como por ejemplo la sílice (SiO₂) y la sílice mesoporosa (mSiO₂), con tamaño de poro que puede variar entre 2 y 50 nm y tamaño final de la nanoestructura “core-shell”

generalmente entre 30 y 300 nm. En la presente tesis doctoral hemos utilizado nanopartículas de óxido de cerio recubiertas de sílice mesoporosa ($\text{CeO}_2@m\text{SiO}_2$) (**Figura 21**).

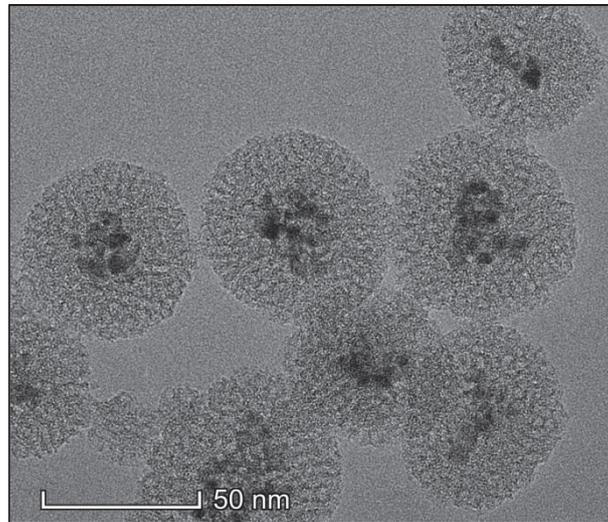


Figura 21. Imagen por microscopía electrónica de transmisión (TEM) de las $\text{CeO}_2@m\text{SiO}_2$ utilizadas en este trabajo.

Las propiedades biológicas de la SiO_2 dependerán de la carga, composición química, agregación y superficie. Las nanopartículas de $m\text{SiO}_2$ más utilizadas hasta el momento presentan morfología esférica, aunque también existen otras formas como los nanorods (147). En general, las nanopartículas recubiertas de $m\text{SiO}_2$ presentan una gran superficie, baja densidad, fácil funcionalización y gran capacidad para cargar fármacos. Por ello, en los últimos años se ha utilizado nanomateriales recubiertos de $m\text{SiO}_2$ para aplicaciones biomédicas diagnósticas y terapéuticas (148).

La utilización de $m\text{SiO}_2$ tiene diversas ventajas respecto otros materiales que se han explorado como “shell” para estabilizar núcleos de NPs inorgánicas, como por ejemplo la albúmina o los liposomas. La $m\text{SiO}_2$ presenta una elevada biocompatibilidad (149), permite incorporar un gran volumen de fármacos debido a su porosidad y son fáciles de funcionalizar por la elevada densidad de grupos silanol en su superficie (150), y además, por su perfil de biodegradación (151), posibilita la liberación sostenida de fármacos consiguiendo una pauta de administración

Introducción

más amplia. De forma interesante, las nanopartículas de $mSiO_2$ pueden integrar distintos compuestos inorgánicos con diferentes funcionalidades dentro del mismo core, consiguiendo la formación de nanopartículas inorgánicas únicas, dobles y triples de un tamaño controlado englobadas dentro del mismo recubrimiento de $mSiO_2$ (152). Finalmente, cabe destacar que es un material biocompatible *in vivo* clasificada como segura (*Generally Recognized as Safe, GRAS*) por la FDA. En el ámbito biomédico, la $mSiO_2$ se utilizó por primera vez en el año 2001 como vehículo para la administración de fármacos (153).

Para la preparación de las $CeO_2@mSiO_2$ se ha empleado un método basado en la formación de $mSiO_2$ en presencia de CeO_2 NPs utilizando tetraetilo ortosilicato (TEOS) como fuente de sílice y bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) como agente director donde se condensa la sílice dejando la estructura mesoporosa (154).

En la literatura existen pocos estudios que hayan comparado el efecto de CeO_2 NPs con las $CeO_2@mSiO_2$. Konduru y colaboradores evaluaron el efecto del recubrimiento de sílice en las CeO_2 NPs (~30 nm) administrando ambas nanopartículas por vía intravenosa, intratraqueal y sonda nasogástrica en ratas. De forma similar a las CeO_2 NPs libres (no recubiertas), las $CeO_2@mSiO_2$ se distribuyeron mayoritariamente a hígado y bazo tras la administración intravenosa. Además, la sílice altera la formación de la corona proteica y aumenta la retención tisular de cerio de forma generalizada en los órganos a excepción del hígado (155).

IV. HIPÓTESIS

La obesidad es una enfermedad metabólica crónica caracterizada por un exceso o acumulación anormal de grasa corporal. Actualmente se considera una pandemia por su elevada prevalencia, por lo que constituye un problema de salud pública y conlleva un elevado impacto social, sanitario y económico asociado tanto a la propia obesidad como a sus comorbilidades. La obesidad está estrechamente relacionada con el desarrollo de síndrome metabólico, incluyendo dislipemia, diabetes mellitus tipo 2, hipertensión e hígado graso, entre otras (1).

El desarrollo de obesidad se produce por un desequilibrio del balance energético, debido a una mayor ingesta calórica comparado con el gasto energético. La predisposición genética y la regulación central y periférica del apetito condicionan la susceptibilidad a desarrollar obesidad, la cual tiene lugar en un ambiente obesogénico condicionado por factores socioeconómicos (5).

En la patogénesis de la obesidad juegan un papel importante el estrés oxidativo y la inflamación crónica de bajo grado (19–22). El exceso de grasa corporal conlleva una disfunción del tejido adiposo caracterizado por hiperplasia e hipertrofia de los adipocitos, secreción de adipocinas y citoquinas proinflamatorias, infiltración de macrófagos y mayor predominio del fenotipo proinflamatorio (M1) en los macrófagos. Asimismo, el tejido adiposo en la obesidad interviene en el desarrollo de resistencia a insulina y el exceso de ácidos grasos libres procedentes de la lipólisis del tejido adiposo da lugar a lipotoxicidad e hiperlipidemia y acumulación de grasa ectópica en hígado y músculo esquelético (1,23–27).

Actualmente entre las opciones terapéuticas disponibles se encuentra el cambio del estilo de vida del paciente, la farmacoterapia orientada a la reducción del peso corporal y la cirugía bariátrica (2). Sin embargo, estas muestran una baja efectividad y/o efectos adversos indeseables y la cirugía bariátrica no está exenta de riesgos (37,38). Por este motivo son necesarias nuevas estrategias terapéuticas centradas, no solo en la pérdida de peso, sino también en la normalización de las alteraciones metabólicas asociadas.

Hipótesis

En este sentido, diferentes estrategias terapéuticas se han basado en la actividad antioxidante para interrumpir el circuito de retroalimentación entre estrés oxidativo e inflamación crónica de bajo grado presente en la obesidad y sus alteraciones metabólicas. Entre ellas, se han evaluado múltiples antioxidantes naturales (flavonoides, arginina, vitamina C, vitamina E, carotenoides, resveratrol, selenio) que muestran efectos protectores contra las alteraciones metabólicas de la obesidad (116). Sin embargo, el consumo de dietas ricas en antioxidantes o la administración de antioxidantes en forma de suplementos constituyen la “paradoja antioxidante”, ya que presentan resultados controvertidos a nivel clínico en la prevención y tratamiento de enfermedades cardiometabólicas (118–120). Entre las limitaciones de los antioxidantes clásicos se encuentran una vida media corta, actividad antioxidante limitada y biodisponibilidad reducida en el sitio de acción (101).

Por su actividad antioxidante y las múltiples ventajas frente los antioxidantes clásicos, los nanomateriales de CeO₂ constituyen una potencial estrategia terapéutica frente las alteraciones metabólicas asociadas a la obesidad. Las CeO₂NPs, a diferencia de los antioxidantes clásicos, presentan una actividad antioxidante autoregenerativa, permiten una biodistribución dirigida, permanecen un mayor tiempo en los tejidos, y actúan solo en situaciones de sobreproducción de ROS, lo que proporciona un efecto antioxidante prolongado a dosis bajas en ausencia de toxicidad (101).

Las CeO₂NPs *in vitro* han demostrado inhibir la adipogénesis, reducir la producción de ROS y regular la sensibilidad a la insulina (142–144). A nivel *in vivo* se ha evaluado poco el efecto sobre las alteraciones metabólicas de la obesidad. En tres modelos animales de obesidad diferentes se ha observado una diversidad de efectos terapéuticos de las CeO₂NPs (143,145,146): reducción del peso corporal, disminución de las citoquinas proinflamatorias y las concentraciones plasmáticas de insulina, leptina, glucosa y TG, y mejoría de la desregulación génica del tejido adiposo, del perfil lipídico hepático y de la microbiota

intestinal, entre otros. A nivel hepático, en estudios recientes de nuestro grupo de investigación, las CeO₂NPs han demostrado un efecto antiesteatótico en ratas fibróticas (113) y con NASH (138), además de los efectos antiinflamatorios y antioxidantes ya conocidos.

En este contexto, nos planteamos evaluar el efecto directo antiesteatótico de los nanomateriales de CeO₂ utilizando un modelo *in vitro* de esteatosis hepatocelular y estudiar las propiedades hipolipemiantes *in vivo* en un modelo animal de obesidad con una fisiopatología similar a la del síndrome metabólico en humanos, las ratas Zucker (96). Las ratas Zucker presentan una mutación en el receptor de la leptina, por lo que las ratas homocigotas (fa/fa) presentan obesidad, dislipemia y MAFLD, en un contexto de inflamación crónica de bajo grado y estrés oxidativo. Dicho esto, la primera hipótesis de la tesis doctoral es la siguiente:

Las CeO₂NPs presentan actividad antioxidante y antiinflamatoria a la vez que mejoran el perfil lipídico en las alteraciones metabólicas asociadas a la obesidad.

Por otro lado, una de las limitaciones de la utilización de nanomateriales es la aglomeración y estabilidad en el medio fisiológico que determina la potencial eficacia y toxicidad de dichas nanopartículas (101). En este sentido, y con la finalidad de poder funcionalizar las nanopartículas en un futuro, se ha diseñado un núcleo de CeO₂NPs recubierto de mSiO₂, la cual es un material biocompatible y seguro. Dicho esto, se ha postulado la segunda hipótesis de la tesis doctoral:

Las CeO₂@mSiO₂ mantienen o maximizan las propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y/o hipolipemiantes de las CeO₂NPs libres.

V. OBJETIVOS

El primer objetivo de la presente tesis doctoral fue **evaluar el efecto antiesteatótico directo de las CeO₂NPs**. Con esta finalidad, y dado que las CeO₂NPs se distribuyen mayoritariamente a hígado tras la administración intravenosa, se utilizó un modelo *in vitro* con células hepáticas HepG2. Este objetivo se alcanzó mediante los siguientes estudios:

1. Comprobar la internalización de las CeO₂NPs en las células HepG2.
2. Estudiar el efecto de las CeO₂NPs sobre la producción de ROS y oxisteroles, así como la viabilidad celular en células expuestas a un estímulo oxidante como el H₂O₂.
3. Evaluar el efecto antiesteatótico de las CeO₂NPs en un modelo *in vitro* de esteatosis hepatocelular, exponiendo las células HepG2 a ácido oleico (OA) y palmítico (PA).
4. Investigar la actividad de las CeO₂NPs sobre el metabolismo de los ácidos grasos.

El segundo objetivo de la tesis doctoral fue **evaluar el efecto sobre el estrés oxidativo y perfil lipídico de las CeO₂@mSiO₂ comparado con las CeO₂NPs libres (no recubiertas de sílice mesoporosa)**. Con esta finalidad, se ha empleado inicialmente células hepáticas HepG2 para comparar los efectos antioxidantes y protectores celulares entre ambas NPs *in vitro*. A continuación, se han utilizado ratas Zucker obesas, modelo animal de obesidad de similar fisiopatología al síndrome metabólico en humanos, para evaluar los efectos *in vivo* sobre el estrés oxidativo, inflamación y perfil lipídico.

1. Estudiar la estabilidad de las CeO₂@mSiO₂ comparado con las CeO₂NPs libres.
2. Comprobar la internalización celular de las CeO₂NPs y CeO₂@mSiO₂.
3. Determinar la actividad antioxidante y sobre la viabilidad celular de las CeO₂@mSiO₂ comparado con las CeO₂NPs libres en células HepG2 expuestas a H₂O₂.
4. Evaluar la biodistribución de las CeO₂@mSiO₂ y CeO₂NPs en las ratas Zucker obesas.
5. Estudiar el lipidoma sérico y hepático, el perfil bioquímico de función hepática, renal y resistencia a la insulina, así como las adipocinas en ratas Zucker obesas tratadas con CeO₂@mSiO₂ o CeO₂NPs.

Objetivos

6. Investigar el efecto de las $\text{CeO}_2@m\text{SiO}_2$ y CeO_2NPs sobre la expresión génica en hígado de genes implicados en la MAFLD y la resistencia a la insulina hepática y, en tejido adiposo, de genes relacionados con funciones orexigénicas, anorexigénicas y de gasto energético.

Los objetivos generales anteriormente mencionados corresponden cada uno con los artículos incluidos en la presente tesis doctoral.

VI. MÉTODOS Y RESULTADOS

ARTÍCULO 1

Parra-Robert M, Casals E, Massana N, Zeng M, Perramón M, Fernández-Varo G, Morales-Ruiz M, Puntos V, Jiménez W, Casals G. Beyond the scavenging of reactive oxygen species (ROS): direct effect of cerium oxide nanoparticles in reducing fatty acids content in an in vitro model of hepatocellular steatosis. *Biomolecules*. 2019;9(9):425.

La MAFLD se considera la manifestación hepática del síndrome metabólico, representando un amplio espectro histopatológico de enfermedad hepática que va desde esteatosis simple hasta NASH, fibrosis, cirrosis y CHC. En concreto, la esteatosis simple está caracterizada por una acumulación hepatocelular de TG superior al 5% (48).

El desarrollo y progresión de MAFLD se produce por exposición de los hepatocitos a múltiples impactos, tanto factores ambientales como genéticos, que dan lugar a estrés oxidativo, inflamación, apoptosis y fibrogénesis (75). Dado el papel del estrés oxidativo en la patogénesis de MAFLD y la acumulación *in vivo* de las CeO₂NPs mayoritariamente en el hígado, los nanomateriales de CeO₂ se han estudiado ampliamente en la enfermedad hepática (101,134).

Recientemente se ha observado en estudios de nuestro grupo de investigación el efecto antiesteatótico de las CeO₂NPs en modelos animales de enfermedad hepática. En primer lugar, en un modelo de fibrosis hepática en ratas expuestas a tetracloruro de carbono (CCl₄) las CeO₂NPs presentaban un efecto antiinflamatorio a la vez que reducían la esteatosis e hipertensión portal (113). Posteriormente se evaluó el efecto de las CeO₂NPs en un estadio previo, en un modelo de NASH utilizando ratas con dieta MCD. Las CeO₂NPs a nivel hepático reducían el tamaño y contenido de las gotas lipídicas, disminuían TG y CE y revertían la sobreexpresión de genes relacionados con estrés oxidativo e hígado graso (138). Ante estos resultados se postuló la potencial utilidad de las CeO₂NPs en el tratamiento de las alteraciones metabólicas de la obesidad como por ejemplo la MAFLD.

Métodos y resultados

Sin embargo, se desconoce si la actividad antiesteatótica de las CeO₂NPs descrita anteriormente es debida a la actividad antioxidante o si es causada por un efecto directo sobre la acumulación de lípidos.

Con esta finalidad se evaluó el efecto directo antiesteatótico de las CeO₂NPs utilizando un modelo *in vitro* de esteatosis hepatocelular, mediante exposición de las células HepG2 a OA (C18:1n9) y PA (C16:0) a un ratio molar 2:1 (156,157). Se determinó el contenido de ácidos grasos por cromatografía de gases – espectrometría de masas (GC-MS) (**Figura 22**). La actividad de la elongasa de ácidos grasos de cadena larga tipo 5 y 6 (ELOVL5 y ELOVL6), la esteroil-CoA desaturasa (SCD1), Δ 5 desaturasa (FADS1) y Δ 6 desaturasa (FADS2) se estudió mediante índices metabólicos establecidos que consisten en el ratio producto – sustrato para cada reacción (158–160). También se calculó el índice lipogénico con el ratio C16:0/C18:2n6c (161,162).

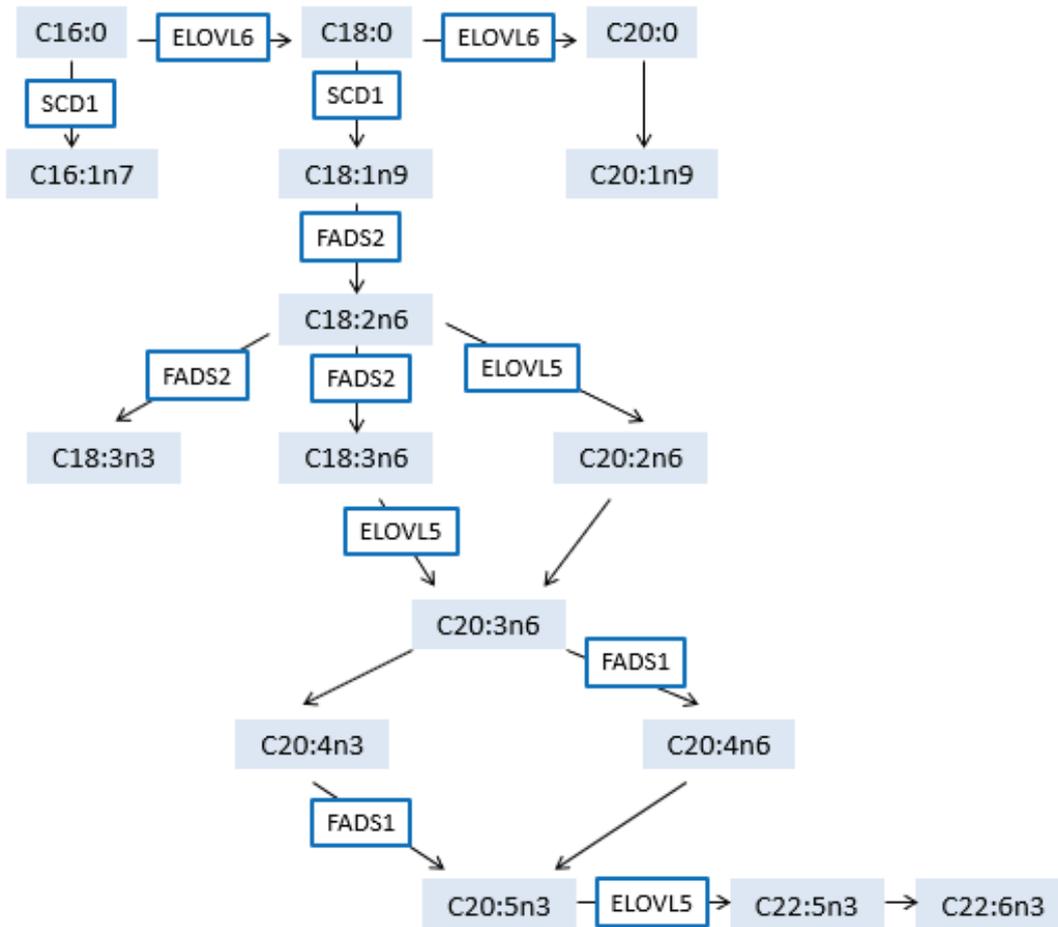


Figura 22. Esquema del metabolismo de los ácidos grasos.

C16:0, ácido palmítico; C16:1n7, ácido palmitoleico; C18:0, ácido esteárico; C18:1n9, ácido oleico; C18:2n6, ácido linoleico; C18:3n3, ácido α-linolénico; C18:3n6, ácido γ-linolénico; C20:0, ácido araquídico; C20:1n9, ácido eicosenoico; C20:2n6, ácido eicosadienoico; C20:3n6, ácido eicosatrienoico; C20:4n3, ácido eicosatetraenoico; C20:4n6, ácido araquidónico; C20:5n3, ácido eicosapentaenoico; C22:5n3, ácido docosapentaenoico; C22:6n3, ácido docosahexaenoico; ELOVL5, elongasa de ácidos grasos de cadena larga tipo 5; ELOVL6, elongasa de ácidos grasos de cadena larga tipo 6; FADS1, Δ5 desaturasa; FADS2, Δ6 desaturasa; SCD1, estearoil-CoA desaturasa.

Además, se evaluó la internalización de las CeO₂NPs en las células HepG2 y el efecto sobre el estrés oxidativo y la viabilidad celular en células expuestas a H₂O₂ a una concentración 1,5 mM, concentración que reduce la viabilidad celular de forma moderada (**Figura 23**) a la vez que produce la sobreproducción de ROS.

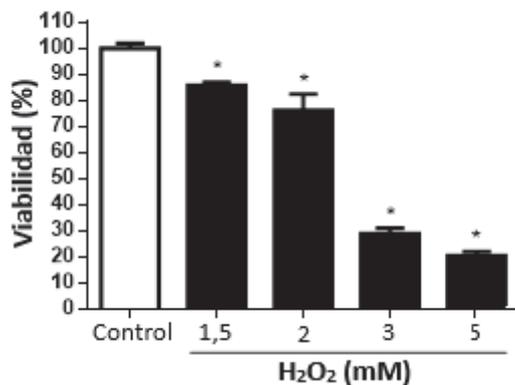


Figura 23. Efecto del peróxido de hidrógeno (H₂O₂) sobre la viabilidad celular.

*p < 0,05 comparado con control.

Las CeO₂NPs (~4 nm) utilizadas en este estudio están prealbuminizadas para evitar la aglomeración y asegurar la formación de la corona proteica (*Figura 1 del artículo*).

Los resultados más importantes de este estudio se enumeran a continuación:

1. Las CeO₂NPs se internalizan en las células HepG2.

En primer lugar, se comprobó la internalización de las CeO₂NPs (10 µg/mL) en las células HepG2 incubadas durante 24 horas mediante microscopía de transmisión electrónica (TEM). Las nanopartículas estaban presentes mayoritariamente en compartimentos delimitados por membrana (vacuolas u orgánulos tipo endosoma), y en menor grado libres en el citoplasma (*Figura 2*).

2. Las CeO₂NPs presentan actividad antioxidante y mejoran la viabilidad celular en células HepG2 expuestas a H₂O₂.

Las células HepG2 fueron tratadas con medio, H₂O₂ (1,5 mM) o H₂O₂ (1,5 mM) y CeO₂NPs (1 o 10 µg/mL). La viabilidad celular se evaluó mediante el ensayo MTS y la producción de ROS con la sonda 2',7'-DCF-DA. El tratamiento con CeO₂NPs mostró una mejora de la viabilidad celular (85,8% H₂O₂ vs 99,6% CeO₂NPs) y una reducción de la producción de ROS (125,4% H₂O₂ vs 109,8% CeO₂NPs), demostrando su efecto antioxidante y protector celular de los nanomateriales de CeO₂ (*Figura S1*).

Además, también se estudió por GC-MS el efecto de las CeO₂NPs sobre la producción de oxisteroles (*Figura 3*). Cuando las células se exponían al estímulo oxidante (H₂O₂ 1,5 mM) presentaban un incremento de 7β-hidroxicolesterol, mientras el tratamiento con CeO₂NPs reducía, aunque de forma no significativa, la concentración de los oxisteroles (7keto-hidroxicolesterol, 7β-hidroxicolesterol y 25-hidroxicolesterol).

3. Las CeO₂NPs exhiben propiedades antiesteatóticas en un modelo *in vitro* de esteatosis hepatocelular.

Con la finalidad de evaluar el efecto de las CeO₂NPs en la esteatosis, las células HepG2 se incubaron con OA (1,33 mM) y PA (0,67 mM) durante 24 horas para la inducción de esteatosis. Las células fueron incubadas con medio, OA/PA, y OA/PA y tratadas con CeO₂NPs (10 µg/mL). Posteriormente se determinó el contenido celular de ácidos grasos por GC-MS.

Conforme a la inducción de esteatosis, las células expuestas a OA/PA mostraron un incremento de los ácidos grasos totales, mientras el tratamiento con CeO₂NPs reducía los ácidos grasos saturados (*Figura 4*).

4. Las CeO₂NPs inducen cambios en el metabolismo de los ácidos grasos en las células HepG2 esteatóticas.

A continuación, se estudiaron específicamente cada uno de los ácidos grasos individualmente. La incubación de las células HepG2 con OA/PA aumentó el contenido celular de C16:0, C18:0, C18:1n9c, C20:0, C20:1n9, C20:2n6, C20:5n3, C22:6n3 y C24:1n9. El tratamiento con CeO₂NPs disminuía significativamente los ácidos grasos saturados más abundantes C16:0 (26%) y C18:0 (35%) (*Figura 5*). Referente a los ácidos grasos insaturados, las CeO₂NPs reducían la mayoría de ácidos grasos de más de 18 carbonos, como el C20:1n9, C20:2n6, C20:3n6, C20:4n6, C20:5n3, C22:6n3 y C24:1n9 (*Figura 6*), mientras incrementaban el contenido de C18:3n3 (44%) y C18:3n6 (10%).

Métodos y resultados

Por último, se evaluó la actividad de las elongasas ELOVL5 y ELOVL6 y las desaturasas SCD1, FADS1 y FADS2, mediante índices metabólicos establecidos (ratio producto – sustrato para cada reacción) (*Figura 7*). Las células HepG2 esteatóticas mostraron un incremento del índice lipogénico C16:0/C18:2n6c, asociado a una activación de la actividad de ELOVL5 e inhibición de la SCD1. Las CeO₂NPs disminuyeron el índice lipogénico y revirtieron los cambios en la actividad de las elongasas y desaturasas inducidos por OA/PA (*Esquema 1*).

En resumen, este estudio demuestra el efecto directo antiesteatótico de las CeO₂NPs a través de la inducción de cambios en el metabolismo de los ácidos grasos.

Article

Beyond the Scavenging of Reactive Oxygen Species (ROS): Direct Effect of Cerium Oxide Nanoparticles in Reducing Fatty Acids Content in an In Vitro Model of Hepatocellular Steatosis

Marina Parra-Robert ^{1,†}, Eudald Casals ^{2,†}, Nuria Massana ¹, Muling Zeng ², Meritxell Perramón ¹, Guillermo Fernández-Varo ^{1,3}, Manuel Morales-Ruiz ^{1,3,4}, Víctor Puentes ^{5,6,7}, Wladimiro Jiménez ^{1,3} and Gregori Casals ^{1,4,*}

¹ Service of Biochemistry and Molecular Genetics, Hospital Clinic Universitari, Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBERehd), Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), 08905 Barcelona, Spain

² School of Biotechnology and Health Sciences, Wuyi University, Jiangmen 529020, China

³ Departament of Biomedicine, University of Barcelona, 08905 Barcelona, Spain

⁴ Working group for the biochemical assessment of hepatic disease-SEQC^{ML}, 08036 Barcelona, Spain

⁵ Vall d'Hebron Research Institute (VHIR), 08035 Barcelona, Spain

⁶ Institut Català de Nanociència i Nanotecnologia (ICN2), CSIC, The Barcelona Institute of Science and Technology (BIST), Campus UAB, Bellaterra, 08193 Barcelona, Spain

⁷ Institució Catalana de Recerca i Estudis Avançats (ICREA), 08010 Barcelona, Spain

* Correspondence: casals@clinic.cat; Tel.: +34-932275400-2667

† These authors contributed equally to this work.

Received: 13 July 2019; Accepted: 27 August 2019; Published: 29 August 2019



Abstract: Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) is characterized by hepatic accumulation of lipids. Antisteatotic effects of cerium oxide nanoparticles (CeO₂NPs) have recently been shown in animal models of liver disease. However, it is unclear whether the activity of CeO₂NPs is related solely to the decrease in oxidative stress or, in addition, they directly decrease liver fatty acid accumulation. To address this question, in this work, we used an in vitro model of hepatocellular steatosis, exposing HepG2 cells to oleic and palmitic acid. Cell uptake of CeO₂NPs and their effect on oxidative stress and viability of hepatic cells cultured with H₂O₂ were also evaluated. Results show that CeO₂NPs were uptaken by HepG2 cells and reduced oxidative stress and improved cell viability. Treatment with oleic and palmitic acid increased lipogenesis and the content of different fatty acids. CeO₂NPs reduced palmitic and stearic acid and most fatty acids consisting of more than 18 carbon atoms. These effects were associated with significant changes in elongase and desaturase activity. In conclusion, CeO₂NPs directly protected HepG2 cells from cell injury in oxidative stress conditions and reduced fatty acid content in steatotic conditions by inducing specific changes in fatty acid metabolism, thus showing potential in the treatment of NAFLD.

Keywords: nonalcoholic fatty liver disease; steatosis; liver; cerium oxide nanoparticles; oxidative stress

1. Introduction

Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) is characterized by hepatic lipid accumulation (steatosis), mainly in the form of triglycerides, and covers a wide spectrum of liver disease that ranges from simple hepatic steatosis (nonalcoholic fatty liver, NAFL) to nonalcoholic steatohepatitis (NASH), the last being

characterized by the appearance of inflammation and a higher risk of progression to more advanced forms including fibrosis, cirrhosis and hepatocellular carcinoma (HCC) [1].

Oxidative stress plays a role in the molecular mechanisms behind the progression of NAFLD. In this regard, the pathogenesis of NAFLD may be explained by a multiple-hit hypothesis [2]. In the context of excess energy, fatty acids (FAs) are esterified into triacylglycerides and stored in lipid droplets in the liver. The multiple-hit hypothesis considers multiple insults, including insulin resistance, adipokines, nutritional factors or gut microbiota that act together on genetically predisposed subjects in the development and progression of the disease [2,3]. These insults are associated with increased oxidative stress, proinflammatory cytokines and adipocytokines, leading to hepatocyte injury, inflammation and fibrosis [4,5]. The hepatic accumulation of free FA, lipid peroxidation products (reactive aldehydes and oxysterols) and reactive oxygen species (ROS) contribute to the development and progression of NAFLD from simple steatosis to NASH by impairing mitochondrial function, energy balance and biogenesis adaptation to chronic injury [6,7].

The current treatment of NAFLD consists of diet and lifestyle interventions, such as healthy eating habits and physical activity, to achieve weight loss and the control of its associated cardio-metabolic risk factors [8–10]. However, reinforcement of these interventions by pharmacological therapies would be useful in the management of patients. Unfortunately, effective treatment options for NAFLD remain limited [1]. At present, there are no pharmacological treatments licensed for the reduction of liver steatosis, and the American and European guidelines for the management of NAFLD patients are only supportive of the use of two drugs: pioglitazone in patients with NASH with or without *diabetes mellitus*, and vitamin E, a recognized antioxidant, in nondiabetic patients with NASH [9,10]. The identification of strategies directed to halt NAFLD progression are, therefore, an urgent need.

In recent years, the antioxidant properties of cerium oxide nanoparticles (CeO₂NPs) have been widely described in the literature [11–16]. CeO₂NPs, which display minimal toxicity to normal tissues and provide cellular protection from various forms of ROS and irradiation [17], have emerged as a powerful antioxidant therapeutic tool in the prevention and treatment of oxidative-stress-related diseases. The interest in CeO₂NPs include their natural advantages over other antioxidants since CeO₂NPs participate catalytically in redox cycles, which mean that they are not consumed during reaction, and thus, they can be used at low doses. Their oxygen storage capacity has proven useful in scavenging free radicals as soon as they are generated in situations of metabolic imbalance [12]. In this context, it has been shown that CeO₂NPs exhibit superoxide dismutase [18], catalase [19] and peroxidase [20] mimetic activities. Thus, CeO₂NPs have been postulated as a possible treatment for pathologies associated with chronic oxidative stress and inflammation such as cancer, cardiac disease and neurodegenerative disease, among others [21–25]. Interestingly, after their administration, CeO₂NPs are accumulated mainly in the liver and for long periods of time [26,27]. Recent studies carried out in our laboratory show that CeO₂NPs decrease portal hypertension, liver inflammatory response and hepatic steatosis in a rat model of liver fibrosis induced by CCl₄ [27]. Additionally, oral administration of CeO₂NPs to a NAFLD rat model associated with neonatal monosodium-glutamate-induced obesity has been reported to decrease body weight and liver steatosis [28]. However, it is unknown whether this antisteatotic effect is due to a direct effect of CeO₂NPs in the liver. In the current study, we used an in vitro model system of cultured human hepatic cells (HepG2) to test the hypothesis of whether CeO₂NPs can directly reduce FA accumulation in the absence of other stimuli.

2. Materials and Methods

2.1. Synthesis and Characterization of CeO₂NPs

2.1.1. Synthesis

CeO₂NPs of 4 nm of mean diameter were synthesized in aqueous media by the chemical precipitation of Cerium (III) Nitrate Hexahydrate (Ce(NO₃)₃) under basic conditions. Briefly, 10 mM of Cerium (III) Nitrate Hexahydrate was dissolved in 97 mL of Milli-Q H₂O at room temperature.

The solution was left under stirring for about 30 min. To this, 3 mL of tetramethylammonium hydroxide (TMAOH) (1.0 ± 0.02 M in H_2O) was added under stirring (final TMAOH concentration of 30 mM), and the mixture was left under stirring overnight. Afterward, nanoparticles (NPs) were purified by centrifugation (20,000 g, 10 min) and resuspended in an aqueous solution of 1 mM TMAOH. In this synthesis, the conversion of initial cerium precursor to CeO_2 NPs is nearly complete, as determined by UV-VIS spectroscopy and inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS).

2.1.2. Albumin Conjugation

Electrostatically stabilized CeO_2 NPs have a strong tendency to aggregate at physiological pH, which can result in deleterious immune responses [29]. To avoid this, Human Serum Albumin (HSA) was conjugated to the CeO_2 NPs surface prior to their use. Albumin was added at 100-fold the amount needed to cover the surface of CeO_2 NPs to ensure complete albumin corona formation.

2.1.3. Characterization

The NPs' size was determined using high-resolution transmission electron microscopy (HR-TEM) with a microscope JEOL JEM 2010F at 200 kV (Tokyo, Japan), and further image analysis using the Image J free software (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). The surface charge of the NPs was characterized in a Z-sizer (Malvern, Worcestershire, UK). The crystal structure was analyzed by X-ray powder diffraction (XRD) (Xpert Pannalytical, MA, USA), and the light interaction by UV-VIS spectroscopy (Shimadzu, Kyoto, Japan).

2.2. Cell Culture

HepG2 cells were obtained from American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA). This immortalized human hepatocellular stable cell line can be repeatedly frozen, thawed and propagated. HepG2 cells were seeded into either 96-well culture plates for cell bioavailability analysis, 24-well culture plates for ROS measurements, six-well culture plates for steatosis induction and nanoparticles cell uptake evaluation or 75 cm^2 flasks for measurements of oxysterols. After seeding, cells were grown to confluence in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 50 U/mL penicillin and 50 μ g/mL streptomycin, in a humidified atmosphere of 5% CO_2 at 37 °C. Thereafter, the cells were switched to serum-free DMEM for 16 h. For cell stimulation and treatment, old medium was removed and replaced with medium, medium containing 1.5 mM H_2O_2 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) or medium containing 1.5 mM H_2O_2 and CeO_2 NPs. Cells were incubated for the indicated time points and then harvested for biochemical or molecular assays. All experiments were repeated at least three times.

2.3. Internalization of CeO_2 NPs in HepG2 Cells

The uptake of CeO_2 NPs by the cell cultures was assessed using bright-field and dark-field TEM images. HepG2 cells were seeded (1.5×10^6 cells/well) in six-well plates and incubated with or without CeO_2 NPs (10 μ g/mL) for 24 h. Thereafter, cells were fixed in a 0.1 M phosphate buffer containing 2.5% glutaraldehyde and 2% paraformaldehyde. Cells were embedded in Spur's resin and thin sections (50–55 nm) were cut and placed on copper grids and then stained with uranyl acetate and lead citrate. After staining, the sections were examined using a low-electron-power microscope to increase contrast in a JEOL-1010 TEM (JEOL, Tokyo, Japan) operated at 80 kV and equipped with a BioScan camera (Gatan, CA, USA).

2.4. Cell Viability Analysis

Cell viability was assessed using the MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium) technique (CellTiter 96; Promega, Madison, WI, USA) according to the manufacturer's instructions. In brief, cells were seeded

(1×10^5 cells/well) in 96-well plates and, after overnight starvation, cells were treated with medium, H_2O_2 (1.5 mM) or H_2O_2 and CeO_2 NPs (10 μ g/mL) for 90 min at 37 °C. Then, cells were washed twice with Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) and CellTiter reagent was added to each well. After incubation for 3 h at 37 °C to allow cells to bioreduce MTS into formazan, the absorbance of formazan, measured at 490 nm (SpectraMax 340, Molecular Devices, Sunnyvale, CA), is directly proportional to the number of living cells in culture.

2.5. Reactive Oxygen Species Measurement

Fluorescence spectrophotometry was used to measure ROS, with 2',7'-DCF-DA (2',7'-dichlorofluorescein diacetate) as the probe (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). DCF-DA readily diffuses through the membrane and is enzymatically hydrolyzed by intracellular esterases to the nonfluorescent DCFH (2',7'-dichlorodihydrofluorescein), which can then be rapidly oxidized to fluorescent DCF in the presence of ROS. HepG2 cells were seeded in 24-well plates and, after overnight starvation, cells were incubated alone or with H_2O_2 (1.5 mM) in the presence of CeO_2 NPs (1 μ g/mL) or medium for 90 min. Thereafter, cells were washed with HBSS and incubated with 10- μ M DCF-DA in Hanks Balanced Salt Solution for 40 min at 37 °C in the dark. The supernatant was collected to measure the production of ROS, and the intensity of DCF fluorescence was immediately read in a fluorescence spectrophotometer (FLUOstar OPTIMA; BMG LABTECH, Ortenberg, Germany) at 485 nm for excitation and at 520 nm for emission.

2.6. Oxysterols Measurements

Cells were seeded in 75-cm² flasks and, after overnight starvation, incubated with medium, H_2O_2 (1.5 mM) or H_2O_2 and CeO_2 NPs (1.5 mM; 10 μ g/mL) for 90 min. Afterward, cell pellets were obtained by trypsinization and the oxysterol content was analyzed. Cholesterol, cholesterol d7, 7 β -hydroxycholesterol, 7-ketocholesterol, 25-hydroxycholesterol and 5 α -cholestane were purchased from Steraloids (Newport, RI). Lipids were extracted from HepG2 cells with chloroform–methanol (2:1 vol/vol) in the presence of butylated hydroxytoluene (0.005%) as an antioxidant. 5 α -cholestane and cholesterol-d7 were added as internal standards. After centrifugation, the lower phase was evaporated under a nitrogen stream and extracts were silylated with N,O-bis-(trimethylsilyl)-trifluoroacetamide containing 1% trimethylchlorosilane (Sigma). Gas chromatography mass spectrometry (GC–MS) analyses were performed on a Shimadzu GCMS QP2010 Ultra instrument (Kyoto, Japan). Sterols were separated in a Sapines-5MS+ capillary column (30 m \times 0.25 mm internal diameter \times 0.25 μ m film thickness) from Teknokroma with helium as a carrier gas at a constant velocity of 50 cm/s. The temperature program was programmed to begin at 50 °C and this temperature was maintained for 3 min. Then, it was elevated at a rate of 80 °C min⁻¹ to 240 °C, before being increased at 2 °C min⁻¹ to a temperature of 290 °C and finally, maintained for 2 min at 290 °C. The ion source and transfer line temperatures were set to 270 °C and 280 °C, respectively. Mass detector was operated in selected ion monitoring (SIM) mode and identification of the analytes was achieved by GC retention time comparison with reference standards. No oxidation of d7-cholesterol to deuterated oxysterols was observed during the analytical procedure.

2.7. Induction of Steatosis in HepG2 Cells with Oleic and Palmitic Acids

HepG2 cells were seeded (1.5×10^6 cells/well) in six-well plates and grown to confluence as described above. After overnight starvation, the medium was changed to 10% FBS medium or 10% FBS medium with 1.33 mM oleic acid (OA) and 0.67 mM palmitic acid (PA) with or without CeO_2 NPs (10 μ g/mL) for 24 h to induce the hepatosteatotic condition [30,31]. Three cell cultures were compared: (i) cells incubated with 10% FBS medium, (ii) cells incubated with 10% FBS medium and OA+PA, (iii) cells incubated with 10% FBS and OA+PA and CeO_2 NPs (10 μ g/mL).

2.8. Total FA Measurements

Lipids were extracted from HepG2 cells with chloroform–methanol (2:1 vol/vol) in the presence of butylated hydroxytoluene (0.005%). C19:0 (Sigma Aldrich, Madrid, Spain) was used as an internal standard. After homogenization, samples were placed on an orbital shaker for 20 min at room temperature and centrifuged for 10 min at 10,000 rpm. The supernatant was mixed with 250 μ L of water, vortexed and centrifuged again for 10 min at 10,000 rpm. The lower organic phase was retrieved, evaporated under a nitrogen stream and redissolved in a mixture of methanol:hexane (4:1, v/v). Acetyl chloride was added and FA methyl ester (FAME) obtained by heating the samples at 100 °C for 1 h. GC–MS analyses were performed on a Shimadzu GCMS QP2010 Ultra instrument (Kyoto, Japan). Final extracts were injected into the gas chromatograph interfaced with a mass selective detector. Chromatographic separation was achieved on a Sapines-5MS+ capillary column (30 m \times 0.25-mm internal diameter \times 0.25- μ m film thickness) from Teknokroma (Barcelona, Spain) with helium as a carrier gas at a constant velocity of 50 cm/s. The temperature program was set to begin at 50 °C and this temperature was maintained for 3 min. Then, it was elevated at a rate of 80 °C min^{-1} to 240 °C, before being increased at 2 °C min^{-1} until 290 °C and finally, maintained for 2 min at 290 °C. The ion source and transfer line temperatures were set to 270 °C and 280 °C, respectively. Mass detector was operated in scan mode. Identification of the FAME in the sample extracts was achieved by mass spectrum and GC retention time comparison with reference standards. The activities of FA elongases and desaturases were estimated, assessing established product to precursor metabolic ratios for each reaction [32–34]. In addition, the lipogenic index was calculated as the ratio C16:0/C18:2n6c [35,36].

