



UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

## Papel de la enterocina FGF15/19 en la plasticidad adiposa y cardíaca

Samantha Morón Ros

**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](http://www.tdx.cat)) i a través del Dipòsit Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://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](http://www.tdx.cat)) y a través del Repositorio Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://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](http://www.tdx.cat)) service and by the UB Digital Repository ([diposit.ub.edu](http://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

# **Papel de la enterocina FGF15/19 en la plasticidad adiposa y cardíaca**

A handwritten signature in blue ink, appearing to be "Samantha Morón Ros".

Samantha Morón Ros  
2020



Grupo de Metabolismo y Enfermedades Moleculares

Departamento de Bioquímica y Biomedicina Molecular  
Facultad de Biología, Universidad de Barcelona

## **Papel de la enterocina FGF15/19 en la plasticidad adiposa y cardíaca**

Memoria presentada por

**Samantha Morón Ros**

para optar al grado de doctora por la Universidad de Barcelona

Firma de los directores



Dr. Francesc Villarroya Gombau  
*Director y tutor*



Dr. Aleix Gavaldà Navarro  
*Codirector*

Barcelona, 2020





La presente tesis doctoral, que lleva por título **Papel de la enterocina FGF15/19 en la plasticidad adiposa y cardíaca**, se estructura según la normativa vigente en lo referente al formato de tesis clásica, establecida por la Facultad de Biología de la Universidad de Barcelona. Consta de los siguientes apartados:

Sinopsis

Índice

Listado de abreviaturas

Listado de figuras y tablas

Introducción

Objetivos

Materiales y métodos

Resultados

Discusión

Conclusiones

Bibliografía



**Sinopsis**



FGF19 in humans (ortholog of FGF15 in mice) is a fibroblast growth factor (FGF) with endocrine effects. It is an enterokine secreted by the ileum after food intake in response to bile acids. The main target of FGF15/19 is the liver, where it regulates the synthesis of bile acids and their release (negative feed-back). However, FGF15/19 may also have hormone-like functions in other tissues and in the whole-body homeostasis, such as the improvement of insulin sensitivity or lowering the body weight.

In this thesis we explored the role of FGF15/19 in favoring the thermogenic capacity of brown adipose tissue (non-shivering thermogenesis) and white adipose tissue (browning) in response to environmental stimuli. Fgf15-null mice showed impaired browning when exposed to cold. Moreover, the overexpression of FGF15 and FGF19 in wild-type mice increased the expression of thermogenic genes in white adipose tissue. Our results suggest that the role of FGF15/19 in browning is likely to be due to indirect effects mediated either by the central nervous system or by intermediate batokines, such as CXCL14.

On the other hand, we described that human patients with cardiac pathologies show lowered levels of FGF19 in plasma. Fgf15-null mice fed a high fat diet showed reduced heart weight and reduced area of their cardiomyocytes compared to wild-type mice. Fgf15-null mice had smaller hearts in physiological and pathological conditions eliciting cardiac hypertrophy. Fgf15-null mice also had impaired development of fibrosis and altered gene expression in relation to the use of glucose or fatty acids as substrates in cardiac hypertrophy. We conclude that FGF15/19 is able to affect the functionality of cardiomyocyte and is necessary to an appropriate cardiac plasticity and correct cardiac adaptation to physiopathological events.

FGF15/19 may be considered as a potential therapeutic agent in relation to adipose tissue and cardiac dysfunction. Further studies must be taken to further explore the mechanisms, either direct and/or indirect, by which FGF15/19 targets organs such as adipose tissues and heart.



# Índice





<b>Abreviaturas</b>	<b>1</b>
<b>Figuras y tablas</b>	<b>7</b>
<b>Introducción. Bloque 1. El tejido adiposo</b>	<b>15</b>
1.1. La obesidad	15
1.2. El tejido adiposo	16
1.2.1. Distribución de tejido adiposo en ratón	21
1.2.2. Distribución de tejido adiposo en humano	23
1.3. Diferenciación adipocitaria	25
1.3.1. Fase de determinación de linaje	26
1.3.2. Fase de diferenciación terminal	27
1.3.2.1. Fase de diferenciación terminal (adipocito blanco)	27
1.3.2.2. Fase de diferenciación terminal (adipocito marrón)	28
1.3.2.3. Diferenciación y transdiferenciación de los adipocitos beige	30
1.4. Funciones del tejido adiposo	32
1.4.1. Funciones del tejido adiposo blanco	33
1.4.1.1. Lipogénesis	34
1.4.1.2. Lipólisis	36
1.4.1.3. Función secretora del TAB	38
1.4.2. Funciones del tejido adiposo marrón	40
1.4.2.1. Termogénesis	40
1.4.2.1.1. Activación de la termogénesis por estímulos adrenérgicos	42
1.4.2.1.2. Regulación no adrenérgica de la termogénesis adaptativa y del <i>browning</i>	43
1.4.2.1.3. Mecanismos de la producción de calor por parte de los adipocitos marrones y beige: la proteína UCP1	47
1.4.2.2. TAM como órgano secretor: las batocinas	45
<b>Introducción. Bloque 2. El corazón y la hipertrofia cardíaca</b>	<b>53</b>
2.1. El corazón y la hipertrofia cardíaca	53

2.1.1. Marcadores de hipertrofia cardíaca	57
2.1.2. Características estructurales y funcionales del corazón durante la hipertrofia	58
2.1.3. Metabolismo cardíaco en la hipertrofia	59
2.1.4. Hipertrofia cardíaca provocada por estrés térmico	62
<b>Introducción. Bloque 3. FGF15/19</b>	<b>65</b>
3.1. Familia de los <i>Fibroblast Growth Factors</i> (FGFs)	65
3.1.1. Clasificación funcional	66
3.1.2. Los receptores de FGF (FGFRs)	68
3.1.3. Correceptores	68
3.2. FGFs endocrinos	70
3.2.1. FGF21	72
3.2.1.1. FGF21 en hígado	74
3.2.1.2. FGF21 en tejido adiposo	75
3.2.1.3. FGF21, tejido adiposo marrón y <i>browning</i> del tejido adiposo blanco	77
3.2.1.4. FGF21 y músculo esquelético	78
3.2.1.5. FGF21 y corazón	78
3.2.1.6. FGF21 y Sistema Nervioso Central	79
3.2.1.7. FGF21 en humanos	80
3.2.2. FGF15/19	81
3.2.2.1. Expresión, regulación y función general (Regulación de los Ácidos Biliares)	81
3.2.2.2. FGF15/19 y el metabolismo de los carbohidratos	86
3.2.2.3. FGF19 y la síntesis de proteínas	87
3.2.2.4. FGF19 y el metabolismo lipídico	87
3.2.2.5. FGF19 y el metabolismo energético	88
3.2.2.6. FGF19 y el tejido muscular	89
3.2.2.7. FGF19 y enfermedades humanas	90
3.2.2.8. FGF19 como diana terapéutica (FGF19, proliferación	92

y carcinoma)	
3.2.3. Relación entre FGF21 y FGF19	98
<b>Objetivos</b>	<b>99</b>
<b>Materiales y métodos</b>	<b>103</b>
1. Modelos animales	105
1.1. Modelos de intervención en animales	105
1.1.1. Experimento de inducción de la termogénesis por frío y de adaptación de la termoneutralidad	105
1.1.2. Sobreexpresión de FGF15: Ad-FGF15 y Ad-Control	106
1.1.3. Sobreexpresión de FGF19: AAV8-FGF19 y AAV8-Control	106
1.1.4. Inducción de la hipertrofia cardíaca	106
1.1.5. Tratamiento con el agonista específico del receptor adrenérgico $\beta$ 3 CL316,243	107
1.1.6. Alimentación de ratones deficientes en <i>Fgf15</i> con una dieta alta en grasas	107
1.1.7. GTT	108
1.1.8. ITT	108
1.2. Obtención de muestras	108
1.3. Análisis histológico e inmunohistoquímico	109
2. Cultivos celulares	109
2.1. Cultivos de adipocitos SGBS	109
2.2. Cultivo de cardiomiocitos de rata	110
2.3. Cultivos de fibroblastos cardíacos de rata	111
2.4. Tratamiento con FGF19 <i>in vitro</i>	111
3. Análisis de la expresión génica	112
3.1. Aislamiento de RNA	112
3.2. Transcripción inversa	112
3.3. PCR cuantitativa en tiempo real	113
4. Extracción de proteínas y Western Blot	114
4.1. Obtención de los extractos proteicos a partir de cultivos celulares y de muestras de tejido	114

4.2. Electroforesis, transferencia e inmunodetección	<b>115</b>
5. Cuantificación de proteínas solubles y análisis de metabolitos en plasma	<b>116</b>
6. Determinación de la temperatura mediante cámara térmica	<b>117</b>
7. Determinación de la fosforilación de proteínas cinasas	<b>117</b>
8. Estudios en humanos	<b>118</b>
8.1. Determinación de los niveles circulantes de FGF19 en muestras de plasma de pacientes con dolencias cardíacas	<b>118</b>
8.2. Muestras humanas de pacientes para determinar los niveles circulantes de FGF19 y su correlación con diferentes genes en tejido adiposo subcutáneo	<b>120</b>
9. Ecocardiografías	<b>122</b>
10. Estadística	<b>122</b>
<b>Resultados: FGF15/19 y la plasticidad en tejido adiposo</b>	<b>123</b>
1. Los niveles circulantes de FGF19 correlacionan con la expresión génica de UCP1 en tejido adiposo subcutáneo en humanos	<b>125</b>
2. FGF15 es necesario para la termogénesis adaptativa de tejido adiposo blanco en ratones a temperatura ambiente	<b>127</b>
3. La adaptación termogénica de los tejidos adiposos está alterada en ratones Fgf15-null	<b>132</b>
4. La sobreexpresión de FGF15 y FGF19 provocan <i>browning</i> en el TABi	<b>141</b>
5. Efectos de FGF15/19 sobre la respuesta de los tejidos adiposos a activadores adrenérgicos	<b>150</b>
6. FGF19 no induce <i>browning</i> en adipocitos humanos <i>in vitro</i>	<b>158</b>
<b>Resultados: FGF15/19 y la plasticidad en corazón</b>	<b>163</b>
1. Los niveles de FGF19 se encuentran alterados en pacientes con patologías cardíacas	<b>165</b>
2. Los ratones Fgf15-null muestran alteraciones en el desarrollo de hipertrofia cardíaca por obesidad	<b>166</b>
3. Alteración de la hipertrofia cardíaca inducida por el frío en ratones Fgf15-null	<b>171</b>

4. Papel de FGF15 en hipertrofia cardíaca patológica inducida por isoproterenol	<b>176</b>
5. La sobreexpresión de FGF15/19 provoca un leve aumento de la hipertrofia cardíaca inducida por isoproterenol	<b>183</b>
6. Efectos del tratamiento con FGF19 en cultivos primarios de cardiomiocitos	<b>190</b>
<b>Discusión: FGF15/19 y la plasticidad en tejido adiposo</b>	<b>195</b>
<b>Discusión: FGF15/19 y la plasticidad en corazón</b>	<b>207</b>
<b>Conclusiones</b>	<b>217</b>
<b>Bibliografía</b>	<b>221</b>



# Abreviaturas





<b>Abreviatura</b>	<b>Significado</b>
<b>ACC</b>	<i>Acetyl coenzyme a carboxylase</i> (Acetil Coenzima a carboxilasa)
<b>AdipoQ</b>	<i>Adiponectin</i> (adiponectina)
<b>ADP</b>	Adenosina difosfato
<b>ADRB3</b>	<i>aderenoreceptor-β-3</i> (receptor β-3-adrenérgico)
<b>AMP</b>	Adenosina monofosfato
<b>AMPK</b>	<i>AMP -activated protein kinase</i> (proteína cinasa activada por AMP)
<b>ATGL</b>	<i>Adipose triglyceride lipase</i> (lipasa de triglicéridos adiposa)
<b>ATP</b>	Adenosina trifosfato
<b>BMI</b>	<i>Body mass index</i> (Índice de masa corporal)
<b>BMP</b>	<i>Bone morphogenic protein</i> (Proteína morfogenética ósea)
<b>C/EBP</b>	<i>CCAAT-enhancer-binding protein</i> (Proteína de unión potenciadora de la secuencia CCAAT)
<b>cAMP</b>	<i>Cyclic AMP</i> (AMP cíclico)
<b>cDNA</b>	<i>Complementary DNA</i> (ADN complementario)
<b>ChRE</b>	<i>Carbohydrate response element</i> (Elemento de respuesta a carbohidratos)
<b>ChREBP</b>	<i>Carbohydrate response enelemnt-binding protein</i> (proteína de unión a elemento de respuesta a carbohidratos)
<b>COX</b>	<i>Cyclooxygenase</i> (ciclooxigenasa)
<b>CPT1</b>	<i>Carnitine palmitoytransferase I</i> (carnitina palmitoiltransferasa I)
<b>CRE</b>	<i>cAMP response element</i> (elemento de respuesta a AMP cíclico)
<b>CREB</b>	<i>cAMP response element-binding protein</i> (proteína de unión a elemento de respuesta a AMP cíclico)
<b>CXCL</b>	<i>Chemokine C-X-C motif</i> (Ligando de tipo quimiocina con motivo C-X-C)
<b>Cyp7a1</b>	<i>Cholesterol 7 alpha-hydroxylase</i> (Colesterol 7 alfa-hidroxilasa)
<b>DIO</b>	<i>Diet-induced obesity</i> (Obesidad inducida por dieta)
<b>DNA</b>	<i>Dexoxyribonucleic acid</i> (ácido desoxiribonucleico)
<b>ERK</b>	<i>Extracellular signal-regulated kinases</i> (cinasa reguladas por señales extracelulares)
<b>FABP4</b>	<i>Fatty acid binding protein</i> (proteína de unión a ácidos grasos)
<b>FGF</b>	<i>Fibroblast growth factor</i> (factor de crecimiento de fibroblastos)

<b>FGFR</b>	<i>Fibroblast growth factor receptor</i> (receptor de factor de crecimiento de fibroblastos)
<b>FXR</b>	<i>Farnesoid X Receptor</i> (Receptor X Farnesoide)
<b>FXRE</b>	<i>Farnesoid X Receptor response element</i> (Elemento de respuesta a Receptor X Farnesoide)
<b>GDF</b>	<i>Growth differentiation factor</i> (Factor de diferenciación de crecimiento)
<b>GLP1</b>	<i>Glucagon-like peptide-1</i> (péptido similar al glucagón tipo 1)
<b>GLUT</b>	<i>Glucose transporter</i> (transportador de glucosa)
<b>HCC</b>	<i>Hepatocellular carcinoma</i> (carcinoma hepatocelular)
<b>HFD</b>	<i>High fat diet</i> (Dieta alta en grasas)
<b>HSGAG</b>	<i>Heparan sulfate glycosaminoglycan</i> (glicosaminoglicanos de heparan sulfato)
<b>HSL</b>	<i>Hormone sensitive lipase</i> (lipasa sensible a hormonas)
<b>IL</b>	Interleucina
<b>KLB</b>	$\beta$ -Klotho
<b>KO</b>	<i>Knock-out</i>
<b>LD</b>	<i>Lipid droplets</i> (Gotas lipídicas)
<b>MAPK</b>	<i>Mitogen-activated protein kinase</i> (proteína cinasa activada por mitógenos)
<b>MGL</b>	<i>Monoacylglycerol lipase</i> (Lipasa monoacilglicerol)
<b>MHC</b>	<i>Myosin heavy chain</i>
<b>mRNA</b>	<i>messenger RNA</i> (ARN mensajero)
<b>MS</b>	<i>Metabolic syndrome</i> (síndrome metabólico)
<b>MSCs</b>	<i>Mesenchymal stem cells</i> (Células madre mesenquimales)
<b>Myf5</b>	<i>Mitogenic factor 5 (factor mitogénico 5)</i>
<b>NA</b>	Noradrenalina
<b>NAFLD</b>	<i>Non-alcoholic fatty liver disease</i> (enfermedad del hígado graso no alcohólica)
<b>NASH</b>	<i>Non-alcoholic steatohepatitis</i> (esteatohepatitis no alcohólica)
<b>NEFA</b>	<i>Non-esterified fatty acid</i> (ácido graso no esterificado)
<b>NP</b>	<i>Natriuretic peptide</i> (Péptido natriurético)
<b>PGC1<math>\alpha</math></b>	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha</i>

<b>PKA</b>	<i>Protein kinase A</i> (Proteína cinasa A)
<b>PPAR</b>	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor</i> (Receptor activador por proliferación peroxisomal)
<b>PRDM16</b>	<i>PRD1-BF-RIZ1 homologous domain containing protein-16</i>
<b>QM</b>	Quilomicrón
<b>RNA</b>	<i>Ribonucleic acid</i> (ácido ribonucleico)
<b>RXR</b>	<i>Retonoids X receptor</i> (Receptor de retinoides X)
<b>SGBS</b>	<i>Simpson-Golabi-Behmel syndrome</i>
<b>SHP</b>	<i>Small heterodimer partner</i>
<b>SNC</b>	Sistema nervioso central
<b>STAT</b>	Trasductor de señal y activador de la transcripción
<b>SVF</b>	<i>Stroma vascular fraction</i> (Fracción del estroma vascular)
<b>T2DM</b>	<i>Type 2 diabetes mellitus</i> (Diabetes Mellitus de tipo 2)
<b>T3</b>	<i>Triiodothyronine</i>
<b>T4</b>	<i>Tetraiodothyronine</i>
<b>TAB</b>	Tejido adiposo blanco
<b>TAM</b>	Tejido adiposo marrón
<b>TG</b>	Triglicéridos
<b>TGR5</b>	<i>G protein-coupled bile acid receptor 5</i>
<b>TNF</b>	<i>Tumour necrosis factor</i> (factor de necrosis tumoral)
<b>UCP</b>	<i>Uncoupling protein</i> (Proteína desacopladora)
<b>VLDL</b>	<i>Very low density lipoprotein</i> (Lipoproteína de muy baja densidad)
<b>WT</b>	<i>Wild type</i> (tipo salvaje)



# Figuras y Tablas



<b>Número de Figura</b>	<b>Descripción</b>
1	Componentes del tejido adiposo.
2	Clasificación de los principales tipos de adipocitos.
3	Principales depósitos de tejido adiposo en ratón.
4	Principales depósitos de a) TAM en neonatos humanos y b y c) de TAM y TAB en humanos adultos.
5	Diferenciación de los adipocitos marrones.
6	Diagrama de la diferenciación adipocitaria.
7	Metabolismo lipídico en los adipocitos.
8	Activación clásica de la termogénesis adaptativa en el tejido adiposo marrón.
9	Elementos de la cadena de transporte de electrones de adipocitos marrones y beige.
10	Esquema de las alteraciones cardíacas sufridas durante el desarrollo de la hipertrofia patológica y la remodelación cardíaca.
11	Desarrollo de hipertrofia en corazón debido a estímulos de tipo fisiológico o patológico.
12	Esquema de las subfamilias FGF.
13	Representación esquemática de los receptores de FGF y de sus correceptores.
14	Comparación entre la expresión de FGF21 en ratón y en humano.
15	Esquema de la activación de la expresión, síntesis y secreción de FGF21 en un adipocito marrón.
16	La expresión de FGF15/19 en diferentes tejidos.
17	Regulación transcripcional de la expresión de FGF19.
18	Regulación enterohepática de la síntesis de ácidos biliares mediante FGF19.
19	Resumen de las funciones que ejercen FGF15 y FGF19 en animales y humanos.
20	Representación esquemática de los efectos beneficiosos que tienen FGF19 y FGF21 como tratamiento farmacológico.
21	Los niveles sistémicos de FGF19 correlacionan negativamente con el BMI y la masa del tejido adiposo en humanos.
22	Los niveles sistémicos de FGF19 correlacionan positivamente con los niveles de expresión de genes termogénicos en tejido adiposo subcutáneo.
23	La falta de FGF15 no provoca cambios en TAM a temperatura ambiente.
24	No hay diferencias entre genotipos en cuanto a la temperatura del TAMi.



25 FGF15 es requerido en TABi para la termogénesis adaptativa en ratones a  
temperatura ambiente.

26 No hay diferencias entre genotipos en cuanto a la temperatura del TABi.

27 La falta de FGF15 no impide la activación termogénica del TAM en ratones a 4 °C.

28 Los niveles proteicos de UCP1 no se encuentran alterados en TAM ante el déficit  
de *Fgf15*.

29 La expresión de batocinas en el TAMi se ve alterada en ratones *Fgf15*-null.

30 Los niveles proteicos de UCP1 se encuentran alterados en TABi ante el déficit de  
*Fgf15*.

31 El déficit de *Fgf15*-null no impide mantener la temperatura en las regiones del  
TAMi y TABi.

32 La adaptación del TABe al desafío termogénico se encuentra impedida en ratones  
*Fgf15*-null.

33 La sobreexpresión sistémica de FGF15 no provoca cambios en el TAM.

34 La sobreexpresión sistémica de *Fgf15* provoca un aumento del *browning* en TABi.

35 La sobreexpresión de FGF15 provoca un aumento de los niveles de UCP1 en TABi.

36 La sobreexpresión sistémica de FGF19 no provoca cambios en el TAM.

37 La sobreexpresión sistémica de FGF19 provoca un aumento del *browning* en TABi.

38 La sobreexpresión de FGF19 provoca un aumento de los niveles de UCP1 en TABi.

39 El tratamiento crónico con CL (agonista del receptor adrenérgico  $\beta$ 3) no provoca  
cambios en el TAM entre ratones WT y *Fgf15*-null.

40 El tratamiento crónico con CL (agonista del receptor adrenérgico  $\beta$ 3) no provoca  
cambios en el TABi entre ratones WT y *Fgf15*-null.

41 El tratamiento con ISO (agonista de los receptores adrenérgico  $\beta$ ) no provoca  
cambios en el TABi entre ratones WT y *Fgf15*-null.

42 La sobreexpresión de FGF15 magnifica el aumento de la expresión de genes  
termogénicos por el tratamiento con ISO.

43 La sobreexpresión de FGF19 no provoca cambios en la expresión de genes  
termogénicos por el tratamiento con ISO.

44 Las células SGBS responden al tratamiento con FGF19 sin comprometer por ello  
su morfología celular.

45 El tratamiento de FGF19 en células SGBS no aumenta los niveles de expresión de  
genes termogénicos.

46 Niveles sistémicos en pg/mL de (A) FGF19 o (B) FGF21 en pacientes control,  
pacientes con insuficiencia cardíaca o con infarto de miocardio.