2.9. Statistical Analysis

Quantitative data were analyzed using GraphPad Prism 6 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) and statistical analysis of the results was performed by an unpaired *t*-test. Data is expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM) and considered significant at a *p*-level of 0.05 or less. The study was performed according to the criteria of the Investigation and Ethics Committee of the Hospital Clínic of Barcelona.

3. Results

3.1. Characterization of CeO₂NPs

A description of the characterization of the CeO₂NPs used in this study has been published previously [27]. Briefly, the measured Z-Potential of CeO₂NPs was +40 mV at the final synthesis pH (pH = 6). The X-ray diffraction pattern showed pure CeO₂NPs with the typical peak broadening characteristic of nanosized particles. In this synthesis, CeO₂NPs obtained are monodisperse with an average of 4 \pm 1 nm size, as determined by TEM. In these conditions, the high surface energy of the NPs makes their electrical double layer unable to keep them apart and small agglomerates are formed. To avoid that, their immediate albuminization as they are formed, once the extreme initial pH of the solution is reduced (from pH 12 to pH 6), is key. HSA conjugation on the surface of the CeO₂NPs has been characterized by the increase in DLS and modification of the Z-Potential (from +40 mV of NPs as synthesized to –14 mV, which is the average Z-Potential value of the HSA (Figure 1).

3.2. Cellular Uptake of CeO₂NPs

Transmission electron microscopy was used to evaluate the association between HepG2 cells and incubation with CeO₂NPs (10 μ g/mL) for 24 h. TEM images revealed the presence of CeO₂NPs inside the cells, mainly in membrane-bound compartments and to a lesser extent, free in the cytoplasm (Figure 2). The presence of CeO₂NPs is revealed in the dark-field images since the high contrast of cerium oxide (CeO₂) crystals allowed them to be easily distinguished (as bright spots) from other cellular structures. The confinement of CeO₂NPs mainly in vacuoles or endosome-like organelles

suggested their presence in secretory compartments. These structures were not observed in the TEM images obtained from control cells incubated without CeO₂NPs.

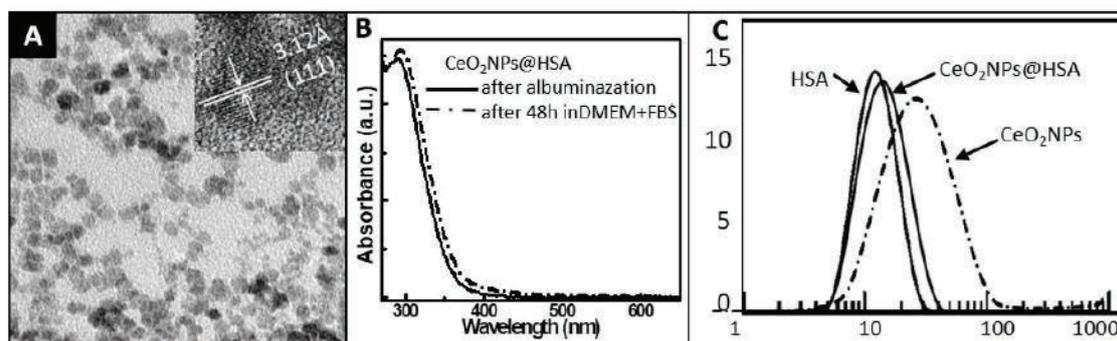


Figure 1. CeO₂NPs characterization. (a) Transmission electron microscopy (TEM) and high-resolution transmission electron microscopy (HR-TEM) (inset) showing the as-synthesized cerium oxide (CeO₂) nanocrystals of 4±1 nm; (b) UV-VIS spectroscopy of CeO₂NPs after conjugation to Human Serum Albumin (HSA) (CeO₂NPs@HSA) and the same nanoparticles (NPs) after 48 h in model physiological media (DMEM + Fetal Bovine Serum at 10% v/v). The similar spectra through time shows the stability in the physiological media of the NPs used; (c) Dynamic light scattering (DLS) of CeO₂NPs as synthesized, HSA, and CeO₂NPs@HSA. While the spectrum of CeO₂NPs shows a large presence of agglomerated NPs, the similar spectra of HSA and CeO₂NPs@HSA rules out the presence of CeO₂ aggregates. Note, that all samples have been purified before measurement.

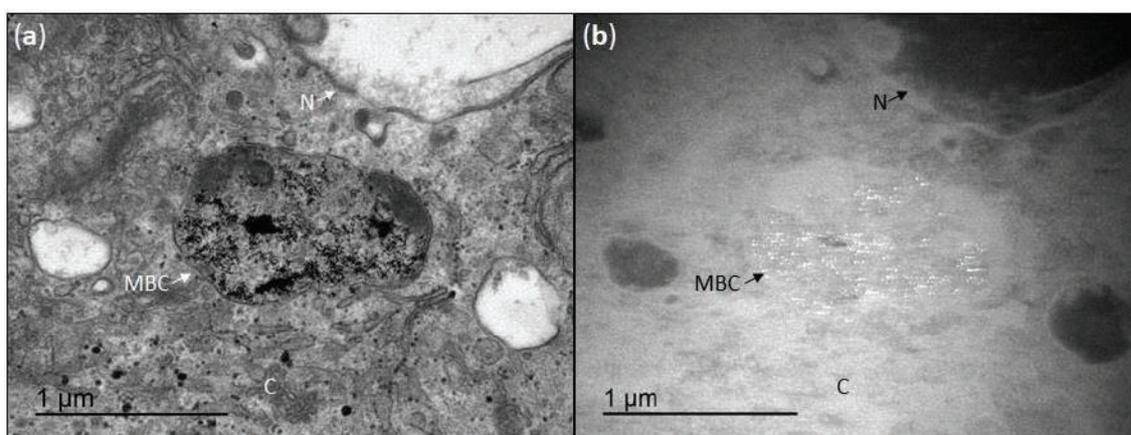


Figure 2. Cellular uptake of CeO₂NPs. (a) Transmission electron microscopy image of CeO₂NPs in HepG2 cells that were incubated for 24 h at a CeO₂NPs concentration of 10 μg/mL; (b) the same image obtained under dark-field exposure, since the high contrast of the CeO₂NPs allows them to be easily distinguished. MBC indicates a membrane-bound compartment, N the nucleus and C the cytoplasm.

3.3. Effect of CeO₂NPs in the Viability of HepG2 Incubated with H₂O₂

To evaluate cellular CeO₂NPs protection from H₂O₂-induced cytotoxicity in human hepatic cells, HepG2 cells were incubated with H₂O₂ and cellular viability was analyzed in the presence of CeO₂NPs or vehicle. Oxidative stress induced with a 1.5 mM H₂O₂ produced a reduction in cell viability of 14% (control 100% ± 1.8% and H₂O₂ 85.8% ± 1.1% viability (mean ± SEM); *p* < 0.0001). In these conditions, CeO₂NPs treatment improved cell viability, from 85.8% ± 1.1% in the H₂O₂ condition to 99.6% ± 1.8% in cells exposed to H₂O₂ and treated with NPs (*p* < 0.0001), indicating that CeO₂NPs protect from the oxidative-stress-associated cell death induced by H₂O₂ in HepG2 cells (Figure S1A).

3.4. Effect of CeO₂NPs in the ROS Production of HepG2 Incubated with H₂O₂

HepG2 cells incubated with H₂O₂ (1.5 mM) increased ROS production by 25% (control 100% ± 3.9% and H₂O₂ 125.4% ± 3.3% (mean ± SEM); $p < 0.0001$), as determined by fluorescence spectrophotometry using the oxidant-sensitive dye 2',7'-DCF-DA. ROS production was significantly inhibited in the presence of CeO₂NPs (H₂O₂ 125.4% ± 3.3% and H₂O₂ with CeO₂NPs 109.8% ± 3.8% (mean ± SEM); $p = 0.006$). These results indicate that CeO₂NPs protect from the oxidative stress induced by H₂O₂ in HepG2 cells (Figure S1B).

3.5. Effect of CeO₂NPs in Cholesterol and Oxysterols Content of HepG2 Cells Treated with H₂O₂

Effects of CeO₂NPs in the cellular content of cholesterol and cholesterol oxidation products were evaluated in HepG2 cells treated with vehicle, HepG2 cells treated with H₂O₂ (1.5 mM) and HepG2 cells treated with H₂O₂ and CeO₂NPs (1.5 mM, 10 µg/mL). Figure 3A shows a chromatogram of cholesterol and cholesterol oxidation products obtained by GC-MS in HepG2 cells. Cholesterol content was approximately 1000-fold higher than cholesterol oxidation products. The most abundant oxysterol measured was 7-ketocholesterol, followed by 7β-hydroxycholesterol and 25-hydroxycholesterol. No significant differences in cholesterol content were observed between cells treated with vehicle, H₂O₂ or H₂O₂ and CeO₂NPs. In contrast, cells treated with H₂O₂ presented a higher content of 7β-hydroxycholesterol. Treatment with CeO₂NPs reduced the concentration of oxysterols, although this decrease was not statistically significant (Figure 3B). Similar results were obtained when the ratio of oxysterol/cholesterol was calculated.

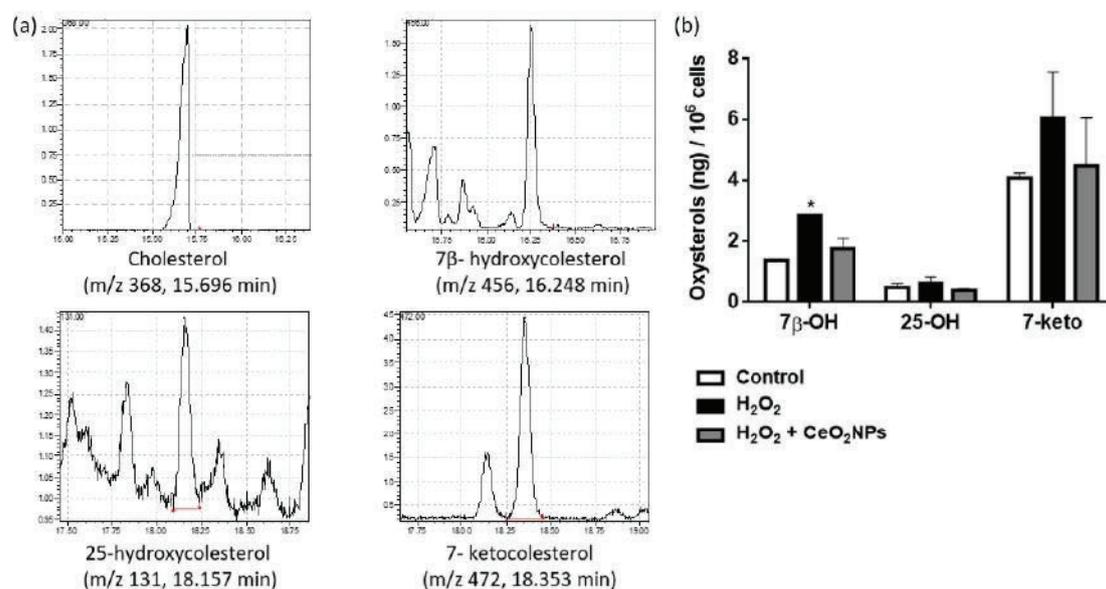


Figure 3. (a) Gas chromatography mass spectrometry chromatograms of cholesterol and its oxidation products in HepG2 cells; (b) oxysterols content in HepG2 cells treated with vehicle, H₂O₂ (1.5 mM) and H₂O₂ and CeO₂NPs (1.5 mM; 10 µg/mL). * $p < 0.05$ compared with control.

3.6. Effects of CeO₂NPs in Total FA Content of HepG2 Cells Treated with Oleic and Palmitic Acid

Oleic and palmitic acid treatment of HepG2 was used as an in vitro model to investigate the effect of CeO₂NPs in steatosis. HepG2 cells were exposed to 1.33 mM oleic acid (OA) and 0.67 mM palmitic acid (PA) for 24 h and intracellular accumulation of total FAs was measured by GC-MS. A chromatogram showing FAs in HepG2 cells is presented in Figure 4A. Consistent with the induction of the steatosis, total FAs content in HepG2 cells was increased in cells exposed to OA and PA in comparison to those exposed to vehicle (Figure 4B). Treatment with CeO₂NPs of cells exposed to OA

and PA produced a significant reduction of total saturated FAs (Figure 4C), while the total amount of unsaturated FAs was not significantly reduced (Figure 4D).

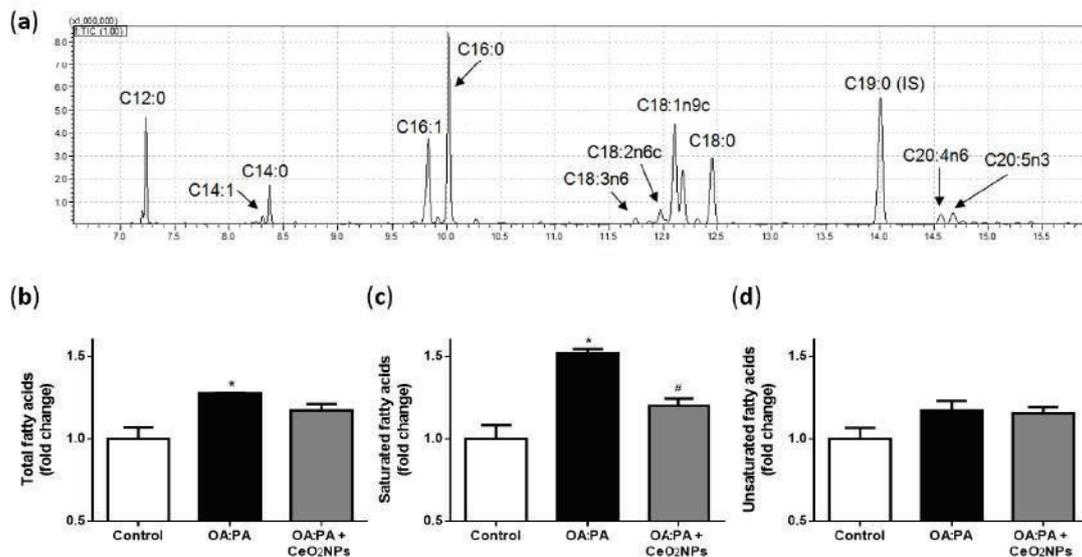


Figure 4. (a) Gas chromatography–mass spectrometry chromatogram of fatty acids in HepG2 cells. Content of total fatty acids (b), saturated fatty acids (c) and unsaturated fatty acids (d) in HepG2 cells exposed to vehicle (control), oleic acid:palmitic acid (OA:PA) (1.33:0.67 mM) and OA:PA with CeO₂NPs (10 µg/mL). * $p < 0.05$ compared with control; # $p < 0.05$ compared with OA:PA.

3.7. CeO₂NPs Induce Specific Changes in the FA Metabolism of Steatotic HepG2 Cells

Analysis of the individual FA species showed that, compared to normal cells, HepG2 cells exposed to OA and PA presented significant elevations in the intracellular content of different FA. As represented in Figure S2 and Table S1 (Supplementary Material), OA and PA incubation increased the cell content of C16:0, C18:0, C18:1n9c, C20:0, C20:1n9, C20:2n6, C20:5n3, C22:6n3 and C24:1n9. Interestingly, CeO₂NPs treatment of cells exposed to OA and PA decreased the cell content of most of these FA. Thus, CeO₂NPs treatment resulted in a 26% and 35% significant reduction of the highly abundant saturated FAs C16:0 and C18:0, respectively, and also, significantly decreased the content of very-long-chain saturated FA C23:0 by 58% (Figure 5). Regarding unsaturated FA, CeO₂NPs reduced the content of most FAs consisting of more than 18 carbon atoms, such as C20:1n9, C20:2n6, C20:3n6, C20:4n6, C20:5n3, C22:6n3 and C24:1n9 (Figure 6). In contrast, C18:3n3 and C18:3n6 content increased 44% and 10%, respectively, in cells treated with CeO₂NPs.

In order to determine the mechanism of CeO₂NPs antisteatotic effect, metabolic pathways of FAs were investigated. The activities of the main FA elongases (elongation of very-long-chain fatty acids 5 and 6 (ELOVL5 and ELOVL6)), and desaturases (steroyl-CoA desaturase 1 (SCD1) and fatty acid desaturase 1 and 2 (FADS1 and FADS2)), were estimated by measuring the ratios between their products and substrates (Figure 7). Results showed that steatotic HepG2 cells presented an elevation of the lipogenic index C16:0/C18:2n6, which was associated with an activation of the elongase ELOVL5 and an inhibition of the desaturase SCD1 activities. CeO₂NPs treatment reduced the lipogenic index and reversed the changes in the elongase and desaturase activities induced by OA and PA. In addition, steatosis-induced elongation and desaturation towards the n-3 and n-6 pathway were normalized after steatotic cells were treated with CeO₂NPs. Scheme 1 shows specific changes in FA metabolism induced by CeO₂NPs in steatotic cells.

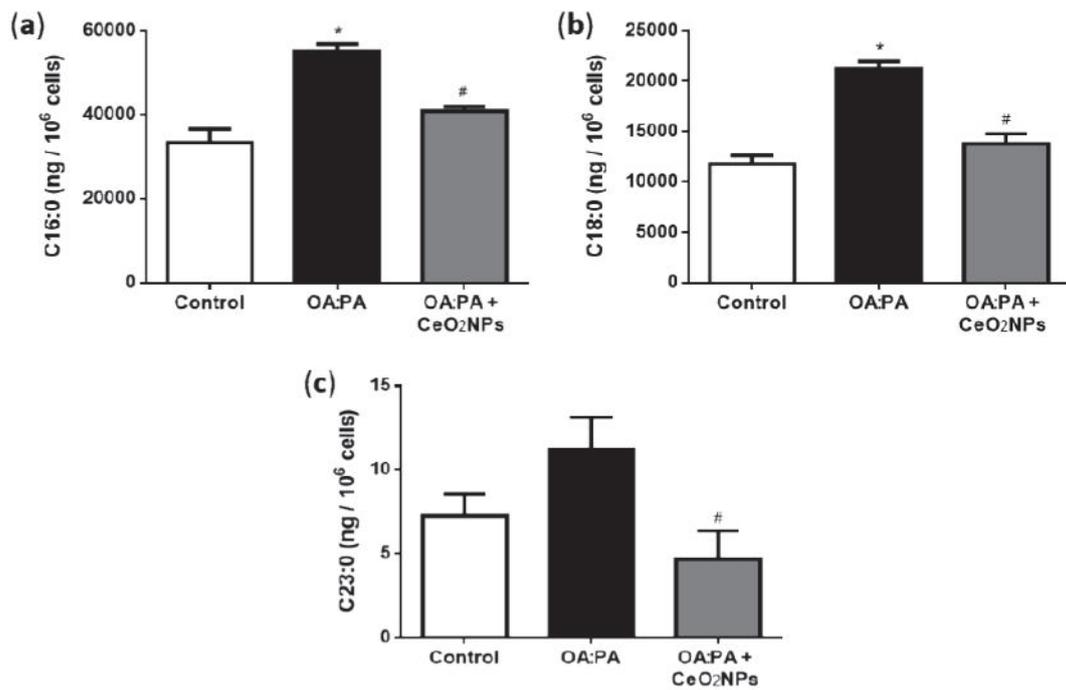


Figure 5. Palmitic (C16:0) (a), stearic (C18:0) (b) and tricosanoic (C23:0) (c) acid content in control cells, cells incubated with OA:PA (1.33:0.67 mM) and cells incubated with OA:PA treated with CeO₂NPs (10 μg/mL). * $p < 0.05$ compared with control; # $p \leq 0.05$ compared with OA:PA.

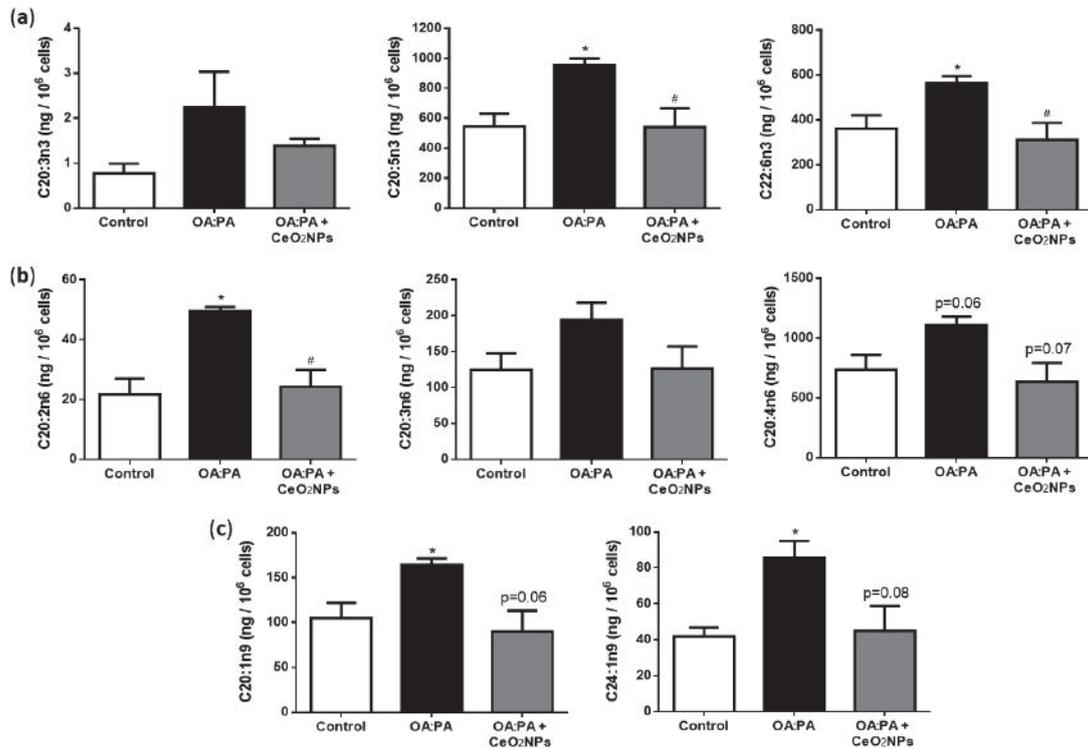


Figure 6. Cell content of n-3 (a), n-6 (b) and n-9 (c) unsaturated fatty acids larger than 18 carbons in control cells, cells incubated with OA:PA (1.33:0.67 mM) and cells incubated with OA:PA treated with CeO₂NPs (10 μg/mL). * $p < 0.05$ compared with control; # $p \leq 0.05$ compared with OA:PA.

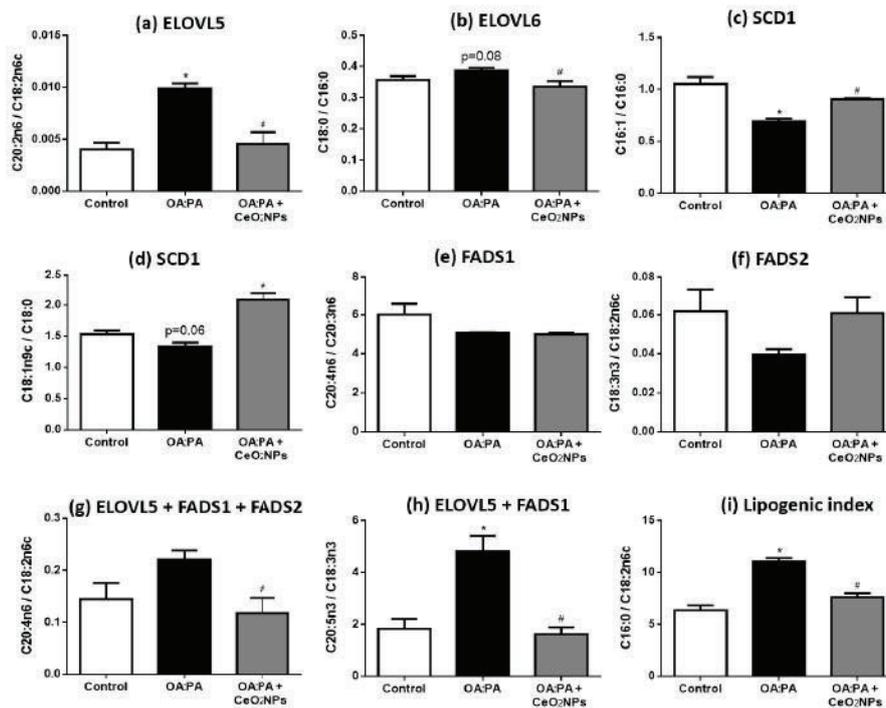
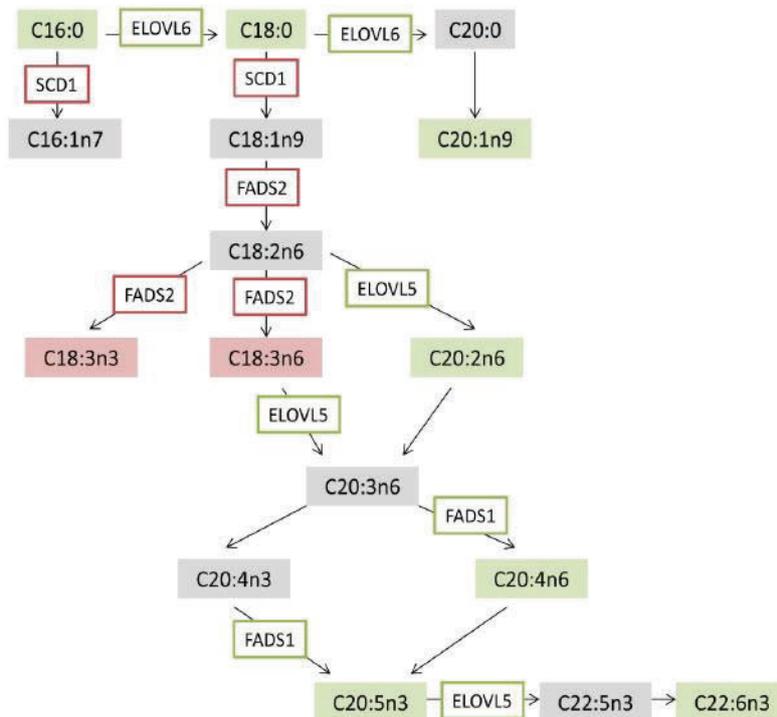


Figure 7. Fatty acid elongase and desaturase activities and lipogenic index in control cells, cells incubated with OA:PA (1.33:0.67 mM) and cells incubated with OA:PA treated with CeO₂NPs (10 µg/mL). C20:2n6/C18:2n6c (ELOVL5) (a); C18:0/C16:0 (ELOVL6) (b); C16:1/C16:0 (SCD1-C16:0) (c); C18:1n9c/C18:0 (SCD1-C18:0) (d); C20:4n6/C20:3n6 (FADS1) (e); C18:3n3/C18:2n6c (FADS2) (f); C20:4n6/C18:2n6c (ELOVL5 + FADS1 + FADS2 n-6 pathway) (g); C20:5n3/C18:3n3 (ELOVL5 + FADS1 n-3 pathway) (h); C16:0/C18:2n6c (lipogenic index) (i). * *p* < 0.05 compared with control; # *p* < 0.05 compared with OA:PA.



Scheme 1. Changes in fatty acid metabolism induced by CeO₂NPs in steatotic hepatic cells (HepG2 cells). Fatty acids in red are those up (increased content) and in green those down (decreased content) after CeO₂NPs treatment in our analyses. An increase in elongase and desaturase activities is framed in red and a decrease, in green.

4. Discussion

The current study shows that CeO₂NPs present protective cellular effects and reduce FA content in cultured human hepatic cells (HepG2 cells) cultivated under characteristic conditions of NAFLD. Specifically, cells were cultured under oxidative stress (H₂O₂ induced) or steatosis (OA:PA induced) in order to evaluate if CeO₂NPs presented a direct effect in these specific conditions. First, we evaluated whether CeO₂NPs were uptaken by HepG2 cells since, after intravenous administration of CeO₂NPs (3–20 nm), they have been observed to be located within hepatocytes of healthy mice [37] and rats with advanced liver disease [27]. In agreement with these *in vivo* studies, TEM images obtained in the current study revealed the uptake by HepG2 cells of CeO₂NPs, which were confined in vacuoles or endosome-like organelles. Similar observations have been reported when studying the uptake of CeO₂NPs by human hepatic cells C3A, in which confocal microscopy revealed a main perinuclear location of nanoparticles that suggested their presence in late endocytic or secretory compartments [38]. Furthermore, internalization of CeO₂NPs has been detected in human hepatic cells WRL-68 by flow cytometry [39].

Increased hepatic oxidative stress is a main physiopathological characteristic of NAFLD [40,41]. Increased ROS generation triggers lipid peroxidation, release of inflammatory cytokines and cell death. Patients with NASH display both an increase in ROS and nitrogen species production and a lack of endogenous antioxidant defenses [40]. In this regard, we next evaluated whether CeO₂NPs could directly decrease cellular oxidative stress in hepatic cells cultured with hydrogen peroxide (H₂O₂). CeO₂NPs produced a reduction in H₂O₂-induced cellular oxidative stress, as indicated by the decreased fluorescence of the oxidant-sensitive dye 2',7'-DCF-DA. This reduction in oxidative stress in CeO₂NPs-treated cells was accompanied by an improvement in cellular viability measured by the MTS assay. These results indicate that CeO₂NPs directly protect human hepatic cells from oxidative stress and the associated cellular injury. In agreement with this observation, Azari et al. [42] recently found that pretreatment of HepG2 cells with CeO₂NPs prevented oxidative and cellular damage caused by acrylamide, a toxic chemical compound present in cooked foods.

Also related to enhanced ROS production in NAFLD is the increase of hepatic oxidized cholesterol metabolites, which have been related to the progression of NAFLD [6,7]. Free cholesterol is susceptible to enzymatic and non-enzymatic oxidation, leading to the formation of a number of cholesterol oxidation products, including 25-hydroxycholesterol (enzymatic reaction) and 7 β -hydroxycholesterol and 7-ketocholesterol (non-enzymatic) [43]. Our findings indicate an increase in 7 β -hydroxycholesterol, 7-ketocholesterol and 25-hydroxycholesterol when HepG2 cells were exposed to an oxidant stimulus such as H₂O₂, suggesting that this is a suitable *in vitro* model for the study of cholesterol oxidation. However, when cells were co-incubated with CeO₂NPs, no significant reduction of oxysterols levels was observed. Correction of oxysterols levels by cholesterol lead to a similar trend. Further studies are necessary to ascertain the effect of CeO₂NPs on oxysterol formation in liver cells.

NAFLD is usually characterized by the presence of hepatic liver steatosis [9,10]. There is evidence derived from animal *in vivo* studies that CeO₂NPs treatment may reduce liver steatosis in different models of liver disease. Thus, in previous studies, our group first observed a reduction in liver steatosis in a CCl₄-induced model of liver fibrosis [27], and the same effect was reproduced in a methionine- and choline-deficient diet model of steatohepatitis in rats [44]. Also, oral administration of CeO₂NPs to a NAFLD rat model associated with neonatal monosodium-glutamate-induced obesity has been reported to decrease body weight and liver steatosis [28]. However, it is unknown whether these antisteatotic effects are only related to a systemic and/or hemodynamic improvement, or if CeO₂NPs may also behave as antisteatotic agents *per se*. In addition, it is unknown whether similar antisteatotic effects of CeO₂NPs to those observed in rats may be found in the human liver. Interestingly, there is evidence that CeO₂NPs may interfere in the normal FA metabolism of human-derived hepatocytes (HepG2 cells) [45,46], which represent the cell type in the liver that mainly accumulates FAs in NAFLD.

Therefore, in order to evaluate the ability of CeO₂NPs to reduce FA content in human hepatic cells, we next used an *in vitro* model of hepatocellular steatosis based on the administration of OA

and PA (2:1 molar ratio) to HepG2 cells. Induction of steatosis in hepatic cells through incubation with a mixture of OA (C18:1n9) and PA (C16:0) is an *in vitro* steatotic model widely used that is useful to evaluate antisteatotic effects in hepatic cells since it mimics the liver steatosis of NAFLD in patients [30,31,47,48]. OA, a monounsaturated FA, and PA, a saturated FA, are the most abundant FAs present in liver triglycerides [49] and serum [50]. These FAs have individual cell effects: OA is more steatogenic, while PA has a greater pro-apoptotic effect [31]. Exposure of HepG2 cells to a 2 mM mixture of OA:PA with a ratio of 2:1 for 24 h provides the maximal lipid accumulation with minimal cytotoxicity [30,31]. Gómez-Lechón et al. [30] found similar lipid accumulation in this *in vitro* model of hepatocellular steatosis when compared to hepatocytes from a human steatotic liver.

Our data show that HepG2 cells incubated with OA and PA increased C16:0, C18:0, C18:1n9c, C20:0, C20:1n9, C20:2n6, C20:5n3, C22:6n3 and C24:1n9. This is in agreement with a general induction of FA content previously observed in this model [31] and in the liver of patients with NAFLD [32,51–53]. However, C18:3n3 and C18:3n6 levels were not increased. In agreement with this, other research groups found low hepatic levels of C18:3n3 and C18:3n6 in animal models of NAFLD induced by a high-fat diet and CCl₄ [54] and a methionine- and choline-deficient diet [55], respectively.

PA (C16:0) increases the synthesis of C18:0 by elongation (ELOVL6), whereas OA (C18:1n9c) leads to higher content of C20:1n9 and C24:1n9, according to the metabolic elongation pathway of n-9 fatty acids. OA also promotes the formation of n-3 and n-6 long chain FAs through FADS2. Steatotic HepG2 cells presented decreased contents of C18:3n3 and C18:3n6, which may be associated with reduced FADS2 activity. By contrast, C20:4n6, C20:5n3 and C22:6n3 were markedly increased, supporting an induction of elongation and desaturation towards the n-3 and n-6 pathways. Overall, the increase in the lipogenic index C16:0 / C18:2n6c on HepG2 cells exposed to OA and PA is also in agreement with the induction of the steatotic metabolic process. Other indexes, such as C18:0/C16:0 (ELOVL6), which is increased in this model, have been shown to relate to the degree of liver steatosis in patients with NAFLD [51].

The antisteatotic effect of CeO₂NPs was proven by reduction of the highly abundant saturated FA C16:0 and C18:0 levels, together with a reduced content of most unsaturated FAs consisting of more than 18 carbon atoms. A differential effect of CeO₂NPs on C16:0 and C18:1n9 may be explained by the fact that C16:0 is not readily esterified and, to avoid toxicity, is converted to unsaturated FAs (such as C16:1n7 and C18:1n9) through elongation by ELOVL6 and desaturation by SCD1. Our data show that CeO₂NPs decreased ELOVL6 and increased SCD1 activities, which may explain why C16:1n7 and C18:1n9 levels were not reduced after CeO₂NPs treatment. Results suggest that CeO₂NPs may induce a more effective transformation of C16:0 to these unsaturated FAs to avoid toxicity.

The other significant FAs for which contents were reduced by CeO₂NPs treatment were those unsaturated FAs that consisted of more than 18 carbon atoms. The effect of CeO₂NPs in the reduction of these FAs was remarkable since many of them were completely normalized. This effect may be related to the observed inhibition of elongation and desaturation towards the n-3 and n-6 pathway. Importantly, CeO₂NPs reduced the eicosanoid precursors C20:4n6, C20:5n3 and C22:6n3, which are involved in the induction of inflammation and cell membrane integrity. However, provided that FAs consisting of more than 18 carbon atoms are preferentially oxidized in peroxisomes rather than in mitochondria, further research is necessary to evaluate whether CeO₂NPs may also promote peroxisome FA oxidation. In addition, C18:3n6 and C18:3n3 FA, which were not increased in steatotic HepG2 cells, exhibited an increase in their levels when cells were treated with CeO₂NPs, suggesting a CeO₂NPs-mediated induction of FADS2 activity. Finally, reduction of the lipogenic index by CeO₂NPs supports an overall antisteatotic effect.

One limitation of this study relates to the lack of evaluation of other factors that may also play a role in the pathophysiology of NAFLD, together with oxidative stress and lipid dysregulations. A significant example are the nuclear receptors, such as peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs), liver X receptors (LXR) and farnesoid X receptors (FXR). They have been involved in the natural history of NAFLD, demonstrating that PPARs have one of the main roles in hepatic steatogenesis, LXR in

hepatic inflammation and FXR in hepatic fibrogenesis [56]. Furthermore, TEM images showing the cell uptake of CeO₂NPs were only obtained in basal conditions and there could be some changes in the localization of CeO₂NPs under oxidative stress and/or steatotic conditions. Finally, the antisteatotic effect of CeO₂NPs was evaluated in an OA:PA mixture and differential effects on steatosis induced by either OA alone or PA alone were not evaluated.

5. Conclusions

CeO₂NPs directly protect human hepatic cells from cell injury in conditions of oxidative stress and reduce FA content in steatotic conditions by inducing specific metabolic changes, suggesting that these NPs have great potential in the treatment of NAFLD.

Supplementary Materials: The following are available online at <http://www.mdpi.com/2218-273X/9/9/425/s1>.

Author Contributions: Conceptualization, M.P.-R., E.C., V.P., W.J. and G.C.; methodology, M.P.-R., E.C., M.Z., N.M., M.P., V.P., W.J. and G.C.; writing—original draft preparation, M.P.-R., E.C. and G.C.; writing—review and editing, M.P.-R., E.C., N.M., M.Z., M.P., G.F.-V., M.M.-R., V.P., W.J., and G.C.

Funding: This research was funded by Ministerio de Economía y Competitividad, grant number PI15-00077 to G.C. and SAF2016-75358-R to M.M.-R., co-financed by FEDER, European Union, “A way of making Europe”; “Secretaria d’Universitats i Recerca del Departament d’Empresa i Coneixement de la Generalitat de Catalunya, convocatòria d’Indústria del Coneixement modalitat B”, grant number 2018_PROD_00187 to W.J, cofinanced by the European Union through the European Regional Development Fund (ERDF), “A way of making Europe”; CIBERehd is financed by the Instituto de Salud Carlos III.; Wuyi University Funding for Hight Talents Introduction, grant number 2018TP010 to E.C. and 2018TP011 to M.Z.; Foundation from Department of Education of Guangdong Province, grant number 2016KCXTD005 and 2017KSYS010, to E.C. and M.Z. The APC was funded by Wuyi University Funding for Hight Talents Introduction, grant number 2018TP010 to E.C.