- 47 La falta de FGF15 provoca una alteración de la hipertrofia patológica asociada a una dieta obesogénica (HFD).
- 48 La falta de FGF15 en una situación de hipertrofia patológica (HFD) provoca una leve disminución de la expresión de genes relacionados con la hipertrofia.
- 49 La falta de FGF15 en una situación de hipertrofia patológica (HFD) provoca una disminución de la expresión de genes relacionados con el metabolismo cardíaco.
- 50 La falta de FGF15 provoca una alteración de la hipertrofia fisiológica asociada a frío.
- 51 La falta de FGF15 en una situación de hipertrofia fisiológica (desafío termogénico) provoca una disminución de la expresión de genes relacionados con la fibrosis y remodelación de la matriz extracelular en el corazón.
- 52 La falta de FGF15 en una situación de hipertrofia fisiológica (desafío termogénico) provoca una disminución de la expresión de genes relacionados con el metabolismo cardíaco.
- 53 La falta de FGF15 provoca una alteración de la hipertrofia patológica provocada por ISO.
- 54 La falta de FGF15 provoca una disminución de la fibrosis en hipertrofia cardíaca (por ISO).
- 55 La falta de FGF15 en una situación de hipertrofia patológica (tratamiento con ISO) no provoca cambios significativos en la expresión de genes relacionados con la fibrosis cardíaca y con la remodelación cardíaca.
- 56 La falta de FGF15 en una situación de hipertrofia patológica (tratamiento con ISO) no provocó cambios en la expresión de genes relacionados con el metabolismo cardíaco.
- 57 La sobreexpresión de FGF15 no provoca cambios significativos en el peso de los corazones pero sí en el área de los cardiomiocitos en condiciones basales y de inducción de hipertrofia por ISO.
- 58 La sobreexpresión de FGF15 no influye en la expresión de genes relacionados con la hipertrofia cardíaca.
- 59 La sobreexpresión de FGF19 no provoca cambios en el peso de los corazones pero sí en el área de los cardiomiocitos en hipertrofia (por ISO).
- 60 Efectos de la sobreexpresión de FGF19 sobre la expresión de genes relacionados con la hipertrofia cardíaca.
- 61 Los NCMs sufren un aumento de tamaño al ser tratadas con FGF19.
- 62 El tratamiento con FGF19 no provoca cambios en la expresión de genes relacionados con la hipertrofia en NCMs.

- 63 El tratamiento con FGF19 no provoca cambios significativos en la expresión de Acta2 en miofibroblastos (fibroblastos de pase 3).
- 64 La exposición de los NCMs con FGF19 provoca cambios en la fosforilación de diferentes cinasas.
- 65 Esquema de las posibles vías de actuación de FGF15/19 en el tejido adiposo
- 66

**Número de  
Tabla**

**Descripción**

- 1 Principales características de los adipocitos marrones clásicos y de los beige/brite.
- 2 Principales depósitos de tejido adiposo marrón y blanco en ratón.
- 3 Principales depósitos de tejido adiposo marrón y blanco en humano.
- 4 Resumen de los tipos de estímulos fisiológicos y patológicos que causan hipertrofia (concéntrica o excéntrica).
- 5 Resumen de las características que diferencian la hipertrofia cardíaca patológica de la fisiológica.
- 6 Clasificación funcional de los diferentes FGFs dependiendo de su rango de acción.
- 7 Los FGFs endocrinos.
- 8 Efectos farmacológicos producidos por la administración de FGF15/19 y FGF21.
- 9 Medios de mantenimiento y diferenciación para los cultivos de adipocitos humanos SGBS.
- 10 Genes analizados durante la tesis doctoral mediante sondas Taqman.
- 11 Datos metabólicos sobre los pacientes proporcionados por el hospital Germans Trias y Pujol.
- 12 Tabla 12. Datos metabólicos sobre los pacientes proporcionados por el hospital Dr. Josep Trueta.
- 13 Caracterización de los animales WT y Fgf15-null. Los ratones se estabularon con dieta y condiciones estándar.
- 14 Niveles de expresión de mRNA de genes relacionados con el metabolismo hepático y con la acción represiva de FGF15.
- 15 Caracterización de los animales WT y Fgf15-null sometidos 7 días a un requerimiento termogénico de 4°C.

- 16 Caracterización de los animales WT y Fgf15-null mantenidos 7 días a termoneutralidad (30 °C).
- 17 Caracterización de animales WT con una inyección retroorbital con la construcción Ad5-Control o Ad5-FGF15, provocando la sobreexpresión de Fgf15 en hígado durante una semana.
- 18 Caracterización de animales WT con una inyección retroorbital con la construcción AAV8-Control o AAV8-FGF19, provocando la sobreexpresión de FGF19 en hígado durante tres semanas.
- 19 Caracterización de animales WT y Fgf15-null tratados durante 14 días con CL mediante inyecciones intraperitoneales o con salino.
- 20 Caracterización de animales WT y Fgf15-null tratados durante 7 días con salino o ISO.
- 21 Caracterización de animales Ad5-Control y Ad5-FGF15 tratados durante 7 días con salino o ISO.
- 22 Caracterización de animales AAV8-Control y AAV8-FGF19 tratados durante 7 días con salino o ISO.
- 23 Caracterización de animales WT y Fgf15-null alimentados durante 13 semanas con una dieta obesogénica HFD o mantenidos con dieta estándar LFD.
- 24 Niveles de expresión de mRNA de genes relacionados con el metabolismo cardíaco.
- 25 Caracterización de animales WT y Fgf15-null mantenidos durante 7 días a 30 °C o 4 °C con condiciones de alimentación estándar.
- 26 Niveles de expresión de mRNA de genes relacionados con el metabolismo cardíaco.
- 27 Parámetros ecocardiográficos de ratones WT y Fgf15-null tratados con 6 días con infusión de isoproterenol o mantenidos con salino.
- 28 Caracterización de animales WT y Fgf15-null tratados durante 7 días con salino o ISO.
- 29 Niveles de expresión de mRNA de genes relacionados con el metabolismo cardíaco.
- 30 Caracterización de animales Ad5-Control y Ad5-FGF15 tratados durante 7 días con salino o ISO.
- 31 Niveles de expresión de mRNA de genes relacionados con el metabolismo cardíaco.
- 32 Caracterización de animales AAV8-Control y AAV8-FGF19 tratados durante 7 días con salino o ISO.
- 33 Niveles de expresión de mRNA de genes relacionados con el metabolismo cardíaco



# Introducción



## **Bloque 1. El tejido adiposo**

### **1.1. La obesidad**

El tejido adiposo ha sido considerado tradicionalmente un lugar de almacenaje de energía en forma de lípidos con el único objetivo de sustentar las necesidades metabólicas del cuerpo en caso de déficit nutricional. Ahora bien, los avances realizados durante estas últimas décadas han permitido que esta visión simplista cambie. Con el descubrimiento de factores como la leptina, se comenzó a considerar al tejido adiposo como un órgano secretor de factores autocrinos, paracrinos y endocrinos. Hoy en día, ha pasado de considerarse un mero almacén a un órgano complejo con diferentes tipos celulares, con un gran impacto sobre la homeostasis energética de los organismos y como responsable de la regulación de diversos aspectos fisiológicos, como por ejemplo, el control de la temperatura corporal (Rosen & Spiegelman, 2014).

Si bien un tejido adiposo sano es deseable y ejerce multitud de funciones beneficiosas para el organismo, las disfunciones del mismo, como por ejemplo su exceso (obesidad) pueden acarrear graves problemas de salud. La obesidad se ha convertido en estas últimas décadas en un problema en todo el mundo, tanto en países desarrollados como de nivel intermedio.

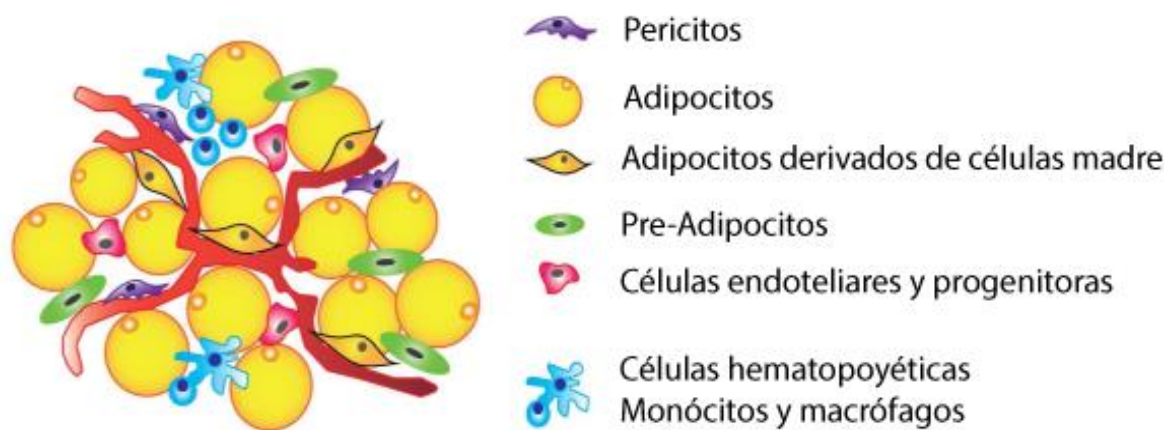
Un exceso de tejido adiposo se asocia a un aumento del tamaño de los adipocitos y de su número, provocando su malfuncionamiento y una acumulación de triglicéridos tanto en circulación como en otros tejidos, como el músculo esquelético, el corazón y el hígado (Bays, 2011). Esta es una importante causa de morbilidad, de incapacitación y mortalidad prematura ya que correlaciona con situaciones de hipertensión, de resistencia a insulina, dislipidemia, síndrome metabólico y diabetes mellitus de tipo 2 (T2DM) (Bays, 2011).

Hasta el momento los numerosos esfuerzos dedicados al tratamiento de la obesidad han resultado de limitada eficacia o de excesiva intervención. La búsqueda de nuevas vías terapéuticas para la obesidad ha propiciado que el tejido adiposo se encuentre en el punto de mira de la comunidad científica y que el interés en su estudio crezca exponencialmente (Zafrir, 2013).



## 1.2. El tejido adiposo

Todos los organismos eucariotas, desde las levaduras hasta los mamíferos, son capaces de almacenar calorías en forma de gotas lipídicas (LD). Los vertebrados cuentan, además, con un tipo celular especializado para ello, el adipocito, célula predominante en el tejido adiposo. Estas células son capaces de almacenar lípidos en su interior en forma de vesículas lipídicas sin padecer la lipotoxicidad asociada a este tipo de macromoléculas. Además, el tejido adiposo también alberga otros tipos celulares, como células precursoras multipotentes, preadipocitos, fibroblastos, células endoteliales, terminales nerviosas y células del sistema inmunitario, constituyendo la fracción del estroma vascular (SVF).



**Figura 1. Componentes del tejido adiposo.** Esta figura muestra una representación esquemática de las poblaciones celulares que componen el tejido adiposo. Imagen obtenida y modificada de Shukla et al., 2015.

En humanos, así como en la mayoría de los mamíferos, se han definido clásicamente dos tipos principales de tejido adiposo: el tejido adiposo blanco (TAB) y el tejido adiposo marrón (TAM). El tipo celular mayoritario del TAB es el adipocito blanco, célula unilocular con pocas mitocondrias encargada de almacenar en su interior el exceso de energía en forma de triglicéridos (TG). En caso de un déficit nutricional, estos serán capaces de liberar los productos de la hidrólisis de los TG (ácidos grasos y glicerol) a la circulación sanguínea para abastecer al organismo. En cambio, el TAM está formado en

su mayoría por adipocitos marrones. El adipocito marrón, a diferencia del anterior, es una célula multilocular con muchas mitocondrias capaces de utilizar los TG de sus vesículas como combustible para generar calor mediante la termogénesis no asociada a temblor.

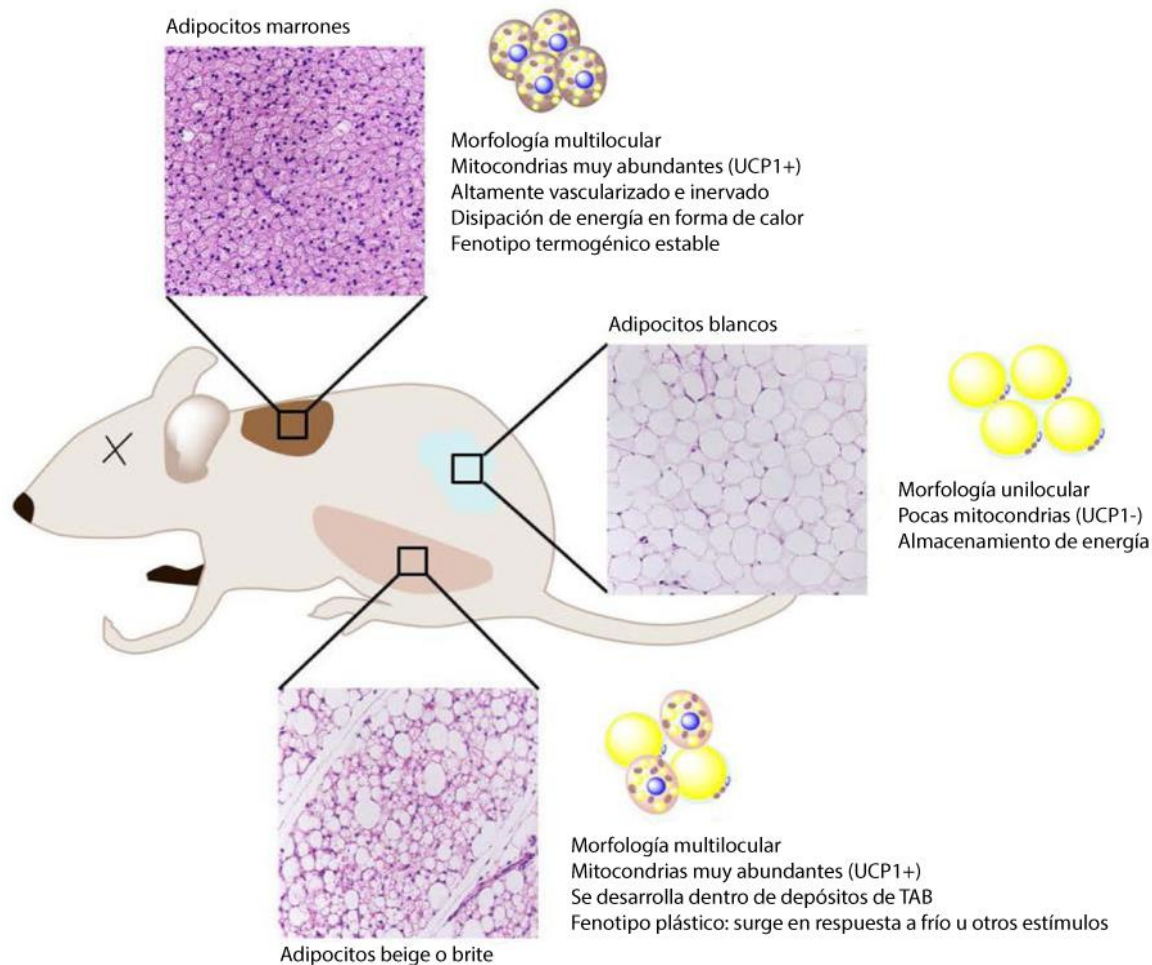
El proceso termogénico que ocurre dentro del TAM se efectúa gracias a una característica única de las mitocondrias de los adipocitos marrones: la presencia de la proteína desacopladora-1 (UCP1) en la membrana mitocondrial interna. Esta proteína, propia de los adipocitos marrones, es capaz de desacoplar la cadena respiratoria, disipando el gradiente de protones en forma de calor e impidiendo la síntesis de ATP. La actividad del TAM es inducida por diferentes estímulos, como el frío o la sobrealimentación (Giralt & Villarroya, 2013). Su activación conlleva un alto consumo de glucosa y de lípidos, lo que supone una protección del individuo frente a la hiperglucemia, la hiperlipidemia y, en última instancia, la obesidad (Cannon & Nedergaard, 2004; Feldmann et al., 2009). Gracias a su gran capacidad oxidativa, el TAM se encuentra en el punto de mira para el estudio de su potencialidad para el tratamiento de la obesidad.

Recientemente, se ha identificado un nuevo tipo de adipocito, presente tanto en humanos como en roedores. En depósitos de TAB de animales o individuos expuestos prolongadamente a frío o a estímulos adrenérgicos se ha detectado la aparición de células positivas para UCP1 y morfología parecida a los adipocitos marrones, especialmente en los depósitos de TAB subcutáneos. A estos adipocitos se les ha asignado el nombre de adipocitos beige o brite (“Brown in White”). Al fenómeno de aparición de adipocitos con características de adipocito marrón en depósitos de TAB tras un estímulo adrenérgico se le conoce como *browning*. Estos adipocitos comparten muchas características con los denominados adipocitos marrones clásicos. Los adipocitos beige, además, están programados para ser bifuncionales: son capaces de almacenar energía en ausencia de estímulos adrenérgicos pero son capaces de cambiar a un estado de generación de energía si reciben las señales adecuadas.

**Tabla 1. Principales características de los adipocitos marrones clásicos y de los beige/brite.** Comparativa entre ambos tipos de adipocito en ratones. Adaptada a partir de Rosen & Spiegelman, 2014.

<b>Características</b>	<b>Adipocitos marrones clásicos</b>	<b>Adipocitos beige/brite</b>
<b>Localización anatómica</b>	Depósitos de TAM clásicos	Depósitos de TAB inguinal, otros adiposos subcutáneos. En menor medida, depósitos viscerales
<b>Morfología</b>	Multilocular	Multilocular/unilocular
<b>UCP1 basal</b>	Elevada	Baja
<b>UCP1 en estado activo</b>	Elevada	Elevada
<b>Termogénesis</b>	Sí	Inducible bajo estímulo
<b>Mitocondrias</b>	Abundante	Abundante una vez estimulados
<b>Vascularización de sus depósitos</b>	Abundante	Abundante una vez estimulados
<b>Marcadores específicos</b>	Ucp1, Zic1, Lhx8, Eva1. Ebf3, Fbxo31	Ucp1, Tbx1, Tmem26, Tnfrsf9, Shox2, Cited1
<b>Potencial para terapia contra la obesidad</b>	Sí	Sí

Existe un tercer tipo de tejido adiposo, el tejido adiposo de la médula ósea, localizado en el interior de los huesos. Los adipocitos que forman este tejido tienen semejanzas con los adipocitos blancos del TAB, con una única LD. Sin embargo a diferencia de los otros, la restricción calórica parece favorecer su aparición. Se cree que puede tener acciones mayoritariamente locales sobre el propio hueso. Su función continúa siendo motivo de investigación.



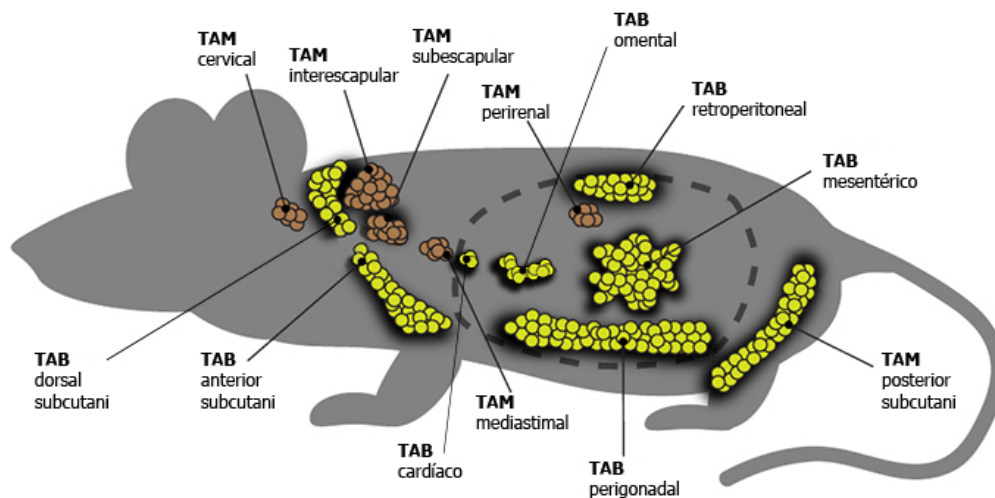
**Figura 2. Clasificación de los principales tipos de adipocitos.** En la imagen se muestran los principales tipos de adipocitos con características funcionales y su localización en ratón. Imagen modificada de Wang & Seale, 2016.

### 1.2.1. Distribución de tejido adiposo en ratón

El órgano adiposo está distribuido en diversas localizaciones o depósitos del cuerpo (Gesta et al., 2006). Estos se pueden clasificar según dos criterios: por su fenotipo visual y funcional (TAB o TAM) o por su localización (subcutánea o visceral) (Locke et al., 1984; Saely et al., 2011; Tchkonja et al., 2006). Además de los depósitos principales que se mostrarán a continuación, se pueden encontrar pequeñas acumulaciones de tejido adiposo vinculadas a diferentes órganos y en comunicación con ellos (Waldén et al., 2012).

**Tabla 2. Principales depósitos de tejido adiposo marrón y blanco en ratón.**

<b>TAM</b>	<b>Descripción</b>
<b>Interescapular</b>	Depósito bilobular simétrico situado entre las escápulas del animal. Es el depósito de tejido adiposo marrón de mayor tamaño y se acostumbra a utilizar en experimentación como representante del TAM.
<b>Cervical</b>	Situado bajo el músculo, en la parte interna del cuello
<b>Subescapular</b>	Situado bajo las escápulas. También se le conoce como depósito axilar.
<b>Mediastinal</b>	También llamado periaórtico, este depósito se encuentra ubicado en la zona del mediastino, envolviendo la arteria aórtica
<b>Perirenal</b>	Se encuentra envolviendo gran parte del hilio renal, en contacto con la arteria, la vena renal y el uréter
<b>TAB</b>	<b>Descripción</b>
<b>Posterior subcutáneo</b>	Depósito unido a la capa dérmica de la zona de la pelvis y que se extiende en dirección ventral hacia las extremidades posteriores. Se puede a su vez dividir en dorsolumbar, inguinal y glúteo. El depósito inguinal se suele utilizar en experimentación como representante del tejido adiposo blanco subcutáneo.
<b>Dorsal subcutáneo</b>	También llamado cervical superficial, se ubica íntimamente sobre el TAM interescapular
<b>Anterior subcutáneo</b>	Depósito bilateral ubicado entre la piel y las fascias posteriores de los músculos de las extremidades delanteras
<b>Perigonadal</b>	Tejido adiposo blanco que rodea a las gónadas. Recibe el nombre de periovárico en hembras y epididimal en machos. Este depósito se suele utilizar en experimentación como representante del tejido adiposo blanco visceral.
<b>Retroperitoneal</b>	Situado en la parte dorsal, encapsulado por una fina membrana que separa este tejido del riñón y del depósito de TAM perirenal
<b>Cardíaco</b>	Tejido adiposo que rodea con una fina capa el corazón desde el ventrículo derecho hasta el ápex
<b>Mesentérico</b>	Tejido que se encuentra envolviendo los intestinos
<b>Omental</b>	Depósito, de poco grosor, que se encuentra sobre el estómago



**Figura 3. Principales depósitos de tejido adiposo en ratón.** Los depósitos viscerales se encuentran rodeados por una línea de puntos. Imagen adaptada a partir de Sanchez-Gurmaches & Guertin, 2014.