Acknowledgments: We thank Scientific and Technology Centers of the University of Barcelona (CCiT-UB) for their contribution to ultrastructural examinations by electron microscopy.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

References

1. Friedman, S.L.; Neuschwander-Tetri, B.A.; Rinella, M.; Sanyal, A.J. Mechanisms of NAFLD development and therapeutic strategies. *Nat. Med.* **2018**, *24*, 908–922. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Buzzetti, E.; Pinzani, M.; Tsochatzis, E.A. The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Metabolism* **2016**, *65*, 1038–1048. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Italian Association for the Study of the Liver (AISF). AISF position paper on nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD): Updates and future directions. *Dig. Liver Dis.* **2017**, *49*, 471–483. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Duvnjak, M.; Lerotić, I.; Baršić, I.; Tomašić, V.; Jukić, L.V.; Velagić, V. Pathogenesis and management issues for non-alcoholic fatty liver disease. *World J. Gastroenterol.* **2007**, *13*, 4539–4550. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Moore, J.B. From sugar to liver fat and public health: Systems biology driven studies in understanding non-alcoholic fatty liver disease pathogenesis. *Proc. Nutr. Soc.* **2019**, *78*, 290–304. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Bellanti, F.; Villani, R.; Facciorusso, A.; Vendemiale, G.; Serviddio, G. Lipid oxidation products in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis. *Free Radic. Biol. Med.* **2017**, *111*, 173–185. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Bellanti, F.; Villani, R.; Tamborra, R.; Blonda, M.; Iannelli, G.; di Bello, G.; Facciorusso, A.; Poli, G.; Iuliano, L.; Avolio, C.; et al. Synergistic interaction of fatty acids and oxysterols impairs mitochondrial function and limits liver adaptation during nafld progression. *Redox Biol.* **2018**, *15*, 86–96. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Singh, S.; Osna, A.N.; Kharbanda, K.K. Treatment options for alcoholic and non-alcoholic fatty liver disease: A review. *World J. Gastroenterol.* **2017**, *23*, 6549–6570. [[CrossRef](#)]
9. Chalasani, N.; Younossi, Z.; Lavine, J.E.; Charlton, M.; Cusi, K.; Rinella, M.; Harrison, S.A.; Brunt, E.M.; Sanyal, A.J. The diagnosis and management of nonalcoholic fatty liver disease: Practice guidance from the American Association for the Study of Liver Diseases. *Hepatology* **2018**, *67*, 328–357. [[CrossRef](#)]
10. European Association for the Study of the Liver (EASL); European Association for the Study of Diabetes (EASD); European Association for the Study of Obesity (EASO). EASL-EASD-EASO clinical practice guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease. *J. Hepatol.* **2016**, *64*, 1388–1402. [[CrossRef](#)]

11. Schubert, D.; Dargusch, R.; Raitano, J.; Chan, S.W. Cerium and yttrium oxide nanoparticles are neuroprotective. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2006**, *342*, 86–91. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Karakoti, A.; Singh, S.; Dowding, J.M.; Seal, S.; Self, W.T. Redox-active radical scavenging nanomaterials. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 4422. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Nelson, B.C.; Johnson, M.E.; Walker, M.L.; Riley, K.R.; Sims, C.M. Antioxidant Cerium Oxide Nanoparticles in Biology and Medicine. *Antioxidants* **2016**, *5*, 15. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Xue, Y.; Zhai, Y.; Zhou, K.; Wang, L.; Tan, H.; Luan, Q.; Yao, X. The Vital Role of Buffer Anions in the Antioxidant Activity of CeO₂ Nanoparticles. *Chem. A Eur. J.* **2012**, *18*, 11115–11122. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Pagliari, F.; Mandoli, C.; Forte, G.; Magnani, E.; Pagliari, S.; Nardone, G.; Licoccia, S.; Minieri, M.; Di Nardo, P.; Traversa, E. Cerium Oxide Nanoparticles Protect Cardiac Progenitor Cells from Oxidative Stress. *ACS Nano* **2012**, *6*, 3767–3775. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Ribera, J.; Rodríguez-Vita, J.; Córdoba, B.; Portolés, I.; Casals, G.; Casals, E.; Jiménez, W.; Puentes, V.; Morales-Ruiz, M. Functionalized cerium oxide nanoparticles mitigate the oxidative stress and pro-inflammatory activity associated to the portal vein endothelium of cirrhotic rats. *PLoS ONE* **2019**, *14*, e0218716. [[CrossRef](#)]
17. Xu, C.; Qu, X. Cerium oxide nanoparticle: A remarkably versatile rare earth nanomaterial for biological applications. *NPG Asia Mater.* **2014**, *6*, e90. [[CrossRef](#)]
18. Korsvik, C.; Patil, S.; Seal, S.; Self, W.T. Superoxide dismutase mimetic properties exhibited by vacancy engineered ceria nanoparticles. *Chem. Commun.* **2007**, *14*, 1056. [[CrossRef](#)]
19. Pirmohamed, T.; Dowding, J.M.; Singh, S.; Wasserman, B.; Heckert, E.; Karakoti, A.S.; King, J.E.S.; Seal, S.; Self, W.T. Nanoceria exhibit redox state-dependent catalase mimetic activity. *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 2736–2738. [[CrossRef](#)]
20. Heckert, E.G.; Seal, S.; Self, W.T. Fenton-Like Reaction Catalyzed by the Rare Earth Inner Transition Metal Cerium. *Environ. Sci. Technol.* **2008**, *42*, 5014–5019. [[CrossRef](#)]
21. Das, S.; Dowding, J.M.; Klump, E.K.; McGinnis, J.F.; Self, W.; Seal, S. Cerium oxide nanoparticles: Applications and prospects in nanomedicine. *Nanomedicine (Lond.)* **2013**, *8*, 1483–1508. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Niu, J.; Wang, K.; Kolattukudy, P.E. Cerium oxide nanoparticles inhibit oxidative stress and nuclear factor- κ B activation in H9c2 cardiomyocytes exposed to cigarette smoke extract. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2011**, *338*, 53–61. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Corsi, F.; Caputo, F.; Traversa, E.; Ghibelli, L. Not Only Redox: The Multifaceted Activity of Cerium Oxide Nanoparticles in Cancer Prevention and Therapy. *Front. Oncol.* **2018**, *8*, 309. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Kargozar, S.; Baines, F.; Hoseini, S.J.; Hamzehlou, S.; Darroudi, M.; Verdi, J.; Hasanzadeh, L.; Kim, H.W.; Mozafari, M. Biomedical applications of nanoceria: New roles for an old player. *Nanomedicine (Lond.)* **2018**, *13*, 3051–3069. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Charbgoon, F.; Bin Ahmad, M.; Darroudi, M. Cerium oxide nanoparticles: Green synthesis and biological applications. *Int. J. Nanomed.* **2017**, *12*, 1401–1413. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Heckman, K.L.; DeCoteau, W.; Estévez, A.; Reed, K.J.; Costanzo, W.; Sanford, D.; Leiter, J.C.; Clauss, J.; Knapp, K.; Gómez, C.; et al. Custom Cerium Oxide Nanoparticles Protect against a Free Radical Mediated Autoimmune Degenerative Disease in the Brain. *ACS Nano* **2013**, *7*, 10582–10596. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Oró, D.; Yudina, T.; Fernández-Varo, G.; Casals, E.; Reichenbach, V.; Casals, G.; De La Presa, B.G.; Sandalinas, S.; Carvajal, S.; Puentes, V.; et al. Cerium oxide nanoparticles reduce steatosis, portal hypertension and display anti-inflammatory properties in rats with liver fibrosis. *J. Hepatol.* **2016**, *64*, 691–698. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Kobyliak, N.; Virchenko, O.; Falalyeyeva, T.; Kondro, M.; Beregova, T.; Bodnar, P.; Shcherbakov, O.; Bubnov, R.; Caprnda, M.; Delev, D.; et al. Cerium dioxide nanoparticles possess anti-inflammatory properties in the conditions of the obesity-associated NAFLD in rats. *Biomed. Pharmacother.* **2017**, *90*, 608–614. [[CrossRef](#)]
29. Casals, E.; Gusta, M.F.; Piella, J.; Casals, G.; Jiménez, W.; Puentes, V. Intrinsic and Extrinsic Properties Affecting Innate Immune Responses to Nanoparticles: The Case of Cerium Oxide. *Front. Immunol.* **2017**, *8*, 970. [[CrossRef](#)]
30. Gomez-Lechon, M.J.; Donato, M.T.; Martínez-Romero, A.; Jiménez, N.; Castell, J.V.; O'Connor, J.E. A human hepatocellular in vitro model to investigate steatosis. *Chem. Interact.* **2007**, *165*, 106–116. [[CrossRef](#)]
31. Ricchi, M.; Odoardi, M.R.; Carulli, L.; Anzivino, C.; Ballestri, S.; Pinetti, A.; Fantoni, L.I.; Marra, F.; Bertolotti, M.; Banni, S.; et al. Differential effect of oleic and palmitic acid on lipid accumulation and apoptosis in cultured hepatocytes. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **2009**, *24*, 830–840. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

32. Chiappini, F.; Coilly, A.; Kadar, H.; Gual, P.; Tran, A.; Desterke, C.; Samuel, D.; Duclos-Vallée, J.C.; Touboul, D.; Bertrand-Michel, J.; et al. Metabolism dysregulation induces a specific lipid signature of nonalcoholic steatohepatitis in patients. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 46658. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Palladini, G.; Di Pasqua, L.G.; Berardo, C.; Siciliano, V.; Richelmi, P.; Mannucci, B.; Croce, A.C.; Rizzo, V.; Perlini, S.; Vairetti, M.; et al. Fatty Acid Desaturase Involvement in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease Rat Models: Oxidative Stress versus Metalloproteinases. *Nutrients* **2019**, *11*, 799. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Puri, P.; Wiest, M.M.; Cheung, O.; Mirshahi, F.; Sargeant, C.; Min, H.K.; Contos, M.J.; Sterling, R.K.; Fuchs, M.; Zhou, H.; et al. The Plasma Lipidomic Signature of Nonalcoholic Steatohepatitis. *Hepatology* **2009**, *50*, 1827–1838. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Hudgins, L.C.; Hellerstein, M.; Seidman, C.; Neese, R.; Diakun, J.; Hirsch, J. Human fatty acid synthesis is stimulated by a eucaloric low fat, high carbohydrate diet. *J. Clin. Investig.* **1996**, *97*, 2081–2091. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Paglialunga, S.; Dehn, C.A. Clinical assessment of hepatic de novo lipogenesis in non-alcoholic fatty liver disease. *Lipids Health Dis.* **2016**, *15*, 686. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Hirst, S.M.; Karakoti, A.S.; Tyler, R.D.; Sriranganathan, N.; Seal, S.; Reilly, C.M. Anti-inflammatory Properties of Cerium Oxide Nanoparticles. *Small* **2009**, *5*, 2848–2856. [[CrossRef](#)]
38. Gaiser, B.K.; Fernandes, T.F.; Jepson, M.A.; Lead, J.R.; Tyler, C.R.; Baalousha, M.; Biswas, A.; Britton, G.J.; Cole, P.A.; Johnston, B.D.; et al. Interspecies comparisons on the uptake and toxicity of silver and cerium dioxide nanoparticles. *Environ. Toxicol. Chem.* **2012**, *31*, 144–154. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Singh, R.; Singh, S. Redox-dependent catalase mimetic cerium oxide-based nanozyme protect human hepatic cells from 3-AT induced acatalasemia. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2019**, *175*, 625–635. [[CrossRef](#)]
40. Salomone, F.; Godos, J.; Zelber-Sagi, S. Natural antioxidants for non-alcoholic fatty liver disease: Molecular targets and clinical perspectives. *Liver Int.* **2016**, *36*, 5–20. [[CrossRef](#)]
41. Rolo, A.P.; Teodoro, J.S.; Palmeira, C.M. Role of oxidative stress in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Free Radic. Biol. Med.* **2012**, *52*, 59–69. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Azari, A.; Shokrzadeh, M.; Zamani, E.; Amani, N.; Shaki, F. Cerium oxide nanoparticles protects against acrylamide induced toxicity in HepG2 cells through modulation of oxidative stress. *Drug. Chem. Toxicol.* **2019**, *42*, 54–59. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Serviddio, G.; Bellanti, F.; Villani, R.; Tamborra, R.; Zerbinati, C.; Blonda, M.; Ciacciarelli, M.; Poli, G.; Vendemiale, G.; Iuliano, L. Effects of dietary fatty acids and cholesterol excess on liver injury: A lipidomic approach. *Redox Biol.* **2016**, *9*, 296–305. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Corominas, M.P.; Carvajal, S.; Oró, D.; Casals, E.; Varo, G.F.; Casals, G.; Parra-Robert, M.; Ribera, J.; Morales-Ruiz, M.; Puentes, V.; et al. FRI-334-Cerium oxide nanoparticles present antilipogenic and antiinflammatory effects in rats with diet-induced non-alcoholic fatty liver disease. *J. Hepatol.* **2019**, *70*, e543. [[CrossRef](#)]
45. Kitchin, K.T.; Grulke, E.; Robinette, B.L.; Castellon, B.T. Metabolomic effects in HepG2 cells exposed to four TiO₂ and two CeO₂ nanomaterials. *Environ. Sci. Nano* **2014**, *1*, 466–477. [[CrossRef](#)]
46. Kitchin, K.T.; Stirdivant, S.; Robinette, B.L.; Castellon, B.T.; Liang, X. Metabolomic effects of CeO₂, SiO₂ and CuO metal oxide nanomaterials on HepG2 cells. *Part Fibre Toxicol.* **2017**, *14*, 50. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Sun, H.; Yang, W.; Tian, Y.; Zeng, X.; Zhou, J.; Mok, M.T.S.; Tang, W.; Feng, Y.; Xu, L.; Chan, A.W.H.; et al. An inflammatory-CCRK circuitry drives mTORC1-dependent metabolic and immunosuppressive reprogramming in obesity-associated hepatocellular carcinoma. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 5214. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Ansari, A.; Bose, S.; Patra, J.K.; Shin, N.R.; Lim, D.W.; Kim, K.W.; Wang, J.H.; Kim, Y.M.; Chin, Y.W.; Kim, H. A Controlled Fermented Samjungwhwan Herbal Formula Ameliorates Non-alcoholic Hepatosteatosis in HepG2 Cells and OLETF Rats. *Front. Pharmacol.* **2018**, *9*, 596. [[CrossRef](#)]
49. Araya, J.; Rodrigo, R.; Videla, L.A.; Thielemann, L.; Orellana, M.; Pettinelli, P.; Poniachik, J. Increase in long-chain polyunsaturated fatty acid n-6/n-3 ratio in relation to hepatic steatosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Clin. Sci.* **2004**, *106*, 635–643. [[CrossRef](#)]
50. Baylin, A.; Kabagambe, E.K.; Siles, X.; Campos, H. Adipose tissue biomarkers of fatty acid intake. *Am. J. Clin. Nutr.* **2002**, *76*, 750–757. [[CrossRef](#)]

51. Yamada, K.; Mizukoshi, E.; Sunagozaka, H.; Arai, K.; Yamashita, T.; Takeshita, Y.; Misu, H.; Takamura, T.; Kitamura, S.; Zen, Y.; et al. Characteristics of hepatic fatty acid compositions in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Liver Int.* **2015**, *35*, 582–590. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Puri, P.; Baillie, R.A.; Wiest, M.M.; Mirshahi, F.; Choudhury, J.; Cheung, O.; Sargeant, C.; Contos, M.J.; Sanyal, A.J. A lipidomic analysis of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* **2007**, *46*, 1081–1090. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Kotronen, A.; Seppänen-Laakso, T.; Westerbacka, J.; Kiviluoto, T.; Arola, J.; Ruskeepää, A.L.; Orešič, M.; Yki-Järvinen, H. Hepatic steatoyl-CoA desaturase (SCD)-1 activity and diacylglycerol but not ceramide concentrations are increased in the nonalcoholic human fatty liver. *Diabetes* **2009**, *58*, 203–208. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Wang, X.; Cao, Y.; Fu, Y.; Guo, G.; Zhang, X. Liver fatty acid composition in mice with or without nonalcoholic fatty liver disease. *Lipids Health Dis.* **2011**, *10*, 234. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Ma, C.; Kesarwala, A.H.; Eggert, T.; Medina-Echeverz, J.; Kleiner, D.E.; Jin, P.; Stroncek, D.F.; Terabe, M.; Kapoor, V.; ElGindi, M.; et al. NAFLD causes selective CD4(+) T lymphocyte loss and promotes hepatocarcinogenesis. *Nature* **2016**, *531*, 253–257. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Ballestri, S.; Nascimbeni, F.; Romagnoli, D.; Baldelli, E.; Lonardo, A. The Role of Nuclear Receptors in the Pathophysiology, Natural Course, and Drug Treatment of NAFLD in Humans. *Adv. Ther.* **2016**, *33*, 291–319. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Figure S1. Cell viability (a) and intracellular reactive oxygen species (ROS) production (b) of HepG2 cells incubated with medium (control), H₂O₂ (1.5 mM) and H₂O₂ and CeO₂NPs (1.5 mM; 10 μg/mL). *p < 0.05 vs control and #p < 0.05 vs H₂O₂. **Figure S2:** Content of saturated (a), monounsaturated (b) and polyunsaturated (c) fatty acids in HepG2 cells exposed to vehicle (control), OA:PA (1.33:0.67 mM) and OA:PA with CeO₂NPs (10 μg/mL). **Table S1:** Fatty acids content in HepG2 cells exposed to vehicle (control), OA:PA (1.33:0.67 mM) and OA:PA with CeO₂NPs (10 μg/mL).

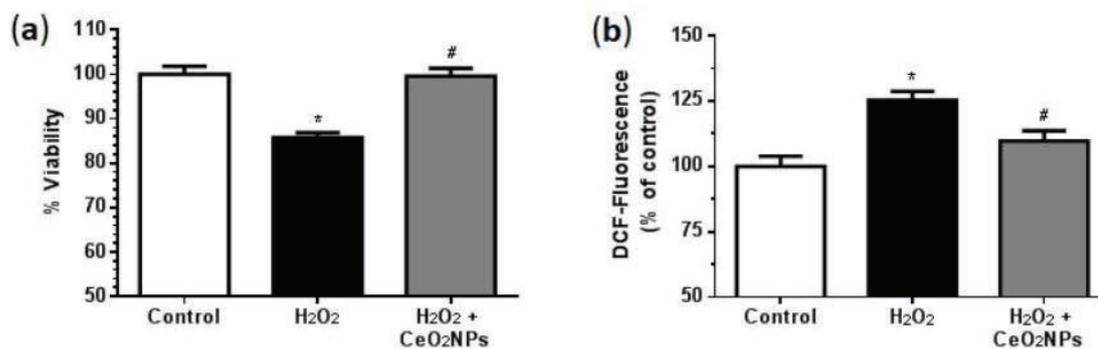


Figure S1. Cell viability (a) and intracellular ROS production (b) of HepG2 cells incubated with medium (control), H₂O₂ (1.5 mM) and H₂O₂ and CeO₂NPs (1.5 mM; 10 μg/mL). *p < 0.05 vs control and #p < 0.05 vs H₂O₂.

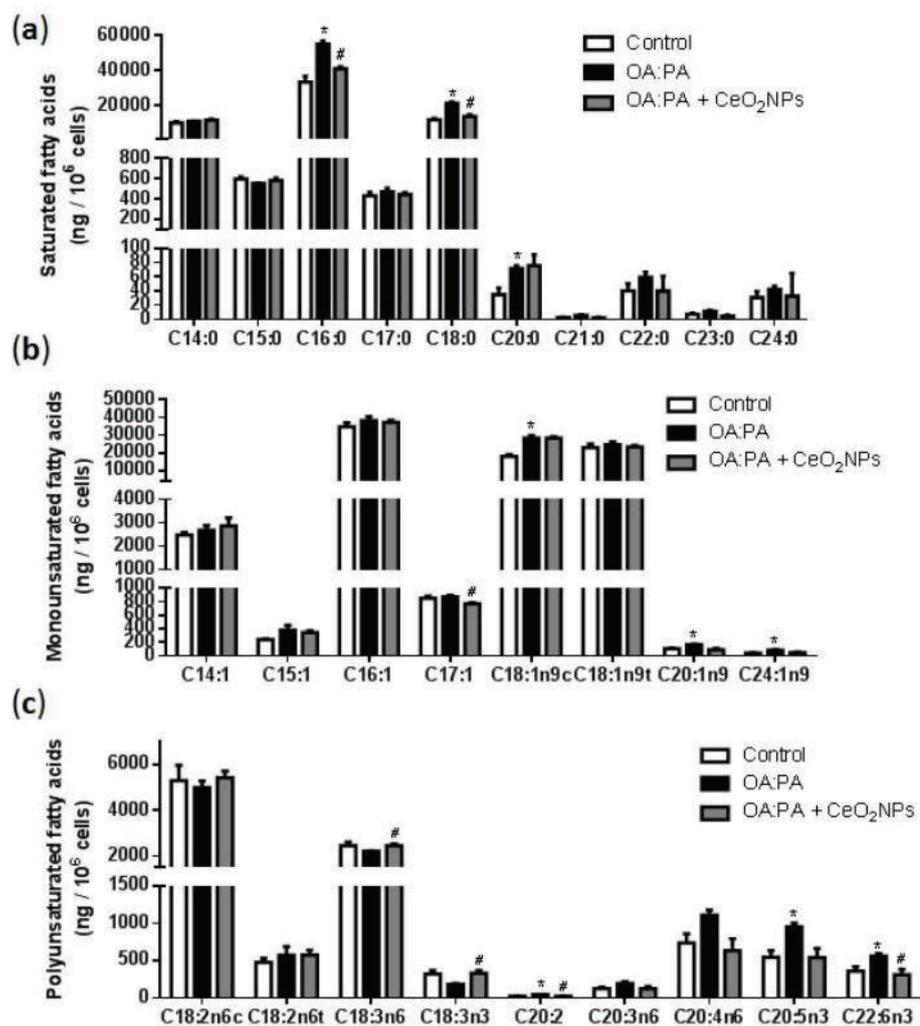


Figure S2. Content of saturated (a), monounsaturated (b) and polyunsaturated (c) fatty acids in HepG2 cells exposed to vehicle (control), OA:PA (1.33:0.67 mM) and OA:PA with CeO₂NPs (10 μg/mL). *p < 0.05 compared with control; #p < 0.05 compared with OA:PA.

Table S1. Fatty acids content in HepG2 cells exposed to vehicle (control), OA:PA (1.33:0.67 mM) and OA:PA with CeO₂NPs (10 µg/mL).

Fatty acids (ng / 10 ⁶ cells)	Control	OA:PA	OA:PA+ CeO ₂ NPs
C12:0	120.0 ± 62.10	210.1 ± 14.52	291.8 ± 104.7
C14:0	10168 ± 661.7	11075 ± 102.1	11769 ± 376.6
C14:1	2490 ± 103.9	2673 ± 221.5	2864 ± 350.7
C15:0	594.8 ± 21.84	552.1 ± 4.895	580.6 ± 25.00
C15:1	242.5 ± 7.916	380.2 ± 72.78	345.6 ± 28.20
C16:0	33369 ± 3277	55013 ± 1837*	40922 ± 1069#
C16:1	34617 ± 2253	38144 ± 2298	37115 ± 1220
C17:0	429.5 ± 35.39	469.9 ± 35.45	442.0 ± 19.78
C17:1	845.6 ± 37.01	873.5 ± 16.63	767.3 ± 19.01#
C18:0	11793 ± 840.9	21290 ± 657.8*	13797 ± 984.3#
C18:1n9c	17980 ± 1108	28358 ± 1335*	28373 ± 747.6
C18:1n9t	22926 ± 1953	24671 ± 1517	23429 ± 616.6
C18:2n6c	5308 ± 661.7	5006 ± 280.0	5429 ± 284.2
C18:2n6t	480.0 ± 49.83	571.0 ± 115.5	577.6 ± 65.52
C18:3n6	2452 ± 162.6	2216 ± 11.28	2462 ± 72.71#
C18:3n3	319.4 ± 50.17	186.7 ± 10.35	330.5 ± 42.42#
C20:0	34.99 ± 9.240	71.35 ± 4.289*	75.35 ± 15.60
C20:1n9	104.9 ± 16.99	164.3 ± 7.179*	89.98 ± 23.33
C20:2n6	21.74 ± 5.267	49.63 ± 1.268*	24.29 ± 5.560#
C20:3n6	124.6 ± 23.29	194.0 ± 24.51	126.7 ± 30.63
C20:3n3	0.775 ± 0.2146	2.250 ± 0.7858	1.388 ± 0.1573
C20:4n6	735.2 ± 122.6	1108 ± 69.95	636.8 ± 156.1
C20:5n3	546.6 ± 86.09	953.4 ± 45.37*	541.5 ± 125.0#
C21:0	2.475 ± 0.725	5.850 ± 1.126	2.200 ± 0.950
C22:0	40.01 ± 10.02	59.25 ± 7.039	39.84 ± 20.82
C22:2	9.463 ± 3.798	13.67 ± 1.349	10.11 ± 2.993
C22:6n3	361.1 ± 59.02	563.4 ± 31.29*	311.1 ± 75.12#
C23:0	7.250 ± 1.286	11.20 ± 1.935	4.680 ± 1.696#
C24:0	30.80 ± 8.530	42.28 ± 4.217	32.93 ± 32.03
C24:1n9	41.86 ± 5.048	85.72 ± 9.331*	44.92 ± 13.88
C22+23+24	78.06 ± 19.68	112.7 ± 13.11	61.78 ± 36.45
Total FA	146135 ± 10387	186338 ± 115.4*	171210 ± 5788
Saturated FA	56589 ± 4713	85793 ± 1609*	67884 ± 2461#
Unsaturated FA	89547 ± 6021	104830 ± 5350	103327 ± 3364

Mean ± SEM. *p < 0.05 compared with control; #p < 0.05 compared with OA:PA.

ARTÍCULO 2

Parra-Robert M, Zeng M, Shu Y, Fernández-Varo G, Perramón M, Desai D, Chen J, Guo D, Zhang X, Morales-Ruiz M, Rosenholm JM, Jiménez W, Puntos V, Casals E, Casals G. Mesoporous silica coated CeO₂ nanozymes with combined lipid-lowering and antioxidant activity induce long-term improvement of the metabolic profile in obese Zucker rats. *Nanoscale*. 2021;13(18): 8452–8466.

La obesidad es una enfermedad metabólica crónica caracterizada por un exceso o acumulación anormal de grasa corporal, debido a un desequilibrio del balance energético por una mayor ingesta calórica comparado con el gasto energético (5). Actualmente constituye un importante problema de salud pública debido al elevado impacto sociosanitario y económico asociado tanto a la obesidad como a sus comorbilidades.

La presencia de obesidad está estrechamente relacionada con el desarrollo de síndrome metabólico y comorbilidades, tales como dislipemia, diabetes mellitus tipo 2, hipertensión, hígado graso, infarto de miocardio, ictus, demencia, apnea del sueño, depresión, osteoartritis y varios tipos de cáncer (1,2). Tanto la obesidad como las complicaciones asociadas más frecuentes se caracterizan a nivel celular y molecular con la presencia de inflamación crónica de bajo grado y estrés oxidativo (19–22).

Actualmente el tratamiento de la obesidad está basado en la reducción de peso mediante modificaciones del estilo de vida del paciente, farmacoterapia y/o procedimientos quirúrgicos, además de tratar aquellas alteraciones metabólicas y comorbilidades asociadas (dislipemia, diabetes tipo 2, hipertensión, etc) (2). Sin embargo, las estrategias terapéuticas actuales muestran una baja efectividad y/o efectos adversos indeseables y la cirugía bariátrica no está exenta de riesgos (37,38).

Dado la creciente prevalencia de la obesidad y sus comorbilidades metabólicas son necesarias nuevas estrategias terapéuticas centradas, no solo en la pérdida de peso, sino también en la normalización de las alteraciones metabólicas asociadas. En este sentido, surge la potencial aplicación de los nanomateriales de CeO₂, los cuales presentan actividad antioxidante, con la finalidad de interrumpir el circuito de retroalimentación entre estrés oxidativo e inflamación crónica de bajo grado (19–21).

No obstante, la aglomeración de las NPs es una de las limitaciones en la utilización de nanomateriales, que determina tanto su eficacia como potencial toxicidad (101). Por este motivo, se ha diseñado un núcleo de CeO₂NPs recubierto de mSiO₂, la cual es un material biocompatible y seguro.

En este segundo trabajo se analizó el efecto sobre el metabolismo lipídico y la actividad antioxidante y antiinflamatoria de las CeO₂@mSiO₂ en un modelo de ratas Zucker obesas cinco semanas después de su administración. Las ratas Zucker obesas, homocigotas para la mutación en el receptor de la leptina (fa/fa), son un modelo animal de obesidad con fisiopatología similar a la del síndrome metabólico en humanos (96), las cuales presentan obesidad y alteraciones típicas del síndrome metabólico (dislipemia y MAFLD).

Los resultados de este estudio se resumen a continuación:

1. El recubrimiento con mSiO₂ mejora la estabilidad, actividad antioxidante y viabilidad celular de las nanopartículas de CeO₂.

Las CeO₂@mSiO₂ (~50 nm) se fabricaron utilizando un método de síntesis en condiciones de solución acuosa, en un solo recipiente (síntesis *one-pot*), a temperatura ambiente y en atmosfera abierta. La encapsulación con mSiO₂ de los cores de CeO₂ (4 nm) mantuvo la estabilidad coloidal en medio fisiológico. En medio de cultivo celular tuvo lugar la formación de una corona proteica en los nanomateriales y, específicamente, las CeO₂@mSiO₂ mantenían el tamaño medio y la dispersión hasta 7

días. En células hepáticas HepG2 ambos nanomateriales eran internalizados y se observaban en orgánulos tipo endosoma. Cuando las células HepG2 eran expuestas a un estímulo oxidante (H_2O_2), las $CeO_2@mSiO_2$ presentaban un mayor efecto antioxidante y protección celular comparado con las CeO_2 NPs libres (*Figura 1 del artículo*).

2. Las $CeO_2@mSiO_2$ son bien toleradas por las ratas Zucker obesas y reducen la presencia de nanopartículas en órganos extrahepáticos.

Una vez demostrada la mayor estabilidad y actividad antioxidante de las $CeO_2@mSiO_2$, se evaluó el efecto *in vivo* de las $CeO_2@mSiO_2$ en las ratas Zucker obesas, modelo de obesidad asociado a inflamación crónica de bajo grado. El protocolo experimental consistió 4 grupos: ratas Zucker delgadas que reciben vehículo (n=10) y ratas Zucker obesas que reciben vehículo (n=10) o tratadas con CeO_2 NPs (n=10) o $CeO_2@mSiO_2$ (n=10). A la semana 8 y 9 recibieron una doble dosis semanal intravenosa de vehículo (500 μ L), CeO_2 NPs (0,1 mg/kg) o $CeO_2@mSiO_2$ (0,1 mg/kg). A la semana 14 los animales fueron sacrificados mediante sobredosis de isoflurano (*Figura 2*).

La biodistribución de ambos nanomateriales fue mayoritaria en hígado y bazo, determinada por espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS). No obstante, cuando las ratas obesas eran tratadas con $CeO_2@mSiO_2$ se observaba una reducción del contenido de cerio en pulmón (70%) y bazo (34%) comparado con las CeO_2 NPs libres.

3. Las $CeO_2@mSiO_2$ reducen las concentraciones circulantes de TNF- α , TG y cLDL en las ratas Zucker obesas.

Las ratas Zucker obesas presentaban un incremento del 45% de la citoquina proinflamatoria TNF- α , la cual solo se normalizó tras el tratamiento con $CeO_2@mSiO_2$. Ambas nanopartículas, y en mayor grado las $CeO_2@mSiO_2$, reducían las concentraciones circulantes de TG y cLDL medidos por espectrofotometría (*Figura 2*).

La reducción de TG y cLDL fue del 23% y del 32%, respectivamente, con el tratamiento con CeO₂NPs libres, mientras con las CeO₂@mSiO₂ se consiguió una reducción mayor del 38% y 42%, respectivamente. Cabe destacar que los efectos hipolipemiantes y antiinflamatorios de los nanomateriales de CeO₂ se observaron 5 semanas después de su administración, mostrando una actividad a largo plazo comparado con los antioxidantes clásicos.

4. Las CeO₂@mSiO₂ reducen las concentraciones circulantes de PA en ratas Zucker obesas.

Con la finalidad de evaluar el efecto de los nanomateriales de CeO₂ sobre el perfil lipídico, se determinó los ácidos grasos totales y el lipidoma en suero por GC-MS. Los componentes lipídicos principales del suero (TG, CE, fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE) y NEFA), se aislaron mediante extracción en fase sólida y posterior derivatización de los ácidos grasos.

Se observó una reducción de los ácidos grasos totales (*Figura 2*), tanto saturados como insaturados. Ambos nanomateriales disminuían las concentraciones de C18:0, C18:1n9t, C20:3n6 y C22:6n3. Además, las CeO₂@mSiO₂ reducían significativamente el PA (C16:0) y otros ácidos grasos (C14:1, C16:1, C18:1n9c, C18:2n6t and C18:3n3) (*Figura 3*).

Referente al lipidoma, las ratas Zucker obesas presentaban un incremento en suero de todas las fracciones lipídicas (TG, CE, PC y PE), excepto los NEFA. Las ratas Zucker obesas tratadas con nanomateriales de CeO₂ mostraron una reducción de los ácidos grasos derivados de TG, los cuales disminuían un 44% en ratas tratadas con CeO₂NPs y un 51% en las ratas tratadas con CeO₂@mSiO₂. Específicamente ambos nanomateriales reducían de forma similar los ácidos grasos insaturados de la fracción de TG (53%), mientras los ácidos grasos saturados eran reducidos en mayor proporción por parte de las CeO₂@mSiO₂ (49%) comparado con las CeO₂NPs libres (32%). Esto se

debe al efecto de las $\text{CeO}_2@m\text{SiO}_2$ reduciendo el PA de la fracción de TG (53% vs. 39%). En global, ambos nanomateriales reducían en más de un 70% el ácido linoleico (C18:2n6c) y araquidónico (C20:4n6), y entre 40-60% otros ácidos grasos (C16:1, C18:0, C18:1n9c, C18:1n9t, C18:2n6t, and C18:3n3). Por el contrario, mientras las CeO_2 NPs producían una disminución significativa del 64% del total de PE, esta reducción representaba solo el 23% en las ratas tratadas con $\text{CeO}_2@m\text{SiO}_2$, debido al efecto diferencial en la reducción del contenido de C20:4n6 de la fracción de PE por parte de las CeO_2 NPs (81%) comparado con las $\text{CeO}_2@m\text{SiO}_2$ (33%). Por último, ambos nanomateriales no reducían de forma significativa las fracciones de CE, PC o NEFA.

5. Las $\text{CeO}_2@m\text{SiO}_2$ mejoran la expresión génica en hígado y tejido adiposo de genes relacionados con síndrome metabólico e inflamación en ratas Zucker obesas.

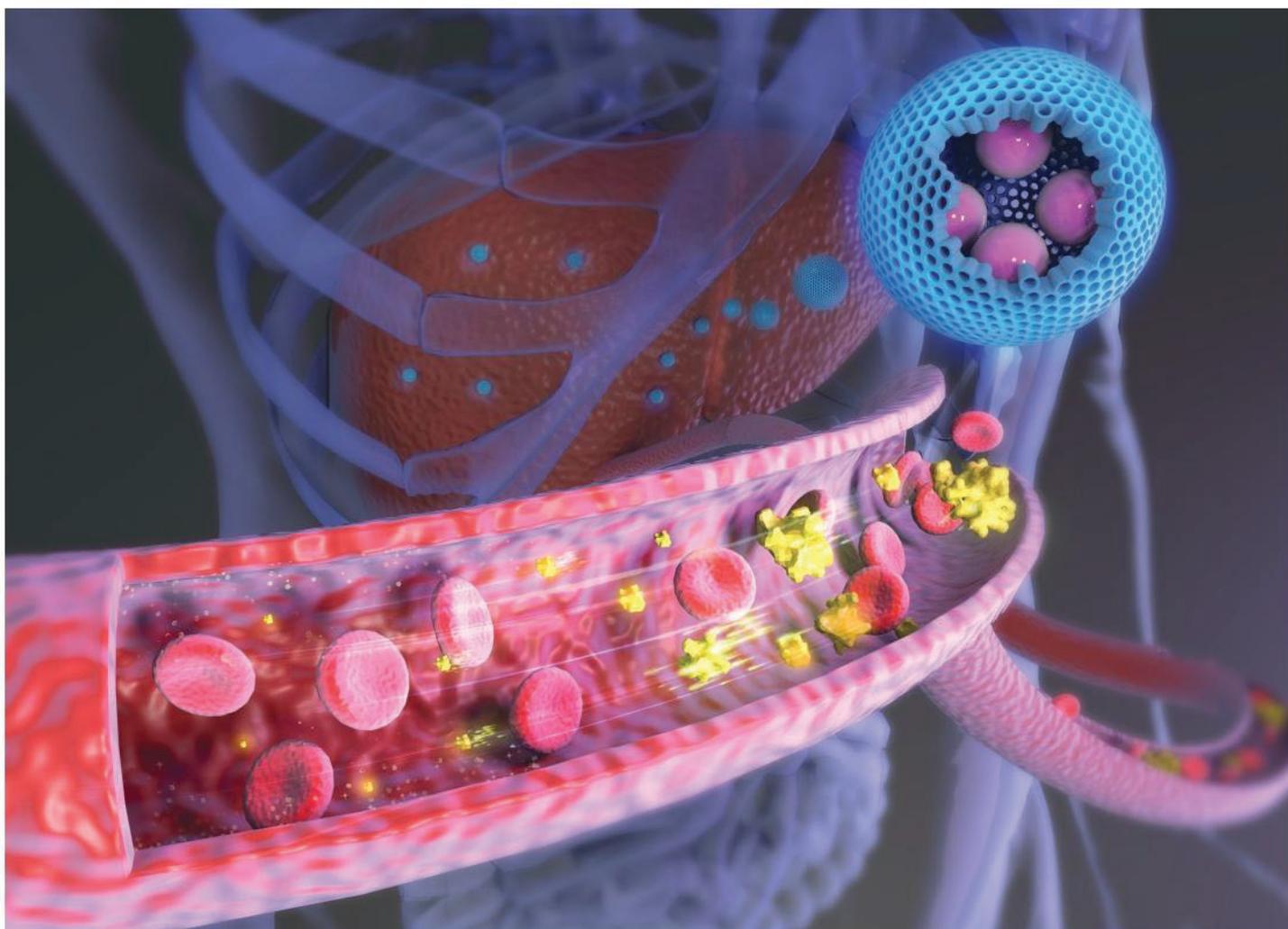
Dado el efecto antioxidante y la distribución hepática mayoritaria de los nanomateriales de CeO_2 , se evaluó el efecto sobre la expresión hepática de genes relacionados con MAFLD y resistencia a la insulina utilizando un array comercial customizado que incluía 88 genes diferentes (*Figura 4*). Las ratas Zucker obesas mostraron un incremento global en la expresión de genes en comparación con las ratas Zucker delgadas. En concreto, un 76% de los genes estaban sobreexpresados (20% de forma significativa), entre los cuales se sobreexpresaban significativamente los genes *Slc2a4*, *Cd36*, *Elovl6*, *G6pd*, *Apoa1* así como otros genes del metabolismo de lípidos y carbohidratos, vías de señalización de adipocinas y apoptosis. En cambio, solamente el 24% de los genes estaban infraexpresados (3% de forma significativa) en las ratas Zucker obesas. El tratamiento con nanomateriales de CeO_2 mostró un efecto inhibitorio en la expresión de dichos genes sobrerregulados en las ratas obesas, siendo más notable en el grupo tratado con $\text{CeO}_2@m\text{SiO}_2$. Específicamente las CeO_2 NPs libres reducían la expresión del 68% de los genes (8% de forma significativa) mientras las $\text{CeO}_2@m\text{SiO}_2$ disminuían el 92% de los genes (15% significativamente). De forma

interesante, la reducción a nivel circulante de TNF- α se asociaba a nivel hepático con la inhibición de los genes implicados en la vía PI3K/mTOR/AKT.

Se evaluó también el efecto de los nanomateriales en la esteatosis hepática por histología y se analizó el lipidoma a nivel hepático, sin observarse efectos significativos en los animales tratados con CeO₂NPs.

Por último, se estudió las propiedades de los nanomateriales de CeO₂ en el tejido adiposo de las ratas obesas utilizando un array comercial customizado que incluía 88 genes relacionados con funciones orexigénicas, anorexigénicas y de gasto energético, así como genes involucrados en la infiltración de macrófagos (*Figura 4*). En el tejido adiposo de las ratas obesas se observó un incremento en la expresión del 82% de los genes analizados (14% de forma significativa), mientras solo el 18% de los genes estaban infraexpresados (5% de forma significativa). Dichas desregulaciones fueron revertidas con el tratamiento con los nanomateriales de CeO₂. De forma similar al hígado, las CeO₂@mSiO₂ ejercían un mayor efecto, reduciendo el 88% de los genes sobreexpresados (6% de forma significativa) comparado con el 76% (3% de forma significativa) con las CeO₂NPs libres.

En resumen, las CeO₂@mSiO₂, con un proceso de síntesis que favorece su adaptabilidad, se postulan como una estrategia terapéutica hipolipemiante y antioxidante de larga duración y segura para tratar las comorbilidades metabólicas asociadas a la obesidad (*Esquema 1*). Esta aproximación terapéutica podría aplicarse también al tratamiento de otras enfermedades metabólicas relacionadas con hiperlipidemia, inflamación crónica de bajo grado y estrés oxidativo.

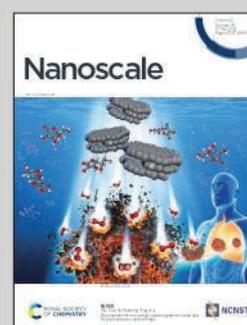


Showcasing research from the Group of Prof. Eudald Casals, School of Biotechnology and Health Sciences, Wuyi University, Jiangmen, China.

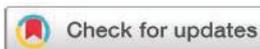
Mesoporous silica coated CeO_2 nanozymes with combined lipid-lowering and antioxidant activity induce long-term improvement of the metabolic profile in obese Zucker rats

A novel nanocomposite based on mesoporous silica coated cerium oxide nanozymes reduces the circulating levels of fatty acids and improves the metabolic phenotype in obese Zucker rats five weeks after its administration. The one-pot synthesis method for the nanocomposite fabrication is implemented entirely in aqueous solution, room temperature and open atmosphere conditions, favoring scalability and offering a safe and translatable lipid-lowering and antioxidant nanomedicine to treat metabolic comorbidities associated with obesity.

As featured in:



See Jessica M. Rosenholm, Víctor Puentes, Eudald Casals, Gregori Casals *et al.*, *Nanoscale*, 2021, 13, 8452.



Cite this: *Nanoscale*, 2021, **13**, 8452

Mesoporous silica coated CeO₂ nanozymes with combined lipid-lowering and antioxidant activity induce long-term improvement of the metabolic profile in obese Zucker rats†

Marina Parra-Robert,^{‡a} Muling Zeng,^{‡b} Ying Shu,^b Guillermo Fernández-Varo,^{a,c} Meritxell Perramón,^a Diti Desai,^d Junhao Chen,^b Dongdong Guo,^b Xu Zhang,^b Manuel Morales-Ruiz,^{‡a,c,e} Jessica M. Rosenholm,^{‡d} Wladimiro Jiménez,^{‡a,c} Víctor Puentes,^{‡f,g,h} Eudald Casals^{‡b} and Gregori Casals^{‡a,e}

Obesity is one of the most important public health problems that is associated with an array of metabolic disorders linked to cardiovascular disease, stroke, type 2 diabetes, and cancer. A sustained therapeutic approach to stop the escalating prevalence of obesity and its associated metabolic comorbidities remains elusive. Herein, we developed a novel nanocomposite based on mesoporous silica coated cerium oxide (CeO₂) nanozymes that reduce the circulating levels of fatty acids and remarkably improve the metabolic phenotype in a model of obese Zucker rats five weeks after its administration. Lipidomic and gene expression analyses showed an amelioration of the hyperlipidemia and of the hepatic and adipose metabolic dysregulations, which was associated with a down-regulation of the hepatic PI3K/mTOR/AKT pathway and a reduction of the M1 proinflammatory cytokine TNF- α . In addition, the coating of the CeO₂ maximized its cell antioxidant protective effects and minimized non-hepatic biodistribution. The one-pot synthesis method for the nanocomposite fabrication is implemented entirely in aqueous solution, room temperature and open atmosphere conditions, favoring scalability and offering a safe and translatable lipid-lowering and antioxidant nanomedicine to treat metabolic comorbidities associated with obesity. This approach may be further applied to address other metabolic disorders related to hyperlipidemia, low-grade inflammation and oxidative stress.