### 1.2.2. Distribución de tejido adiposo en humano

En humanos también se puede observar una división del TAB en subcutáneo y visceral. Sin embargo, la definición de diferentes depósitos está menos clara (sobre todo en el caso del subcutáneo, ya que se extiende uniformemente debajo de toda la dermis) (Cinti, 2009). Ahora bien, a pesar de que se distribuya de una forma continua, existen determinadas regiones donde se acumula preferencialmente. Además, existen diferencias asociadas al género: mientras que los hombres tienden a acumular tejido adiposo en la región subcutánea abdominal y en el compartimento visceral, las mujeres suelen acumularlo preferentemente en la región gluteofemoral, de manera subcutánea (Arner, 1997).

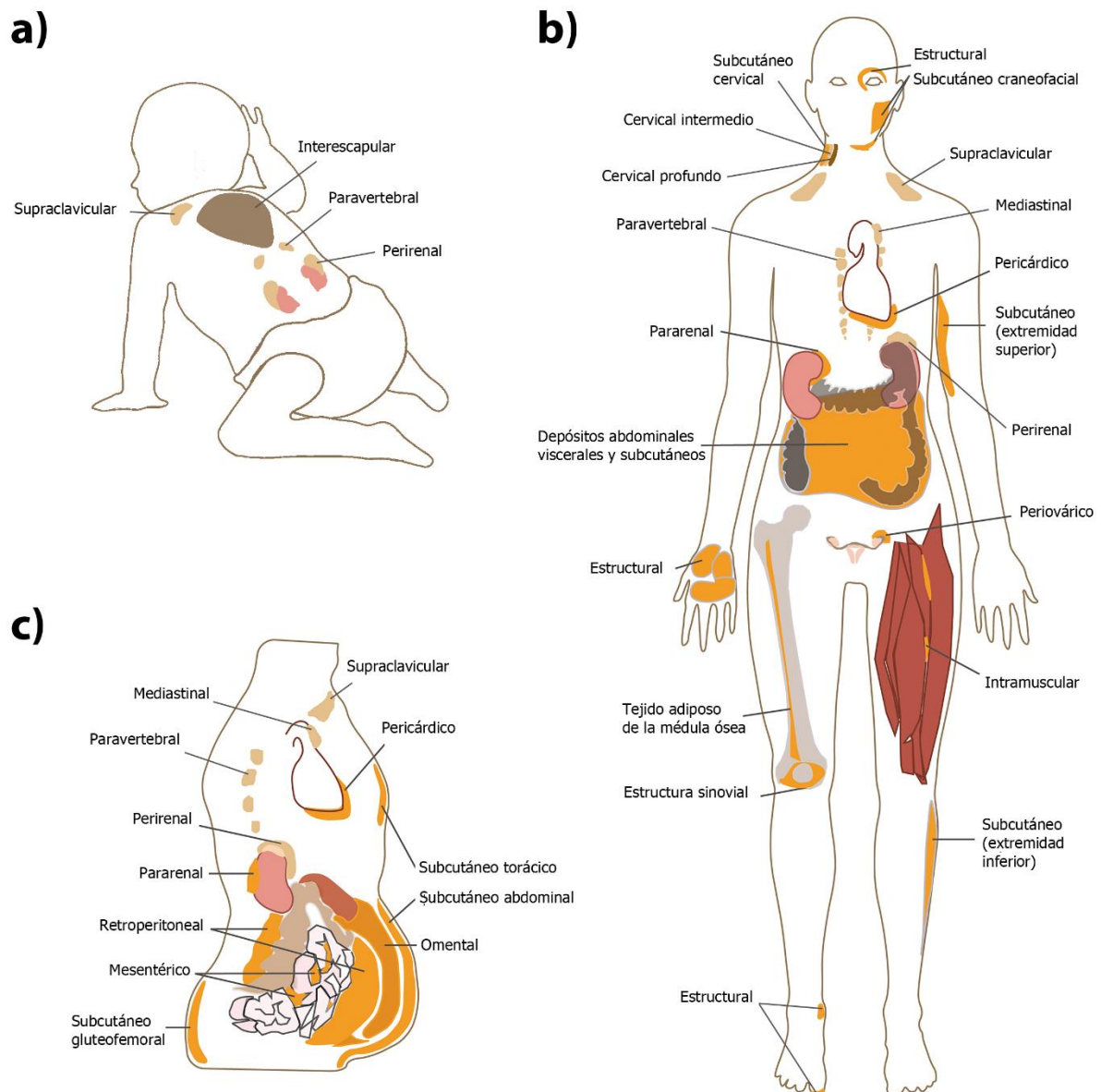
En el caso del TAM, su existencia ha estado reconocida desde hace décadas pero se creía que, en humanos, solo estaba presente de forma significativa durante las etapas tempranas de su vida (neonatal e infantil), desapareciendo progresivamente durante el desarrollo, y siendo reemplazado totalmente por TAB al alcanzar su etapa adulta (Sacks & Symonds, 2013). Sin embargo, a finales del S.XX, gracias al uso clínico de la tomografía de emisión de positrones por captación de  $[^{18}\text{F}]$ -desoxiglucosa (FDG-PET-CT-scan)

utilizada para detectar tumores, gracias a la alta avidéz por la captación de glucosa marcada por parte de los adipocitos marrones, se reveló la existencia de TAM en humanos adultos (Hany et al., 2002; Nedergaard et al., 2007). Al principio se creía que las regiones marcadas podían ser un artefacto de la propia técnica, pero resultaron ser depósitos de TAM con adipocito marrones y/o beige metabólicamente activos. Tras analizar biopsias de dichas regiones, se pudo detectar diferentes tipos de adipocitos marrones, clásicos e inducibles, coexistiendo entre sí (Sharp et al., 2012; Van Marken Lichtenbelt et al., 2009; Virtanen et al., 2009; Zingaretti et al., 2009). Estudios posteriores han demostrado que la presencia y actividad de estos adipocitos marrones correlacionan negativamente con la edad y con el índice de masa corporal (BMI) (Saito et al., 2009; Symonds et al., 2012).

Como conclusión, el órgano adiposo humano se puede clasificar también en depósitos de TAB y de TAM de la siguiente forma:

**Tabla 3. Principales depósitos de tejido adiposo marrón y blanco en humano.**

<b>TAM</b>	<b>Descripción</b>
<b>Clásicos</b>	En neonatos, interescapular (como en roedores) En adultos, cervical
<b>Inducibles</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Presente tras un estímulo térmico. Supraclavicular, paravertebral, peritiroidal, mediastinal/periaórtico, perirenal/suprarenal y cervical intermedia.</li> </ul>
<b>TAB</b>	<b>Descripción</b>
<b>Subcutáneo</b>	Abdominal, craneofacial, gluteofemoral. Repartido debajo de la piel
<b>Visceral</b>	Mesentérico, pericárdico, omental, retroperitoneal, pararenal, perigonadal



**Figura 4. Principales depósitos de a) TAM en neonatos humanos y b y c) de TAM y TAB en humanos adultos.** La figura 4b) muestra un plano frontal general y la 4c) una sección torácica-abdominal lateral. En las imágenes se muestra en naranja los depósitos de TAM, en beige los de TAM inducibles y en marrón los TAM clásicos. Esta imagen ha sido modificada a partir de Virtanen et al., 2009.

### 1.3. Diferenciación adipocitaria

El tejido adiposo tiene su origen en el tejido embrionario mesodérmico, en un proceso llamado adipogénesis. Este es un proceso complejo y regulado de manera estricta. Se encuentra dividido en dos fases: la fase de determinación del linaje y la fase de diferenciación terminal (o adipogénica). En la primera fase las células madre



mesenquimales (MSCs) se convierten en pre-adipocitos. En la segunda sufren cambios y adquieren toda la maquinaria proteica necesaria para completar su diferenciación en adipocitos plenamente funcionales, con capacidad de síntesis y almacenaje de lípidos (Cristancho & Lazar, 2011).

El TAB y el TAM aparecen en diferentes estados ontogénicos del desarrollo de los individuos. En la gran mayoría de los mamíferos, el TAM se desarrolla antes que el TAB. En roedores, el TAM aparece durante el período fetal y se activa después del nacimiento debido al estrés térmico provocado por el parto y el inicio de la alimentación. En cambio, el TAB se empieza a formar a mitad de la gestación (humanos) o poco después del nacimiento (ratones) (Cannon & Nedergaard, 2004; Pope et al., 2014; Symonds et al., 2015).

### **1.3.1. Fase de determinación del linaje**

Esta primera fase comprende el paso de células precursoras a pre-adipocitos. Las MSCs determinadas estarán limitadas a ese tipo celular, pero aun así deberán recibir señales externas para llegar a ser adipocitos al final de la fase terminal.

Debido a las similitudes existentes entre adipocitos blancos y marrones (como por ejemplo la capacidad de acumular lípidos en las vesículas), clásicamente se había considerado que provenían del mismo linaje celular. Pero hoy en día se sabe que los diferentes tipos de adipocitos derivan de diferentes células precursoras. Los adipocitos marrones provienen de aquellas células precursoras que expresaban Myf5 (myogenic factor 5) y la proteína Pax 7 (paired box 7), ambas relacionadas con el linaje de las células musculares. En cambio, los adipocitos blancos provienen de células precursoras que no expresan estos marcadores. Esta separación era clara hasta que recientemente se ha observado la presencia de adipocitos blancos provenientes de células Myf5+ y adipocitos marrones provenientes de células Myf5- (Sanchez-Gurmanches & Guertin, 2014; Seale et al., 2008). Ahora sabemos que la principal diferencia entre un tipo celular y otro no es la expresión de los marcadores antes mencionados, sino la localización de las células precursoras. Así, los adipocitos que se encuentran en la zona dorsal-anterior provienen

de células precursoras Myf5+, mientras que los de la zona ventral-posterior lo hacen de células Myf5-.

La diferenciación tiene lugar gracias a estímulos tanto de tipo físico-mecánico (contactos célula-célula o composición/rigidez de la matriz extracelular) como químico (principalmente factores de la familia Wingless/int1-WNT- y de la superfamilia de factores de crecimiento transformadores beta, TGF $\beta$ ). Gracias a estas señales se induce una parada de la proliferación de las células precursoras y su diferenciación a preadipocitos. El resultado de la diferenciación dependerá de la combinatoria de señales y de factores WNT o TGF $\beta$ , pudiendo decantar la balanza a blanco o marrón, así como a otros tipos celulares (por ejemplo células óseas o musculares) (Cristancho & Lazar, 2011; Lefterova & Lazar, 2009; Takada et al., 2009; Zamani & Brown, 2011). Algunos miembros de las proteínas morfogenéticas óseas (BMPs) de la familia de TGF $\beta$  promueven la diferenciación a adipocito blanco (BMP2, BMP4) (Skillington et al., 2002; Sottile & Seuwen, 2000). Otros en cambio promoverán la diferenciación a adipocito marrón (BMP7 o BMP9) (Kuo et al., 2014; Tseng, 2008).