Received 5th February 2021
 Accepted 4th April 2021

DOI: 10.1039/d1nr00790d

rsc.li/nanoscale

Introduction

The worldwide epidemic condition of obesity has been increasing tremendously over the past decades, and it is nowadays recognized as one of the most serious public health problems because of its prevalence, costs, and associated metabolic comorbidities, such as cardiovascular diseases, type 2 diabetes mellitus, metabolic associated fatty liver disease (MAFLD), and

certain forms of cancer.^{1–7} Currently, lifestyle therapies, pharmacotherapy, and bariatric surgery are available approaches to treat obesity. However, most of the therapies show low effectiveness and/or undesired systemic side effects and surgery is associated with high risks.^{8,9} Therefore, establishing a sustained, effective, and safe treatment to stop the escalating prevalence of obesity and its associated metabolic conditions is an urgent requirement still largely unmet.

^aService of Biochemistry and Molecular Genetics, Hospital Clinic Universitari, Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBERehd), Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Carrer de Villarroel, 170, 08036 Barcelona, Spain. E-mail: casals@clinic.cat

^bSchool of Biotechnology and Health Sciences, Wuyi University, 99 Yingbing Middle Rd., Jiangmen, 529020, China. E-mail: wyuchemecm@126.com

^cDepartment of Biomedicine, University of Barcelona, 08905 Barcelona, Spain

^dPharmaceutical Sciences Laboratory, Faculty of Science and Engineering, Åbo Akademi University, Artillerigatan 6A, 20500 Turku, Finland.

E-mail: jerosenh@abo.fi

^eWorking group for the biochemical assessment of hepatic disease-SEQCML, 08036 Barcelona, Spain

^fVall d'Hebron Research Institute (VHIR), 08035 Barcelona, Spain. E-mail: victor.puentes@icn.cat

^gInstitut Català de Nanociència i Nanotecnologia (ICN2), CSIC, The Barcelona Institute of Science and Technology (BIST), Campus UAB s/n, Bellaterra, 08193 Barcelona, Spain

^hInstitució Catalana de Recerca i Estudis Avançats (ICREA), Passeig de Lluís Companys, 23, 08010 Barcelona, Spain

†Electronic supplementary information (ESI) available: Extended characterization of the nanozymes, cell internalization, effect on fatty liver (Fig. S1–S4), data of serum biochemical parameters, lipid profiles, adipokines, fatty acids and gene expression analyses (Tables S1–S11), and additional materials and methods. See DOI: 10.1039/d1nr00790d

‡Both authors contributed equally to this study.

It has been demonstrated that oxidative stress and systemic low-grade inflammation are the underlying mechanisms linking obesity with its metabolic comorbidities.¹⁰ In this context, the use of antioxidant substances to disrupt the activation of the feedback loop between oxidative stress and the inflammatory processes has been considered a promising therapeutic approach over the last decades.^{1–3,5–7} A wide range of protective effects against obesity comorbidities has been described for many antioxidant treatments such as flavonoids, arginine, vitamin C, vitamin E, carotenoids, resveratrol, and selenium.^{11,12} Also, diets rich in antioxidants such as mono-unsaturated fatty acids (MUFAs), ω -3 polyunsaturated fatty acids (PUFAs), vitamin C or vitamin E, have been associated with a lower risk of developing metabolic abnormalities.¹³ However, despite the preclinical success, clinical studies with antioxidant rich-diets or purified antioxidant substances show controversial results in the prevention and treatment of cardio-metabolic diseases.^{11,12,14–16} This has been attributed to their poor stability, short half-life, easy degradation by proteolytic or gastrointestinal enzymes, and low bioavailability at the site of action, which limits their efficacy *in vivo*.^{17,18}

Recently, advances in nanomaterials synthesis and bioengineering are offering different nanoscale agents such as antioxidant nanoparticles (NPs),¹⁹ also described as nanozymes²⁰ or Reactive Oxygen Species (ROS) based nanomedicines,²¹ that overcome the limitations of classical antioxidants. These materials allow functionalization for targeted delivery, show longer residence time in tissues, and a self-regenerating activity that provides a long-time protective action at low doses.¹⁸ Amongst them, cerium oxide nanoparticles (CeO₂NPs) are broadly used for their ability to participate in the diversity of cross-reactions between ROS and inflammation by mimicking the activity of many endogenous antioxidant enzymes (*e.g.*, superoxide dismutase, catalase, and peroxidase) and to modulate cellular microenvironments.¹⁷ Furthermore, and in contrast with other nanozymes, CeO₂NPs have been shown to directly interfere with the cell metabolism of fatty acids *in vitro*.²² This makes CeO₂NPs especially attractive to be evaluated as therapeutic agents in obesity. However, their *in vivo* effects on metabolic profiles associated with low-grade chronic inflammation are unknown. In addition, likewise other promising nanomedicines, its anti-inflammatory activity has been only proved in models of systemic or local severe inflammation.¹⁷ Moreover, due to their small size, these NPs generally show a high tendency to agglomerate in physiological media, losing its nanoscale properties and inducing undesirable proinflammatory immune responses, as we recently reviewed.^{17,23} Even more, the lack of reproducible and scalable protocols to obtain well-dispersed NPs are also pointed out in recent discussions about the limited number of nanomaterials that have reached clinical practice.²⁴ All these, inevitably raises concerns and doubts among scientists, clinicians, and funding agencies about the potential of nanomedicine.^{25,26}

To address these challenges, we set out to design a novel nanozyme composite based on 5 nm CeO₂ nanozymes embedded inside a mesoporous silica (mSiO₂) shell. In terms

of biocompatibility and safety, silica is an excellent substance and it has been classified as “Generally Recognized as Safe” (GRAS) by the FDA. The mSiO₂ coating maximized the stability in physiological media and the ROS-scavenging activity of the CeO₂ nanozymes, and minimized their non-hepatic biodistribution, thus improving their safety profile. Moreover, the synthesis method is entirely implemented in aqueous solution and at room temperature, which favors biocompatibility and scalability, thus potentially enabling rapid clinical translation. Further, the nanocomposites were administered to the experimental genetic model of obese Zucker rats, a model of mild inflammation that spontaneously develops a range of metabolic disorders which mimics in many ways the metabolic comorbidities associated to obesity in humans. Overall, results show that the nanocomposites improved the metabolic phenotype associated with obesity, reduced hyperlipidemia by decreasing the circulating levels of triglycerides, LDL-cholesterol and palmitic acid, among others, and ameliorated obesity-induced gene expression dysregulations in the liver and adipose tissue five weeks after administration. These findings expand the several proposed therapeutic applications of CeO₂ nanozymes, in which models of severe inflammation are commonly employed, by demonstrating a long-term improvement of the metabolic alterations associated with mild inflammation in obesity using a safe and translatable CeO₂ based nanocomposite with combined lipid-lowering and antioxidant activities. Furthermore, this approach can be applied to other conditions related to low-grade inflammation and oxidative stress, key mechanisms in the progression of different prevalent diseases.²⁷

Results and discussion

Mesoporous silica coating improves CeO₂ stability, antioxidant activity, and cell protection

For the synthesis of the CeO₂@mSiO₂ nanocomposites we developed a one-pot synthesis method in aqueous media and at room temperature based on the adjustment of the different parameters of the sol-gel process for the silica shell formation (Fig. 1a). Our method allows to obtain nanocomposites of ~50 nm. This size was chosen since it is in the range of sizes that displays the highest cellular uptake,^{28–30} permeability through the liver leaky vasculature associated with inflammatory diseases^{31,32} and liver accumulation.³³ To this, CeO₂NPs cores (5 nm) were synthesized by the chemical precipitation at basic pH of cerium nitrate (10 mM) with ammonium hydroxide (NH₄OH; 27 mM). Afterward, the pH was adjusted with additional amounts of NH₄OH to the required basic conditions for core stability and mSiO₂ coating (pH = 10). For the encapsulation of the CeO₂ cores, the sequential addition of a solution of absolute EtOH (at 1:4 v/v EtOH:H₂O ratio) and CTAB (~1:30 (w/w) cores:CTAB ratio) as structure-directing agent, formed the CTAB-overcoated CeO₂NPs. Subsequently, with the addition of TEOS (1:3 CTAB:TEOS) and stirring overnight, the silica condensation reaction took place, yielding

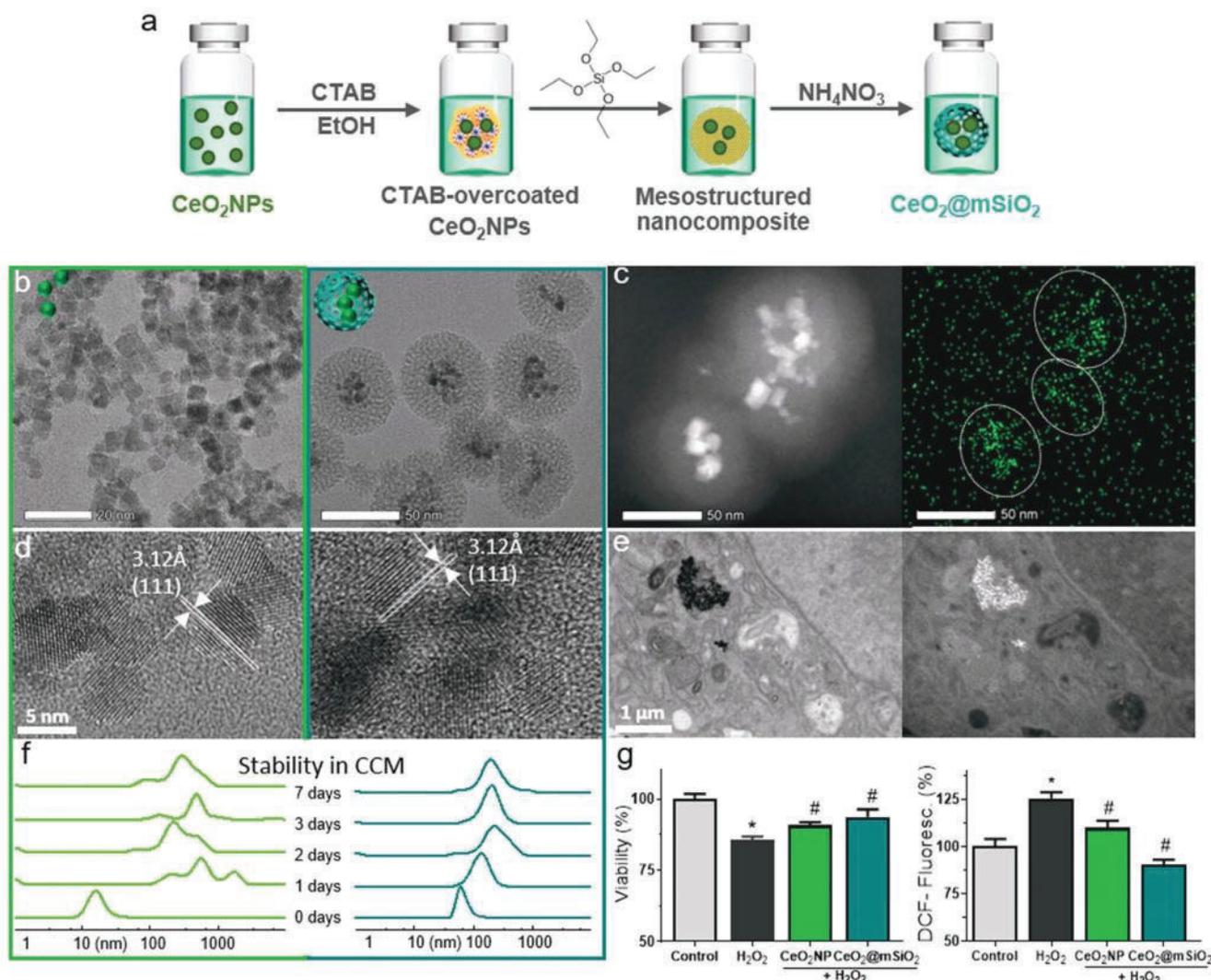


Fig. 1 Characterization of the CeO_2 NPs and CeO_2 @ mSiO_2 nanocomposites, and their antioxidant activity and cellular protection. (a) Schematic illustration of the one-pot synthesis method developed to obtain the designed CeO_2 @ mSiO_2 nanocomposites. (b) Representative TEM images of CeO_2 NPs and CeO_2 @ mSiO_2 nanocomposites. Scale bars: 20 nm and 50 nm respectively. Additional TEM images and corresponding size distribution are in Fig. S1†. (c) High-angle annular dark-field (HAADF) images of the nanocomposite and the elemental mapping of Ce. (d) High Resolution TEM image analysis of the non-coated CeO_2 cores (left) and mSiO_2 coated (right), showing the maintenance of the crystalline structure of the CeO_2 inside the shell. (e) Bright and dark-field TEM images of the nanocomposites uptaken by HepG2 cells. The crystallinity of the CeO_2 makes them easy to distinguish from the amorphous cellular structures under dark-field. (f) Time evolution of the hydrodynamic diameter, D_H , of both nanomaterials dispersed in cell culture media (DMEM + 10%FBS), measured by DLS. (g) Effect of CeO_2 NPs and CeO_2 @ mSiO_2 on ROS production (right) and cell viability (left) of HepG2 cells treated with vehicle (control), H_2O_2 , or H_2O_2 with nanocomposites. Data are presented as the mean \pm SEM of at least three independent experiments * $p < 0.01$ vs. control, # $p < 0.01$ vs. H_2O_2 .

monodisperse CeO_2 @ mSiO_2 nanocomposites. Finally, the purification and CTAB removal of the nanocomposites was performed by washing three times with a solution of ammonium nitrate (2 g L^{-1}), a highly efficient ion-exchange method that ensures complete CTAB elimination.³⁴

Fig. 1b–d shows the characterization of the CeO_2 @ mSiO_2 nanocomposites. TEM images of the CeO_2 NPs before and after encapsulation with the mesoporous shell are in Fig. 1b. The final composite size was $53.8 \pm 8.7 \text{ nm}$ and the CeO_2 NPs cores size was $5.3 \pm 0.8 \text{ nm}$, calculated by image analysis based on transmission electron microscopy (TEM) images (Fig. S1†).

The HR-TEM image analysis (Fig. 1d) and the comparison of the X-Ray Diffraction patterns (Fig. S2†) confirms the crystalline structure of the CeO_2 cores inside the shell. TEM images revealed that none of the CeO_2 NPs were outside the shell. In addition, the similar UV-VIS spectra of the CeO_2 NPs cores before and after mSiO_2 coating confirmed the successful coating of all the initial CeO_2 NPs without inducing NPs aggregation or degradation (Fig. S2†). Importantly, contrary to the non-coated CeO_2 NPs, the mSiO_2 encapsulation allowed maintenance of the colloidal stability in physiological media. We monitored the hydrodynamic diameter (D_H) and the

ζ -potential of the CeO₂NPs and the nanocomposites in cell culture media (DMEM + 10%FBS) over time. Both CeO₂NPs and CeO₂@mSiO₂ showed a D_H increase during the first day of incubation (Fig. 1f) and a decrease of their negative ζ -potential reaching similar values as the proteins in the cell culture medium (Fig. S2†), which is consistent with the formation of a protein-corona.³⁵ In the case of CeO₂@mSiO₂, both average size and monodispersity were maintained for the following 7 days. Conversely, free CeO₂NPs showed a continuous increase of the D_H and polydispersity index (Fig. 1f).

Next, we evaluated whether the mesoporous coating affected the antioxidant capacity of the CeO₂NPs. The protective effects of free CeO₂NPs and CeO₂@mSiO₂ nanocomposites against hydrogen peroxide (H₂O₂)-induced cytotoxicity were assessed in the human hepatic cell line HepG2. Fig. 1g shows the ROS levels and cell viability when CeO₂NPs and CeO₂@mSiO₂ were used at 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of CeO₂, a dose that previously has been confirmed to display higher antioxidant activity and cell protective effects.^{22,36} ROS levels were decreased by 60% when using free CeO₂NPs and, remarkably, the antioxidant activity of CeO₂@mSiO₂ nanocomposites was two-fold higher and led to a complete recovery of the basal values of ROS (Fig. 1g). In agreement with these results, cell viability was increased from 86 \pm 1.1% (H₂O₂ stimulated cells) to 91 \pm 1.1% (CeO₂NPs) and 94 \pm 2.6% (CeO₂@mSiO₂) (Fig. 1g). None of these effects were observed when using pure mSiO₂ nanoparticles. The cellular uptake of CeO₂@mSiO₂ and free CeO₂NPs after cell culture treatments was confirmed by TEM images (Fig. 1e and Fig. S3†), and in both cases, the CeO₂NPs are observed within endosome-like organelles. Altogether, these data demonstrate the increased stability in the physiological media of the mSiO₂ encapsulated small-sized CeO₂ cores, which is translated to an enhancement of their antioxidant activity and cellular protection.

CeO₂@mSiO₂ are well tolerated in obese Zucker rats and reduce the presence of NPs in non-targeted organs

Once identified the improved physicochemical and antioxidant properties of the CeO₂@mSiO₂ nanocomposites, we evaluated whether these benefits could be translated to the treatment of mild inflammation, which challenges the onset of therapeutic effects. To this, the *in vivo* activity of the CeO₂@mSiO₂ in low-grade inflammation associated with obesity was assessed and compared with free CeO₂NPs in the experimental genetic model of obese Zucker rats. Compared to lean Zucker rats, obese Zucker rats presented significantly increased body weight, adipokines, and lipemia (Table S1†). The protective effects of CeO₂@mSiO₂ were evaluated by assessing the metabolic alterations in four groups of Zucker rats: lean rats receiving saline solution, and obese rats receiving saline solution, free CeO₂NPs or CeO₂@mSiO₂. At 8th and 9th week ages, rats were anesthetized by isoflurane inhalation, and vehicle (500 μL), CeO₂NPs (0.1 mg kg⁻¹) or CeO₂@mSiO₂ (0.1 mg kg⁻¹) were intravenously (i.v.) injected twice a week (Fig. 2a). Animals were euthanized by isoflurane overdose on week 14th. No exacerbating effect of any metabolic disturbance

or induction of organic toxicity was observed after the treatment with nanomaterials (Fig. 2b and Table S1†).

The accumulation of cerium (Ce) in different tissues of obese Zucker rats was also analyzed at week 14th. As expected, Ce was mainly present in the liver and spleen regardless of being administered as free CeO₂NPs or embedded in the mSiO₂. Regarding non-hepatic tissues, less Ce was observed in the case of CeO₂@mSiO₂ administration. Rats treated with CeO₂@mSiO₂ presented a significant 70% lower Ce content in the lung ($p = 0.004$) and a 34% reduction in the spleen ($p = 0.18$), when compared to the administration of free CeO₂NPs (Fig. 2c). These results are in agreement with different studies showing the increased accumulation of naked NPs in the lungs due to their aggregation,³⁷ and indicate that our mesoporous encapsulation approach for small-sized NPs is a safer design for their i.v. administration. Besides, the easy functionalization of the silica surface may allow an improved controlled biodistribution of different NPs for different clinical applications.

CeO₂@mSiO₂ reduces circulating levels of TNF- α , triglycerides, and LDL-cholesterol in obese Zucker rats

To evaluate the therapeutic potential of the CeO₂NPs and CeO₂@mSiO₂ nanocomposites in low-grade inflammation associated with obesity, we first measured the adipokines serum levels in obese Zucker rats treated with both nanomaterials. Obese rats presented a 45% increase of TNF- α , which was normalized only after CeO₂@mSiO₂ treatment (Fig. 2d and Table S1†). Importantly, TNF- α is a major M1-like proinflammatory cytokine involved in the low-grade inflammation associated with metabolic alterations linked to obesity.^{38–40} Moreover, CeO₂NPs and, to a higher extent, CeO₂@mSiO₂ remarkably reduced triglycerides (TG) and LDL-cholesterol (Fig. 2d and Table S1†), which are well-known main risk factors for cardiovascular diseases. Spectrophotometric assays showed that serum levels of TG and LDL-cholesterol were reduced by 23% and 32%, respectively, when treated with CeO₂NPs, whereas they were further reduced to 38% and 42% when treated with CeO₂@mSiO₂. This is consistent with the known role of TNF- α in lipid metabolism^{36,38,39,41} and with previous results showing the ability of CeO₂NPs to revert the proinflammatory phenotype and induce macrophage polarization from M1, which obtain energy through glycolysis, to M2, which uses oxidative metabolism.⁴² Remarkably, the TNF- α reduction and lipid-lowering effects were observed 5 weeks after the administration of the treatment, showing a long-term activity compared with classical antioxidants.

CeO₂@mSiO₂ decreases circulating palmitic acid levels in obese Zucker rats

Hepatic redox imbalance has been identified as a causal determinant of metabolic traits such as hyperlipidemia associated with obesity and insulin resistance.⁴³ As the antioxidant and anti-inflammatory properties of CeO₂ based nanomaterials are well described,^{17,18,36,44,45} the next step of our analysis focused

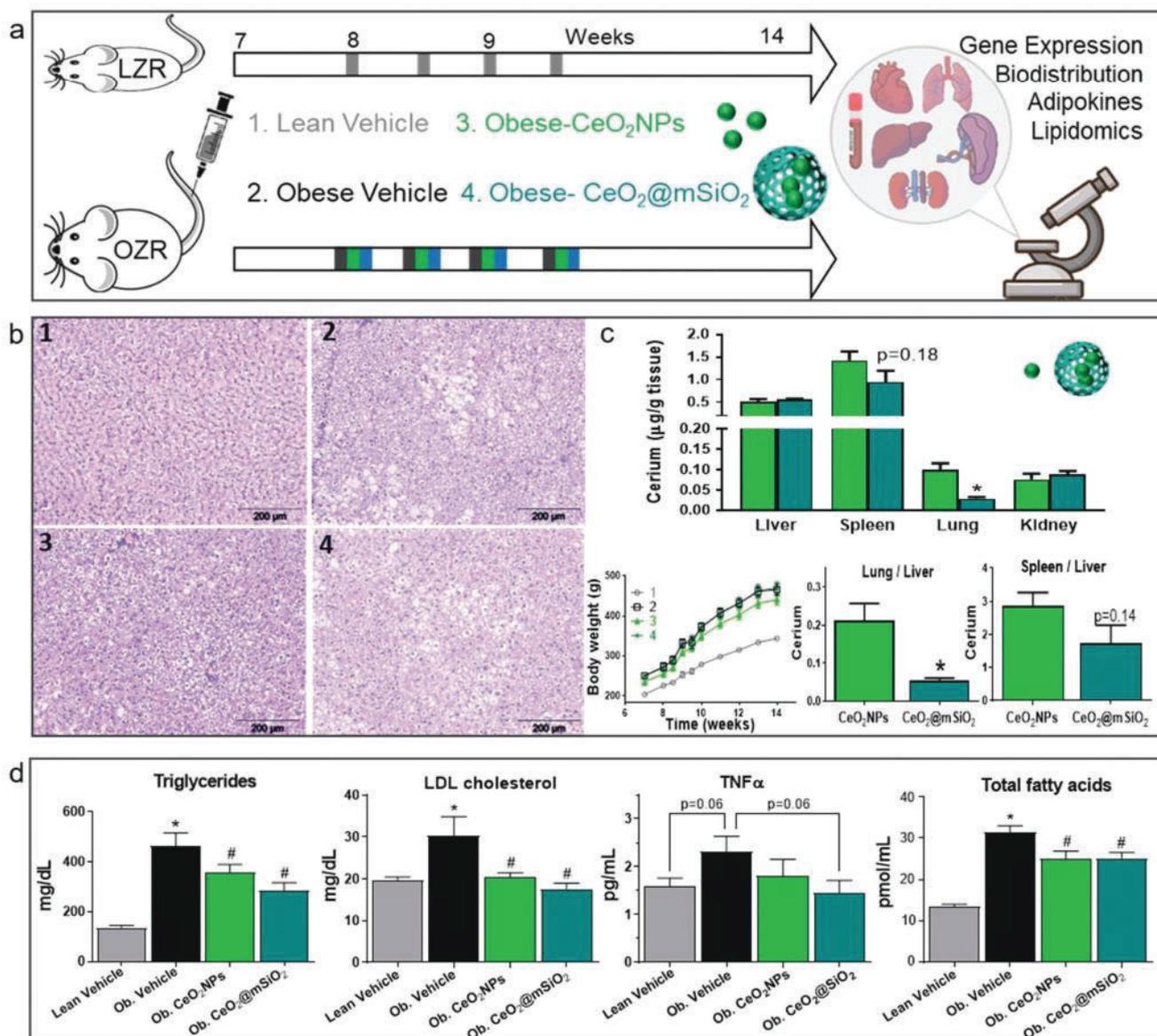


Fig. 2 CeO₂@mSiO₂ decrease non-hepatic biodistribution of Ce and reduce hyperlipidemia and TNF- α in obese Zucker rats. (a) Schematic illustration of the treatment of Zucker rats with the free CeO₂NPs and the nanocomposites CeO₂@mSiO₂, and analyses performed. (b) Haematoxylin-eosin staining of representative liver sections from lean (1) and obese rats receiving vehicle (2) or treated with CeO₂NPs (3) or CeO₂@mSiO₂ (4). (c) Top. Biodistribution of Ce in tissues of obese Zucker rats receiving CeO₂NPs or CeO₂@mSiO₂. Organs were collected 5 weeks after the last NPs administration and were evaluated for Ce concentration using ICP-MS. Below. Relation of Ce accumulation in spleen/liver and lung/liver using CeO₂NPs or CeO₂@mSiO₂, and graph of body weight development. Results are given as means \pm SEM. * p < 0.05 vs. CeO₂NPs (d) Serum levels of triglycerides, LDL-cholesterol, TNF- α , and total fatty acids in lean Zucker rats receiving vehicle and obese Zucker rats receiving vehicle or treated with CeO₂NPs or CeO₂@mSiO₂. Results are given as means \pm SEM. * p < 0.05 compared with lean Zucker rats receiving vehicle; # p < 0.05 compared with obese Zucker rats receiving vehicle.

on their lipid-lowering effects. Serum fatty acids (FA) and lipidome were investigated in obese Zucker rats treated with CeO₂NPs or CeO₂@mSiO₂. In agreement with the spectrophotometric results, the mass spectrometric analysis showed a significant reduction of total FA in serum that included saturated and unsaturated FA (Fig. 2d). Both nanomaterials significantly reduced C18:0, C18:1n9t, C20:3n6, C22:6n3 and C23:0. In addition, CeO₂@mSiO₂ also significantly reduced palmitic

acid (C16:0) and other five FA (C14:1, C16:1, C18:1n9c, C18:2n6t and C18:3n3) (Fig. 3a and Table S2†). In order to better understand the effects on circulating lipids, principal lipids components were isolated by solid phase extraction and derived FA were determined by GC-MS. The lipidomic analysis revealed that obese rats presented higher serum levels of TG, cholesterol esters (CE), phosphatidylcholines (PC), and phosphatidylethanolamines (PE) compared with lean rats (Fig. 3b).

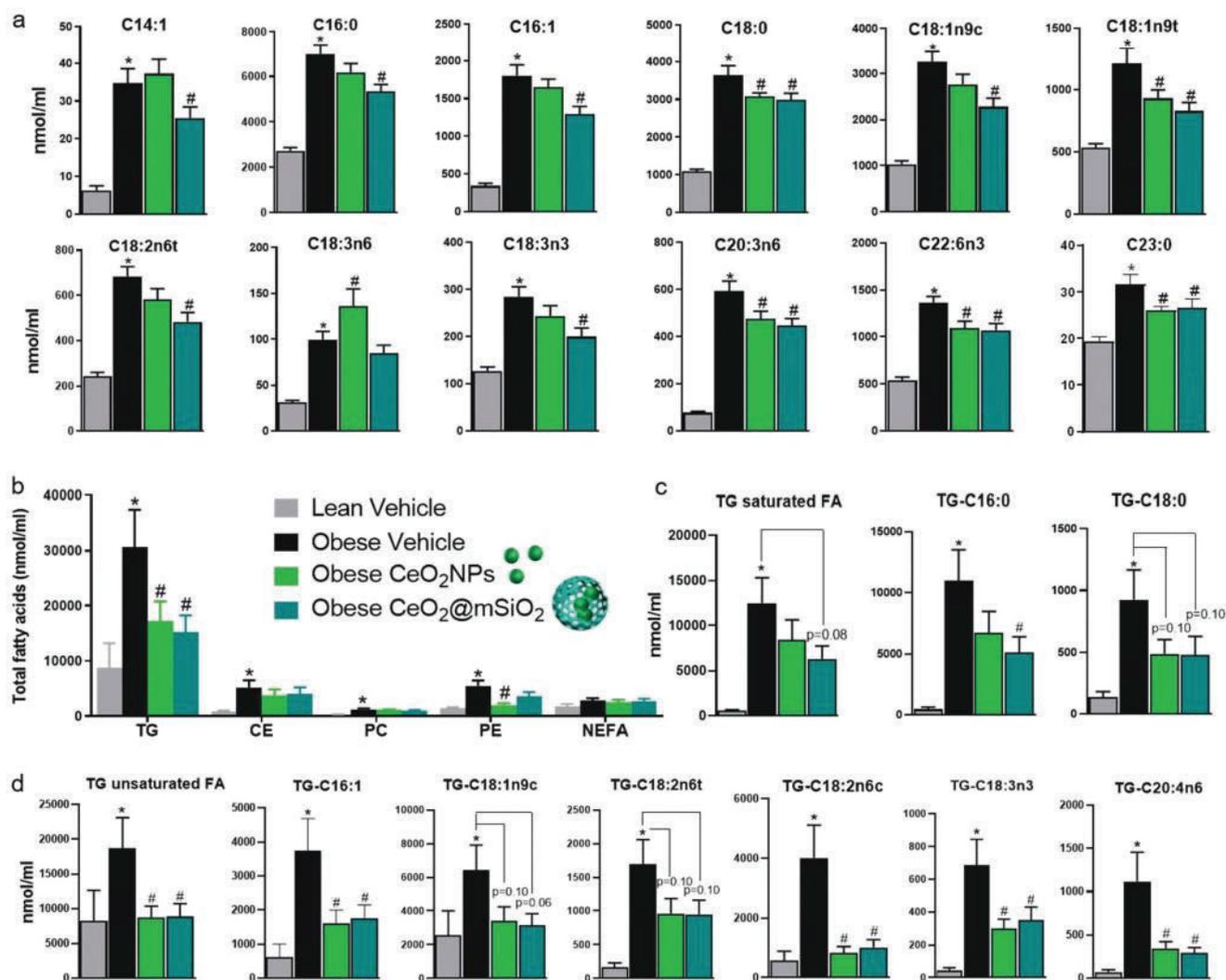


Fig. 3 Effect of $\text{CeO}_2@m\text{SiO}_2$ on the serum total fatty acids and lipidome. (a) Serum levels of individual total fatty acids (C14:1, C16:0, C16:1, C18:0, C18:1n9c, C18:1n9t, C18:2n6t, C18:3n6, C18:3n3, C20:3n6, C22:6n3, C23:0). (b) Triglycerides (TG), cholesterol esters (CE), phosphatidylcholines (PC), phosphatidylethanolamines (PE), and non-esterified fatty acids (NEFA) content of total fatty acids in the serum of lean Zucker rats receiving vehicle and obese Zucker rats receiving vehicle or treated with CeO_2NPs or $\text{CeO}_2@m\text{SiO}_2$. (c) Serum levels of triglycerides derived saturated fatty acids (total saturated, C16:0 and C18:0). (d) Serum levels of triglycerides derived unsaturated fatty acids (total unsaturated, C16:1; C18:1n9c; C18:2n6t, C18:2n6c, C18:3n3, C20:4n6). Results are given as mean \pm SEM. * $p < 0.05$ compared with lean Zucker rats receiving vehicle; # $p < 0.05$ compared with obese Zucker rats receiving vehicle.

The effects of both nanomaterials were found to be related almost exclusively to a diminution of TG-derived FA levels, which were reduced 44% in rats treated with CeO_2NPs and 51% in rats treated with $\text{CeO}_2@m\text{SiO}_2$. The analysis of the lipidome showed that both nanomaterials similarly reduced TG-derived unsaturated FA (53% reduction) (Fig. 3d), whereas the effect on the reduction of TG-derived saturated FA was greater in rats treated with $\text{CeO}_2@m\text{SiO}_2$ (49%) compared with rats treated with free CeO_2NPs (32%) (Fig. 3c). This was due to a more significant effect of $\text{CeO}_2@m\text{SiO}_2$, reducing the content of palmitic acid in TG (53% vs. 39%). By contrast, similar effects of both nanomaterials were observed in the reduction of FA other than palmitic acid in TG that included a highly remarkable reduction (>70%) of the proinflammatory and

proadipogenic omega-6 FAs linoleic acid (C18:2n6c) and arachidonic acid (C20:4n6).^{46,47} Other TG-derived FA such as C16:1, C18:0, C18:1n9c, C18:1n9t, C18:2n6t, and C18:3n3 were also reduced between 40 and 60% (Fig. 3c and d). On the contrary, the nanomaterials did not significantly reduce CE, PC, or non-esterified fatty acids (NEFA) levels. Finally, whereas CeO_2NPs produced a significant 64% decrease of total PE, this reduction account only for 23% in rats treated with $\text{CeO}_2@m\text{SiO}_2$ (Fig. 3b). This was related to a significant difference in the reduction of the content of C20:4n6 in PE (81% vs. 33%). Collectively, these data demonstrate that CeO_2 nanomaterials remarkably decreased TG-derived FA in the serum of obese Zucker rats, and that the nanocomposite $\text{CeO}_2@m\text{SiO}_2$ formulation induces a more significant reduction of the palmitic

tic acid, the most abundant and cytotoxic proinflammatory saturated FA.

CeO₂@mSiO₂ improves liver and adipose tissue expression of genes related to metabolic and inflammatory signals in obese Zucker rats

Given the redox activity and main hepatic distribution of CeO₂ nanomaterials, we next evaluated whether the reduction of TNF- α circulating levels and lipid-lowering effects were associated with an improvement of the hepatic gene expression of obese rats. For this, total RNA obtained from the liver of Zucker rats was analyzed using a customized array of 88 genes involved in adipokine signaling, inflammatory response, apoptosis, carbohydrate and lipid metabolism, insulin signaling, and oxidative phosphorylation pathway. Fig. 4a shows the overall up-regulation of the analyzed genes in obese Zucker rats. Specifically, 76% of the genes were up-regulated (20% significantly), whereas only 24% were down-regulated (3% significantly). A significant increase was observed in the expression levels of *Slc2a4*, *Cd36*, *Elovl6*, *G6pd*, *Apoa1* as well as other genes involved in carbohydrate and lipid metabolism, adipokine signaling, and apoptosis (Table S3[†]). Treatment with nanomaterials exerted a predominantly inhibitory effect against the obesity-induced up-regulation of hepatic gene expression (Fig. 4a), which was more remarkable in the group treated with CeO₂@mSiO₂. Specifically, CeO₂NPs reduced the expression of 68% of the genes (8% significantly), while CeO₂@mSiO₂ reduced the expression of 92% of the genes (15% significantly) (Tables S4 and S5[†]).

In agreement with the systemic reduction of TNF- α levels, this cytokine was also found to be down-regulated in the liver of obese treated rats. Further evidence of the protective hepatic effect of CeO₂ nanomaterials was provided by the normalization of the expression of *Mtor* and *Akt1*, where multiple inflammatory and metabolic signals converge, and *Pik3ca*, which encodes for the catalytic subunit of phosphatidylinositol 3-kinase and is an essential downstream target of TNF receptor 2. This agrees with the overall inhibition of gene expression related to insulin signaling and lipid metabolism and transport and strongly suggested the inhibition of the PI3K/AKT/mTOR pathway in the liver, which is involved in the activation of *de novo* lipogenesis and gluconeogenesis and tumorigenesis. Significantly, a reduced phosphorylation of proteins involved in the PI3K/mTOR pathway has been previously observed in hepatic cells under oxidative stress treated with CeO₂NPs,⁴⁸ and the efficacy of CeO₂NPs in experimental hepatocellular carcinoma has been recently demonstrated.⁴⁹ In the same direction, both nanomaterials also down-regulated *STAT-3*, a factor involved in tumor development in obesity and MAFLD linked to oxidative and inflammatory environments even in the absence of NASH or fibrosis.^{50,51} Furthermore, expression of *Slc2a4* (encoding the insulin-regulated glucose transporter) and *Abcg1* (involved in lipid homeostasis) was down-regulated in obese rats by both nanomaterials. Additional effects were observed by CeO₂@mSiO₂ treatment in comparison with free CeO₂NPs, including the significant

down-regulation of 8 additional essential genes in oxidative phosphorylation (*Ndubf6*), lipid transport and metabolism (*Apoa1*, *Lpl*, *Abca1*), insulin signaling (*Insr*, *Pik3r1*), apoptosis (*Mapk1*) and carbohydrate metabolism (*Gsk3b*). Finally, it is also noteworthy that the expression of 12 genes related to carbohydrate metabolism (*Gsk3b*, *Rbp4*), insulin signaling (*Igf1*, *Igf1bp1*), and lipid metabolism and transport (*Acs15*, *Acs3*, *Cyp2e1*, *Foxa2*, *Hmgcr*, *Nr1h3*, *Nr1h4*, *Slc27a5*) was significantly reduced in obese rats treated with CeO₂@mSiO₂ compared with those treated with free CeO₂NPs (Table S6[†]). These results show a large protective effect of CeO₂@mSiO₂ against hepatic dysregulations associated with obesity and are consistent with their increased ROS-scavenging properties and their more significant reduction of TNF- α and palmitic acid.

Conversely to the previous observation of steatosis reduction by CeO₂NPs treatment in Wistar rats fed with methionine and choline-deficient (MCD) diet,⁵² assessment of liver steatosis in obese Zucker rats by histological staining with Oil red O and GC-MS lipidomic analysis did not show differences before or after treatment (Fig. S4 and Table S7[†]). Given that MCD diet is characterized by weight loss in contrast to the increased adipose tissue of obese Zucker rats, the effects of CeO₂ nanomaterials at the adipose tissue level were also studied. Total RNA obtained from the adipose tissue of Zucker rats was analyzed using an array of 88 essential genes involved in obesity. As expected, obese Zucker rats presented an overall up-regulation (Fig. 4b and Table S8[†]). Specifically, 82% of the genes were up-regulated in obesity (14% significantly), whereas only 18% were down-regulated (5% significantly).

Further, the treatment with CeO₂ nanomaterials reversed most of the dysregulations induced by obesity in the adipose tissue (Fig. 4b). Similar to the results observed in the liver, the CeO₂@mSiO₂ nanocomposites showed higher effects. Specifically, the expression of 76% of the up-regulated genes was reduced by CeO₂NPs (3% significantly) and 88% by CeO₂@mSiO₂ (6% significantly). Tables S9 and S10[†] show the genes significantly down-regulated by CeO₂NPs and CeO₂@mSiO₂, respectively, and Table S11[†] summarizes significant gene expression results comparing their effects. Both nanomaterials significantly down-regulated adipose tissue expression of *Nr3c1* (glucocorticoid receptor), which promotes adiposity and associated metabolic disorders in fat-fed mice.⁵³ This down-regulation was also observed in *Pparg1* (master regulator of mitochondrial biogenesis highly sensitive to ROS),⁵⁴ and *C3* (important participant in lipid metabolism that contributes to the metabolic syndrome and the low-grade inflammation associated with obesity).⁵⁵ Remarkably, when using the CeO₂@mSiO₂ nanocomposites, additional beneficial effects were observed, including the normalization of several genes involved in energy expenditure and metabolic rates (*e.g.* *Agrp*, *Atrn*, *Adra2b*, *Drd1*).

The specific molecular mechanisms that link the accumulation of CeO₂ nanomaterials in the liver with their protective effects in serum and adipose tissue needs to be further clarified. However, our results point as one crucial factor the significant effects found on the reduction of the hepatic M1

proinflammatory cytokine TNF- α and the down-regulation of PI3K/mTOR/AKT pathway, which play a major role in the regulation of systemic inflammation, metabolism, and lipid homeostasis.⁵⁶ This is also consistent with the observed broad beneficial regulation of gene expression in the adipose tissue, which may further reduce hyperlipidemia and systemic inflammation in a sort of positive feedback. Scheme 1 shows a summary of the therapeutic effects of CeO₂ nanomaterials and the proposed mechanisms. Altogether, these data indicate that hepatic protective effects of nanomaterials also induce an improvement of the adipose tissue and systemic metabolic dysregulations associated with obesity, and that these beneficial effects are enhanced with the use of the CeO₂@mSiO₂ nanocomposite formulation.

Experimental

Synthesis of CeO₂@mSiO₂ nanocomposites and CeO₂NPs

CeO₂@mSiO₂ nanocomposites of 53.8 ± 8.7 nm were synthesized by wet-chemistry methods, at room temperature and open atmospheric conditions. Equal volumes of aqueous solutions of cerium(III) nitrate hexahydrate (Ce(NO₃)₃; 20 mM) and ammonium hydroxide (NH₄OH; 54 mM) were mixed at a final concentration of 10 mM and 27 mM respectively, and a final volume of 7 mL. This mixture was kept under overnight stirring to allow the formation of the CeO₂NPs cores. Next, 3 mL of a solution consisting on 10 mg mL⁻¹ of cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) in a EtOH:H₂O (2:1 v/v ratio) was added dropwise under sonication to have a proper NP cores dispersion during the CTAB overcoating process. This was maintained under stirring for 30 minutes, and 60 μ L of Tetraethyl Orthosilicate (TEOS) was added dropwise. Afterward, the solution was kept under stirring overnight to allow the mesoporous SiO₂ shell formation. Finally, the obtained core-shell NPs were centrifuged and resuspended three times with a solution of ammonium nitrate in ethanol (20 g L⁻¹) for the CTAB removal. The particles were washed and kept in EtOH for further use. In addition, CeO₂NPs of 5 nm without the mesoporous coating were prepared similarly by mixing the aqueous solutions of Ce(NO₃)₃ and NH₄OH at the conditions described above. Additional characterization of the nanomaterials and instrumentation used can be found in ESI and Fig. S1 and S2.†

Cell culture

HepG2 cells were obtained from American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA). This immortalized human hepatocyte stable cell line can be repeatedly frozen, thawed and propagated. HepG2 cells were seeded into 6-well culture plates for internalization assessment, 96-well culture plates for cell bioavailability analysis or 24-well culture plates for ROS measurements. After seeding, cells were grown to confluence in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), supplemented with 10% foetal bovine serum (FBS), 50 U mL⁻¹ penicillin and 50 μ g mL⁻¹ streptomycin, in a humidified atmo-

sphere of 5% CO₂ at 37 °C. Thereafter, the cells were switched to serum-free DMEM for 16 h. For cell stimulation and treatment, old medium was removed and replaced with medium, medium containing 1.5 mM H₂O₂ (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) or medium containing 1.5 mM H₂O₂ and CeO₂NPs or CeO₂@mSiO₂ (1 or 10 μ g mL⁻¹).

TEM images of biological samples

Internalization of nanomaterials in HepG2 cells was assessed using TEM. HepG2 cells were seeded (1.5×10^6 cells per well) in 6-well plates and incubated with medium, medium with CeO₂NPs (10 μ g mL⁻¹) and medium with CeO₂@mSiO₂ (10 μ g mL⁻¹) for 24 h. Thereafter, cells were fixed in a 0.1 M phosphate buffer containing 2.5% glutaraldehyde and 2% paraformaldehyde. Cells were embedded in Spur's resin and thin sections (50–55 nm) were cut and placed on copper grids. After staining, the sections were examined at low electron power microscope to increase contrast in a JEOL-1010 TEM (JEOL, Tokyo, Japan) operated at 80 kV and equipped with a BioScan camera (Gatan, CA, USA).

Cell viability analysis

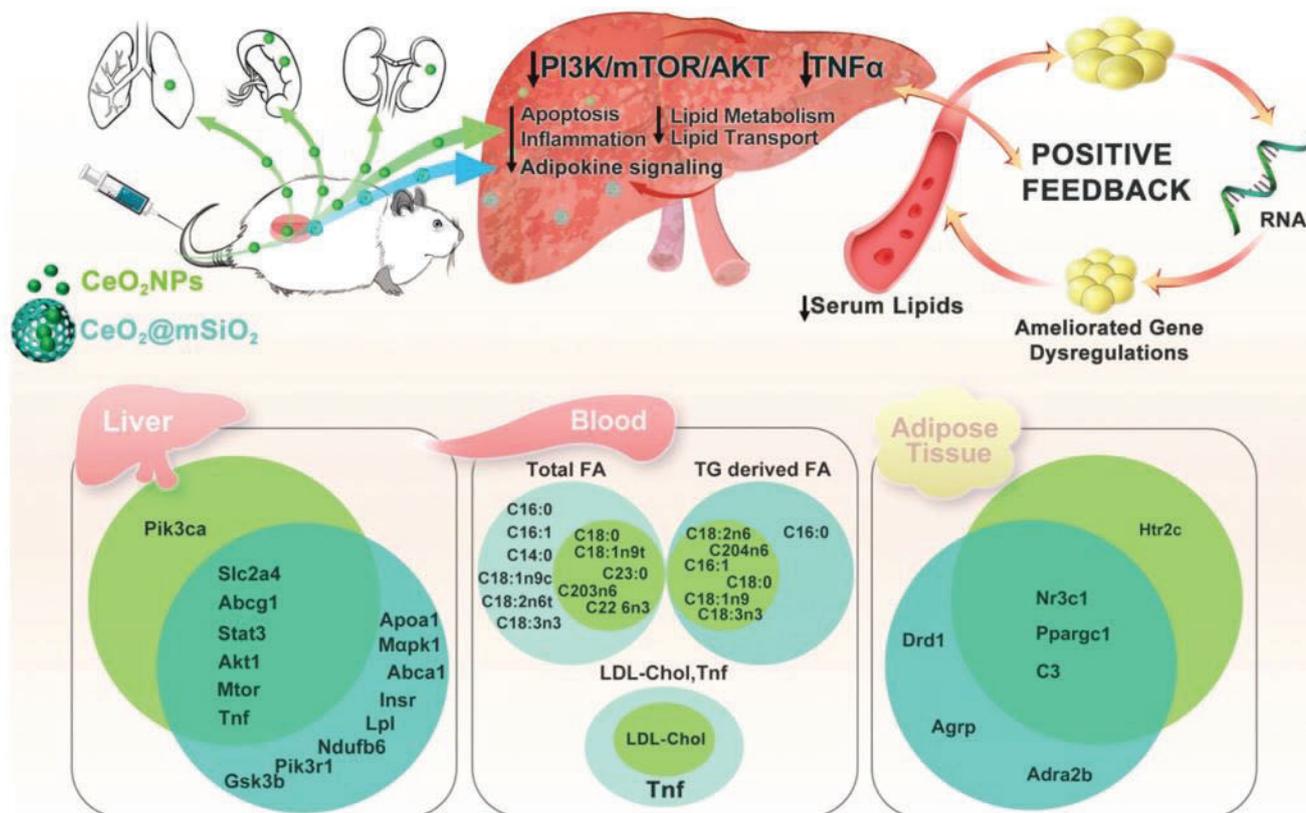
Cell viability was assessed using the MTS technique (CellTiter 96; Promega, Madison, WI, USA) according to the manufacturer's instructions. In brief, cells were seeded (1×10^5 cells per well) in 96-well plates and treated with medium, H₂O₂ (1.5 mM) or H₂O₂ and CeO₂NPs (1 μ g mL⁻¹) or CeO₂@mSiO₂ (1 μ g mL⁻¹) for 90 min at 37 °C. Then, cells were washed twice with Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) and CellTiter reagent was added to each well. After incubation for 3 h at 37 °C to allow cells to bioreduce MTS, the absorbance of formazan was measured at 490 nm (SpectraMax 340, Molecular Devices, Sunnyvale, CA). The quantity of formazan is directly proportional to the number of living cells in culture.

Reactive oxygen species measurement

Fluorescence spectrophotometry was used to measure ROS, with 2',7'-DCFDA as the probe (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). DCF-DA readily diffuses through the membrane and is enzymatically hydrolysed by intracellular esterases to the non-fluorescent DCFH, which can then be rapidly oxidized to fluorescent DCF in the presence of ROS. Cells were seeded in 24-well plates and incubated alone with medium or treated with H₂O₂ (1.5 mM) or H₂O₂ in the presence of CeO₂NPs (1 μ g mL⁻¹) or CeO₂@mSiO₂ (1 μ g mL⁻¹) for 90 min. Thereafter cells were washed with HBSS and incubated with 10 μ M DCF-DA in Hanks Balanced Salt Solution for 40 min at 37 °C in the dark. The supernatant was collected to measure the production of ROS, and the intensity of DCF fluorescence was immediately read in a fluorescence spectrophotometer (FLUOstar OPTIMA; BMG LABTECH, Ortenberg, Germany) at 485 nm for excitation and at 520 nm for emission.

Animals and experimental design

Studies were performed in 40 male Zucker rats (Charles-River, Saint Aubin les Elseuf, France). Six-week-old Zucker rats were



Scheme 1 CeO₂NPs and CeO₂@mSiO₂ induce long-term improvement of the metabolic profile by addressing the low-grade chronic inflammation and oxidative stress associated with obesity. The superior stability, ROS scavenging activity and improved biodistribution of the CeO₂@mSiO₂ nanocomposites compared with free CeO₂NPs allow a higher decrease of TNF- α and hepatic PI3K/mTOR/AKT pathway which are associated to a higher reduction of hyperlipidemia, including LDL-cholesterol, TG and palmitic acid, as well as other FA and TG-derived FA. Furthermore, CeO₂@mSiO₂ nanocomposites showed a larger protective effect against hepatic and adipose tissue dysregulations associated to obesity. In the liver, the activity of CeO₂@mSiO₂ nanocomposites reverses gene expression of obesity-related dysregulations and decreases key genes in adipokine signaling, inflammation and apoptosis, oxidative phosphorylation, lipid transport and metabolism, insulin signaling and carbohydrate metabolism. This, in the adipose tissue is reflected by an improvement of the obesogenic genes dysregulation, which generates a sort of positive feedback that further improve systemic effects.

fed *ad libitum* with standard chow (Purina 5008) and water. On week 8 and 9, Zucker rats were anesthetized by isoflurane inhalation and i.v. injected (500 μ L) with CeO₂NPs (0.1 mg kg⁻¹), CeO₂@mSiO₂ (0.1 mg kg⁻¹) or vehicle (saline solution containing TMAOH 0.48 mM), twice a week. Four groups of 10 rats were studied: lean Zucker rats treated with vehicle, obese Zucker rats treated with vehicle, obese Zucker rats treated with CeO₂NPs and obese Zucker rats treated with CeO₂@mSiO₂. Weigh was recorded throughout the experimental study. Animals were euthanized by isoflurane overdose on week 14. Liver and adipose tissue specimens were obtained from each animal, immediately frozen in dry ice, and stored at -80 °C. Liver was also fixed in 10% buffered formalin for further analysis. A blood sample was also obtained to measure standard liver and renal function tests in baseline conditions. All animal procedures were approved by the Investigation and Ethics Committee of Animal Experimentation of the University of Barcelona (HCB/2018/0644) in accordance with Catalan Government Decree 214/97.

Organ distribution of cerium in CeO₂NPs or CeO₂@mSiO₂ treated obese Zucker rats

Eight obese Zucker rats treated with CeO₂NPs ($n = 4$) and CeO₂@mSiO₂ ($n = 4$) were studied. Liver, spleen, heart, kidney, lung, retroperitoneal adipose tissue and gastrocnemius muscle were collected from 14-week-old obese Zucker rats that were treated with CeO₂NPs or CeO₂@mSiO₂ at week 8th and 9th as described in the experimental protocol. Samples were diluted with an aqueous solution of HNO₃ 2% w/w (Trace Metal Basis; Sigma-Aldrich) and analyzed for cerium concentration by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS, Agilent 7500; Agilent Technologies, California, USA). The quantification was done by interpolation in a standard curve obtained from a commercial 1000 ppm cerium standard (Sigma-Aldrich).

Histological examination of liver steatosis

Liver sections from tissue fixed in 10% buffered formalin were stained with haematoxylin-eosin (H&E) and images were

acquired at 100 \times magnification with a microscope (Eclipse E600; Nikon, Tokyo, Japan) and digital camera (RT-Slider Spot; Diagnostic Instruments, Sterling Heights, MI, USA) to assess liver steatosis. Hepatic lipid droplet quantification by Oil Red was performed in frozen liver samples that were embedded in Tissue-Tek[®] OCT compound (Sakura Finetek, Alphen aan den Rijn, The Netherlands) and cut to a thickness of 3–5 μm in a cryostat (Cryostat CM 1950; Leica Biosystems). Cryostat frozen sections were stained with Oil Red O (ORO) solution (Sigma Aldrich) for analysis of intracytoplasmic lipid droplets in the liver. Images of ORO staining at 200 \times magnification were obtained using Eclipse E600 microscope (Nikon, Tokyo, Japan) and digital camera (RT-Slider Spot; Diagnostic Instruments, Sterling Heights, MI, USA).

Systemic effects of CeO₂NPs and CeO₂@mSiO₂ in Zucker rats

Standard parameters of liver and renal function, electrolytes and lipid profile were measured in the BS-200E Chemistry Analyzer (Mindray Medical International Ltd, Shenzhen, China): albumin, alanine transaminase, aspartate transaminase, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol, creatinine, glucose, potassium, sodium, total cholesterol, total proteins and triglycerides. Circulating levels of inflammatory cytokines, such as MCP-1, IL-1 β and TNF- α , as well as insulin and leptin hormones, were analysed using the Milliplex MAP Rat Adipokine Magnetic Bead Panel (Merck Millipore, Darmstadt, Germany). HOMA-IR was calculated by applying the following formula: glucose (mmol L⁻¹) \times insulin (mIU L⁻¹)/22.5.

Serum and hepatic lipid profiling by mass spectrometry analysis

Liver tissue (30–40 mg) or serum (100 μL) were homogenized in chloroform:methanol (2:1, v/v, Scharlab, Barcelona, Spain and PanReac AppliChem, Darmstadt, Germany, respectively) containing 0.005% butylated hydroxytoluene (Sigma Aldrich, Saint Louis, USA) and separated with water following the Folch method. Methyl nonadecanoate was used as internal standard (Sigma-Aldrich). After evaporation of the organic phase, the residue was dissolved in methanol:hexane (4:1, v/v) and transesterified (fatty acids methyl esters, FAME) with acetyl chloride. Finally, the organic layer, subsequent to separation with potassium carbonate at 6%, was analysed by gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS) leading to quantification of total fatty acids. GC–MS analyses of FAME were performed on a Shimadzu GCMS QP2010 Ultra instrument (Kyoto, Japan). Final extracts were injected in splitless mode (valve opened at 1 min) into the gas chromatograph interfaced with a mass selective detector. Chromatographic separation was achieved on a Sapines-5MS + capillary column (30 m \times 0.25 mm internal diameter \times 0.25 μm film thickness) from Teknokroma (Barcelona, Spain) with helium as a carrier gas at a constant velocity of 50 cm s⁻¹. The temperature program was set to begin at 50 $^{\circ}\text{C}$, maintained at this temperature for 1 min, elevated at 25 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ to 200 $^{\circ}\text{C}$, then increased at 3 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ until 230 $^{\circ}\text{C}$ and finally maintained for 18 min at

230 $^{\circ}\text{C}$. The ion source and transfer line temperatures were set at 270 $^{\circ}\text{C}$ and 280 $^{\circ}\text{C}$, respectively. The mass detector was operated both in selected ion monitoring (SIM) and scan modes. Identification and quantification of the FAME in the sample extracts was achieved by mass spectrum and GC retention time comparison with reference standards (Supelco 37 Component FAME Mix, Sigma-Aldrich). Total fatty acids results are expressed as pmol of FA per mg liver tissue and nmol mL⁻¹ of serum.

Lipid species content was obtained from liver tissue (50 mg) and serum (500 μL) samples that underwent Folch extraction (chloroform:methanol:water, 8:4:3, v/v) as mentioned above. Glycerol trinonadecanoate (TG 19:0/19:0/19:0, Sigma Aldrich, Madrid, Spain), cholesteryl heptadecanoate (CE 17:0), 1,2-dinonadecanoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (PC 19:0/19:0), 1,2-dipentadecanoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine (PE 15:0/15:0) and nonadecanoate (C19:0) were used as internal standards. Separation of triglycerides (TG), cholesterol esters (CE), phosphatidylcholines (PC), phosphatidylethanolamines (PE) and non-esterified fatty acids (NEFA) from total lipid liver extracts dissolved in chloroform was performed by solid-phase extraction (SPE) using aminopropyl silica columns, as previously described.⁴⁹ First, the CE and TG fractions were eluted with chloroform. Thereafter, PC were eluted with chloroform:methanol (3:2, v/v), PE were eluted with methanol and finally NEFA were eluted with chloroform:methanol:acetic acid (100:2:2, v/v). In order to isolate CE and TG, the first fraction was evaporated under nitrogen stream, dissolved in hexane (Merck Millipore, Darmstadt, Germany) and transferred to a fresh preconditioned aminopropyl silica column preconditioned with hexane. Then CE were eluted with hexane, and TG were eluted with hexane:chloroform:ethylacetate (100:5:5, v/v). All solvent fractions containing isolated lipids were dried under nitrogen stream and transesterified into FAME with 0.5 M sodium hydroxide (NaOH) and boron trifluoride (Sigma Aldrich, Saint Louis, USA, B1252) in methanol. Final extracts were analysed by GC–MS under the conditions described above. Lipid species results are expressed as pmol of FA per mg liver tissue and nmol mL⁻¹ of serum.

For the study of oxysterols in the liver, Folch extraction was performed as described, using as internal standards cholesterol-d7 and 7 β -hydroxycholesterol-d7 (Sigma-Aldrich – Merck KGaA, Darmstadt, Alemania). The residue was dissolved in 50 μL pyridine and 50 μL *N,O*-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (BSTFA) with 1% trimethylchlorosilane (TMCS) (BSTFA/TMCS), followed by a microwave-assisted derivatization during 3 minutes, and injection into the GC–MS. GC–MS analyses were performed on a Shimadzu GCMS QP2010Ultra instrument. The final extract was injected in split-less mode with a sampling time of 1 min into the gas chromatograph interfaced with a mass selective detector. The GC was equipped with a Sapines-5MS + capillary column (30 m length \times 0.25 mm inner diameter \times 0.25 μm film thickness; Teknokroma, Sant Cugat del Vallés, Spain). Helium was used as a carrier gas at a constant velocity of 50 cm s⁻¹. Oven temperature was held at

100 °C for 3 min, elevated from 100 °C to 240 °C at a rate of 20 °C min⁻¹, then linearly increased until 300 °C at 30 °C min⁻¹ and finally temperature was maintained for 18 min at 300 °C. The ion source and interface temperatures were set to 250 °C and 280 °C, respectively. Mass detector was operated both in SIM and SCAN modes. Identification of oxysterols was achieved in comparison with known standards of cholesterol, 7 β -hydroxycholesterol, 7 α -hydroxycholesterol, cholesterol 5 α ,6 α -epoxide and 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycerol (Sigma-Aldrich). Results are expressed as μ g of oxysterols per g liver or ratio with the internal standard.

Hepatic messenger expression of inflammatory and steatosis genes in obese Zucker rats

Gene expression was evaluated on liver tissue from 16 Zucker rats, four from each experimental group. Total RNA was extracted from the liver of lean and obese Zucker rats using a RNA extraction column kit (RNAeasy, Qiagen) and its quality (ratios 260/280 \sim 2 and 260/230 $>$ 1) and concentration was assessed by spectrophotometry (ND-100 spectrophotometer, Thermo Fisher Scientific). RNA samples were treated with RNase-Free DNase set (Qiagen) to remove residual DNA. Total RNA (500 ng) was reverse-transcribed into cDNA using an RT2 first-strand kit (Qiagen). Finally, real-time PCR array was performed using the RT2 Modified PCR Array Rat Fatty Liver (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. This array was partially modified by the manufacturer with the addition of four genes of interest (Elovl5, Elovl6, Hsd17b13 and Nox4). The modified fatty liver array profiles the expression of 88 key genes involved in the mechanisms of metabolic associated fatty liver disease (MAFLD) and hepatic insulin resistance, belonging to different pathways such as adipokine signalling, inflammatory response and apoptosis, carbohydrate metabolism, insulin signalling, lipid metabolic pathways and oxidative phosphorylation: Abca1, Abcg1, Acaca, Acadl, Acly, Acox1, Acs15, Acsm3, Adipor1, Adipor2, Akt1, Apoa1, Apob, Apoc3, Apoe, Atp5c1, Casp3, Cd36, Cebpb, Cnbp, Cpt1a, Cpt2, Cyp2e1, Cyp7a1, Dgat2, Elovl5, Elovl6, Fabp1, Fabp3, Fabp5, Fas, Fasn, Foxa2, G6pc, G6pd, Gck, Gk, Gsk3b, Hmgcr, Hnf4a, Hsd17b13, Ifng, Igf1, Igfbp1, Il10, Il1b, Il6, Insr, Irs1, Ldlr, Lepr, Lpl, Mapk1, Mapk8, Mxipl, Mtor, Ndufb6, Nfkb1, Nox4, Nr1h2, Nr1h3, Nr1h4, Pck2, Pdk4, Pik3ca, Pik3r1, Pklr, Ppa1, Ppara, Ppard, Pparg, Pparge1a, Prkaa1, Ptpn1, Rbp4, Rxra, Scd1, Serpine1, Slc27a5, Slc2a1, Slc2a2, Slc2a4, Socs3, Srebf1, Srebf2, Stat3, Tnf, Xbp1. A Light Cycler 480 (Roche Diagnostics) was used to process the PCR array plates, applying an automated baseline and threshold cycle detection. Gene expression was normalized by the internal controls (Actb, B2m, Hprt1, Ldha, Rplp1) and fold-change of the target gene between test and control samples was calculated, as defined in the formula $2^{-\Delta\Delta CT}$. Data was elucidated using GeneGlobe Data Analysis Centre of Qiagen. Results were expressed as fold-regulation, which represents fold-change results in a biologically meaningful way. Fold-regulation is equal to the fold-change when fold-change values are greater than one, illustrating an up-regulation. On the

other hand, fold-regulation is the negative inverse of the fold-change when fold-change values are less than one, indicating a down-regulation of the gene expression. Biological cut-off was set to a fold regulation of \pm 1.

Histological examination of adipose tissue

Frozen adipose samples were embedded in Tissue-Tek® OCT compound (Sakura Finetek, Alphen aan den Rijn, The Netherlands) and cut in a cryostat (Cryostat CM 1950; Leica Biosystems). Cryostat frozen sections of adipose tissue (5–8 μ m) were stained with Harris hematoxylin (Panreac, Castellar del Vallès, Spain) and eosin (Casa Alvarez, Madrid, Spain). Tissue sections were examined by microscopy using Eclipse E600 microscope (Nikon, Tokyo, Japan) and digital camera (RT-Slider Spot; Diagnostic Instruments, Sterling Heights, MI, USA). Images were acquired at 100 \times magnification.

Adipose tissue messenger expression of orexigenic, anorectic and energy expenditure obesity-related genes in obese Zucker rats

Gene expression was evaluated on retroperitoneal adipose tissue from 16 Zucker rats, four from each experimental group. Total RNA was extracted using a RNA extraction kit (RNeasy Lipid Tissue, Qiagen), assessing their concentration and quality (ratios 260/280 and 260/230) by spectrophotometry (NanoDrop-1000 spectrophotometer, Thermo Fisher Scientific). RNA samples were treated with RNase-Free DNase set (Qiagen) to remove residual DNA. Total RNA (450 ng) was reverse-transcribed into cDNA using an RT2 first-strand kit (Qiagen). Finally, real-time PCR array was performed using the RT2 Modified PCR Array Rat Obesity (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. This array was partially modified by the manufacturer with the addition of four genes of interest (Cd163, Cd68, Il10 and Nos2). The modified obesity array profiles the expression of 88 key genes related to orexigenic, anorectic and energy expenditure function: Adcyap1, Adcyap1r1, Adipoq, Adipor1, Adipor2, Adra2b, Adrb1, Agrp, Apoa4, Atrn, Bdnf, Brs3, C3, Calca, Calcr, Cartpt, Cck, Cckar, Cd163, Cd68, Clps, Cnr1, Cntf, Cntfr, Crh, Crhr1, Drd1, Drd2, Gal, Galr1, Geg, Gcgr, Gh1, Ghr, Ghrl, Ghsl, Glp1r, Grp, Grpr, Hcrtr1, Hrh1, Htr2c, Iapp, Il10, Il1a, Il1b, Il1r1, Il6, Il6r, Ins1, Ins2, Insr, Lep, Lepr, Mc3r, Mchr1, Nmb, Nmbp, Nmu, Nmur1, Nos2, Npy, Npy1r, Nr3c1, Ntrk1, Nts, Ntsr1, Oprk1, Oprm1, Pomc, Ppara, Pparg, Pparge1a, Prlhr, Ptpn1, Pyy, Ramp3, Sigmar1, Sort1, Sst, Sstr1, Thrb, Tnf, Trh, Trhr, Ucn, Ucp1. A Light Cycler 480 (Roche Diagnostics) was used to process the PCR array plates, applying an automated baseline and threshold cycle detection. Gene expression was normalized by the internal controls (Actb, B2m, Hprt1, Ldha, Rplp1) and fold-change of the target gene between test and control samples was calculated, as defined in the formula $2^{-\Delta\Delta CT}$. Data was elucidated using GeneGlobe Data Analysis Center of Qiagen. Results were expressed as fold-regulation, which represents fold-change results in a biologically meaningful way. Fold-regulation is equal to the fold-change when fold-change

values are greater than one, illustrating an up-regulation. On the other hand, fold-regulation is the negative inverse of the fold-change when fold-change values are less than one, indicating a down-regulation of the gene expression. Biological cut-off was set to a fold regulation of ± 1 .

Statistical analysis

Quantitative data were analysed using GraphPad Prism 6 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Statistical analysis of the results was performed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Newman–Keuls *post hoc* test for comparison between multiple groups. Unpaired Student's *t*-test was used for comparison between two independent groups. Data is expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM) and considered significant at a *p* value of 0.05 or less. The study was performed according to the criteria of the Investigation and Ethics Committee of the Hospital Clínic of Barcelona.

Conclusions

In summary, we have shown that the optimization of the design and synthesis of mesoporous silica coated CeO₂ nanocomposites enable a high stability of the antioxidant CeO₂ nanozymes in the physiological media, maximize their ROS-scavenging activity, and decrease their presence in organs other than liver, which improves their safety profile. In addition, the nanocomposites show a remarkable lipid-lowering effect and a long-term improvement of the metabolic phenotype associated with obesity in obese Zucker rats. These results expand the currently proposed therapeutic applications of CeO₂ nanozymes, in which models of severe inflammation are commonly employed, by addressing the long-term dysregulations associated with mild inflammation and by proving the effectiveness of the new CeO₂ based nanocomposite in ameliorating the metabolic alterations associated with obesity, a pressing public health problem that entails a major societal and economic burden. Future work is required to investigate whether the described combined antioxidant and lipid-lowering activities can be applied to other types of proposed nanomaterials with known antioxidant properties (*e.g.* Fe₃O₄, MnO₂, *etc.*) to further expand the possibilities of the promising field of nanozymes. In addition, the final fate and potential toxicity over years of CeO₂ and other nanomaterials is still to be elucidated, which is recognized as part of the future work for their clinical translation, as we recently reviewed.¹⁷ The association between the reduction of inflammatory markers, circulating lipids and the regulation of the critical genes involved in this process has been also shown. Although determining the fundamental specific molecular mechanisms of this cascade of beneficial effects needs further research, the effects on hepatic M1 proinflammatory cytokine TNF- α and PI3K/mTOR/AKT pathway have been identified to play a main role. Finally, it is important to note that the synthesis method is entirely implemented in aqueous solution and at room

temperature, which favors biocompatibility and scalability, and mesoporous silica is classified as “Generally Recognized as Safe” (GRAS) by the FDA, thus potentially enabling rapid clinical translation. Hence, this study offers a new therapeutic opportunity to treat obesity and its metabolic comorbidities, and may offer a foundation for future studies to address other disorders related to low-grade inflammation and oxidative stress.

Author contributions

M. Z., Y. S., J. C., D. G., X. Z., and E. C. developed the synthesis method and characterized the nanocomposites. D. D and E. C. performed the experiments of the mesoporous silica shell and characterized the samples. M. P-R., G. F-V., M. P. M. M-R., W. J., and G. C analysed cell viability and antioxidant activity of the samples and performed the *in vivo* assays. J. M. R. V. P., E. C., and G. C. conceived the idea, designed the experiments and supervised the research. All authors have given approval to the final version of the manuscript.

Conflicts of interest

There are no conflicts to declare.

Acknowledgements

This research was supported by the Instituto de Salud Carlos III (PI19/00774 to G. C. and G. F-V.), Dirección General de Investigación Científica y Técnica (RTI2018-094734-B-C2 to W. J.), co-financed by FEDER, European Union, “A way of making Europe”, and the Secretaria d'Universitats i Recerca del Departament d'Empresa i Coneixement de la Generalitat de Catalunya (2018_PROD_00187 to W. J.), the National Natural Science Foundation of China (31950410536 to E. C. and 22005221 to M. Z.), the Wuyi University Funding (2018TP010 to E. C., and 2018TP011 and 2020FKZX05 to M. Z.), Guangdong Science and Technology Department (2019A050512006 to E. C.), and the Academy of Finland (309374 to J. M. R.). The authors would like to acknowledge the following facilities for their helping in the analysis of the samples: TEM images and ultrastructural analysis of CeO₂@mSiO₂ in HepG2 cells were made at the Scientific and Technology Centres of the University of Barcelona (CCiT-UB), Spain; IDIBAPS Core Facilities and Leitat Technological Center.

References

- 1 S. Bryan, B. Baregazy, D. Spicer, P. K. Singal and N. Khaper, *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 2013, **91**, 22–30.
- 2 A. Carrier, *Antioxid. Redox Signaling*, 2017, **26**, 429–431.

- 3 S. Furukawa, T. Fujita, M. Shimabukuro, M. Iwaki, Y. Yamada, Y. Nakajima, O. Nakayama, M. Makishima, M. Matsuda and I. Shimomura, *J. Clin. Invest.*, 2017, **114**, 1752–1761.
- 4 P. González-Muniesa, M. A. Martínez-González, F. B. Hu, J. P. Després, Y. Matsuzawa, R. J. F. Loos, L. A. Moreno, G. A. Bray and J. A. Martinez, *Nat. Rev. Dis. Primers*, 2017, **3**, 17034.
- 5 G. S. Hotamisligil, *Nature*, 2006, **444**, 860–867.
- 6 N. Houstis, E. D. Rosen and E. S. Lander, *Nature*, 2006, **440**, 944–948.
- 7 N. Ouchi, J. L. Parker, J. J. Lugus and K. Walsh, *Nat. Rev. Immunol.*, 2011, **11**, 85–97.
- 8 S. H. Chang, C. R. Stoll, J. Song, J. E. Varela, C. J. Eagon and G. A. Colditz, *JAMA Surg.*, 2014, **149**, 275–287.
- 9 M. O. Dietrich and T. L. Horvath, *Nat. Rev. Drug Discovery*, 2012, **11**, 675–691.
- 10 M. F. Gregor and G. S. Hotamisligil, *Annu. Rev. Immunol.*, 2011, **29**, 415–445.
- 11 F. Franco, C. Domenico, F. Paolo, D. Alberto, P. Ana, G. Andrea, P. Carla and M. Giovanna, *Curr. Diabetes Rev.*, 2011, **7**, 313–324.
- 12 B. M. Gregório, D. B. De Souza, F. A. de Moraes Nascimento, L. M. Pereira and C. Fernandes-Santos, *Curr. Pharm.*, 2016, **22**, 859–869.
- 13 V. Rani, G. Deep, R. Singh, K. Palle and U. Yadav, *Life Sci.*, 2016, **148**, 183–193.
- 14 B. Halliwell, *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 2013, **75**, 637–644.
- 15 R. M. Howes, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 2006, **1067**, 22–26.
- 16 S. Hutson, *Nat. Med.*, 2008, **14**, 795–795.
- 17 E. Casals, M. Zeng, M. Parra-Robert, G. Fernández-Varo, M. Morales-Ruiz, W. Jiménez, V. Puentes and G. Casals, *Small*, 2020, **16**, 1907322.
- 18 B. Yang, Y. Chen and J. Shi, *Adv. Mater.*, 2019, **31**, 1901778.
- 19 Y. Liu and J. Shi, *Nano Today*, 2019, **27**, 146–177.
- 20 M. Ghorbani, H. Derakhshankhah, S. Jafari, S. Salatin, M. Dehghanian, M. Falahati and A. Ansari, *Nano Today*, 2019, **29**, 100775.
- 21 B. Yang, Y. Chen and J. Shi, *Chem. Rev.*, 2019, **119**, 4881–4985.
- 22 M. Parra-Robert, E. Casals, N. Massana, M. Zeng, M. Perramón, G. Fernández-Varo, M. Morales-Ruiz, V. Puentes, W. Jiménez and G. Casals, *Biomolecules*, 2019, **9**, 425.
- 23 E. Casals, M. F. Gusta, J. Piella, G. Casals, W. Jimenez and V. Puentes, *Front. Immunol.*, 2017, **8**, 970.
- 24 D. Bobo, K. J. Robinson, J. Islam, K. J. Thurecht and S. R. Corrie, *Pharm. Res.*, 2016, **33**, 2373–2387.
- 25 J. C. Leroux, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2017, **56**, 15170–15171.
- 26 J. P. Martins, J. das Neves, M. de la Fuente, C. Celia, H. Florindo, N. Günday-Türelı, A. Popat, J. L. Santos, F. Sousa, R. Schmid, J. Wolfram, B. Sarmento and H. Santos, *Drug Delivery Transl. Res.*, 2020, **10**, 726–729.
- 27 D. Furman, J. Campisi, E. Verdin, P. Carrera-Bastos, S. Targ, C. Franceschi, L. Ferrucci, D. W. Gilroy, A. Fasano, G. W. Miller, A. H. Miller, A. Mantovani, C. M. Weyand, N. Barzilai, J. J. Goronzy, T. A. Rando, R. B. Effros, A. Lucia, N. Kleinstreuer and G. M. Slavich, *Nat. Med.*, 2019, **25**, 1822–1832.
- 28 B. D. Chithrani, A. A. Ghazani and W. C. Chan, *Nano Lett.*, 2006, **6**, 662–668.
- 29 W. Jiang, B. Y. S. Kim, J. T. Rutka and W. C. W. Chan, *Nat. Nanotechnol.*, 2008, **3**, 145–150.
- 30 F. Lu, S. H. Wu, Y. Hung and C. Y. Mou, *Small*, 2009, **5**, 1408–1413.
- 31 M. Bartneck, K. T. Warzecha and F. Tacke, *Hepatobiliary Surg. Nutr.*, 2014, **3**, 364–376.
- 32 S. D. Conner and S. L. Schmid, *Nature*, 2003, **422**, 37–44.
- 33 E. Blanco, H. Shen and M. Ferrari, *Nat. Biotechnol.*, 2015, **33**, 941–951.
- 34 N. Lang and A. Tuel, *Chem. Mater.*, 2004, **16**, 1961–1966.
- 35 E. Casals, T. Pfaller, A. Duschl, G. J. Oostingh and V. Puentes, *ACS Nano*, 2010, **4**, 3623–3632.
- 36 D. Oro, T. Yudina, G. Fernandez-Varo, E. Casals, V. Reichenbach, G. Casals, B. de la Presa, S. Sandalinas, S. Carvajal, V. Puentes and W. Jimenez, *J. Hepatol.*, 2016, **64**, 691–698.
- 37 M. Yan, C. Yang, B. Huang, Z. Huang, L. Huang, X. Zhang and C. Zhao, *Int. J. Nanomed.*, 2017, **12**, 7183–7195.
- 38 G. S. Hotamisligil, N. S. Shargill and B. M. Spiegelman, *Science*, 1993, **259**, 87–91.
- 39 C. Popa, M. Netea, P. Riel, J. W. Meer and A. F. Stalenhoef, *J. Lipid Res.*, 2007, **48**, 751–762.
- 40 S. M. Reilly and A. R. Saltiel, *Nat. Rev. Endocrinol.*, 2017, **13**, 633–643.
- 41 F. Lago, R. Gómez, J. J. Gómez-Reino, C. Dieguez and O. Gualillo, *Trends Biochem. Sci.*, 2009, **34**, 500–510.
- 42 J. Ribera, J. Rodríguez-Vita, B. Cordoba, I. Portolés, G. Casals, E. Casals, W. Jiménez, V. Puentes and M. Morales-Ruiz, *PLoS One*, 2019, **14**, e0218716.
- 43 R. P. Goodman, A. L. Markhard, H. Shah, R. Sharma, O. S. Skinner, C. B. Clish, A. Deik, A. Patgiri, Y. H. H. Hsu, R. Masia, H. L. Noh, S. Suk, O. Goldberger, J. N. Hirschhorn, G. Yellen, J. L. Kim and V. K. Mootha, *Nature*, 2020, **583**, 122–126.
- 44 S. M. Hirst, A. S. Karakoti, R. D. Tyler, N. Sriranganathan, S. Seal and C. M. Reilly, *Small*, 2009, **5**, 2848–2856.
- 45 Z. Wang, X. Shen, X. Gao and Y. Zhao, *Nanoscale*, 2019, **11**, 13289–13299.
- 46 J. K. Innes and P. C. Calder, *Prostaglandins, Leukotrienes Essent. Fatty Acids*, 2018, **132**, 41–48.
- 47 C. Ma, A. H. Kesarwala, T. Eggert, J. Medina-Echeverz, D. E. Kleiner, P. Jin, D. F. Stroncek, M. Terabe, V. Kapoor, M. ElGindi, M. Han, A. M. Thornton, H. Zhang, M. Egger, J. Luo, D. W. Felsher, D. W. McVicar, A. Weber, M. Heikenwalder and T. F. Greten, *Nature*, 2016, **531**, 253–257.
- 48 S. Carvajal, M. Perramón, G. Casals, D. Oró, J. Ribera, M. Morales-Ruiz, E. Casals, P. Casado, P. Melgar-Lesmes, G. Fernández-Varo, P. Cutillas, V. Puentes and W. Jiménez, *Int. J. Mol. Sci.*, 2019, **20**, 5959.

- 49 G. Fernández-Varo, M. Perramón, S. Carvajal, D. Oró, E. Casals, L. Boix, L. Oller, L. Macías-Muñoz, S. Marfà, G. Casals, M. Morales-Ruiz, P. Casado, P. R. Cutillas, J. Bruix, M. Navasa, J. Fuster, J. C. Garcia-Valdecasas, M. C. Pavel, V. Puentes and W. Jiménez, *Hepatology*, 2020, **72**, 1267–1282.
- 50 L. Belloni, S. Di Cocco, F. Guerrieri, A. D. G. Nunn, S. Piconese, D. Salerno, B. Testoni, C. Pulito, F. Mori, M. Pallocca, A. Sacconi, E. Vivoli, F. Marra, S. Strano, G. Blandino, M. Levrero and N. Pediconi, *Sci. Rep.*, 2018, **8**, 13638–13638.
- 51 M. Grohmann, F. Wiede, G. T. Dodd, E. N. Gurzov, G. J. Ooi, T. Butt, A. A. Rasmiena, S. Kaur, T. Gulati, P. K. Goh, A. E. Treloar, S. Archer, W. A. Brown, M. Muller, M. J. Watt, O. Ohara, C. A. McLean and T. Tiganis, *Cell*, 2018, **175**, 1289–1306.
- 52 S. Carvajal, M. Perramón, D. Oró, E. Casals, G. Fernández-Varo, G. Casals, M. Parra, B. González de la Presa, J. Ribera, Ó. Pastor, M. Morales-Ruiz, V. Puentes and W. Jiménez, *Sci. Rep.*, 2019, **9**, 12848.
- 53 K. M. Mueller, K. Hartmann, D. Kaltenecker, S. Vettorazzi, M. Bauer, L. Mauser, S. Amann, S. Jall, K. Fischer, H. Esterbauer, T. D. Müller, M. H. Tschöp, C. Magnes, J. Haybaeck, T. Scherer, N. Bordag, J. P. Tuckermann and R. Moriggl, *Diabetes*, 2017, **66**, 272–286.
- 54 J. St-Pierre, S. Drori, M. Uldry, J. M. Silvaggi, J. Rhee, S. Jäger, C. Handschin, K. Zheng, J. Lin, W. Yang, D. K. Simon, R. Bachoo and B. M. Spiegelman, *Cell*, 2006, **127**, 397–408.
- 55 A. Barbu, O. A. Hamad, L. Lind, K. N. Ekdahl and B. Nilsson, *Mol. Immunol.*, 2015, **67**, 101–107.
- 56 D. W. Lamming and D. M. Sabatini, *Cell Metab.*, 2013, **18**, 465–469.

Supporting Information

Mesoporous silica coated CeO₂ nanozymes with combined lipid-lowering and antioxidant activity induce long-term improvement of the metabolic profile in obese Zucker rats

Marina Parra-Robert,^{‡a} Muling Zeng,^{‡b} Ying Shu,^b Guillermo Fernandez-Varo,^{a,c} Meritxell Perramon,^a Diti Desai,^d Junhao Chen,^b Dongdong Guo,^b Xu Zhang,^b Manuel Morales-Ruiz,^{a,c,e} Jessica M. Rosenholm,^{*d} Wladimiro Jiménez,^{a,c} Victor Puentes,^{*f} Eudald Casals,^{*b} Gregori Casals^{*a,e}

^a Service of Biochemistry and Molecular Genetics, Hospital Clinic Universitari, Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBERehd), Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Carrer de Villarroel, 170, 08036 Barcelona, Spain

^b School of Biotechnology and Health Sciences, Wuyi University, 99 Yingbing Middle Rd., Jiangmen, 529020, China

^c Department of Biomedicine, University of Barcelona, 08905 Barcelona, Spain

^d Pharmaceutical Sciences Laboratory, Faculty of Science and Engineering, Åbo Akademi University, Artillerigatan 6A, 20500, Turku, Finland

^e Working group for the biochemical assessment of hepatic disease-SEQCML, 08036 Barcelona, Spain

^f Vall d'Hebron Research Institute (VHIR), 08035, Barcelona, Spain. Institut Català de Nanociència i Nanotecnologia (ICN2), CSIC, The Barcelona Institute of Science and Technology (BIST), Campus UAB s/n, Bellaterra, 08193, Barcelona, Spain. Institució Catalana de Recerca i Estudis Avançats (ICREA), Passeig de Lluís Companys, 23, 08010, Barcelona, Spain

[‡] Both authors contributed equally to this study.

^{*} Corresponding authors e-mail:

Jessica M. Rosenholm: jerosenh@abo.fi

Victor Puentes: victor.puentes@icn.cat

Eudald Casals: wyuchemecm@126.com

Gregori Casals: casals@clinic.cat

Table of Contents.