Los miembros pertenecientes a la familia WNT son glicoproteínas secretadas que tienen papeles clave durante el desarrollo embrionario. Su activación puede llevar a la activación o inhibición de la adipogénesis, promoviendo la diferenciación en un tipo celular u otro.

### **1.3.2. Fase de diferenciación terminal**

#### **1.3.2.1. Fase de diferenciación terminal (adipocito blanco)**

Una vez los preadipocitos entran en un programa adipogénico determinado, se inicia una cascada transcripcional que culminará con la expresión de diferentes proteínas claves para la adipogénesis, como Glut4, leptina o adiponectina y componentes de la maquinaria de acumulación y metabolismo de lípidos. A pesar de los muchos factores de transcripción que participan en la adipogénesis, los principales que intervienen durante la diferenciación terminal de los adipocitos blancos son: el receptor activado por proliferación peroxisomal  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) y los miembros de la familia de proteínas de unión potenciadores de la secuencia CCAAT (C/EBP)  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\delta$ .

En presencia de estímulos adipogénicos se induce la expresión de C/EBP $\beta$  en los preadipocitos y este factor reclutará otros factores de transcripción adipogénicos a través de la vía cAMP-PKA-CREB (Zhang et al., 2004). Primero se inducirá la expresión de C/EBP $\delta$  (Tanaka et al., 1997) y este, junto con C/EBP $\beta$  promoverá la síntesis de los factores de transcripción STAT5A, GR y RXR, además de los genes clave de la adipogénesis, PPAR $\gamma$  y C/EBP $\alpha$ , cuya expresión marcará el inicio de la segunda fase de la diferenciación terminal. Este reclutamiento e inducción es clave para la diferenciación a adipocitos y está altamente regulado (Tang et al., 2004).

Los últimos estadios de la diferenciación terminal adipocitaria suponen la aparición del fenotipo de adipocito maduro, con una elevada expresión de genes propios de este tipo celular y la adquisición de la morfología de adipocito blanco. Los factores de transcripción PPAR $\gamma$  (heterodímero con RXR) y C/EBP $\alpha$  promoverán la expresión de diferentes marcadores adipogénicos (como GLUT4) y de otras proteínas relacionadas con la síntesis de ácidos grasos (como FAS o ACC), con su movilización (como FABP4) o con la lipólisis (por ejemplo HSL). También se inducirá la expresión de ciertas adipocinas importantes para la regulación metabólica del tejido adiposo, como puede ser la leptina (Maurizi et al., 2018; Tontonoz & Spiegelman, 2008; Wu et al., 1999).

A nivel farmacológico existen compuestos capaces de inducir la expresión o bien de activar estos factores de transcripción claves en la diferenciación adipocitaria (Kaiden et al., 1980; Klemm et al., 2001).

#### **1.3.2.2. Fase de diferenciación terminal (adipocito marrón)**

Como ya se ha mencionado anteriormente, los adipocitos marrones provienen generalmente de precursores Myf5+. Las cascadas de señalización desencadenadas por PPAR $\gamma$  y por C/EBP $\beta$  son esenciales tanto para la diferenciación a adipocito marrón como para el mantenimiento del fenotipo, siendo comunes con la diferenciación a adipocito blanco (Nedergaard et al., 2005; Tang et al., 2003; Tang et al., 2004). Pero, a diferencia de lo que ocurre en la diferenciación a adipocito blanco, en el caso de los marrones C/EBP $\alpha$  se expresa antes que C/EBP $\beta$  ya que es esencial para la biogénesis mitocondrial y la adquisición de la capacidad termogénica característica de este tipo de adipocitos

(Carmona et al., 2002). A lo largo de su diferenciación los adipocitos marrones adquieren esta capacidad termogénica mediante la expresión de la proteína UCP1, de genes relacionados con el metabolismo lipídico y mediante la biogénesis mitocondrial (Kajimura et al., 2010).

Por otra parte, cabe destacar que, a diferencia de los adipocitos blancos, la diferenciación a adipocito marrón requiere de la actividad noradrenérgica. Dado un estímulo de frío, los nervios eferentes secretan noradrenalina que activa el receptor  $\beta$ 3-adrenérgico, promoviendo la proliferación celular e inhibiendo la apoptosis. La activación de este receptor también inhibe la expresión de proteínas de control del ciclo celular. Así, la noradrenalina favorece la diferenciación de las MSCs a preadipocitos marrones. Esta promoción de la diferenciación favorecerá también el incremento de la masa del tejido adiposo marrón tras una exposición a frío. La noradrenalina también causará un incremento en los niveles intracelulares de cAMP, activando así C/EBP $\beta$  a través de CREB, crucial para la inducción de la termogénesis (Cannon & Nedergaard, 2004).

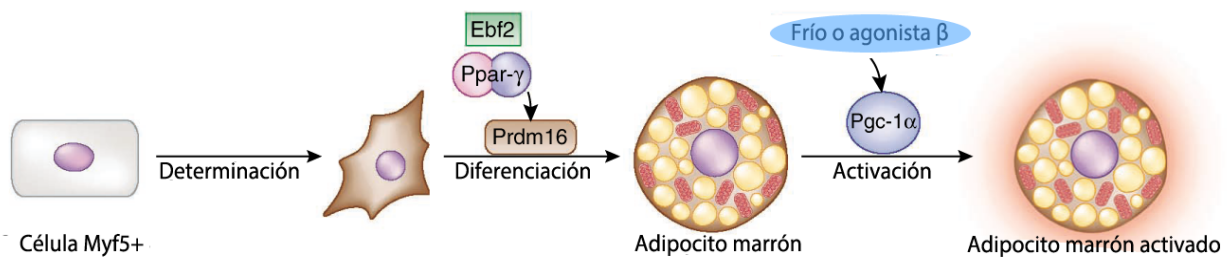
Los factores PPAR $\gamma$  y C/EBP $\beta$  en adipocito marrón interactúan con el factor de dominios PR 16 (PRDM16) (Kajimura et al., 2009). Este factor juntamente con el coactivador PGC1 $\alpha$  son dos factores clave para la diferenciación de los adipocitos y la adquisición del fenotipo termogénico. El factor PDRM16 es expresado preferencialmente en TAM respecto a TAB. Este factor es capaz de reprimir la diferenciación a célula muscular, favoreciendo el fenotipo de adipocito marrón. Además, actúa reprimiendo genes específicos de adipocito blanco en el marrón, siendo clave tanto para la diferenciación a marrón como para su mantenimiento (Harms et al., 2014).

PDRM16 interacciona con C/EBP $\beta$ , induciendo PPAR $\gamma$  y PGC1 $\alpha$ , y desencadenando así el programa transcripcional del adipocito marrón. Más tarde es capaz de interactuar también con el heterodímero PPAR $\gamma$ -RXR y con PPAR $\alpha$ . Esta última interacción coincide con la etapa terminal de la diferenciación a adipocito marrón e induce la expresión de PGC1 $\alpha$  y Ucp1.

PGC1 $\alpha$  fue identificado al principio como un coactivador de PPAR $\gamma$  inducible por frío. Actualmente está considerado un regulador clave de la biogénesis mitocondrial y del metabolismo oxidativo de muchos tipos celulares. Esta proteína es producto del gen

*Ppargc1a* y puede presentar diferentes isoformas gracias al proceso de *splicing* alternativo. PGC1 $\alpha$  sería la principal isoforma implicada en el metabolismo de los tejidos adiposos, hígado y músculo (Ruas et al., 2012).

La expresión y la activación de PGC1 $\alpha$  en el adipocito maduro están ligadas a estímulos  $\beta$ -adrenérgicos y al frío. Su expresión se induce en respuesta a p38MAPK vía la activación del factor de transcripción 2 (ATF2) (Cao et al., 2004; Cao et al., 2001). Como se ha mencionado, PGC1 $\alpha$  es capaz de interactuar con PPAR $\gamma$  y PPAR $\alpha$ , así como con los receptores de las hormonas tiroideas en los adipocitos marrones y beige. Esta interacción provocará la activación de esos receptores nucleares y la inducción de la expresión de UCP1, de la yodotironina deiodinasa tipo II (DIO2) y de genes relacionados con la cadena respiratoria y la  $\beta$ -oxidación mitocondrial.



**Figura 5. Diferenciación de los adipocitos marrones.** Durante el desarrollo embrionario del TAM, las células precursoras se convierten en preadipocitos marrones para después convertirse en adipocitos marrones maduros. Tras recibir los estímulos adecuados, estos adipocitos marrones pueden activarse. Imagen modificada a partir de Harms & Seale, 2013.

### 1.3.2.3. Diferenciación y trasdiferenciación de los adipocitos beige

Como ya hemos mencionado anteriormente, los adipocitos beige o brite son adipocitos con características de marrón que aparecen en zonas de TAB después de estímulos termogénicos o  $\beta$ -adrenérgicos sostenidos en el tiempo. Este proceso se denomina **browning**. El origen de estas células con características tanto de adipocito marrón como blanco ha sido motivo de controversia. A pesar de la existencia de múltiples teorías, dos de ellas son las más aceptadas sobre la procedencia de estas células beige. La primera propone que los adipocitos blancos tienen la capacidad de realizar un proceso de