Supporting Figures	3
<u>Figure S1.</u> TEM images, size distribution and BET analysis of the CeO ₂ NPs cores and CeO ₂ @mSiO ₂ nanocomposites.....	3
<u>Figure S2.</u> Additional characterization: XRD UV-VIS spectra and ζ-Potential.....	4
<u>Figure S3.</u> CeO ₂ @mSiO ₂ and CeO ₂ NPs cell internalization.....	5
<u>Figure S4.</u> Effect of nanomaterials on fatty liver accumulation.....	6
Supporting Tables	8
<u>Table S1.</u> Effects of CeO ₂ NPs and CeO ₂ @mSiO ₂ on body weight, liver-body weight ratio and serum biochemical parameters, lipid profile and adipokines in obese Zucker rats.....	8
<u>Table S2.</u> Total fatty acid serum levels in lean Zucker rats receiving vehicle and obese Zucker rats receiving vehicle and treated with CeO ₂ NPs and CeO ₂ @mSiO ₂	9
<u>Table S3.</u> Differentially expressed genes in the liver of obese Zucker rats treated with vehicle compared to lean vehicle.....	10
<u>Table S4.</u> Differentially expressed genes in the liver of obese Zucker rats treated with CeO ₂ NPs compared with obese vehicle group.....	11
<u>Table S5.</u> Differentially expressed genes in the liver of obese Zucker rats treated with CeO ₂ @mSiO ₂ compared to obese vehicle group.....	11
<u>Table S6.</u> Messenger expression of genes involved in adipokine signalling, carbohydrate metabolism, insulin signalling, lipid metabolism and transport, oxidative phosphorylation, inflammatory response and apoptosis in the liver of obese Zucker rats receiving vehicle and treated with CeO ₂ NPs and CeO ₂ @mSiO ₂	12
<u>Table S7.</u> Total fatty acid hepatic levels in lean Zucker rats receiving vehicle and obese Zucker rats receiving vehicle or treated with CeO ₂ NPs or CeO ₂ @mSiO ₂	14
<u>Table S8.</u> Differentially expressed genes in the adipose tissue of obese Zucker rats treated with vehicle compared to lean vehicle group.....	15
<u>Table S9.</u> Differentially expressed genes in the adipose tissue of obese Zucker rats treated with CeO ₂ NPs compared with obese vehicle group.....	16
<u>Table S10.</u> Differentially expressed genes in the adipose tissue of obese Zucker rats treated with CeO ₂ @mSiO ₂ compared to obese vehicle group.....	16
<u>Table S11.</u> Adipose tissue messenger expression of obesity-related genes in obese Zucker rats.....	17
Supporting Methods	18

Supporting Figures

Figure S1. TEM images, size distribution and BET analysis of the CeO₂NPs cores and CeO₂@mSiO₂ nanocomposites.

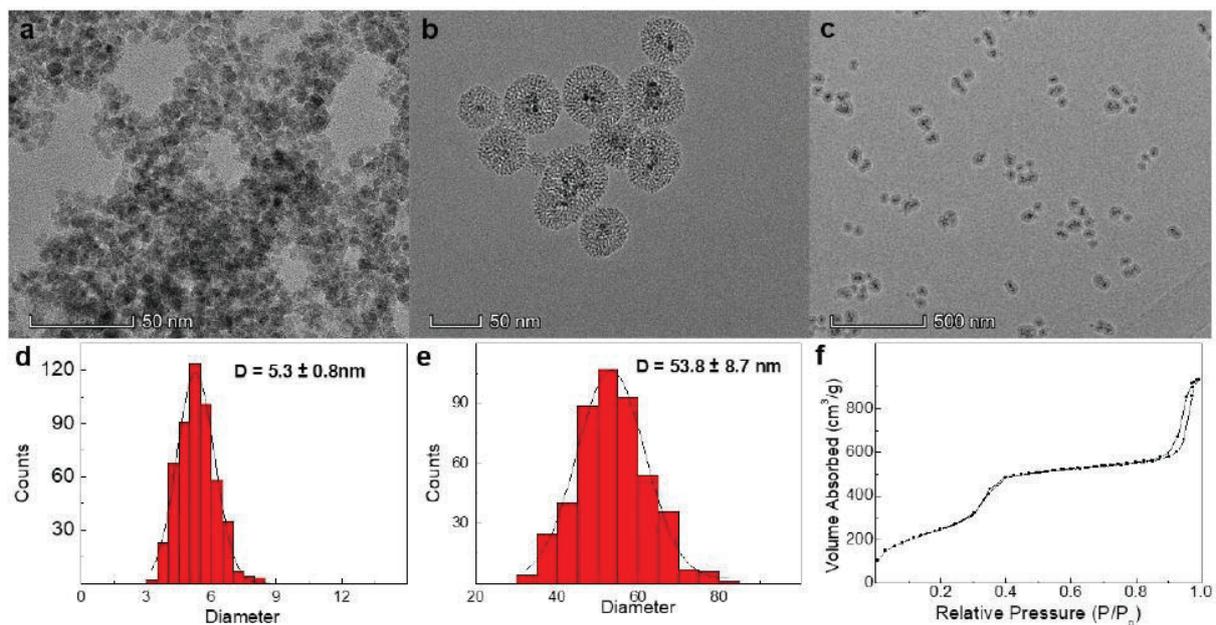


Figure S1. (a-c) Additional TEM images of the CeO₂NPs (a) and CeO₂@mSiO₂ at different magnifications (b, c). Images are also taken from different synthesis, and at different time points of storage, showing the reproducibility and stability of the process. (d-e) The CeO₂NPs and CeO₂@mSiO₂ nanocomposites size of typical synthesis, calculated by image analysis based on transmission electron microscopy (TEM) images and counting more than 500 particles. f) CeO₂@mSiO₂ isotherms exhibiting the characteristic IV behavior of a well-developed mesoporous structure. The Brunauer–Emmett–Teller (BET) surface area was calculated as 905 m²/g and 1.4 cm³/g and a narrow pore size distribution of 4.0 nm was determined using the Barrett–Joiner–Halenda (BJH) method.

Figure S2. Additional characterization: XRD, UV-VIS spectra and ζ -Potential.

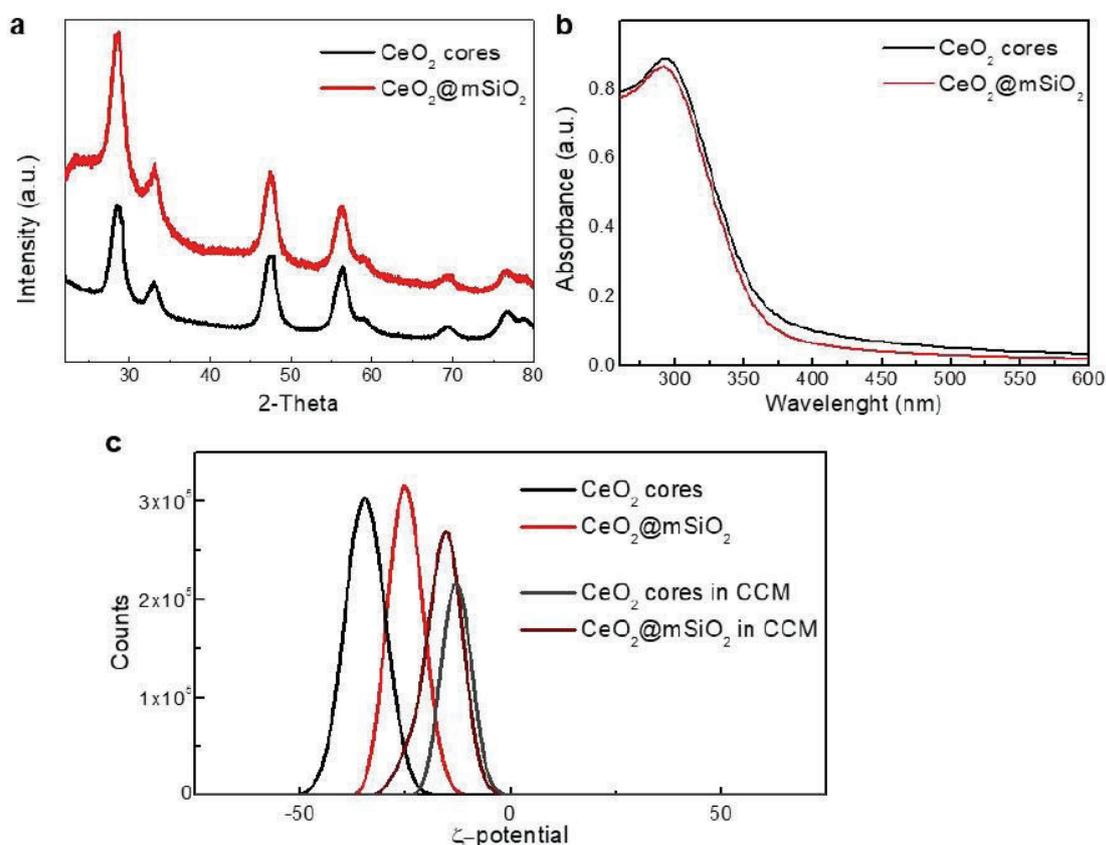


Figure S2. (a) XRD spectra of the CeO₂NP cores (black line) and the CeO₂@mSiO₂ core-shell (red line) showing the maintenance of the crystalline structure of the CeO₂ cores inside the shell. **(b)** UV-VIS spectra of the CeO₂NP cores and the CeO₂@mSiO₂ core-shell, showing the successful coating of all CeO₂NPs without inducing aggregation or degradation of the NPs. The spectra of the CeO₂@mSiO₂ was recorded without further dilution, while the spectra of the CeO₂NPs was recorded taking into account the dilution factor of the CeO₂ cores employed in the synthesis. A small blue shift and varying intensity can be observed in the spectra, attributed to the modification of the refractive index of the environment surrounding the CeO₂ cores after mSiO₂ encapsulation. Furthermore, for both nanomaterials, ICP-MS indicated a full conversion of Ce to CeO₂NPs, hence the final CeO₂ concentration was determined as 1.2 mg/mL (3.5×10^{15} CeO₂NPs/mL) in the case of CeO₂@mSiO₂ and 1.72 mg/mL (3.5×10^{15} CeO₂NPs/mL) in the case of CeO₂NPs. The values of NP/mL are calculated taking the mean diameter of the CeO₂ cores as 5 nm. **(c)** ζ -potential of the CeO₂NP cores (black line, -35.5 mV) and CeO₂@mSiO₂ (red line, -24.9 mV) after synthesis. After incubation 24 hours in cell culture medium (DMEM + 10%FBS) and purification, CeO₂ cores ζ -potential was -12.8 mV (grey line) and CeO₂@mSiO₂ was -16.3 mV (dark red line). Both nanomaterials reached similar values as the proteins in the cell culture medium (c.a. -10 mV) which is consistent with the formation of a stable (hard) protein corona.

Figure S3. $\text{CeO}_2@m\text{SiO}_2$ and CeO_2NPs cell internalization.

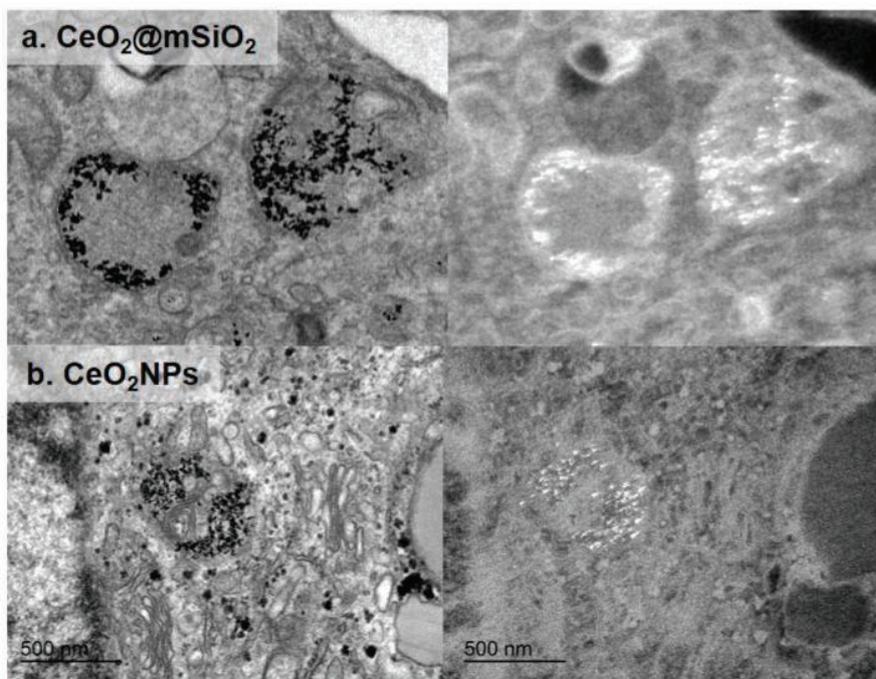


Figure S3. Bright and dark-field additional TEM images of **(a)** $\text{CeO}_2@m\text{SiO}_2$ and **(b)** CeO_2NPs uptake by HepG2 cells. The crystallinity of the CeO_2 makes them easy to distinguish from the amorphous cellular structures under dark-field.

Figure S4. Effect of nanomaterials on fatty liver accumulation.

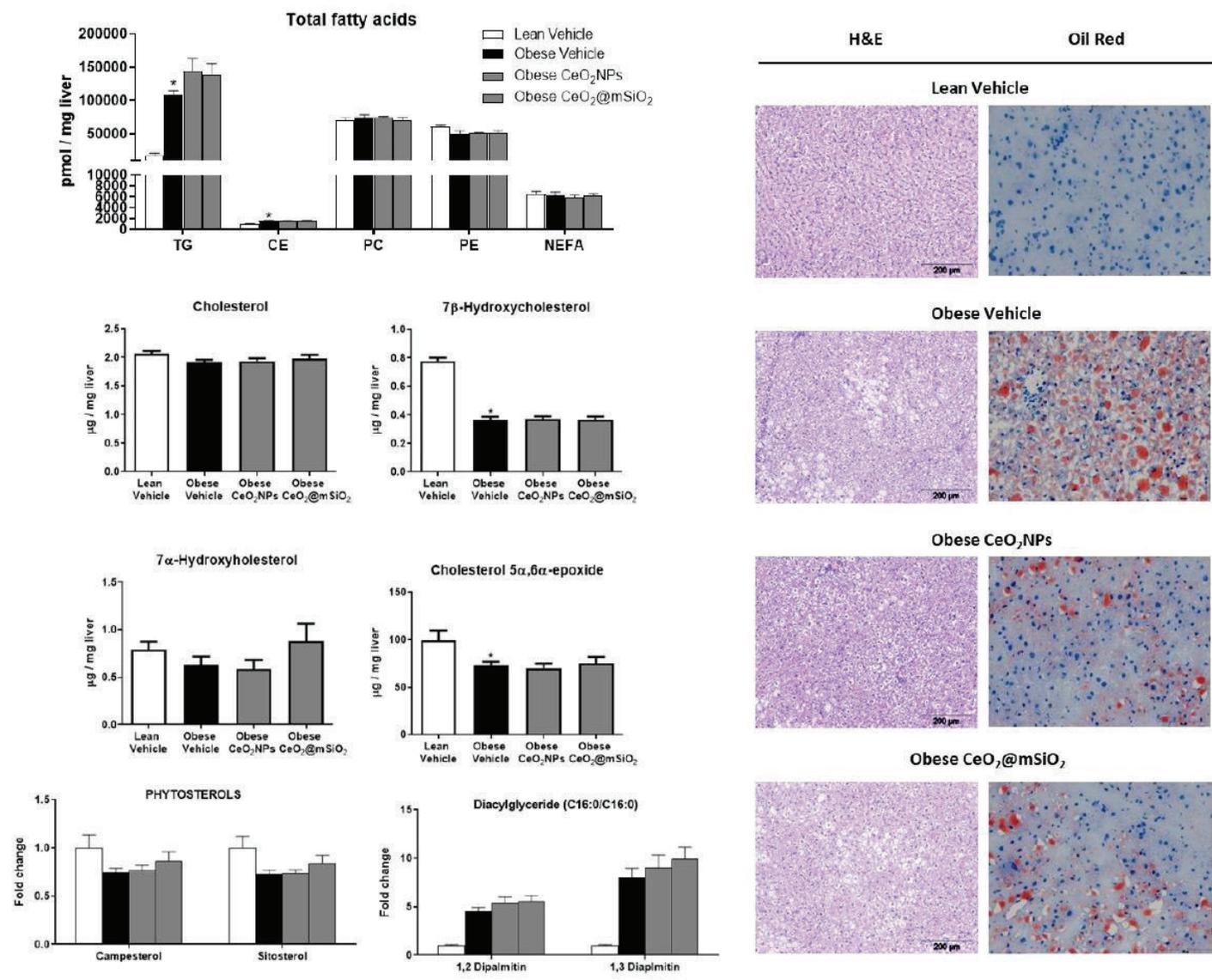


Figure S4. (a) Effect of nanomaterials on lipids measured by gas chromatography-mass spectrometry. **(b)** Haematoxylin-eosin (H&E) and Oil-Red staining of representative liver sections from lean rats receiving vehicle and obese rats receiving vehicle or treated with CeO₂NPs or CeO₂@mSiO₂.

Supporting Tables.

Table S1. Effects of CeO₂NPs and CeO₂@mSiO₂ on body weight, liver-body weight ratio and serum biochemical parameters, lipid profile and adipokines in obese Zucker rats.

	Lean rats		Obese rats	
	Vehicle (n=10)	Vehicle (n=10)	CeO ₂ NPs (n=10)	CeO ₂ @mSiO ₂ (n=10)
<u>Body and liver weight</u>				
Body weight (g)	344 ± 6	466 ± 14*	441 ± 13*	469 ± 16*
Liver weight (g)	14.7 ± 0.5	22.7 ± 1.1*	21.2 ± 1.0*	23.0 ± 1.4*
Liver-body weight ratio (%)	4.30 ± 0.13	4.88 ± 0.13	4.81 ± 0.16	4.91 ± 0.24
<u>Glucose and insulin resistance</u>				
Glucose (mg/dL)	122.4 ± 5.3	114.9 ± 7.6	112.3 ± 6.5	118.4 ± 4.4
Insulin (pg/mL)	822 ± 108	2677 ± 252*	2740 ± 360*	2687 ± 181*
HOMA-IR	75 ± 13	223 ± 30*	219 ± 31*	213 ± 14*
<u>Serum lipids</u>				
Triglycerides (mg/dL)	135.8 ± 9.4	462.8 ± 51.9*	358.2 ± 31.3**	285.1 ± 31.2**
Total cholesterol (mg/dL)	119.3 ± 3.4	244.6 ± 6.0*	236.2 ± 8.6*	235.7 ± 13.7*
LDL-cholesterol (mg/dL)	19.8 ± 0.7	30.3 ± 4.5*	20.5 ± 0.9#	17.6 ± 1.4#
HDL-cholesterol (mg/dL)	83.0 ± 3.3	175.0 ± 3.1*	170.5 ± 7.3*	174.2 ± 8.7*
<u>Serum adipokines</u>				
IL-1β (pg/mL)	7.2 ± 0.7	52.1 ± 10.7*	47.0 ± 6.0*	52.2 ± 12.5*
MCP-1 (pg/mL)	328 ± 16	462 ± 33*	408 ± 22	396 ± 46
TNF-α (pg/mL)	1.59 ± 0.17	2.31 ± 0.32	1.81 ± 0.34	1.46 ± 0.25
Leptin (pg/mL)	2493 ± 267	7091 ± 446*	8358 ± 497*	7272 ± 659*
<u>Renal and liver function</u>				
Creatinine (mg/dL)	0.35 ± 0.02	0.48 ± 0.02*	0.44 ± 0.01*	0.44 ± 0.03*
Sodium (mmol/L)	143.4 ± 0.5	145.9 ± 0.6*	144.2 ± 0.5#	143.6 ± 0.5#
Potassium (mmol/L)	4.6 ± 0.2	4.7 ± 0.1	4.9 ± 0.1	4.7 ± 0.2
AST (U/L)	67.8 ± 3.8	96.9 ± 8.1*	117.5 ± 10.1*	104.0 ± 7.7*
ALT (U/L)	64.8 ± 2.6	97.9 ± 6.9*	97.9 ± 9.0*	101.8 ± 5.8*
Total proteins (g/L)	63.1 ± 0.6	74.8 ± 0.7*	73.7 ± 0.8*	73.8 ± 1.1*
Albumin (g/L)	36.0 ± 0.4	40.9 ± 0.4*	40.3 ± 0.3*	40.7 ± 0.6*

Data expressed as mean ± SEM. *p <0.05 compared with lean Zucker rats (Lean Vehicle). #p <0.05 compared with obese Zucker rats receiving vehicle (Obese Vehicle). One-way ANOVA with the Newman-Keuls post hoc test. HOMA-IR calculated by applying the following formula: glucose (mmol/L) x insulin (mIU/L) / 22.5.

Table S2. Total fatty acid serum levels in lean Zucker rats receiving vehicle and obese Zucker rats receiving vehicle and treated with CeO₂NPs and CeO₂@mSiO₂.

Fatty acids (nmol/mL)	Lean Zucker rats		Obese Zucker rats		
	Vehicle (n=10)	Vehicle (n=10)	CeO ₂ NPs (n=10)	CeO ₂ @mSiO ₂ (n=8)	
<i>C12:0</i>	22.01 ± 8.36	34.75 ± 10.64	18.46 ± 3.31	27.99 ± 10.70	
<i>C14:0</i>	100.7 ± 12.80	339.0 ± 31.06*	306.5 ± 25.55*	259.1 ± 30.95*	
<i>C14:1</i>	6.31 ± 1.19	34.86 ± 3.73*	37.18 ± 3.88*	25.50 ± 2.95*†	
<i>C15:0</i>	31.50 ± 1.56	38.61 ± 4.98	32.70 ± 2.77	27.78 ± 2.45	
<i>C16:0</i>	2737 ± 133.6	6989 ± 441.1*	6176 ± 385.2*	5342 ± 311.9*†	
<i>C16:1</i>	340.5 ± 35.35	1802 ± 143.0*	1651 ± 103.6*	1291 ± 104.8*†	
<i>C17:0</i>	39.35 ± 3.36	60.97 ± 10.87	46.64 ± 4.90	42.32 ± 6.24	
<i>C18:0</i>	1089 ± 57.39	3631 ± 258.1*	3075 ± 100.3*†	2989 ± 171.8*†	
<i>C18:1n9c</i>	1035 ± 72.31	3251 ± 230.9*	2770 ± 212.8*	2279 ± 189.2*†	
<i>C18:1n9t</i>	532.5 ± 33.16	1208 ± 128.1*	929.1 ± 68.33*†	827.8 ± 68.59*†	
<i>C18:2n6c</i>	2663 ± 115.7	2970 ± 206.1	2807 ± 136.0	2409 ± 189.7	
<i>C18:2n6t</i>	244.1 ± 16.50	684.6 ± 42.48*	582.5 ± 47.34*	483.1 ± 41.56*†	
<i>C18:3n6</i>	31.27 ± 2.14	99.67 ± 8.86*	136.1 ± 18.78*†	84.52 ± 8.98*	
<i>C18:3n3</i>	127.1 ± 8.23	284.5 ± 20.76*	243.7 ± 21.59*	199.4 ± 18.37*†	
<i>C20:0</i>	13.60 ± 0.70	22.72 ± 1.79*	20.72 ± 1.71*	18.60 ± 1.26*	
<i>C20:1n9</i>	51.94 ± 21.03	44.82 ± 4.93	56.13 ± 11.87	32.59 ± 4.91	
<i>C20:2</i>	37.67 ± 3.16	54.98 ± 4.55	44.21 ± 6.17	40.87 ± 4.94	
<i>C20:3n6</i>	76.26 ± 6.20	590.9 ± 44.43*	474.8 ± 31.61*†	446.6 ± 29.37*†	
<i>C20:4n6</i>	3612 ± 173.1	7470 ± 252.2*	6602 ± 175.7*	6901 ± 525.3*	
<i>C20:5n3</i>	59.44 ± 4.38	230.0 ± 21.58*	246.0 ± 29.27*	174.8 ± 19.06*	
<i>C21:0</i>	3.48 ± 0.16	4.01 ± 0.32	3.64 ± 0.24	3.42 ± 0.20	
<i>C22:0</i>	24.91 ± 0.96	47.78 ± 2.66*	41.66 ± 1.59*	43.87 ± 3.13*	
<i>C22:6n3</i>	536.5 ± 36.95	1366 ± 63.65*	1091 ± 73.29*†	1071 ± 69.64*†	
<i>C23:0</i>	19.36 ± 0.98	31.66 ± 2.06*	25.96 ± 1.01*†	26.62 ± 1.97*†	
<i>C24:0</i>	56.12 ± 3.10	88.64 ± 6.06*	75.46 ± 3.21*	78.27 ± 5.58*	
<i>C24:1n9</i>	63.46 ± 4.77	121.7 ± 7.63*	94.28 ± 6.74*	113.6 ± 13.54*	
<i>Unsaturated/Sat FA</i>	2.279 ± 0.060	1.819 ± 0.056*	1.806 ± 0.123*	1.858 ± 0.045*	
<i>n6/n3</i>	9.315 ± 0.343	6.325 ± 0.183*	6.671 ± 0.380*	7.189 ± 0.329*	
<i>C18:0/C16:0</i>	0.400 ± 0.017	0.522 ± 0.019*	0.499 ± 0.025*	0.564 ± 0.024*	
<i>C16:1/C16:0</i>	0.122 ± 0.009	0.256 ± 0.008*	0.268 ± 0.011*	0.240 ± 0.009*	
<i>C16:0/C18:2n6c</i>	1.030 ± 0.031	2.378 ± 0.091*	2.198 ± 0.081*	2.253 ± 0.088*	
<i>C18:1n9c/C18:0</i>	0.9591 ± 0.062	0.9043 ± 0.049	0.9127 ± 0.062	0.7711 ± 0.064	
<i>C18:3n3/C18:2n6c</i>	0.047 ± 0.002	0.093 ± 0.003*	0.089 ± 0.003*	0.083 ± 0.003*†	
<i>C18:3n6/C18:2n6c</i>	0.012 ± 0.001	0.035 ± 0.003*	0.044 ± 0.005*	0.035 ± 0.002*	
<i>C20:4n6/C20:3n6</i>	49.08 ± 2.858	12.33 ± 0.715*	13.95 ± 0.704*	16.00 ± 1.775*	
<i>C20:4n6/C18:3n6</i>	119.4 ± 8.354	78.56 ± 6.397*	49.11 ± 8.143*†	87.75 ± 9.962*	
<i>C20:4n6/C18:2n6c</i>	1.376 ± 0.079	2.619 ± 0.181*	2.353 ± 0.098*	3.025 ± 0.379*	
<i>C20:5n3/C18:3n3</i>	0.479 ± 0.038	0.802 ± 0.044*	0.868 ± 0.135*	0.906 ± 0.094*	
<i>C20:2n6/C18:2n6c</i>	0.014 ± 0.001	0.018 ± 0.001	0.012 ± 0.002†	0.017 ± 0.001	
<i>Peroxidability Index (%)</i>	167.4 ± 5.196	154.5 ± 5.392	151.9 ± 4.352	166.0 ± 7.244	
<i>Saturated FA</i>	4137 ± 199.4	11251 ± 701.2*	9156 ± 732.1*†	8858 ± 495.9*†	
<i>Unsaturated FA</i>	9364 ± 361.0	20206 ± 922.7*	15955 ± 1128*†	17082 ± 471.9*†	
<i>Total FA</i>	13501 ± 536.4	31457 ± 1567*	25111 ± 1727*†	25244 ± 1270*†	

Mean ± SEM. *p<0.05 compared with control group (lean Zucker rats Vehicle); †p<0.05 compared with vehicle group (obese Zucker rats Vehicle). One-way ANOVA with the Newman-Keuls post hoc test.

Table S3. Differentially expressed genes in the liver of obese Zucker rats treated with vehicle compared to lean vehicle group.

Genes	Fold regulation	P value
Up-regulated		
<i>Slc2a4</i>	12.18	0.013
<i>Cd36</i>	8.42	0.035
<i>Elovl6</i>	6.14	0.000
<i>G6pd</i>	3.92	0.039
<i>Apoa1</i>	3.75	0.003
<i>Pdk4</i>	3.73	0.034
<i>Fasn</i>	3.47	0.017
<i>Srebf1</i>	3.40	0.046
<i>Acly</i>	2.74	0.037
<i>Dgat2</i>	2.68	0.005
<i>Scd1</i>	2.55	0.029
<i>Pklr</i>	2.38	0.013
<i>Fas</i>	2.36	0.040
<i>Akt1</i>	2.10	0.000
<i>Mtor</i>	2.10	0.000
<i>Stat3</i>	1.89	0.016
<i>Pck2</i>	1.74	0.048
<i>Ndufb6</i>	1.58	0.021
Down-regulated		
<i>Nox4</i>	-26.89	0.000
<i>Acsm3</i>	-2.26	0.040
<i>Gk</i>	-1.47	0.014

Fold regulation. Obese Zucker rats treated with vehicle compared with lean rats treated with vehicle (unpaired Student's t-test).

Table S4. Differentially expressed genes in the liver of obese Zucker rats treated with CeO₂NPs compared with obese vehicle group.

Genes	Fold regulation	P value
<i>Slc2a4</i>	-5.84	0.028
<i>Tnf</i>	-3.52	0.039
<i>Abcg1</i>	-1.94	0.032
<i>Stat3</i>	-1.80	0.021
<i>Pik3ca</i>	-1.74	0.015
<i>Akt1</i>	-1.68	0.002
<i>Mtor</i>	-1.56	0.033

Fold regulation. Obese Zucker rats treated with CeO₂NPs compared with obese rats treated with vehicle (unpaired Student's t-test).

Table S5. Differentially expressed genes in the liver of obese Zucker rats treated with CeO₂@mSiO₂ compared to obese vehicle group.

Genes	Fold regulation	P value
<i>Slc2a4</i>	-6.84	0.021
<i>Mtor</i>	-1.93	0.006
<i>Apoa1</i>	-1.70	0.032
<i>Stat3</i>	-1.70	0.030
<i>Mapk1</i>	-1.67	0.043
<i>Abca1</i>	-1.65	0.036
<i>Akt1</i>	-1.61	0.000
<i>Abcg1</i>	-1.60	0.048
<i>Insr</i>	-1.56	0.005
<i>Lpl</i>	-1.52	0.016
<i>Ndufb6</i>	-1.52	0.015
<i>Pik3r1</i>	-1.47	0.023
<i>Gsk3b</i>	-1.36	0.033

Fold regulation. Obese Zucker rats treated with CeO₂@mSiO₂ compared with obese rats treated with vehicle (unpaired Student's t-test).

Table S6. Messenger expression of genes involved in adipokine signalling, carbohydrate metabolism, insulin signalling, lipid metabolism and transport, oxidative phosphorylation, inflammatory response and apoptosis in the liver of obese Zucker rats receiving vehicle and treated with CeO₂NPs and CeO₂@mSiO₂.

Genes	Obese rats Vehicle (n=4)	Obese rats CeO ₂ NPs (n=4)	Obese rats CeO ₂ @mSiO ₂ (n=4)
Adipokine signaling, inflammation and apoptosis			
<i>Akt1</i>	2.10*	1.25 [#]	1.31**
<i>Fas</i>	2.36*	1.65	1.44
<i>Mapk1</i>	1.34	-1.04	-1.25 [#]
<i>Mtor</i>	2.10*	1.35 [#]	1.09 [#]
<i>Nox4</i>	-26.89*	-27.61*	-32.22*
<i>Pik3ca</i>	1.41	-1.24 [#]	-1.01
<i>Stat3</i>	1.89*	1.05 [#]	1.11 [#]
<i>Tnf</i>	2.22	-1.59 [#]	-1.23
<i>Xbp1</i>	-1.07	-1.21	-1.58*
Carbohydrate metabolism			
<i>Acly</i>	2.74*	2.60*	2.69*
<i>G6pd</i>	3.92*	5.73*	4.65*
<i>Gsk3b</i>	1.58	1.32	1.16 ^{#†}
<i>Mlxipl</i>	-1.02	-1.13	-1.50*
<i>Pck2</i>	1.74*	1.26	1.00
<i>Pdk4</i>	3.73*	2.94	1.90*
<i>Pklr</i>	2.38*	1.74*	1.68*
<i>Rbp4</i>	1.09	1.19	-1.35 [†]
Insulin signaling			
<i>Igf1</i>	-1.40	-1.36	-1.94* [†]
<i>Igfbp1</i>	-1.87	-1.49*	-2.39* [†]
<i>Insr</i>	1.24	1.02	-1.26 [#]
<i>Irs1</i>	-1.09	-1.38	-1.61*
<i>Pik3r1</i>	1.30	1.43	-1.13 [#]
<i>Scl2a4</i>	12.18*	2.09 [#]	1.78 [#]
Lipid metabolism and transport			
<i>Abca1</i>	1.13	-1.27	-1.46* [#]
<i>Abcg1</i>	1.06	-1.83 [#]	-1.51 [#]
<i>Acaca</i>	1.75	2.25*	1.87*
<i>Acadl</i>	1.46	1.44*	1.48*
<i>Acsf5</i>	2.21	3.12*	1.80* [†]
<i>Acsm3</i>	-2.26*	-1.42	-3.39* [†]
<i>Apoa1</i>	3.75*	3.17*	2.20* [#]
<i>Cd36</i>	8.42*	9.40*	7.31*
<i>Cyp2e1</i>	-1.42	-1.37	-2.07 [†]
<i>Dgat2</i>	2.68*	2.36*	1.75*
<i>Elovl5</i>	1.60	1.47*	1.29
<i>Elovl6</i>	6.14*	4.68*	6.02*
<i>Fabp5</i>	2.71	3.18*	2.28
<i>Fasn</i>	3.47*	4.24*	2.95*
<i>Foxa2</i>	2.36	2.00*	1.21 [†]
<i>Gk</i>	-1.47*	-1.82*	-1.51*
<i>Hmgcr</i>	-1.02	1.19	-1.34* [†]
<i>Hsd17b13</i>	1.35	1.38*	1.14
<i>Lpl</i>	1.73	1.34	1.14 [#]
<i>Nr1h3</i>	1.65	1.16	-1.15 [†]

<i>Nr1h4</i>	1.16	1.24	-1.31* [†]
<i>Ppa1</i>	1.19	1.41*	1.16
<i>Scd1</i>	2.55*	2.68*	2.98*
<i>Slc27a5</i>	1.03	1.12	-1.47 [†]
<i>Srebf1</i>	3.40*	2.25	1.93
<hr/>			
<i>Oxidative phosphorylation</i>			
<i>Atp5c1</i>	1.24	1.71*	1.06
<i>Ndufb6</i>	1.58*	1.22	1.04 [#]

Fold regulation compared with control group (lean Zucker rats). *p <0.05 compared with control; #p <0.05 compared with obese Zucker rats treated with vehicle. [†]p <0.05 compared with obese Zucker rats treated with CeO₂NPs. Biological cut-off was set to a fold regulation of ± 1 (unpaired Student's t-test).

Table S7. Total fatty acid hepatic levels in lean Zucker rats receiving vehicle and obese Zucker rats receiving vehicle or treated with CeO₂NPs or CeO₂@mSiO₂.

Fatty acids (pmol/mg liver)	Lean Zucker rats		Obese Zucker rats	
	Vehicle (n=10)	Vehicle (n=10)	CeO ₂ NPs (n=10)	CeO ₂ @mSiO ₂ (n=8)
<i>C12:0</i>	40.80 ± 3.586	229.7 ± 30.02*	250.0 ± 34.31*	222.9 ± 18.01*
<i>C14:0</i>	645.9 ± 22.66	6803 ± 1019*	7195 ± 1199*	7099 ± 973*
<i>C14:1</i>	54.10 ± 5.034	930.0 ± 150.3*	1092 ± 223.2*	1016 ± 158.8*
<i>C15:0</i>	193.5 ± 13.76	374.8 ± 42.33*	304.8 ± 22.25*	380.2 ± 32.92*
<i>C16:0</i>	27977 ± 436.0	151405 ± 25810*	150768 ± 23230*	149321 ± 19049*
<i>C16:1</i>	2565 ± 148.5	34454 ± 5376*	34684 ± 5647*	34764 ± 4578*
<i>C17:0</i>	389.2 ± 32.09	496.5 ± 53.97	389.8 ± 19.55	489.0 ± 21.69
<i>C17:1</i>	99.40 ± 5.883	586.9 ± 95.29*	422.6 ± 33.33*	559.3 ± 64.14*
<i>C18:0</i>	16143 ± 397.9	24863 ± 1123*	23883 ± 1023*	25461 ± 878.9*
<i>C18:1n9c</i>	5147 ± 237.4	65128 ± 12262*	56446 ± 8658*	59950 ± 8104*
<i>C18:1n9t</i>	5077 ± 255.1	15275 ± 2226*	13371 ± 1548*	12217 ± 1207*
<i>C18:2n6c</i>	13861 ± 579.2	14918 ± 1118	16729 ± 1683	16681 ± 1605
<i>C18:2n6t</i>	1342 ± 63.79	15703 ± 3066*	13448 ± 2071*	14380 ± 2012*
<i>C18:3n6</i>	178.0 ± 10.53	608.9 ± 59.04*	769.5 ± 122.5*	781.2 ± 129.4*
<i>C18:3n3</i>	597.4 ± 26.77	5968 ± 1145*	5172 ± 792.9*	5442 ± 747.1*
<i>C20:0</i>	75.20 ± 3.392	92.67 ± 5.231*	96.70 ± 7.364*	94.11 ± 3.011*
<i>C20:1n9</i>	112.5 ± 4.949	252.2 ± 25.95*	244.6 ± 27.68*	264.9 ± 24.31*
<i>C20:2</i>	366.0 ± 25.35	214.4 ± 7.941*	224.1 ± 7.078*	230.0 ± 11.84*
<i>C20:3n6</i>	899.0 ± 97.24	2035 ± 93.43*	2346 ± 127.1*	2429 ± 201.3*
<i>C20:4n6</i>	19738 ± 962.2	18293 ± 909.4	18064 ± 681.6	19338 ± 547.4
<i>C20:5n3</i>	245.6 ± 40.71	555.2 ± 37.51*	687.1 ± 69.45*	675.0 ± 75.61*
<i>C21:0</i>	8.300 ± 0.2603	8.100 ± 0.4583	8.300 ± 0.6333	8.300 ± 0.3350
<i>C22:0</i>	137.1 ± 7.182	151.1 ± 6.894	141.1 ± 3.433	151.6 ± 7.022
<i>C22:6n3</i>	6343 ± 219.5	5969 ± 283.6	5713 ± 321.8	6198 ± 322.2
<i>C23:0</i>	110.0 ± 4.323	91.56 ± 3.481*	84.44 ± 1.864*	97.60 ± 6.797
<i>C24:0</i>	334.1 ± 19.74	292.8 ± 8.593	300.2 ± 8.701	327.5 ± 16.85
<i>C24:1n9</i>	194.2 ± 12.66	203.6 ± 10.93	177.0 ± 6.962	199.3 ± 10.71
Total FA	129956 ± 2479	387684 ± 50942*	373128 ± 46184*	381830 ± 37490*
Saturated FA	46250 ± 673.9	184770 ± 27941*	183402 ± 25243*	183571 ± 20431*
Unsaturated FA	82408 ± 2274	202914 ± 23131*	189726 ± 21283*	198259 ± 17297*

Mean ± SEM. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001 compared with control group (Lean Zucker rats Vehicle); †p<0.05, ††p<0.01 compared with vehicle group (Obese Zucker rats Vehicle). One-way ANOVA with the Newman-Keuls post hoc test.

Table S8. Differentially expressed genes in the adipose tissue of obese Zucker rats treated with vehicle compared to lean vehicle group.

Genes	Fold regulation	P value
<i>Up-regulated</i>		
<i>Il6</i>	9.49	0.019
<i>Ramp3</i>	9.08	0.006
<i>Cnr1</i>	8.31	0.000
<i>Gcgr</i>	6.69	0.004
<i>Drd1</i>	5.77	0.028
<i>Nmur1</i>	3.49	0.026
<i>Tnf</i>	3.45	0.004
<i>Cd68</i>	3.35	0.026
<i>Lep</i>	2.78	0.001
<i>Ins2</i>	2.37	0.013
<i>Il1b</i>	2.22	0.014
<i>Il1r1</i>	1.61	0.042
<i>Down-regulated</i>		
<i>Calca</i>	-1.66	0.027
<i>Adipor2</i>	-1.56	0.024
<i>Pparg</i>	-1.52	0.007
<i>Thrb</i>	-1.43	0.037

Fold regulation. Obese Zucker rats treated with vehicle compared with lean rats treated with vehicle (unpaired Student's t-test).

Table S9. Differentially expressed genes in the adipose tissue of obese Zucker rats treated with CeO₂NPs compared with obese vehicle group.

Genes	Fold regulation	P value
<i>Ins2</i>	-2.25	0.012
<i>Htr2c</i>	-1.90	0.028
<i>Nr3c1</i>	-1.33	0.044

Fold regulation. Obese Zucker rats treated with CeO₂NPs compared with obese rats treated with vehicle (unpaired Student's t-test).

Table S10. Differentially expressed genes in the adipose tissue of obese Zucker rats treated with CeO₂@mSiO₂ compared to obese vehicle group.

Genes	Fold regulation	P value
<i>Drd1</i>	-3.72	0.044
<i>Agrp</i>	-2.27	0.023
<i>Ins2</i>	-2.26	0.025
<i>Adra2b</i>	-1.80	0.030
<i>Nr3c1</i>	-1.50	0.015

Fold regulation. Obese Zucker rats treated with CeO₂@mSiO₂ compared with obese rats treated with vehicle (unpaired Student's t-test).

Table S11. Adipose tissue messenger expression of obesity-related genes in obese Zucker rats.

Genes	Obese rats Vehicle (n=4)	Obese rats CeO ₂ NPs (n=4)	Obese rats CeO ₂ @mSiO ₂ (n=4)
Energy expenditure			
<i>Adipoq</i>	-1.59	-1.25	-2.13*
<i>Adipor2</i>	-1.56*	-1.19	-1.86
<i>C3</i>	5.45	1.39	-1.23
<i>Pparg</i>	-1.52*	-1.51*	-1.49*
<i>Ppargc1a</i>	1.36	-2.12	-2.48*
<i>Thrb</i>	-1.43*	-1.67*	-1.79*
Macrophage infiltration and characterization			
<i>Cd68</i>	3.35*	2.42	2.81*
<i>Il10</i>	1.21	1.67*	1.43
<i>Nos2</i>	1.30	1.29*	1.45*
Orexigenic			
<i>Adra2b</i>	-1.04	-1.12	-1.86**
<i>Agrp</i>	1.80	1.65	-1.26#†
<i>Cnr1</i>	8.31*	4.73	6.92*
<i>Galr1</i>	3.38	4.33*	3.03*
<i>Npy1r</i>	-1.56	-1.59*	-1.91*
<i>Nr3c1</i>	1.12	-1.19**	-1.35**
Anorectic			
<i>Atrn</i>	1.48	1.59*	-1.07†
<i>Calca</i>	-1.66*	-1.83	-2.61*
<i>Calcr</i>	-1.01	-1.13	-1.57†
<i>Cck</i>	11.53	11.63*	19.95*
<i>Drd1</i>	5.77*	3.68*	1.55#†
<i>Gcgr</i>	6.69*	4.35	5.34*
<i>Hrh1</i>	1.19	-1.25	1.06†
<i>Htr2c</i>	3.24*	1.71#	4.66*†
<i>Il1b</i>	2.22*	1.48	2.06*
<i>Il1r1</i>	1.61*	1.43	1.63*
<i>Il6</i>	9.49*	8.94*	11.88*
<i>Ins2</i>	2.37*	1.05#	1.05#
<i>Insr</i>	-1.32	-1.43*	-1.77*
<i>Lep</i>	2.78*	2.37*	2.22*
<i>Nmb</i>	-1.47	-1.25	-2.08*
<i>Nmu</i>	3.18	1.99*	1.58
<i>Nmur1</i>	3.49*	1.78	2.95*
<i>Ramp3</i>	9.08*	6.26*	8.37*
<i>Tnf</i>	3.45*	2.99*	3.26*

Fold regulation compared with control group (lean Zucker rats). *p <0.05 compared with control; #p <0.05 compared with obese Zucker rats treated with vehicle. †p <0.05 compared with obese Zucker rats treated with CeO₂NPs. Biological cut-off was set to a fold regulation of ± 1.

Supporting Methods.

Nanomaterials Characterization.

TEM images were acquired with a JEOL 1010 Electron Microscope operating at an accelerating voltage of 80 kV. Samples for TEM were prepared by drop casting on carbon coated copper TEM grids (Ted-pella, Inc). The grids were left to dry at room temperature. Observations were made on different parts of the grid and with different magnifications and more than 500 particles were computer-analysed and measured for the size distribution.

HRTEM, HAADF-STEM and elemental mapping by EDX were acquired with a JEOL JEM-2100. Samples were centrifuged and dispersed in water previous to their deposition (10 μ L) on an ultrathin formvar-coated 200-mesh copper grid (Ted-pella, Inc.)

Nitrogen sorption isotherms were measured with a ASAP2010 analyser (Micromeritics, USA). Before measurements, the samples were dried in a vacuum oven at room temperature for 24 h, and outgassed in the instrument at 60 °C for 24 h. The specific surface areas were calculated by the Brunauer-Emmett-Teller (BET) method in a linear relative pressure range between 0.05 and 0.25. The pore size distributions were derived from the desorption branches of the isotherms by the NLDFT method kernel file developed for silica exhibiting a cylindrical pore geometry. The total pore volumes were derived by the nitrogen sorption amount at the relative pressure values where the capillary condensation of the primary mesopores finished, in order to exclude the contribution from the textural porosity of the nanoparticles.

UV-visible spectrophotometry. UV-visible spectra were acquired with a Shimadzu UV-2400 Spectrophotometer. One mL of the NP solution was placed in a cuvette, and spectral analysis was performed in the 190 nm to 800 nm range.

ζ -Potential and DLS measurements were made with a Malvern ZetaSizer Nano ZS Instrument operating with a light source wavelength of 532 nm and a fixed scattering angle of 173° for DLS measure. The software was arranged with the specific parameters of refractive index and absorption coefficient of the material and the viscosity of the solvent according the manufacturer instructions.

VII. DISCUSIÓN

La presente tesis evalúa los nanomateriales basados en CeO₂ como nueva estrategia terapéutica frente las alteraciones metabólicas asociadas a la obesidad, las cuales presentan una serie de ventajas respecto los antioxidantes clásicos (actividad antioxidante autoregenerativa, biodistribución dirigida, mayor tiempo de residencia en los tejidos, y actividad únicamente en situaciones de sobreproducción de ROS), proporcionando un efecto antioxidante prolongado a dosis bajas en ausencia de toxicidad (101).

Teniendo en cuenta que las CeO₂NPs se distribuyen mayoritariamente a hígado tras su administración intravenosa en modelos animales de roedores (106,113), en el primer estudio se utilizó un modelo *in vitro* con células hepáticas HepG2, incubadas bajo condiciones de estrés oxidativo (inducido por H₂O₂) o de esteatosis hepatocelular (inducido por OA/PA). Los resultados muestran que las CeO₂NPs ejercen un efecto protector celular y reducen el contenido de ácidos grasos.

En primer lugar, se demostró la internalización de las CeO₂NPs en las células HepG2 mediante TEM, localizándose mayoritariamente en compartimentos delimitados por membrana (vacuolas u orgánulos tipo endosoma). De forma similar, se ha descrito la internalización de CeO₂NPs en células hepáticas humanas C3A, en las cuales por microscopia confocal se localizaban mayoritariamente en la zona perinuclear sugiriendo su presencia en compartimentos secretores o endocíticos (163). Además, también se ha evidenciado la internalización de las CeO₂NPs en células humanas hepáticas WRL-68 mediante citometría de flujo (164).

A continuación, debido a que el estrés oxidativo es una característica fundamental en la patogénesis de MAFLD (75) y del resto de alteraciones metabólicas de la obesidad (21,22), se utilizó un modelo *in vitro* de estrés oxidativo incubando las células HepG2 con H₂O₂ a una concentración de 1,5 mM. Dicha concentración se ha escogido por la reducción moderada de la viabilidad celular y aumento de la producción de ROS de forma significativa. El tratamiento

Discusión

de las células con CeO₂NPs mostró una reducción de la producción de ROS, evidenciada por la disminución de la fluorescencia de la sonda 2',7'-DCF-DA sensible a la oxidación. Esta reducción del estrés oxidativo se acompañó de una mejora en la viabilidad celular medida por el ensayo MTS.

De acuerdo con estos resultados, el pretratamiento de células HepG2 con CeO₂NPs ha demostrado previamente prevenir el estrés oxidativo y el daño celular causado por la acrilamida, un compuesto químico tóxico presente en comida con elevada temperatura de cocción (165).

Por otro lado, la sobreproducción de ROS en la MAFLD viene acompañada de la oxidación del colesterol libre a óxidos de colesterol (oxisteroles), los cuales están implicados en la progresión de la MAFLD (166,167). Estos pueden producirse de forma enzimática (25-hidroxicolesterol) y no-enzimática (7β-hidroxicolesterol y 7-cetocolesterol) (168). En nuestro estudio las células HepG2 expuestas a H₂O₂ presentan un incremento del contenido de oxisteroles, sin observar una reducción significativa de ellos cuando son tratadas con CeO₂NPs. Por ello, son necesarios futuros estudios con otros tipos celulares o condiciones experimentales para elucidar el efecto de las CeO₂NPs en la formación hepática de oxisteroles.

Respecto a la acción de las CeO₂NPs sobre la esteatosis hepatocelular, en estudios previos de nuestro grupo de investigación las CeO₂NPs mostraron un efecto antiesteatótico en ratas con fibrosis hepática (113) y con NASH (138), además de los efectos antiinflamatorios y antioxidantes ya conocidos. Kobylak y colaboradores utilizaron un modelo de obesidad con MAFLD en rata inducida en periodo neonatal por glutamato monosódico, en las cuales la administración oral de CeO₂NPs (1-5 nm de diámetro) a una dosis de 1 mg/kg durante 3 meses ejercía un efecto antiesteatótico disminuyendo los lípidos hepáticos, además de reducir el peso corporal, el tejido adiposo visceral y las citoquinas proinflamatorias (145). Sin embargo,

se desconoce si este efecto antiesteatótico de las CeO₂NPs es debido a la mejora sistémica y/o hemodinámica o si presentan un efecto antiesteatótico directo per se.

Además, también se desconoce si efectos antiesteatóticos similares a los observados en ratas se pueden dar en el hígado humano. De forma interesante, existe la evidencia que las CeO₂NPs pueden interferir, en condiciones normales, en el metabolismo de los ácidos grasos de líneas celulares derivadas de hepatocitos humanos (células HepG2) (169,170), tipo celular donde se acumula mayoritariamente los ácidos grasos en la MAFDL.

Por los motivos anteriormente mencionados, con la finalidad de evaluar la capacidad de las CeO₂NPs para reducir el contenido de ácidos grasos en células hepáticas humanas, se utilizó un modelo *in vitro* de esteatosis hepatocelular incubando las células HepG2 durante 24 horas con la mezcla de ácido OA (C18:1n9) y PA (C16:0) a un ratio molar 2:1, el cual constituye un modelo ampliamente utilizado en células hepáticas ya que se asemeja a la esteatosis hepática de la MAFDL (156,157,171–173). El OA, ácido graso monoinsaturado, y el PA, ácido graso saturado, son los ácidos grasos más abundantes presentes en los TG hepáticos (174) y a nivel plasmático (175). Estos ácidos grasos presentan individualmente efectos diferenciales: el OA es más esteatogénico mientras el PA presenta un mayor efecto proapoptótico (157). Específicamente, el OA mitiga la lipotoxicidad hepatocelular inducida por el PA a través de la inhibición del estrés del retículo endoplásmico y la apoptosis (176). La exposición de las células HepG2 a la mezcla de OA/PA a una concentración de 2mM y con un ratio molar 2:1 durante 24 horas proporciona la máxima acumulación de lípidos con la mínima citotoxicidad (156,157). Gómez-Lechón y colaboradores mostraron que este modelo *in vitro* de esteatosis hepatocelular presentaba una acumulación lipídica similar a los hepatocitos humanos de hígados con esteatosis (156).

En nuestro estudio, las células HepG2 incubadas con OA/PA mostraron un incremento del contenido celular de los ácidos grasos C16:0, C18:0, C18:1n9c, C20:0, C20:1n9, C20:2n6,

Discusión

C20:5n3, C22:6n3 y C24:1n9. Estos resultados van en consonancia con la inducción general del contenido de ácidos grasos reportado tanto en este modelo *in vitro* (157) como en el hígado de pacientes con MAFLD (158,177–179). Sin embargo, el contenido de los ácidos alfa-linolénico (C18:3n3) y gamma-linolénico (C18:3n6) no se incrementó. Resultados similares fueron observados en modelos animales de MAFLD, inducida por dieta de alto contenido en grasas y CCl₄ (180) y por dieta deficiente en metionina y colina (181).

Brevemente, en el modelo *in vitro* de esteatosis hepatocelular, el PA (C16:0) aumenta la síntesis de ácido esteárico (C18:0) a través de la elongación por la ELOVL6, mientras el OA (C18:1n9c) conlleva un mayor contenido de C20:1n9 y C24:1n9, de acuerdo con la vía metabólica de elongación de los ácidos grasos n-9. El OA también promueve la formación de ácidos grasos de cadena larga n-3 y n-6 a través de FADS2. Las células HepG2 esteatóticas presentaban un menor contenido de C18:3n3 y C18:3n6, lo cual puede estar relacionado con una reducción de la actividad de FADS2. Por otro lado, el contenido de C20:4n6, C20:5n3, C22:6n3 se incrementó, respaldando la inducción de la elongación y desaturación de las vías n-3 y n-6. En global, el incremento del índice lipogénico C16:0/C18:2n6c en las células HepG2 expuestas a OA/PA está en concordancia con la inducción del proceso metabólico de esteatosis. Otros índices, tales como C18:0/C16:0 (ELOVL6), el cual está incrementado en este modelo, se ha relacionado con el grado de esteatosis hepática en pacientes con MAFLD (177).

El efecto antiesteatótico de las CeO₂NPs se demostró por la reducción de los ácidos grasos saturados más abundantes C16:0 y C18:0, conjuntamente con una disminución del contenido de la mayoría de ácidos grasos insaturados de más de 18 carbonos. El efecto diferencial de las CeO₂NPs sobre el C16:0 y C18:1n9 se podría explicar por el hecho que el C16:0 no está esterificado y, con la finalidad de evitar toxicidad, se convierte a ácidos grasos insaturados (por ejemplo, C16:1n7 y C18:1n9) a través de la elongación por ELOV6 y desaturación por SCD1. Nuestros resultados muestran que las CeO₂NPs reducen la actividad de ELOVL6 e incrementan

la de SCD1, lo cual explica por qué C16:1n7 y C18:1n9 no están reducidos después del tratamiento con CeO₂NPs. Los resultados sugieren que las CeO₂NPs pueden inducir una transformación más efectiva del C16:0 a los ácidos grasos insaturados para evitar la toxicidad.

Las CeO₂NPs ejercieron también un efecto antiesteatótico notable sobre los ácidos grasos insaturados de más de 18 carbonos, reduciendo sus concentraciones hasta su normalización en la mayoría de ellos. Este efecto puede ser debido a la inhibición de la elongación y desaturación en las vías n-3 y n-6. De manera importante, las CeO₂NPs redujeron los ácidos grasos precursores de eicosanoides como el ácido araquidónico (C20:4n6), ácido eicosapentaenoico (C20:5n3) y ácido docosahexaenoico (C22:6n3), los cuales participan en la inducción de inflamación y la integridad de la membrana celular. Sin embargo, siendo los ácidos grasos de más de 18 átomos de carbono oxidados preferencialmente en los peroxisomas en vez de en las mitocondrias, es necesaria una mayor investigación para evaluar si las CeO₂NPs pueden promover la oxidación de los ácidos grasos en peroxisomas. Por el contrario, los ácidos grasos C18:3n3 y C18:3n6, los cuales no se incrementaban en las células HepG2 esteatóticas, mostraron un incremento ante el tratamiento con CeO₂NPs, sugiriendo que las NPs ejercen una inducción de la actividad de FADS2. Por último, la reducción del índice lipogénico por las CeO₂NPs respalda un efecto antioesteatótico global.

Entre las limitaciones de nuestro primer estudio se encuentra la falta de evaluación de otros factores que juegan un papel importante en la fisiopatología de la MAFLD, junto con la presencia de estrés oxidativo y alteraciones en el metabolismo de lípidos. Por ejemplo, no se ha estudiado el efecto de las CeO₂NPs en los receptores nucleares, tales como receptores activados por proliferadores peroxisomales (*Peroxisome Proliferator-Activated Receptors*; PPARs), receptores X hepáticos (*Liver X Receptors*; LXR) y receptores X farnesoide (*Farnesoid X Receptor*; FXR), los cuales están implicados en la historia natural de MAFLD: PPARs en la esteatogénesis hepática, LXR en la inflamación hepática y FXR en la fibrogénesis hepática

Discusión

(182). Asimismo, otra de las limitaciones de nuestro estudio es el hecho que la internalización de las CeO₂NPs por las células HepG2 solamente se ha estudiado en condiciones basales y podría haber cambios en la localización intracelular de las CeO₂NPs bajo condiciones de estrés oxidativo y/o esteatosis. De forma similar, el efecto antioxidante y protector celular de las CeO₂NPs no se ha evaluado en el modelo *in vitro* de esteatosis hepatocelular. Por último, los efectos antiesteatóticos de las CeO₂NPs se han evaluado mediante exposición a la mezcla de OA/PA, sin haberse estudiado el efecto diferencial en la esteatosis inducida ya sea por OA o por PA de forma individual.

Una vez demostrado el efecto protector de las CeO₂NPs frente al estrés oxidativo en células hepáticas humanas y el efecto antiesteatótico a través de la inducción de cambios en el metabolismo de los ácidos grasos en un modelo *in vitro* de esteatosis hepatocelular, se procedió a evaluar los efectos de los nanomateriales a nivel *in vivo* en las ratas Zucker, modelo animal de obesidad con fisiopatología similar a la del síndrome metabólico en humanos (96).

De especial interés, en este segundo estudio utilizamos dos tipos de nanocería, CeO₂NPs “libres”, estabilizadas electrostáticamente, de 4 nm, y las mismas nanopartículas de óxido de cerio de 4 nm recubiertas de sílice mesoporosa (CeO₂@mSiO₂), con el objetivo de evaluar el efecto sobre el estrés oxidativo y perfil lipídico de las CeO₂@mSiO₂ comparado con las CeO₂NPs libres.

De forma interesante, los resultados *in vitro* muestran como el recubrimiento con mSiO₂ mejora la estabilidad, la actividad antioxidante y la viabilidad celular de las nanopartículas de CeO₂ en las células hepáticas HepG2. Según descrito en el primer estudio, las CeO₂NPs libres miden alrededor de 4 nm y aproximadamente 10 nm después de la conjugación con albúmina. Si no se realiza dicha pre-albuminización, las nanopartículas tienden a agregarse inmediatamente y el tamaño medido por DLS presenta una mayor variabilidad (10-100 nm). En cambio, las CeO₂@mSiO₂ constan de cores que son las mismas CeO₂NPs (4 nm), los cuales

encapsulados con $mSiO_2$ alcanzan aproximadamente un diámetro de 50 nm. Este tamaño se escogió ya que se encuentra en el rango de tamaño que muestra una mayor captación celular (183–185), permeabilidad a través de la vasculatura hepática permeable asociada a enfermedades inflamatorias (186,187) y acumulación hepática (188). Dicha encapsulación con $mSiO_2$ mantuvo la estabilidad coloidal en medio fisiológico y, en medio de cultivo celular, donde tiene lugar la formación de una corona proteica en los nanomateriales, con mayor eficiencia que la albuminización, las $CeO_2@mSiO_2$ mantenían el tamaño medio y la dispersión hasta 7 días. En las células hepáticas HepG2 ambos nanomateriales eran internalizados y se observaban en orgánulos tipo endosoma. Además, cuando las células HepG2 eran expuestas a H_2O_2 , las $CeO_2@mSiO_2$ presentaban un mayor efecto antioxidante y protección celular comparado con las CeO_2 NPs libres. Estos efectos no se observaron utilizando únicamente $mSiO_2$.

A destacar, las $CeO_2@mSiO_2$ se fabricaron utilizando un método de síntesis en condiciones de solución acuosa, en un solo recipiente (síntesis *one-pot*), a temperatura ambiente y en atmosfera abierta, lo cual favorece su translación, adaptación y rápida síntesis. Además, la sílice es un material biocompatible y regulado como seguro por la FDA.

Una vez estudiada la estabilidad y actividad antioxidante de las $CeO_2@mSiO_2$, se evaluó el efecto *in vivo* de las $CeO_2@mSiO_2$ en ratas Zucker obesas, homocigotas para la mutación en el receptor de la leptina (*fa/fa*), las cuales constituyen un modelo animal de obesidad de similar fisiopatología al síndrome metabólico en humanos (96). Las ratas Zucker obesas desarrollan obesidad entre la tercera y quinta semana de vida junto con alteraciones metabólicas típicas del síndrome metabólico, entre las cuales se encuentran la dislipemia y MAFLD. Este modelo animal fue el escogido al presentar las alteraciones metabólicas asociadas a la obesidad y una fisiopatología similar a los humanos, así como al representar un modelo de inflamación crónica

Discusión

de bajo grado, que dificulta la aparición de los efectos terapéuticos de la nanocería, en comparación con los modelos asociados a un elevado daño celular.

Las $\text{CeO}_2@m\text{SiO}_2$ fueron bien toleradas por las ratas Zucker obesas. No se observó ninguna exacerbación de las alteraciones metabólicas o inducción de toxicidad orgánica después del tratamiento con nanomateriales. En cuanto a la biodistribución por ICP-MS, ambos nanomateriales se localizaron mayoritariamente en hígado y bazo, tal como era esperable según resultados previos en nuestro grupo (113). Se observó una menor cantidad de cerio en pulmón y riñón, y casi indetectable en corazón, músculo gastrocnemio y tejido adiposo retroperitoneal. De forma diferencial, cuando las ratas obesas eran tratadas con $\text{CeO}_2@m\text{SiO}_2$ se observó una menor presencia de nanopartículas en órganos extrahepáticos: reducción del 70% del contenido de cerio en pulmón y del 34% en bazo, comparado con las CeO_2 NPs libres. De acuerdo con estos resultados, otros grupos han reportado un incremento de la acumulación de NPs libres en pulmón debido al fenómeno de agregación (189), y en este sentido la encapsulación con $m\text{SiO}_2$ de NPs de pequeño tamaño puede representar una estrategia segura para su administración intravenosa. Además, la superficie de la sílice se puede funcionalizar para realizar una biodistribución controlada de diferentes NPs en una amplia variedad de aplicaciones clínicas.

Las ratas Zucker obesas presentaban un incremento de la citoquina proinflamatoria $\text{TNF-}\alpha$, la cual solamente se normalizó tras el tratamiento con $\text{CeO}_2@m\text{SiO}_2$. La importancia de este hallazgo recae en que el $\text{TNF-}\alpha$ es probablemente la citoquina proinflamatoria M1 principal que participa en la inflamación de bajo grado asociada con las alteraciones metabólicas de la obesidad (190–192). Además, ambas nanopartículas, y en mayor grado las $\text{CeO}_2@m\text{SiO}_2$, reducían las concentraciones circulantes de TG y cLDL medidos por espectrofotometría, los cuales constituyen factores de riesgo principales de las enfermedades cardiovasculares. Estos resultados van en concordancia con la función bien conocida del $\text{TNF-}\alpha$ en el metabolismo de

lípidos (190,191,193) y con resultados previos que muestran la capacidad de las CeO₂NPs para revertir el fenotipo proinflamatorio e inducir la polarización de macrófagos de M1, los cuales obtienen la energía de la glicólisis, a M2, los cuales utilizan el metabolismo oxidativo (139). Cabe destacar que los efectos hipolipemiantes y antiinflamatorios de los nanomateriales de CeO₂ mencionados anteriormente se observaron 5 semanas después de su administración, mostrando una actividad a largo plazo comparado con las aproximaciones farmacológicas clásicas.

Dicha disminución de la concentración de TG y cLDL séricos han sido observados también por otros grupos en modelos animales de obesidad. Rocca y colaboradores mostraron una reducción de la concentración de TG séricos cuando los nanomateriales de CeO₂ (0,5 mg/kg) fueron administrados vía intraperitoneal durante 6 semanas en ratas Wistar controles (143). Por otro lado, Bubnov y colaboradores utilizaron ratones BALB/C y CBA obesos mediante inducción con dieta rica en grasas, en los cuales administraron nanomateriales de CeO₂ (0,1, 0,001 y 0,001 M) y/o probióticos durante una semana, mostrando una disminución en la concentración de colesterol en suero y efectos beneficiosos en la microbiota intestinal (146).

El desequilibrio redox a nivel hepático se ha identificado como causa común de las alteraciones metabólicas como la hiperlipemia asociada a la obesidad y la resistencia a la insulina (194). Dado que las actividades antioxidante y antiinflamatoria de los nanomateriales basados en CeO₂ están bien descritas (101,106,112,113,195), el siguiente objetivo de nuestro estudio se centró en evaluar el efecto de los nanomateriales de CeO₂ sobre el perfil lipídico mediante la determinación de los ácidos grasos totales y el lipidoma en suero por GC-MS. En la línea de los resultados obtenidos por espectrofotometría (TG y cLDL), el análisis por GC-MS mostró una reducción significativa de los ácidos grasos totales en suero, tanto saturados como insaturados. Ambos nanomateriales disminuían las concentraciones de C18:0, C18:1n9t, C20:3n6 y C22:6n3. Asimismo, específicamente las CeO₂@mSiO₂ reducían significativamente el

Discusión

PA (C16:0) y otros cinco ácidos grasos (C14:1, C16:1, C18:1n9c, C18:2n6t and C18:3n3). A continuación, para profundizar en los efectos sobre los lípidos circulantes, se determinó por GC-MS los componentes lipídicos principales del suero, los cuales se aislaron por extracción en fase sólida y posterior derivatización de los ácidos grasos en cada fracción. El análisis del lipidoma evidenció que las ratas Zucker obesas presentaban un incremento en suero de TG, CE, PC y PE comparado con las ratas Zucker delgadas. Las ratas Zucker obesas tratadas con nanozimas de CeO₂ mostraron una reducción de los ácidos grasos derivados de TG, y de forma más importante por parte de las CeO₂@mSiO₂ por un efecto reductor sobre los ácidos grasos saturados, y en especial sobre el PA. En global, ambos nanomateriales reducían en más de un 70% el ácido linoleico (C18:2n6c) y araquidónico (C20:4n6), siendo ambos ácidos grasos n-6 proinflamatorios y proadipogénicos (181,196,197), y redujeron entre 40-60% otros ácidos grasos (C16:1, C18:0, C18:1n9c, C18:1n9t, C18:2n6t, and C18:3n3). Por el contrario, mientras las CeO₂NPs producían una disminución abundante del total de PE, las ratas tratadas con CeO₂@mSiO₂ mostraban una ligera reducción, por el efecto diferencial en la reducción del contenido de C20:4n6 de la fracción de PE. Por último, ambos nanomateriales no reducían de forma significativa las fracciones de CE, PC o NEFA. En conjunto, nuestros resultados muestran como los nanomateriales de CeO₂ disminuían significativamente los ácidos grasos derivados de la fracción de TG en el suero de las ratas obesas y, específicamente, las CeO₂@mSiO₂ inducían una mayor reducción de las concentraciones circulantes de PA, el ácido graso saturado más abundante y con propiedades proinflamatorias y citotóxicas.

En las ratas obesas tratadas con CeO₂@mSiO₂, dicha disminución de las concentraciones circulantes de PA está asociada al efecto antiinflamatorio a través de la reducción la citoquina proinflamatoria TNF- α . En este sentido, Korbecki y colaboradores mostraron como el PA causaba la inducción de la respuesta inflamatoria a través de la activación de TLR4, causando la sobreexpresión de diversas citoquinas proinflamatorias como el TNF- α (46).

Dado las propiedades antioxidantes y la distribución hepática mayoritaria de los nanomateriales de CeO₂, posteriormente se evaluó si la actividad antiinflamatoria e hipolipemiante de los nanomateriales de CeO₂ se asociaban a una mejora en la expresión génica en el hígado de las ratas obesas. Las ratas Zucker obesas mostraron un incremento global en la expresión de genes, entre los cuales se sobreexpresaban significativamente los genes *Slc2a4*, *Cd36*, *Elovl6*, *G6pd*, *Apoa1*, así como otros genes del metabolismo de lípidos y carbohidratos, vías de señalización de adipocinas y apoptosis. Las alteraciones moleculares del metabolismo lipídico anteriormente mencionadas son similares a las descritas en la MAFLD por Ipsen y colaboradores, entre las cuales destaca el incremento de la expresión de genes que intervienen en la captación de ácidos grasos y la lipogénesis *de novo* (77). El tratamiento con nanomateriales de CeO₂ mostró un efecto inhibitorio en la expresión de dichos genes sobrerregulados en las ratas obesas, siendo más notable en el grupo tratado con CeO₂@mSiO₂, comparado con las CeO₂NPs libres.

De acuerdo con la reducción a nivel circulante de TNF- α , esta citoquina se encontraba infraexpresada en el hígado de las ratas obesas tratadas con nanomateriales de CeO₂. El tratamiento con nanozimas de CeO₂ normalizó la expresión de *Mtor* y *Akt1*, genes donde convergen múltiples señales inflamatorias y metabólicas, y *Pik3ca*, gen que codifica para la subunidad catalítica del fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K) y es un gen diana esencial del receptor 2 de TNF. Estos resultados sugieren la inhibición hepática de la vía PI3K/AKT/mTOR, la cual interviene en la activación de la lipogénesis *de novo*, gluconeogénesis y tumorigénesis, y concuerdan con la inhibición global de la expresión de genes relacionados con la señalización de la insulina y el metabolismo y transporte de lípidos. De modo interesante, se ha descrito previamente una reducción en la fosforilación de proteínas que participan en la vía PI3K/mTOR en células hepáticas bajo condiciones de estrés oxidativo tratadas con CeO₂NPs (198) y la eficacia de las CeO₂NPs en un modelo experimental de CHC (141). En la misma línea, ambos nanomateriales infraexpresaban *Stat-3*, un factor involucrado en el desarrollo tumoral en la

Discusión

obesidad y MAFLD relacionado con un ambiente inflamatorio y oxidativo, incluso en ausencia de NASH o fibrosis (199,200). Además, ambos nanomateriales disminuían la expresión de *Slc2a4* (codifica GLUT4, proteína transportadora de glucosa regulada por la insulina) y *Abcg1* (implicado en la homeostasis de lípidos). Se observaron efectos adicionales por parte de las $\text{CeO}_2@m\text{SiO}_2$ comparado con las CeO_2 NPs libres, disminuyendo la expresión de 8 genes que participan en la fosforilación oxidativa (*Ndufb6*), transporte y metabolismo de lípidos (*Apoa1*, *Lpl*, *Abca1*), señalización de la insulina (*Insr*, *Pik3r1*), apoptosis (*Mapk1*) y metabolismo de carbohidratos (*Gsk3b*). Por último, cabe destacar que la expresión de 12 genes relacionados con el metabolismo de carbohidratos (*Gsk3b*, *Rbp4*), señalización de la insulina (*Igf1*, *Igfbp1*), y metabolismo y transporte de lípidos (*Acs15*, *Acsm3*, *Cyp2e1*, *Foxa2*, *Hmgcr*, *Nr1h3*, *Nr1h4*, *Slc27a5*) estaba significativamente reducida en las ratas obesas tratadas con $\text{CeO}_2@m\text{SiO}_2$ comparado con aquellas tratadas con CeO_2 NPs libres. Estos resultados muestran un efecto protector de las $\text{CeO}_2@m\text{SiO}_2$ frente las desregulaciones hepáticas asociadas con la obesidad y son consistentes con la mayor actividad antioxidante y la reducción distintiva de $\text{TNF-}\alpha$ y PA por parte de las $\text{CeO}_2@m\text{SiO}_2$.

A diferencia de las observaciones previas en nuestro grupo, donde en un modelo de rata de NASH (ratas Wistar con dieta MCD) se lograba la reducción de esteatosis por el tratamiento con CeO_2 NPs (138), en nuestro estudio no observamos diferencias en la esteatosis hepática, tanto evaluada por histología con tinción Oil Red como por el análisis lipidómico hepático por GC-MS. Dado que la dieta MCD está caracterizada por pérdida de peso contrariamente al aumento de tejido adiposo en las ratas Zucker obesas, se estudió posteriormente las propiedades de los nanomateriales de CeO_2 en la expresión génica del tejido adiposo de las ratas obesas. Tal como se esperaba, en el tejido adiposo de las ratas obesas se observó un incremento de la expresión de genes y dichas desregulaciones fueron revertidas con el tratamiento con los nanomateriales de CeO_2 . De forma similar al hígado, las $\text{CeO}_2@m\text{SiO}_2$ ejercían un mayor efecto sobre las desregulaciones génicas en el tejido adiposo. Ambos

nanomateriales reducían significativamente la expresión en tejido adiposo de *Nr3c1* (receptor de glucocorticoides), el cual promueve la adiposidad y las alteraciones metabólicas asociadas en ratones alimentados con dieta rica en grasas (201). Esta regulación negativa también se observó en *Ppargc1*, gen regulador de la biogénesis mitocondrial altamente sensible a ROS (202), y *C3*, gen que interviene en el metabolismo de lípidos y contribuye al síndrome metabólico y a la inflamación de bajo grado asociada a la obesidad (203). De forma interesante, las $\text{CeO}_2@m\text{SiO}_2$ confieren efectos beneficiosos adicionales, incluido la normalización de diferentes genes implicados en el gasto energético y tasa metabólica (p. ej. *Agp*, *Atrn*, *Adra2b*, *Drd1*). En la línea de los resultados obtenidos en tejido adiposo, las CeO_2 NPs han demostrado inhibir la expresión de genes relacionados con la adipogénesis y reducir la acumulación de TG en cultivos celulares de preadipocitos 3T3-L1, así como mejorar la desregulación génica del tejido adiposo de ratas Wistar controles (143).

Los mecanismos moleculares específicos que conectan la acumulación de los nanomateriales de CeO_2 en el hígado con sus efectos protectores en suero y tejido adiposo deben ser clarificados en mayor detalle. Sin embargo, nuestros resultados apuntan como factores clave los efectos significativos en la reducción hepática de la citoquina proinflamatoria TNF- α y la regulación negativa de la vía PI3K/mTOR/AKT, la cual juega un papel fundamental en la regulación de la inflamación sistémica, metabolismo y homeostasis lipídica (204). Esto también concuerda con los efectos beneficiosos en la expresión génica del tejido adiposo, los cuales conllevan la reducción de la hiperlipemia e inflamación sistémica en una especie de retroalimentación positiva.

Una de las limitaciones de este segundo estudio es la ausencia de estudio de la localización celular específica de los nanomateriales de CeO_2 dentro del hígado (hepatocitos, células Kupfer, células hepáticas estrelladas) que podría ayudar a caracterizar el mecanismo de acción antioxidante, antiinflamatorio e hipolipemiante de los nanomateriales en el *feedback* entre

Discusión

hígado, tejido adiposo y a nivel circulante. En este sentido, son necesarios más estudios para confirmar el mecanismo de acción hipolipemiante de los nanomateriales de CeO₂ propuesto en nuestro segundo estudio.

En resumen, ambos estudios muestran que los nanomateriales de CeO₂ son internalizados por las células hepáticas, ejerciendo un efecto protector celular a través de efectos antioxidantes y antiinflamatorios. En un modelo animal de obesidad, estas propiedades de los nanomateriales de CeO₂ se trasladan en una acción hipolipemiante importante y de larga duración, en la disminución de la citoquina proinflamatoria TNF- α e inhibición hepática de la vía PI3K/mTOR/AKT, y en la mejora de la expresión génica hepática y del tejido adiposo. El recubrimiento de las CeO₂NPs con mSiO₂ maximiza la mayoría de estos efectos, como consecuencia de su mayor estabilidad, a la vez que incrementa la selectividad hepática y reduce el contenido pulmonar de cerio. Por lo tanto, el presente trabajo permite establecer los nanomateriales basados en CeO₂ como una posible estrategia terapéutica hipolipemiante y antioxidante segura para tratar las comorbilidades metabólicas asociadas a la obesidad. Otras enfermedades metabólicas caracterizadas por hiperlipidemia, inflamación de bajo grado y estrés oxidativo podrían beneficiarse también de la utilización de los nanomateriales basados en CeO₂.

VIII. CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos en los dos estudios que conforman esta tesis doctoral, se puede concluir que:

1. Los nanomateriales basados en CeO_2 se internalizan en las células hepáticas HepG2 y se localizan en orgánulos tipo endosoma.
2. El tratamiento con CeO_2NPs de las células HepG2 expuestas a un estímulo oxidante (H_2O_2) reduce la producción de ROS y mejora la viabilidad celular.
3. En un modelo *in vitro* de esteatosis hepatocelular, el tratamiento con CeO_2NPs consigue disminuir los ácidos grasos saturados más abundantes C16:0 y C18:0 y la mayoría de ácidos grasos insaturados de más de 18 carbonos.
4. Las CeO_2NPs inducen cambios en la actividad de elongasas y desaturasas que participan en el metabolismo de los ácidos grasos.
5. El recubrimiento con mSiO_2 de las CeO_2NPs mejora la estabilidad, incrementa la actividad antioxidante y potencia el efecto protector celular comparado con las CeO_2NPs libres.
6. En las ratas Zucker obesas, la administración de los nanomateriales de CeO_2 es bien tolerada, distribuyéndose mayoritariamente a hígado y bazo, destacando una menor presencia de cerio en órganos extrahepáticos por parte de las $\text{CeO}_2@\text{mSiO}_2$.
7. Las $\text{CeO}_2@\text{mSiO}_2$ reducen las concentraciones plasmáticas y la expresión hepática de la citoquina proinflamatoria $\text{TNF-}\alpha$ en ratas Zucker obesas.
8. El tratamiento de las ratas Zucker obesas con $\text{CeO}_2@\text{mSiO}_2$ ejerce un mayor efecto hipolipemiante (TG y cLDL) respecto las CeO_2NPs libres.
9. Las $\text{CeO}_2@\text{mSiO}_2$ disminuyen las concentraciones plasmáticas de PA.

Conclusiones

10. El análisis del lipidoma sérico muestra una reducción de la fracción de TG por parte de ambos nanomateriales, siendo mayor la disminución de los ácidos grasos saturados derivados de TG por parte de las $\text{CeO}_2@m\text{SiO}_2$.
11. Las $\text{CeO}_2@m\text{SiO}_2$ mejoran notablemente las desregulaciones génicas en hígado y tejido adiposo asociadas a la obesidad.

Globalmente y según los resultados obtenidos en esta tesis doctoral, se puede concluir que los nanomateriales basados en CeO_2 se postulan como una estrategia terapéutica hipolipemiente y antioxidante segura para tratar las comorbilidades metabólicas asociadas a la obesidad. Esta aproximación terapéutica podría aplicarse también al tratamiento de otras enfermedades metabólicas relacionadas con hiperlipidemia, inflamación de bajo grado y estrés oxidativo.

IX. BIBLIOGRAFÍA

1. González-Muniesa P, Martínez-González MA, Hu FB, Després JP, Matsuzawa Y, Loos RJF, et al. Obesity. *Nat Rev Dis Prim*. 2017;3:1–18.
2. Yumuk V, Tsigos C, Fried M, Schindler K, Busetto L, Micic D, et al. European guidelines for obesity management in adults. *Obes Facts*. 2015;8:402–24.
3. Cardillo C, Barton M. Obesity, diabetes and cardiovascular risk: How to disrupt a vicious cycle. *Endocr Metab Sci*. 2021;2:100081.
4. Klop B, Elte JWF, Cabezas MC. Dyslipidemia in obesity: mechanisms and potential targets. *Nutrients*. 2013;5:1218–40.
5. Blüher M. Obesity: global epidemiology and pathogenesis. *Nat Rev Endocrinol*. 2019;15:288–98.
6. Arrizabalaga JJ, Vidal J, Masmiquel L, Monereo S, Moreira J, Moreno B, et al. Guía de práctica clínica para el manejo del sobrepeso y la obesidad en personas adultas. *Endocrinol Nutr*. 2003;50:1–38.
7. WHO. Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation. *World Heal Organ Tech Rep Ser*. 2000;894:1–253.
8. Heymsfield SB, Wadden TA. Mechanisms, pathophysiology, and management of obesity. *N Engl J Med*. 2017;376:254–66.
9. Alberti G, Zimmet P, Shaw J, Grundy SM. The IDF consensus worldwide definition of the metabolic syndrome. International Diabetes Federation. 2006.
10. WHO. Obesity and overweight [Internet]. World Health Organization. 2016 [citado el 20 de Abril de 2021]. Disponible en: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>
11. WHO. The Global Health Observatory [Internet]. World Health Organization. [citado el 20 de Abril de 2021]. Disponible en: <https://www.who.int/data/gho>
12. OECD Health Policy Studies. The heavy burden of obesity: the economics of prevention. 2019.
13. Maes HHH, Neale MC, Eaves LJ. Genetic and environmental factors in relative body weight and human adiposity. *Behav Genet*. 1997;27:325–51.
14. Speliotes EK, Willer CJ, Berndt SI, Monda KL, Thorleifsson G, Jackson AU, et al. Association analyses of 249,796 individuals reveal 18 new loci associated with body mass index. *Nat Genet*. 2010;42:937–48.
15. Kopelman PG. Obesity as a medical problem. *Nature*. 2000;404:635–43.
16. Oussaada SM, van Galen KA, Cooman MI, Kleinendorst L, Hazebroek EJ, van Haelst MM, et al. The pathogenesis of obesity. *Metabolism*. 2019;92:26–36.
17. Narayanaswami V, Dwoskin LP. Obesity: current and potential pharmacotherapeutics and targets. *Pharmacol Ther*. 2017;170:116–47.
18. Murray S, Tulloch A, Gold MS, Avena NM. Hormonal and neural mechanisms of food reward, eating behaviour and obesity. *Nat Rev Endocrinol*. 2014;10:540–52.
19. Gregor MF, Hotamisligil GS. Inflammatory mechanisms in obesity. *Annu Rev Immunol*. 2011;29:415–45.
20. Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. *Nature*. 2006;444:860–7.
21. Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, Iwaki M, Yamada Y, Nakajima Y, et al. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest*. 2004;114:1752–61.
22. Carrier A. Metabolic syndrome and oxidative stress: A complex relationship. *Antioxidants Redox Signal*. 2017;26:429–31.
23. Tilg H, Moschen AR. Adipocytokines: Mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol*. 2006;6:772–83.
24. Kahn SE, Hull RL, Utzschneider KM. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature*. 2006;444:840–6.
25. Jung UJ, Choi MS. Obesity and its metabolic complications: The role of adipokines and the relationship between obesity, inflammation, insulin resistance, dyslipidemia and

- nonalcoholic fatty liver disease. *Int J Mol Sci*. 2014;15:6184–223.
26. Ouchi N, Parker JL, Lugus JJ, Walsh K. Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nat Rev Immunol*. 2011;11:85–97.
 27. de Luca C, Olefsky JM. Inflammation and insulin resistance. *FEBS Lett*. 2008;582:97–105.
 28. Ballesteros Pomar MD, Vilarrasa García N, Rubio Herrera MÁ, Barahona MJ, Bueno M, Caixàs A, et al. The SEEN comprehensive clinical survey of adult obesity: Executive summary. *Endocrinol Diabetes y Nutr*. 2021;68:130–6.
 29. Alberti KGMM, Zimmet P, Shaw J. The metabolic syndrome - A new worldwide definition. *Lancet*. 2005;366:1059–62.
 30. Pasquali R, Casanueva F, Haluzik M, Van Hulsteijn L, Ledoux S, Monteiro MP, et al. European society of endocrinology clinical practice guideline: Endocrine work-up in obesity. *Eur J Endocrinol*. 2020;182:G1–32.
 31. Garvey WT, Mechanick JL, Brett EM, Garber AJ, Hurley DL, Jastreboff AM, et al. American association of clinical endocrinologists and American college of endocrinology comprehensive clinical practice guidelines for medical care of patients with obesity. *Endocr Pract*. 2016;22:1–203.
 32. Jensen MD, Ryan DH, Apovian CM, Ard JD, Comuzzie AG, Donato KA, et al. 2013 AHA/ACC/TOS guideline for the management of overweight and obesity in adults: A report of the American College of cardiology/American Heart Association task force on practice guidelines and the obesity society. *Circulation*. 2014;129:102–38.
 33. Schutz DD, Busetto L, Dicker D, Farpour-Lambert N, Pryke R, Toplak H, et al. European practical and patient-centred guidelines for adult obesity management in primary care. *Obes Facts*. 2019;12:40–66.
 34. Salas-Salvadó J, Díaz-López A, Ruiz-Canela M, Basora J, Fitó M, Corella D, et al. Effect of a lifestyle intervention program with energy-restricted Mediterranean diet and exercise on weight loss and cardiovascular risk factors: One-year results of the PREDIMED-Plus trial. *Diabetes Care*. 2019;42:777–88.
 35. Ryan DH, Kahan S. Guideline recommendations for obesity management. *Med Clin North Am*. 2018;102:49–63.
 36. WEGOVY (semaglutide) injection, for subcutaneous use. US Food and Drug Administration (FDA) approved product information. [Internet]. [citado el 30 de Setiembre de 2021]. Disponible en: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2021/215256s000lbl.pdf
 37. Chang S-H, Stoll CRT, Song J, Varela JE, Eagon CJ, Colditz GA. Bariatric surgery. A systematic review and meta-analysis, 2003-2012. *JAMA Surg*. 2014;149:275–87.
 38. Dietrich MO, Horvath TL. Limitations in anti-obesity drug development: The critical role of hunger-promoting neurons. *Nat Rev Drug Discov*. 2012;11:675–91.
 39. Vekic J, Zeljkovic A, Stefanovic A, Jelic-Ivanovic Z, Spasojevic-Kalimanovska V. Obesity and dyslipidemia. *Metabolism*. 2019;92:71–81.
 40. Franssen R, Monajemi H, Stroes ESG, Kastelein JJP. Obesity and dyslipidemia. *Med Clin North Am*. 2011;95:893–902.
 41. Ference BA, Graham I, Tokgozoglu L, Catapano AL. Impact of lipids on cardiovascular health: JACC health promotion series. *J Am Coll Cardiol*. 2018;72:1141–56.
 42. Cooney MT, Dudina A, De Bacquer D, Wilhelmsen L, Sans S, Menotti A, et al. HDL cholesterol protects against cardiovascular disease in both genders, at all ages and at all levels of risk. *Atherosclerosis*. 2009;206:611–6.
 43. Saydah S, Bullard KMK, Cheng Y, Ali MK, Gregg EW, Geiss L, et al. Trends in cardiovascular disease risk factors by obesity level in adults in the United States, NHANES 1999-2010. *Obesity*. 2014;22:1888–95.
 44. Zhang T, Chen J, Tang X, Luo Q, Xu D, Yu B. Interaction between adipocytes and high-density lipoprotein:new insights into the mechanism of obesity-induced dyslipidemia and atherosclerosis. *Lipids Health Dis*. 2019;18:223.