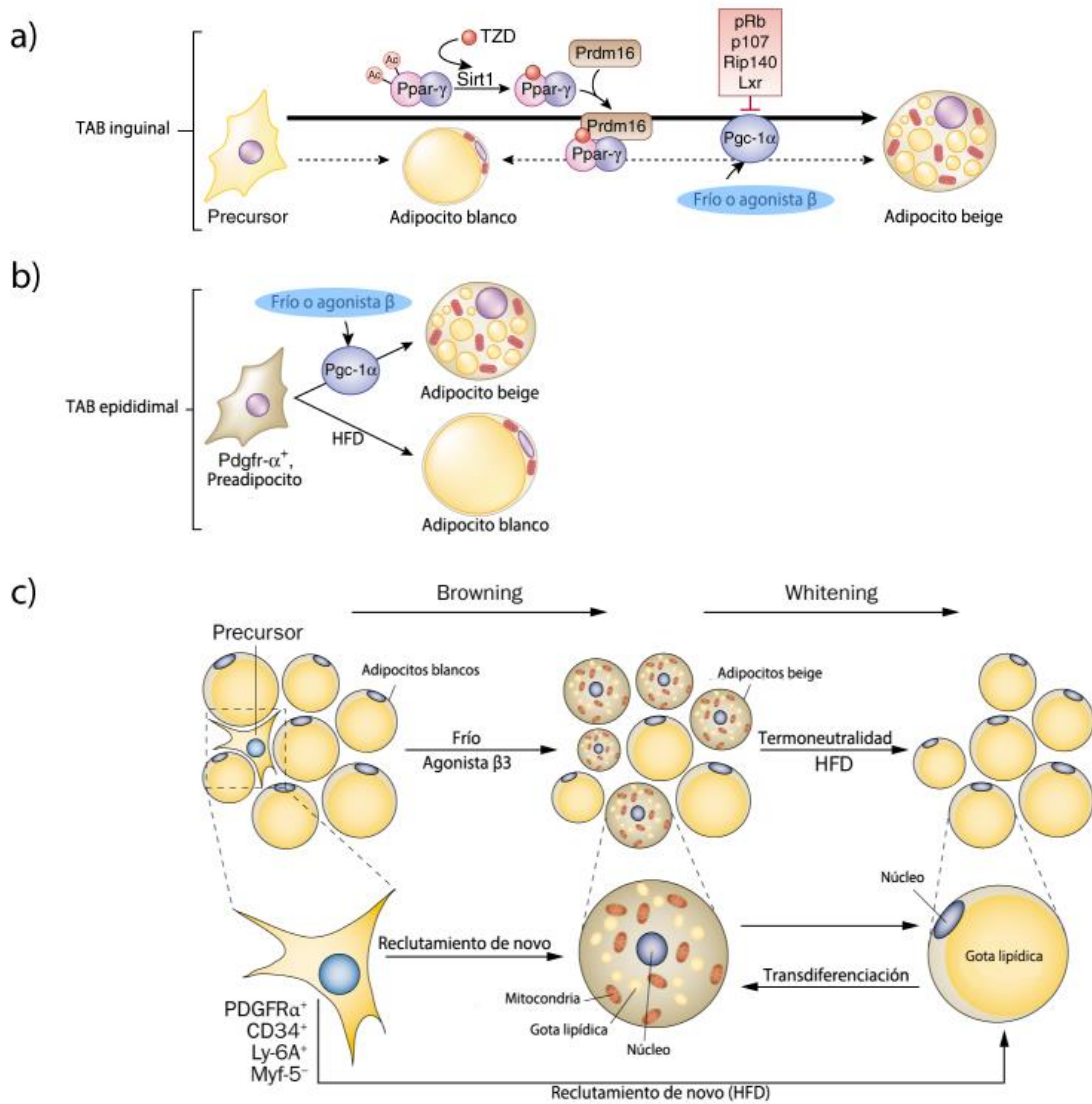
transdiferenciación hacia adipocitos beige en respuesta a ciertos estímulos (Cinti, 2009). La segunda propone la formación *de novo* de nuevos adipocitos maduros a través de la diferenciación desde precursores beige, generalmente My5f- residentes en los depósitos de TAB (Wang et al., 2013).

La teoría de transdiferenciación propone que bajo condiciones de frío prolongadas o estímulo noradrenérgico, el adipocito blanco es capaz de sufrir una reprogramación genética y epigenética que conduce a un cambio de fenotipo, caracterizado por la expresión de marcadores termogénicos y la producción de calor. Las células pasan de ser adipocitos blancos con una sola vacuola lipídica a adipocitos UCP1+ con múltiples vacuolas y un fenotipo intermedio entre adipocito blanco y marrón (adipocito paucilocular). Además, recientemente se ha observado que si este estímulo finaliza y el organismo que había sufrido *browning* se expone a calor, las células recuperarán su fenotipo de adipocito blanco (***whitening***). Esto demuestra la gran plasticidad que tienen las células del tejido adiposo (Rossewald et al., 2013; Rossewald et al., 2014). Esta teoría de la transdiferenciación y de su reversibilidad ya se ha visto en otros tipos de adipocitos, los llamados adipocitos rosas. En la zona de las glándulas mamarias de los mamíferos se ha observado que los adipocitos blancos pueden transdiferenciarse en células glandulares capaces de producir leche, con un fenotipo similar al de una célula endotelial (Morrioni et al., 2004).

La teoría de la diferenciación ***de novo***, por otro lado, propone que dentro del TAB existen precursores residentes, capaces de diferenciarse tanto en adipocitos blancos como beige. Bajo la presencia de un estímulo noradrenérgico, estas células aumentan su capacidad de proliferación y dan lugar a estos adipocitos con características de marrón. En cambio, estos mismos precursores bajo otro tipo de estímulo, como por ejemplo el de una dieta rica en grasas (HFD), se diferenciarán en adipocitos blancos almacenando energía y sintetizando TG (Lee et al., 2012; Wang et al., 2013).

Sin embargo, estas dos teorías no son excluyentes, por lo que no se puede descartar un mecanismo mixto. Dependiendo de las necesidades del individuo (estado nutricional, metabólico y térmico) y del tejido en cuestión habrá una transdiferenciación desde adipocitos blancos o una diferenciación *de novo* desde precursores. En cuanto a las cascadas de señalización necesarias para la diferenciación de los adipocitos beige, estas

no han sido estudiadas con tanta profundidad como en el caso de los adipocitos marrones o blancos, debido a su reciente descubrimiento.



**Figura 6. Diagrama de la diferenciación adipocitaria.** a) Diferenciación a adipocito blanco y adipocito beige en TAB inguinal. b) Diferenciación a adipocito blanco y beige en TAB epididimal. c) Esquema del modelo de diferenciación de adipocito beige a través del reclutamiento de novo o de la transdiferenciación. Figuras obtenidas y modificadas de Harms & Seale, 2013 y Bartelt & Heeren, 2014.

#### 1.4. Funciones del tejido adiposo

El tejido adiposo cumple una función u otra dependiendo de si es TAB o TAM y de su localización. El TAB y el TAM realizan funciones consideradas antagónicas pero que

permiten un correcto balance energético: el TAB almacena energía mientras que el TAM la consume (Zafrir, 2013). A nivel global, además, el órgano adiposo lleva a cabo funciones clave en el organismo. Se encuentra dispuesto en zonas delicadas para ofrecer protección, como por ejemplo en los ojos o rodeando ciertos órganos. También podemos encontrarlo en zonas sometidas a un alto estrés mecánico, como puede ser el caso de los talones y las palmas de las manos.

Por otra parte, el tejido adiposo ayuda al mantenimiento de la temperatura corporal gracias a la capacidad del TAB de actuar como aislante térmico del cuerpo y del TAM de generar calor en caso de que sea necesario. Además, cuando estos tejidos se ven alterados, pueden dar lugar a diferentes enfermedades metabólicas, como la obesidad o las lipodistrofias.

#### **1.4.1. Funciones del tejido adiposo blanco**

La función principal del TAB, como se ha ido comentando, es el almacenaje de energía en forma de TG en el interior de los adipocitos (Dani & Billon, 2012). Estas reservas energéticas pueden ser movilizadas y utilizadas en situaciones de déficit energético, como por ejemplo en ayuno.

Dependiendo del estado nutricional del organismo, se puede favorecer el almacenaje o el consumo de energía. El balance energético se define como la diferencia entre la energía incorporada a través de la dieta y la energía consumida mediante la tasa metabólica basal (el gasto energético asociado a la realización de las funciones básicas del organismo) y el gasto energético adaptativo (energía necesaria para realizar actividades físicas o llevar a cabo procesos necesarios en respuesta a estímulos ambientales).

En caso de sobrealimentación, el balance energético será positivo y habrá un aumento del almacenaje de TG en el TAB. Como consecuencia, este proceso provocará una expansión del TAB mediante dos procesos: aumento del tamaño de los adipocitos (hipertrofia) y, en algunos casos, un aumento del número de estas células (hiperplasia). Cuando esta situación se mantiene a largo plazo, nos encontramos en una situación de aumento de peso del individuo llegando a ser patológica (obesidad) (Tamucci et al., 2018).



Si la energía consumida es mayor que la energía incorporada, el balance energético será negativo. En este caso, el tejido adiposo movilizará los TG acumulados previamente, hidrolizándolos para que los ácidos grasos libres resultantes puedan ser utilizados como combustible para la  $\beta$ -oxidación y así solventar la necesidad energética del individuo.

En el modelo de la sociedad actual, este balance energético suele encontrarse desplazado a un resultado positivo debido a diferentes factores: la gran disponibilidad de alimentos con alto contenido calórico, el aumento de la industrialización, el transporte motorizado, la disminución de la actividad física... Juntos, estos factores ambientales contribuyen a que la obesidad y el sobrepeso sean problemas crecientes y de difícil solución. Además, algunos estudios han relacionado el aumento de la obesidad con la reducción de la exposición a variaciones de temperatura, debido al uso de sistemas de control térmico como la calefacción. A causa de ello, pasamos mucho tiempo en ambientes termoneutrales, donde la actividad del TAM resulta innecesaria y, por tanto, no se producen movilizaciones de TG desde el TAB para su consumo.

#### **1.4.1.1. Lipogénesis**

La síntesis de TG, o lipogénesis, se lleva a cabo mediante una serie de procesos que incluyen la síntesis de ácidos grasos “de novo” o bien su captación por parte de la célula, y su posterior esterificación. Las principales células donde podemos encontrar este fenómeno son los hepatocitos y los adipocitos.

Los lípidos aportados en la dieta son mayoritariamente TG, aunque también podemos encontrar ácidos grasos libres, colesterol y otros esteroides. Estos son absorbidos por el intestino y entran al torrente sanguíneo en forma de quilomicrones. Por otro lado, en el hígado se transforma el exceso de carbohidratos en TG a través de la lipogénesis *de novo* y su esterificación. Estos TG también serán incorporados al torrente sanguíneo pero en forma de VLDL (Lipoproteínas de muy baja intensidad). Los QM y los VLDL serán distribuidos por todo el organismo. Gracias a la acción de la lipoproteína lipasa endotelial (o la lipasa hepática, en el caso del hígado), los TG se hidrolizan localmente y los ácidos grasos no esterificados (NEFA) resultantes son captados por las células (Strable & Ntambi, 2010).

En situación de balance energético positivo, los NEFA fruto de la hidrólisis local de TGs o presentes como tales en la circulación serán reesterificados para convertirse de nuevo en TG y ser almacenados. También, según la situación metabólica podrán ser convertidos en Acetil-CoA y ser utilizados como sustrato metabólico oxidable. Los ácidos grasos entran en las células mediante los transportadores CD36 y la familia de transportadores de ácidos grasos FATP (Gollberg et al., 2009).

La lipogénesi *de novo* en el adipocito empieza con la entrada de glucosa a través del transportador de glucosa 4 (GLUT4) o 1 (GLUT1). Esta será metabolizada en el citosol hasta convertirse en piruvato el cual, a su vez, pasará a Acetil-CoA en las mitocondrias gracias a la acción de la enzima piruvato descarboxilasa. Este Acetil-CoA entrará entonces en el Ciclo de Krebs y el citrato producido, uno de los intermediarios de este ciclo, abandonará la mitocondria. Una vez fuera, será metabolizado en el citosol, dando como resultado Acetil-CoA y Malonil-CoA (gracias a las enzimas citrato liasa y acetil carboxilasa).

En este punto, la enzima ácido graso sintasa (FAS) elongará el Malonil-CoA inicial añadiendo, en cada ciclo, 2 carbonos provenientes de Acetil-CoA y utilizando la energía proveniente de la reducción del NADPH, formando el ácido palmítico (16 carbonos). A partir del ácido palmítico se podrán sintetizar los ácidos de cadenas más largas, gracias a la actividad de las enzimas de la familia elongasas de ácidos grasos de cadena larga (ELOV) o ácidos grasos insaturados (formación de dobles enlaces entre determinados carbonos) (Strable & Ntambi, 2010).