45. Veilleux A, Caron-Jobin M, Noël S, Laberge PY, Tchernof A. Visceral adipocyte hypertrophy is associated with dyslipidemia independent of body composition and fat distribution in women. *Diabetes*. 2011;60:1504–11.
46. Korbecki J, Bajdak-Rusinek K. The effect of palmitic acid on inflammatory response in macrophages: an overview of molecular mechanisms. *Inflamm Res*. 2019;68:915–32.
47. Mach F, Baigent C, Catapano AL, Koskinas KC, Casula M, Badimon L, et al. 2019 ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias: Lipid modification to reduce cardiovascular risk. *Eur Heart J*. 2020;41:111–88.
48. Anstee QM, McPherson S, Day CP. How big a problem is non-alcoholic fatty liver disease? *BMJ*. 2011;343:1–5.
49. Anstee QM, Targher G, Day CP. Progression of NAFLD to diabetes mellitus, cardiovascular disease or cirrhosis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2013;10:330–44.
50. Buzzetti E, Pinzani M, Tsochatzis EA. The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Metabolism*. 2016;65:1038–48.
51. Singh S, Allen AM, Wang Z, Prokop LJ, Murad MH, Loomba R. Fibrosis progression in nonalcoholic fatty liver versus nonalcoholic steatohepatitis: a systematic review and metaanalysis of paired-biopsy studies. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2015;13:643–54.
52. Bernadette Moore J. From sugar to liver fat and public health: Systems biology driven studies in understanding non-alcoholic fatty liver disease pathogenesis. *Proc Nutr Soc*. 2019;78:290–304.
53. Frith J, Day CP, Henderson E, Burt AD, Newton JL. Non-alcoholic fatty liver disease in older people. *Gerontology*. 2009;55:607–13.
54. Vernon G, Baranova A, Younossi ZM. Systematic review: The epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis in adults. *Aliment Pharmacol Ther*. 2011;34:274–85.
55. Camhi SM, Bray GA, Bouchard C, Greenway FL, Johnson WD, Newton RL, et al. The relationship of waist circumference and BMI to visceral, subcutaneous, and total body fat: Sex and race differences. *Obesity*. 2011;19:402–8.
56. Younossi ZM. Non-alcoholic fatty liver disease – A global public health perspective. *J Hepatol*. 2019;70:531–44.
57. Caballería L, Pera G, Auladell MA, Torán P, Muñoz L, Miranda D, et al. Prevalence and factors associated with the presence of nonalcoholic fatty liver disease in an adult population in Spain. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2010;22:24–32.
58. Kalia HS, Gaglio PJ. The prevalence and pathobiology of nonalcoholic fatty liver disease in patients of different races or ethnicities. *Clin Liver Dis*. 2016;20:215–24.
59. Romero-Gómez M, Zelber-Sagi S, Trenell M. Treatment of NAFLD with diet, physical activity and exercise. *J Hepatol*. 2017;67:829–46.
60. Åberg F, Puukka P, Salomaa V, Männistö S, Lundqvist A, Valsta L, et al. Risks of light and moderate alcohol use in fatty liver disease: Follow-up of population cohorts. *Hepatology*. 2020;71:835–48.
61. Younossi ZM, Koenig AB, Abdelatif D, Fazel Y, Henry L, Wymer M. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease—Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology*. 2016;64:73–84.
62. Ekstedt M, Hagström H, Nasr P, Fredrikson M, Stål P, Kechagias S, et al. Fibrosis stage is the strongest predictor for disease-specific mortality in NAFLD after up to 33 years of follow-up. *Hepatology*. 2015;61:1547–54.
63. Valenti L, Al-Serri A, Daly AK, Enrico Galmozzi, Ramezza R, Dongiovanni P, et al. Homozygosity for the Patatin-Like Phospholipase-3/Adiponutrin I148M polymorphism influences liver fibrosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2010;51:1209–17.
64. Liu YL, Reeves HL, Burt AD, Tiniakos D, McPherson S, Leathart JBS, et al. TM6SF2 rs58542926 influences hepatic fibrosis progression in patients with non-alcoholic fatty

- liver disease. *Nat Commun*. 2014;5:4309.
65. Anstee QM, Seth D, Day CP. Genetic factors that affect risk of alcoholic and nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology*. 2016;150:1728-1744.e7.
 66. Mancina RM, Dongiovanni P, Petta S, Pingitore P, Meroni M, Rametta R, et al. The MBOAT7-TMC4 variant rs641738 increases risk of nonalcoholic fatty liver disease in individuals of european descent. *Gastroenterology*. 2016;150:1219–30.
 67. Zarrinpar A, Gupta S, Maurya MR, Subramaniam S, Loomba R. Serum microRNAs explain discordance of non-alcoholic fatty liver disease in monozygotic and dizygotic twins: a prospective study. *Gut*. 2016;65:1546–54.
 68. Zeybel M, Hardy T, Wong YK, Mathers JC, Fox CR, Gackowska A, et al. Multigenerational epigenetic adaptation of the hepatic wound-healing response. *Nat Med*. 2012;18:1369–77.
 69. Hardy T, Zeybel M, Day CP, Dipper C, Masson S, McPherson S, et al. Plasma DNA methylation: A potential biomarker for stratification of liver fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease. *Gut*. 2017;66:1321–8.
 70. Gehrke N, Schattenberg JM. Metabolic inflammation—A role for hepatic inflammatory pathways as drivers of comorbidities in nonalcoholic fatty liver disease? *Gastroenterology*. 2020;158:1929–47.
 71. Younossi Z, Anstee QM, Marietti M, Hardy T, Henry L, Eslam M, et al. Global burden of NAFLD and NASH: Trends, predictions, risk factors and prevention. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2018;15:11–20.
 72. Pimpin L, Cortez-Pinto H, Negro F, Corbould E, Lazarus J V., Webber L, et al. Burden of liver disease in Europe: Epidemiology and analysis of risk factors to identify prevention policies. *J Hepatol*. 2018;69:718–35.
 73. Estes C, Anstee QM, Arias-Loste MT, Bantel H, Bellentani S, Caballeria J, et al. Modeling NAFLD disease burden in China, France, Germany, Italy, Japan, Spain, United Kingdom, and United States for the period 2016–2030. *J Hepatol*. 2018;69:896–904.
 74. Younossi ZM, Blissett D, Blissett R, Henry L, Stepanova M, Younossi Y, et al. The economic and clinical burden of nonalcoholic fatty liver disease in the United States and Europe. *Hepatology*. 2016;64:1577–86.
 75. Bessone F, Razori MV, Roma MG. Molecular pathways of nonalcoholic fatty liver disease development and progression. *Cell Mol Life Sci*. 2019;76:99–128.
 76. Donnelly KL, Smith CI, Schwarzenberg SJ, Jessurun J, Boldt MD, Parks EJ. Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Invest*. 2005;115:1343–51.
 77. Ipsen DH, Lykkesfeldt J, Tveden-Nyborg P. Molecular mechanisms of hepatic lipid accumulation in non-alcoholic fatty liver disease. *Cell Mol Life Sci*. 2018;75:3313–27.
 78. Eslam M, Newsome PN, Sarin SK, Anstee QM, Targher G, Romero-Gomez M, et al. A new definition for metabolic dysfunction-associated fatty liver disease: An international expert consensus statement. *J Hepatol*. 2020;73:202–9.
 79. Marchesini G, Day CP, Dufour JF, Canbay A, Nobili V, Ratziu V, et al. EASL-EASD-EASO Clinical Practice Guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol*. 2016;64:1388–402.
 80. Cotter TG, Rinella M. Nonalcoholic fatty liver disease 2020: The state of the disease. *Gastroenterology*. 2020;158:1851–64.
 81. Younossi Z, Tacke F, Arrese M, Chander Sharma B, Mostafa I, Bugianesi E, et al. Global perspectives on nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*. 2019;69:2672–82.
 82. Hannah WN, Harrison SA. Effect of weight loss, diet, exercise, and bariatric surgery on nonalcoholic fatty liver disease. *Clin Liver Dis*. 2016;20:339–50.
 83. Chalasani N, Younossi Z, Lavine JE, Charlton M, Cusi K, Rinella M, et al. The diagnosis and management of nonalcoholic fatty liver disease: Practice guidance from the

- American Association for the Study of Liver Diseases. *Hepatology*. 2018;67:328–57.
84. Shetty A, Syn WK. Current treatment options for nonalcoholic fatty liver disease. *Curr Opin Gastroenterol*. 2019;35:168–76.
 85. Reimer KC, Wree A, Roderburg C, Tacke F. New drugs for NAFLD: lessons from basic models to the clinic. *Hepatology Int*. 2020;14:8–23.
 86. Kleinert M, Clemmensen C, Hofmann SM, Moore MC, Renner S, Woods SC, et al. Animal models of obesity and diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol*. 2018;14:140–62.
 87. Speakman JR. Use of high-fat diets to study rodent obesity as a model of human obesity. *Int J Obes*. 2019;43:1491–2.
 88. Coleman DL. Obese and diabetes: two mutant genes causing diabetes-obesity syndromes in mice. *Diabetologia*. 1978;14:141–8.
 89. Phillips MS. Leptin receptor missense mutation in the fatty Zucker rat. *Nat Genet*. 1996;13:18–9.
 90. Zucker TF, Zucker LM. Hereditary obesity in the rat associated with high serum fat and cholesterol. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1962;110:165–71.
 91. Zucker TF, Zucker LM. Fat accretion and growth in the rat. *J Nutr*. 1963;80:6–19.
 92. Zucker LM, Antoniades HN. Insulin and obesity in the Zucker genetically obese rat “fatty.” *Endocrinology*. 1972;90:1320–30.
 93. Koletsky S. Obese spontaneously hypertensive rats-A model for study of atherosclerosis. *Exp Mol Pathol*. 1973;19:53–60.
 94. Peterson RG, Shaw AN, Neel M-A, Little LA, Eichberg J. Zucker diabetic fatty rat as a model for non-insulin-dependent diabetes mellitus. *ILAR J*. 1990;32:16–9.
 95. Kawano K, Hirashima T, Mori S, Saitoh Y, Kurosumi M, Natori T. Spontaneous long-term hyperglycemic rat with diabetic complications. Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) strain. *Diabetes*. 1992;41:1422–8.
 96. Aleixandre A, Miguel M. Ratas Zucker como modelo experimental para el estudio de diferentes enfermedades. *Endocrinol Nutr*. 2008;55:217–22.
 97. Pelaz B, Alexiou C, Alvarez-Puebla RA, Alves F, Andrews AM, Ashraf S, et al. Diverse applications of nanomedicine. *ACS Nano*. 2017;11:2313–81.
 98. Farokhzad OC, Langer R. Impact of nanotechnology on drug delivery. *ACS Nano*. 2009;3:16–20.
 99. Liu Y, Shi J. Antioxidative nanomaterials and biomedical applications. *Nano Today*. 2019;27:146–77.
 100. Ghorbani M, Derakhshankhah H, Jafari S, Salatin S, Dehghanian M, Falahati M, et al. Nanozyme antioxidants as emerging alternatives for natural antioxidants: Achievements and challenges in perspective. *Nano Today*. 2019;29:100775.
 101. Casals E, Zeng M, Parra-Robert M, Fernández-Varo G, Morales-Ruiz M, Jiménez W, et al. Cerium oxide nanoparticles: Advances in biodistribution, toxicity, and preclinical exploration. *Small*. 2020;16:1907322.
 102. Yant WP, Hawk CO. The activity of various metals and metal oxide catalysts in promoting the oxidation of methane by air. *J Am Chem Soc*. 1927;49:1454–60.
 103. Su EC, Montreuil CN, Rothschild WG. Oxygen storage capacity of monolith three-way catalysts. *Appl Catal*. 1985;17:75–86.
 104. Kašpar J, Fornasiero P, Graziani M. Use of CeO₂-based oxides in the three-way catalysis. *Catal Today*. 1999;50:285–98.
 105. Rzigalinski B, Bailey D, Chow L, Kuiry C, Patil S, Merchant S, et al. Cerium oxide nanoparticles increase the lifespan of cultured brain cells and protect against free radical and mechanical trauma. *FASEB J*. 2003;17:A606.
 106. Hirst SM, Karakoti AS, Tyler RD, Sriranganathan N, Seal S, Reilly CM. Anti-inflammatory properties of cerium oxide nanoparticles. *Small*. 2009;5:2848–56.
 107. Niu J, Azfer A, Rogers LM, Wang X, Kolattukudy PE. Cardioprotective effects of cerium oxide nanoparticles in a transgenic murine model of cardiomyopathy. *Cardiovasc Res*.

- 2007;73:549–59.
108. Pirmohamed T, Dowding JM, Singh S, Wasserman B, Heckert E, Karakoti AS, et al. Nanoceria exhibit redox state-dependent catalase mimetic activity. *Chem Commun.* 2010;46:2736–8.
 109. Korsvik C, Patil S, Seal S, Self WT. Superoxide dismutase mimetic properties exhibited by vacancy engineered ceria nanoparticles. *Chem Commun.* 2007;1056–8.
 110. Heckert EG, Seal S, Self WT. Fenton-like reaction catalyzed by the rare earth inner transition metal cerium. *Environ Sci Technol.* 2008;42:5014–9.
 111. Hirst SM, Karakoti A, Singh S, Self W, Tyler R, Seal S, et al. Bio-distribution and in vivo antioxidant effects of cerium oxide nanoparticles in mice. *Environ Toxicol.* 2013;28:107–18.
 112. Yang B, Chen Y, Shi J. Nanocatalytic medicine. *Adv Mater.* 2019;31:1901778.
 113. Oró D, Yudina T, Fernández-Varo G, Casals E, Reichenbach V, Casals G, et al. Cerium oxide nanoparticles reduce steatosis, portal hypertension and display anti-inflammatory properties in rats with liver fibrosis. *J Hepatol.* 2016;64:691–8.
 114. Tseng MT, Lu X, Duan X, Hardas SS, Sultana R, Wu P, et al. Alteration of hepatic structure and oxidative stress induced by intravenous nanoceria. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2012;260:173–82.
 115. Park K, Park J, Lee H, Choi J, Yu WJ, Lee J. Toxicity and tissue distribution of cerium oxide nanoparticles in rats by two different routes: single intravenous injection and single oral administration. *Arch Pharm Res.* 2018;41:1108–16.
 116. Martins Gregório B, Benchimol De Souza D, Amorim de Moraes Nascimento F, Matta L, Fernandes-Santos C. The potential role of antioxidants in metabolic syndrome. *Curr Pharm Des.* 2016;22:859–69.
 117. Rani V, Deep G, Singh RK, Palle K, Yadav UCS. Oxidative stress and metabolic disorders: Pathogenesis and therapeutic strategies. *Life Sci.* 2016;148:183–93.
 118. Halliwell B. The antioxidant paradox: Less paradoxical now? *Br J Clin Pharmacol.* 2013;75:637–44.
 119. Howes RM. The free radical fantasy: A panoply of paradoxes. *Ann N Y Acad Sci.* 2006;1067:22–6.
 120. Hutson S. Experts urge a more measured look at antioxidants. *Nat Med.* 2008;14:795.
 121. Parra-Robert M, Casals E, Massana N, Zeng M, Perramón M, Fernández-Varo G, et al. Beyond the scavenging of reactive oxygen species (ROS): Direct effect of cerium oxide nanoparticles in reducing fatty acids content in an in vitro model of hepatocellular steatosis. *Biomolecules.* 2019;9:425.
 122. Chen J, Patil S, Seal S, McGinnis JF. Rare earth nanoparticles prevent retinal degeneration induced by intracellular peroxides. *Nat Nanotechnol.* 2006;1:142–50.
 123. Cai X, Sezate SA, Seal S, McGinnis JF. Sustained protection against photoreceptor degeneration in tubby mice by intravitreal injection of nanoceria. *Biomaterials.* 2012;33:8771–81.
 124. D'Angelo B, Santucci S, Benedetti E, Di Loreto S, Phani R, Falone S, et al. Cerium oxide nanoparticles trigger neuronal survival in a human alzheimer disease model by modulating BDNF pathway. *Curr Nanosci.* 2009;5:167–76.
 125. Kim CK, Kim T, Choi IY, Soh M, Kim D, Kim YJ, et al. Ceria nanoparticles that can protect against ischemic stroke. *Angew Chem Int Ed.* 2012;51:11039–43.
 126. Ranjbar A, Soleimani Asl S, Firozian F, Heidary Dartoti H, Seyedabadi S, Taheri Azandariani M, et al. Role of cerium oxide nanoparticles in a paraquat-induced model of oxidative stress: Emergence of neuroprotective results in the brain. *J Mol Neurosci.* 2018;66:420–7.
 127. Schubert D, Dargusch R, Raitano J, Chan SW. Cerium and yttrium oxide nanoparticles are neuroprotective. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006;342:86–91.
 128. Pourkhalili N, Hosseini A, Nili-Ahmadabadi A, Hassani S, Pakzad M, Baeri M, et al.

- Biochemical and cellular evidence of the benefit of a combination of cerium oxide nanoparticles and selenium to diabetic rats. *World J Diabetes*. 2011;2:204–10.
129. Khurana A, Tekula S, Godugu C. Nanoceria suppresses multiple low doses of streptozotocin-induced Type 1 diabetes by inhibition of Nrf2/NF- κ B pathway and reduction of apoptosis. *Nanomedicine*. 2018;13:1905–22.
 130. Chen G, Xu Y. Biosynthesis of cerium oxide nanoparticles and their effect on lipopolysaccharide (LPS) induced sepsis mortality and associated hepatic dysfunction in male Sprague Dawley rats. *Mater Sci Eng C*. 2018;83:148–53.
 131. Ge L, Hu Q, Chen J, Shi M, Yang H, Zhu G. Inhibition of TNF- α sepsis of lipopolysaccharide induction using nano cerium oxide system. *Mater Sci Eng C*. 2017;77:405–10.
 132. Tarnuzzer RW, Colon J, Patil S, Seal S. Vacancy engineered ceria nanostructures for protection from radiation-induced cellular damage. *Nano Lett*. 2005;5:2573–7.
 133. Nourmohammadi E, Khoshdel-sarkarizi H, Nedaeinia R, Sadeghnia HR, Hasanzadeh L, Darroudi M, et al. Evaluation of anticancer effects of cerium oxide nanoparticles on mouse fibrosarcoma cell line. *J Cell Physiol*. 2019;234:4987–96.
 134. Casals G, Perramón M, Casals E, Portolés I, Fernández-Varo G, Morales-Ruiz M, et al. Cerium oxide nanoparticles: A new therapeutic tool in liver diseases. *Antioxidants*. 2021;10:660.
 135. Ibrahim HG, Attia N, Hashem FEZA, El Heneidy MAR. Cerium oxide nanoparticles: In pursuit of liver protection against doxorubicin-induced injury in rats. *Biomed Pharmacother*. 2018;103:773–81.
 136. Hashem RM, Rashd LA, Hashem KS, Soliman HM. Cerium oxide nanoparticles alleviate oxidative stress and decreases Nrf-2/HO-1 in D-GALN/LPS induced hepatotoxicity. *Biomed Pharmacother*. 2015;73:80–6.
 137. Manne NDPK, Arvapalli R, Graffeo VA, Bandarupalli VVK, Shokuhfar T, Patel S, et al. Prophylactic treatment with cerium oxide nanoparticles attenuate hepatic ischemia reperfusion injury in Sprague Dawley Rats. *Cell Physiol Biochem*. 2017;42:1837–46.
 138. Carvajal S, Perramón M, Oró D, Casals E, Fernández-Varo G, Casals G, et al. Cerium oxide nanoparticles display antilipogenic effect in rats with non-alcoholic fatty liver disease. *Sci Rep*. 2019;9:12848.
 139. Ribera J, Rodríguez-Vita J, Cordoba B, Portolés I, Casals G, Casals E, et al. Functionalized cerium oxide nanoparticles mitigate the oxidative stress and proinflammatory activity associated to the portal vein endothelium of cirrhotic rats. *PLoS One*. 2019;14:e0218716.
 140. Adebayo OA, Akinloye O, Adaramoye OA. Cerium oxide nanoparticles attenuate oxidative stress and inflammation in the liver of diethylnitrosamine-treated mice. *Biol Trace Elem Res*. 2020;193:214–25.
 141. Fernández-Varo G, Perramón M, Carvajal S, Oró D, Casals E, Boix L, et al. Bespoke nanoceria: An effective treatment in experimental hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2020;72:1267–82.
 142. Rocca A, Mattoli V, Mazzolai B, Ciofani G. Cerium oxide nanoparticles inhibit adipogenesis in rat mesenchymal stem cells: Potential therapeutic implications. *Pharm Res*. 2014;31:2952–62.
 143. Rocca A, Moscato S, Ronca F, Nitti S, Mattoli V, Giorgi M, et al. Pilot in vivo investigation of cerium oxide nanoparticles as a novel anti-obesity pharmaceutical formulation. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med*. 2015;11:1725–34.
 144. Lopez-Pascual A, Urrutia-Sarratea A, Lorente-Cebrián S, Martínez JA, González-Muniesa P. Cerium oxide nanoparticles regulate insulin sensitivity and oxidative markers in 3T3-L1 adipocytes and C2C12 myotubes. *Oxid Med Cell Longev*. 2019;2695289.
 145. Kobylak N, Virchenko O, Falalyeyeva T, Kondro M, Beregova T, Bodnar P, et al. Cerium dioxide nanoparticles possess anti-inflammatory properties in the conditions of the

- obesity-associated NAFLD in rats. *Biomed Pharmacother.* 2017;90:608–14.
146. Bubnov R, Babenko L, Lazarenko L, Kryvtsova M, Shcherbakov O, Zholobak N, et al. Can tailored nanocerium act as a prebiotic? Report on improved lipid profile and gut microbiota in obese mice. *EPMA J.* 2019;10:317–35.
 147. Mestre R, Cadefau N, Hortelão AC, Grzelak J, Gich M, Roig A, et al. Nanorods based on mesoporous silica containing iron oxide nanoparticles as catalytic nanomotors: Study of motion dynamics. *ChemNanoMat.* 2021;7:134–40.
 148. Girija AR, Balasubramanian S. Theragnostic potentials of core/shell mesoporous silica nanostructures. *Nanotheranostics.* 2019;3:1–40.
 149. Trewyn BG, Slowing II, Giri S, Chen HT, Lin VSY. Synthesis and functionalization of a mesoporous silica nanoparticle based on the sol-gel process and applications in controlled release. *Acc Chem Res.* 2007;40:846–53.
 150. Manzano M, Vallet-Regí M. Mesoporous silica nanoparticles for drug delivery. *Adv Funct Mater.* 2020;30:3–5.
 151. Park JH, Gu L, Von Maltzahn G, Ruoslahti E, Bhatia SN, Sailor MJ. Biodegradable luminescent porous silicon nanoparticles for in vivo applications. *Nat Mater.* 2009;8:331–6.
 152. Zeng M, Shu Y, Parra-Robert M, Desai D, Zhou H, Li Q, et al. Scalable synthesis of multicomponent multifunctional inorganic core@mesoporous silica shell nanocomposites. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2021;128:112272.
 153. Vallet-Regí M, Rámila A, Del Real RP, Pérez-Pariente J. A new property of MCM-41: Drug delivery system. *Chem Mater.* 2001;13:308–11.
 154. Parra-Robert M, Zeng M, Shu Y, Fernández-Varo G, Perramón M, Desai D, et al. Mesoporous silica coated CeO₂ nanozymes with combined lipid-lowering and antioxidant activity induce long-term improvement of the metabolic profile in obese Zucker rats. *Nanoscale.* 2021;13:8452–66.
 155. Konduru N V., Jimenez RJ, Swami A, Friend S, Castranova V, Demokritou P, et al. Silica coating influences the corona and biokinetics of cerium oxide nanoparticles. *Part Fibre Toxicol.* 2015;12:31.
 156. Gómez-Lechón MJ, Donato MT, Martínez-Romero A, Jiménez N, Castell JV, O'Connor JE. A human hepatocellular in vitro model to investigate steatosis. *Chem Biol Interact.* 2007;165:106–16.
 157. Ricchi M, Odoardi MR, Carulli L, Anzivino C, Ballestri S, Pinetti A, et al. Differential effect of oleic and palmitic acid on lipid accumulation and apoptosis in cultured hepatocytes. *J Gastroenterol Hepatol.* 2009;24:830–40.
 158. Chiappini F, Coilly A, Kadar H, Gual P, Tran A, Desterke C, et al. Metabolism dysregulation induces a specific lipid signature of nonalcoholic steatohepatitis in patients. *Sci Rep.* 2017;7:46658.
 159. Palladini G, Di Pasqua LG, Berardo C, Siciliano V, Richelmi P, Mannucci B, et al. Fatty acid desaturase involvement in non-alcoholic fatty liver disease rat models: Oxidative stress versus metalloproteinases. *Nutrients.* 2019;11:799.
 160. Puri P, Wiest MM, Cheung O, Mirshahi F, Sargeant C, Min H-K, et al. The plasma lipidomic signature of nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology.* 2009;50:1827–38.
 161. Hudgins LC, Hellerstein M, Seidman C, Neese R, Diakun J, Hirsch J. Human fatty acid synthesis is stimulated by a eucaloric low fat, high carbohydrate diet. *J Clin Invest.* 1996;97:2081–91.
 162. Paglialunga S, Dehn CA. Clinical assessment of hepatic de novo lipogenesis in non-alcoholic fatty liver disease. *Lipids Health Dis.* 2016;15:159.
 163. Gaiser BK, Fernandes TF, Jepson MA, Lead JR, Tyler CR, Baalousha M, et al. Interspecies comparisons on the uptake and toxicity of silver and cerium dioxide nanoparticles. *Environ Toxicol Chem.* 2012;31:144–54.
 164. Singh R, Singh S. Redox-dependent catalase mimetic cerium oxide-based nanozyme

- protect human hepatic cells from 3-AT induced acatalasemia. *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 2019;175:625–35.
165. Azari A, Shokrzadeh M, Zamani E, Amani N, Shaki F. Cerium oxide nanoparticles protects against acrylamide induced toxicity in HepG2 cells through modulation of oxidative stress. *Drug Chem Toxicol*. 2019;42:54–9.
 166. Bellanti F, Villani R, Tamborra R, Blonda M, Iannelli G, di Bello G, et al. Synergistic interaction of fatty acids and oxysterols impairs mitochondrial function and limits liver adaptation during nafld progression. *Redox Biol*. 2018;15:86–96.
 167. Bellanti F, Villani R, Facciorusso A, Vendemiale G, Serviddio G. Lipid oxidation products in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis. *Free Radic Biol Med*. 2017;111:173–85.
 168. Serviddio G, Bellanti F, Villani R, Tamborra R, Zerbinati C, Blonda M, et al. Effects of dietary fatty acids and cholesterol excess on liver injury: A lipidomic approach. *Redox Biol*. 2016;9:296–305.
 169. Kitchin KT, Grulke E, Robinette BL, Castellon BT. Metabolomic effects in HepG2 cells exposed to four TiO₂ and two CeO₂ nanomaterials. *Env Sci Nano*. 2014;1:466–77.
 170. Kitchin KT, Stirdivant S, Robinette BL, Castellon BT, Liang X. Metabolomic effects of CeO₂, SiO₂ and CuO metal oxide nanomaterials on HepG2 cells. *Part Fibre Toxicol*. 2017;14:50.
 171. Sun H, Yang W, Tian Y, Zeng X, Zhou J, Mok MTS, et al. An inflammatory-CCRK circuitry drives mTORC1-dependent metabolic and immunosuppressive reprogramming in obesity-associated hepatocellular carcinoma. *Nat Commun*. 2018;9:5214.
 172. Ansari AZ, Bose S, Patra JK, Shin NR, Lim DW, Kim KW, et al. A controlled fermented Samjunghwan herbal formula ameliorates non-alcoholic hepatosteatosis in HepG2 cells and OLETF rats. *Front Pharmacol*. 2018;9:596.
 173. Xiao Z, Chu Y, Qin W. IGFBP5 modulates lipid metabolism and insulin sensitivity through activating AMPK pathway in non-alcoholic fatty liver disease. *Life Sci*. 2020;256:117997.
 174. Araya J, Rodrigo R, Videla LA, Thielemann L, Orellana M, Pettinelli P, et al. Increase in long-chain polyunsaturated fatty acid n-6/n-3 ratio in relation to hepatic steatosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Clin Sci*. 2004;106:635–43.
 175. Risé P, Eligini S, Ghezzi S, Colli S, Galli C. Fatty acid composition of plasma, blood cells and whole blood: Relevance for the assessment of the fatty acid status in humans. *Prostaglandins Leukot Essent Fat Acids*. 2007;76:363–9.
 176. Zeng X, Zhu M, Liu X, Chen X, Yuan Y, Li L, et al. Oleic acid ameliorates palmitic acid induced hepatocellular lipotoxicity by inhibition of ER stress and pyroptosis. *Nutr Metab*. 2020;17:11.
 177. Yamada K, Mizukoshi E, Sunagozaka H, Arai K, Yamashita T, Takeshita Y, et al. Characteristics of hepatic fatty acid compositions in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Liver Int*. 2015;35:582–90.
 178. Puri P, Baillie RA, Wiest MM, Mirshahi F, Choudhury J, Cheung O, et al. A lipidomic analysis of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2007;46:1081–90.
 179. Kotronen A, Seppänen-Laakso T, Westerbacka J, Kiviluoto T, Arola J, Ruskeepää AL, et al. Hepatic stearoyl-CoA desaturase (SCD)-1 activity and diacylglycerol but not ceramide concentrations are increased in the nonalcoholic human fatty liver. *Diabetes*. 2009;58:203–8.
 180. Wang X, Cao Y, Fu Y, Guo G, Zhang X. Liver fatty acid composition in mice with or without nonalcoholic fatty liver disease. *Lipids Health Dis*. 2011;10:234.
 181. Ma C, Kesarwala AH, Eggert T, Medina-echeverz J, Kleiner DE, Jin P, et al. NAFLD causes selective CD4⁺ T lymphocyte loss and promotes hepatocarcinogenesis. 2016;531:253–7.
 182. Ballestri S, Nascimbeni F, Romagnoli D, Baldelli E, Lonardo A. The role of nuclear receptors in the pathophysiology, natural course, and drug treatment of NAFLD in

- humans. *Adv Ther.* 2016;33:291–319.
183. Chithrani BD, Ghazani AA, Chan WCW. Determining the size and shape dependence of gold nanoparticle uptake into mammalian cells. *Nano Lett.* 2006;6:662–8.
 184. Jiang W, Kim BYS, Rutka JT, Chan WCW. Nanoparticle-mediated cellular response is size-dependent. *Nat Nanotechnol.* 2008;3:145–50.
 185. Lu F, Wu SH, Hung Y, Mou CY. Size effect on cell uptake in well-suspended, uniform mesoporous silica nanoparticles. *Small.* 2009;5:1408–13.
 186. Bartneck M, Warzecha KT, Tacke F. Therapeutic targeting of liver inflammation and fibrosis by nanomedicine. *Hepatobiliary Surg Nutr.* 2014;3:364–76.
 187. Conner SD, Schmid SL. Regulated portals of entry into the cell. *Nature.* 2003;422:37–44.
 188. Blanco E, Shen H, Ferrari M. Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery. *Nat Nanotechnol.* 2015;33:941–51.
 189. Yan M, Yang C, Huang B, Huang Z, Zeqian L, Zhang X, et al. Systemic toxicity induced by aggregated layered double hydroxide nanoparticles. *Int J Nanomedicine.* 2017;12:7183–95.
 190. Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor- α : Direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science (80-).* 1993;259:87–92.
 191. Popa C, Netea MG, Van Riel PLCM, Van Der Meer JWM, Stalenhoef AFH. The role of TNF- α in chronic inflammatory conditions, intermediary metabolism, and cardiovascular risk. *J Lipid Res.* 2007;48:751–2.
 192. Reilly SM, Saltiel AR. Adapting to obesity with adipose tissue inflammation. *Nat Rev Endocrinol.* 2017;13:633–43.
 193. Lago F, Gómez R, Gómez-Reino JJ, Dieguez C, Gualillo O. Adipokines as novel modulators of lipid metabolism. *Trends Biochem Sci.* 2009;34:500–10.
 194. Goodman RP, Markhard AL, Shah H, Sharma R, Owen S, Clish CB, et al. Hepatic NADH reductive stress underlies common variation in metabolic traits. *Nature.* 2020;583:122–6.
 195. Wang Z, Shen X, Gao X, Zhao Y. Simultaneous enzyme mimicking and chemical reduction mechanisms for nanoceria as a bio-antioxidant: A catalytic model bridging computations and experiments for nanozymes. *Nanoscale.* 2019;11:13289–99.
 196. Innes JK, Calder PC. Omega-6 fatty acids and inflammation. *Prostaglandins Leukot Essent Fat Acids.* 2018;132:41–8.
 197. Naughton SS, Mathai ML, Hryciw DH, McAinch AJ. Linoleic acid and the pathogenesis of obesity. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2016;125:90–9.
 198. Carvajal S, Perramón M, Casals G, Oró D, Ribera J, Morales-Ruiz M, et al. Cerium oxide nanoparticles protect against oxidant injury and interfere with oxidative mediated kinase signaling in human-derived hepatocytes. *Int J Mol Sci.* 2019;20:5959.
 199. Belloni L, Di Cocco S, Guerrieri F, Nunn ADG, Piconese S, Salerno D, et al. Targeting a phospho-STAT3-miRNAs pathway improves vesicular hepatic steatosis in an in vitro and in vivo model. *Sci Rep.* 2018;8:13638.
 200. Grohmann M, Wiede F, Dodd GT, Gurzov EN, Ooi GJ, Butt T, et al. Obesity drives STAT-1-dependent NASH and STAT-3-dependent HCC. *Cell.* 2018;175:1289–306.
 201. Mueller KM, Hartmann K, Kaltenecker D, Vettorazzi S, Bauer M, Mauser L, et al. Adipocyte glucocorticoid receptor deficiency attenuates aging- and HFD-induced obesity and impairs the feeding-fasting transition. *Diabetes.* 2017;66:272–86.
 202. St-Pierre J, Drori S, Uldry M, Silvaggi JM, Rhee J, Jäger S, et al. Suppression of reactive oxygen species and neurodegeneration by the PGC-1 transcriptional coactivators. *Cell.* 2006;127:397–408.
 203. Barbu A, Hamad OA, Lind L, Ekdahl KN, Nilsson B. The role of complement factor C3 in lipid metabolism. *Mol Immunol.* 2015;67:101–7.
 204. Lamming DW, Sabatini DM. A central role for mTOR in lipid homeostasis. *Cell Metab.* 2013;18:465–9.

ANEXO 1. Otras publicaciones relacionadas con la tesis doctoral

A continuación se citan publicaciones no incluidas en la tesis doctoral en las cuales se ha colaborado durante el desarrollo de la tesis doctoral:

1. Zeng M, Shu Y, **Parra-Robert M**, Desai D, Zhou H, Li Q, Rong Z, Karaman DS, Yang H, Peng J, Fernandez-Varo G, Jiménez W, Casals G, Puntos V, Rosenholm JM, Casals E. Scalable synthesis of multicomponent multifunctional inorganic core@mesoporous silica shell nanocomposites. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2021;128:112272. Epub 2021 Jun 24. IF (2020): 7,328. (Q1) Materials Science, Biomaterials.
2. Casals E, Zeng M, **Parra-Robert M**, Fernández-Varo G, Morales-Ruiz M, Jiménez W, Puntos V, Casals G. Cerium Oxide Nanoparticles: Advances in Biodistribution, Toxicity, and Preclinical Exploration. *Small*. 2020;e1907322. IF (2020): 13,281. (Q1) Nanoscience and Nanotechnology.
3. Carvajal S, Perramón M, Oró D, Casals E, Fernández-Varo G, Casals G, **Parra M**, González de la Presa B, Ribera J, Pastor O, Morales-Ruiz M, Puntos V, Jiménez W. Cerium oxide nanoparticles display antilipogenic effect in rats with non-alcoholic fatty liver disease. *Scientific Reports*. 2019;9,12848. IF (2019): 3,998. (Q1) Multidisciplinary Sciences.

ANEXO 2. Comunicaciones a congresos relacionadas con la tesis doctoral

A continuación se citan las comunicaciones a congresos nacionales e internacionales derivadas del desarrollo de la tesis doctoral:

1. **Parra-Robert M**, Fernández-Varo G, Zeng M, Shu Y, Perramon M, Desai D, Zhou H, Li Q, Rong Z, Morales-Ruiz M, Rosenholm JM, Jiménez W, Puntos V, Casals E, Casals G. Mesoporous silica-coated nanocería reduce metabolic alterations associated with obesity. Anual Congress of Nanoscience and Nanotechnology. Online. 2020.
2. Casals G, **Parra M**, Fernández-Varo F, Perramon M, Morales-Ruiz M, Casals E, Puntos V, Jiménez W. Las nanopartículas de óxido de cerio tienen efectos hipolipemiantes en ratas Zucker obesas. Congreso de la Sociedad Española de Endocrinología y Nutrición (SEEN). Bilbao, España. 2019.
3. Casals E, Muling Z, **Parra M**, Fernández-Varo G, Jiménez W, Puntos V, Casals G. Catalytic Cerium Oxide Nanoparticles in Nanomedicine and Their Use in Liver Diseases. 19th IEEE International Conference on Nanotechnology (IEEE-NANO). Macau, China. 2019.
4. **Parra-Robert M**, Fernández-Varo G, Casals E, Cano C, Morales Ruiz M, Puntos V, Jiménez W, Casals G. Cerium oxide nanoparticles are lipid-lowering agents in obese Zucker rats. 23rd IFCC-EFLM European Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (EuroMedLab). Barcelona, España. 2019.
5. Perramón Corominas M, Carvajal S, Oró D, Casals E, Fernández Varo G, Casals G, **Parra-Robert M**, Ribera J, Morales-Ruiz M, Puntos V, Jiménez W. Cerium oxide nanoparticles present antilipogenic and antiinflammatory effects in rats with diet-induced non-alcoholic fatty liver disease. EASL International Liver Congress. Vienna, Austria. 2019.
6. Casals G, **Parra-Robert M**, Fernández Varo G, Casals E, Massana N, Cano C, Morales-Ruiz M, Puntos V, Jiménez W. Evaluación de los efectos de las nanopartículas de óxido de cerio en el síndrome metabólico. XII Congreso Nacional del Laboratorio Clínico. Bilbao, España. 2018.