Tanto los ácidos grasos de nueva síntesis como los incorporados a través de la dieta se unirán a los fosfolípidos de las membranas celulares o serán esterificados para su almacenaje en forma de TG, formando así los LD. En la síntesis de los TG intervendrán los intermediarios del Ciclo de Krebs. Estos son sustrato para la enzima Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK), que producirá Glicerol-3-Fosfato y, tras la acción de las enzimas de la familia GTPA y AGPATS, se unen a ácidos grasos libres hasta obtener TG en el lumen del retículo endoplasmático. Debido a la naturaleza de estas biomoléculas, los TG forman aglomerados, ya que tienen tendencia a unir-se. Cuando estos agregados alcanzan un tamaño determinado, se separan del ER, se rodean de una capa de fosfolípidos, colesterol y otras proteínas (importantes para el control de la movilización de los lípidos, como la

caveolina-1 o las perilipinas). Este conjunto de lípidos y proteínas se le denomina vesícula lipídica (Brasaemle, 2007; Kersten, 2001; Strable & Ntambi, 2010).

La lipogénesis está altamente regulada mediante hormonas (como la insulina o factores de crecimiento), cambios en moléculas intermedias y en ratios de energía (ATP/ADP). Por ejemplo, después de la ingesta de alimentos los niveles de glucosa circulantes aumentan, incremento que provocará la secreción de insulina. Gracias a la acción de esta hormona, el transportador GLUT4 será translocado a la membrana de las células, llevando a un aumento de la captación de glucosa y a la activación de la síntesis de ácidos grasos, ya sea para su consumo o para su almacenaje. Coherentemente, la acción del glucagón en situación de ayuno conlleva una situación contraria, provocando la degradación de los TG y su consumo, favoreciendo la lipólisis e inhibiendo la lipogénesis (Kersten, 2001; Kim et al., 1998; Tontonoz et al., 1993).

#### **1.4.1.2. Lipólisis**

En el apartado anterior se describe lo que sucede cuando existe una situación de superávit energético, cuando el balance es positivo. Ahora bien, en el caso contrario, donde el balance energético es negativo y hay una necesidad energética (en ayuno o tras un ejercicio prolongado, por ejemplo) se requerirá que los adipocitos liberen los ácidos grasos que tienen almacenados mediante el proceso de lipólisis, los cuales serán utilizados como sustrato energético por otros tejidos, cubriendo el déficit energético.

La lipólisis es una vía catabólica que actúa sobre los TG, liberando los tres ácidos grasos no esterificados y la molécula de glicerol, que serán liberados en el torrente sanguíneo. Los NEFA liberados serán captados por los tejidos que se encuentren en una situación de déficit energético y utilizados como sustrato de la  $\beta$ -oxidación mitocondrial. En el caso de los adipocitos marrones, estos NEFA podrán ser utilizados por las mismas mitocondrias de las células.

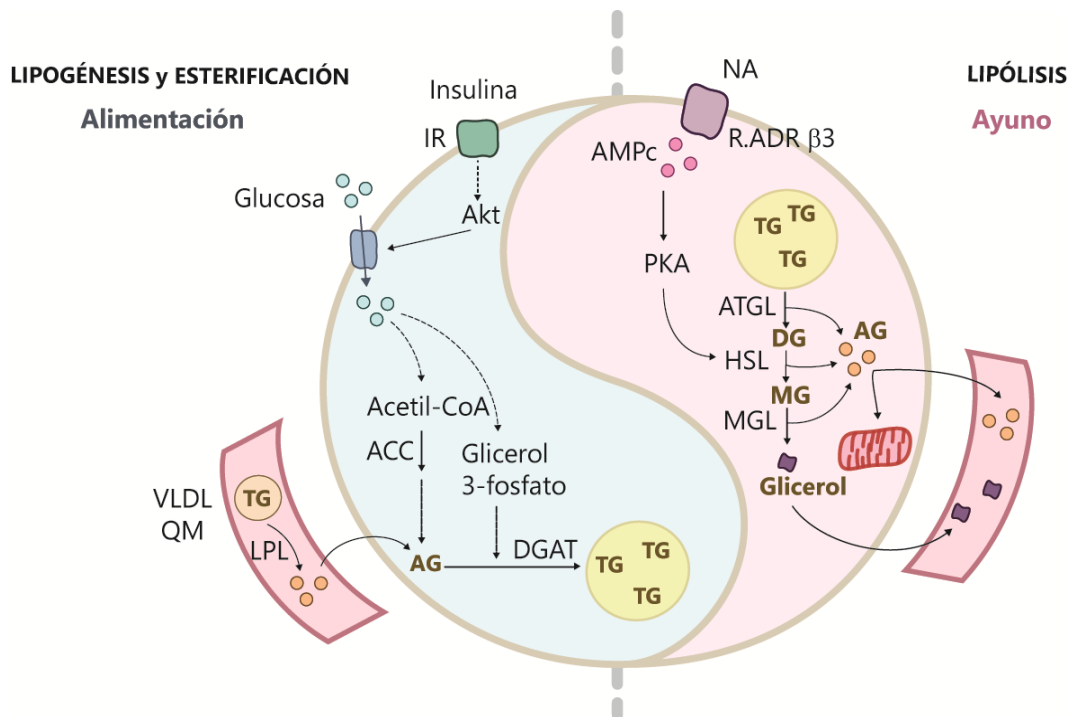
La señal clásica que activa la lipólisis es la adrenalina y noradrenalina (NA), que actuarán vía receptores adrenérgicos  $\alpha/\beta$  y una cascada de señalización intracelular que implica el AMPc. Otra manera de activar este proceso es mediante la caída del ratio insulina/glucagón (Frühbeck et al., 2014; Sztalryd et al., 2003). En situación de ayuno

hay un aumento de la síntesis y liberación de glucagón, hormona que actúa mediante un receptor del tipo GPCR. La unión de la hormona al receptor provocará la fosforilación de PKA, que a su vez fosforilará la Lipasa sensible a hormonas (HSL) y la Perilipina A (proteína que impide el paso de las lipasas a la vesícula lipídica). A causa de la fosforilación, la perilipina A sufre un cambio conformacional facilitando así el acceso de las lipasas a los TG, empezando así el proceso de lipólisis. Cabe destacar que este proceso también se vería activado en el caso de que el ratio insulina/glucagón disminuyera por una menor cantidad de insulina (Chakrabarti et al., 2013; Sztalryd et al., 2003).

Las lipasas que acceden al interior de la vesícula lipídica son la ATGL (adipose TG lipasa), la HSL y la monoacilglicerol lipasa (MGL). Cada una cataliza un paso diferente de la lipólisis. La ATGL hidroliza el TG obteniendo así un ácido graso y un diacilglicerol. La HSL separa otro ácido graso, dejando que el monoacilglicerol resultante sea hidrolizado por la MGL, liberando el último ácido graso y el glicerol (Sztalryd et al., 2003; Zechner et al., 2012).

Los ácidos grasos resultantes serán oxidados dentro de la célula y, gracias a la FABP4 (Fatty acid binding prot 4) unida a la HSL, transportados fuera de la célula para alcanzar otros tejidos. El glicerol puede ser reutilizado en la misma célula en el caso del adipocito marrón, gracias a su actividad glicerolcinasa, o transportado fuera mediante la aquaporina-7, alcanzando el hígado y siendo sustrato para la gluconeogénesis.

Una vez lleguen los ácidos grasos libres a las células diana, serán incorporados en su interior mediante diferentes proteínas. Gracias a CD36 llegarán al citosol y pasarán a las mitocondrias para su oxidación gracias a la lanzadora de carnitina y a la acción de la carnitina palmitil transferasa 1 (CPT1) (Frühbeck et al., 2014).



**Figura 7. Metabolismo lipídico en los adipocitos.** Esquema de la lipogénesis *de novo* (izquierda) y esterificación y esquema de la lipólisis (derecha). Imagen modificada a partir de Tesis de la Dra. Laura Campderrós, 2019.

### 1.4.1.3. Función secretora del TAB

Como se ha mencionado anteriormente, el TAB no tiene la única función de ser un almacén de energía en caso de necesidad nutricional. En los últimos años se ha postulado como un órgano endocrino con gran capacidad de secretar hormonas y citocinas, cruciales para la regulación de múltiples procesos fisiológicos del organismo. Las moléculas liberadas por los adipocitos con función de hormona son llamadas adipocinas y pueden actuar a nivel autocrino, paracrino o endocrino. Las principales adipocinas liberadas por los adipocitos blancos son:

- **Leptina:** la principal función de la leptina es ejercer de mensajero entre el tejido adiposo blanco y el sistema nervioso central, e informar del estado nutricional en el que se encuentra. Vía el hipotálamo y otros núcleos que expresan su receptor, controla la ingesta del individuo (Friedman & Halaas, 1998). Provoca una reducción de los niveles de glucosa (mejorando así la sensibilidad a insulina), inhibe la lipogénesis, y activa la lipólisis y la termogénesis. En una situación de

ayuno, los niveles de leptina disminuyen, estimulando el apetito e inhibiendo la acción de las hormonas anabólicas. En individuos obesos, los niveles de leptina circulantes se encuentran elevados y correlacionan positivamente con la adiposidad, constituyendo la obesidad una situación de resistencia a la leptina (Fried, et al., 2000).

- **Adiponectina:** esta adipocina actúa como sensor del estado nutricional, incrementando la sensibilidad a la insulina en los tejidos periféricos. También tiene la capacidad de promover la oxidación de los ácidos grasos en músculo (vía proteína cinasa activada por AMP, AMPK), e inhibir la gluconeogénesis en el hígado y la lipólisis en los adipocitos para favorecer la captación de glucosa (Qiao et al., 2014; Yamauchi et al., 2002). Además, también ejerce acciones sobre el sistema inmunitario, inhibiendo la adhesión de los monocitos y teniendo efectos anti-inflamatorios sobre las células endoteliales. En situaciones de obesidad, resistencia a insulina o inflamación, los niveles de adiponectina se ven reducidos (Hu et al., 1996; Li et al., 2009).
- **Resistina:** es una proteína secretada por el TAB relacionada con procesos inflamatorios y con el metabolismo de la glucosa. En ratones es producida principalmente por los adipocitos blancos. Contrariamente, en humanos la resistina es secretada principalmente por células del sistema inmunológico residentes en el TAB. En condiciones de obesidad, la resistina induce la resistencia a la insulina, mientras que en condiciones fisiológicas, llevaría a una mejora de la regulación del metabolismo de la glucosa (Banerjee et al., 2004; Rajala et al., 2004).

Además de estas adipocinas principales, existen muchas otras secretadas por el TAB: la adiposina, la apelina, la omentina, la proteína de unión a retinol 4 (RBP4), la vaspina, la visfatina, etc. Los NEFAs liberados durante la lipólisis también pueden actuar como moléculas señalizadoras, contribuyendo a la resistencia a insulina en tejidos periféricos, a la disminución de su producción y a la activación de procesos inflamatorios a través de células del sistema inmunitario (Harwood, 2012).

Finalmente, a todas estas moléculas producidas por el TAB debemos sumar un amplio surtido de citocinas y quimiocinas, liberadas principalmente por células que forman el SVF. Estas citocinas pueden ser antiinflamatorias (manteniendo la homeóstasis del tejido) o proinflamatorias (llevando a un estado de inflamación crónica, como en una situación de obesidad) (Hotamisligil et al., 1993).

#### **1.4.2. Funciones del tejido adiposo marrón**

El TAM es el lugar donde se lleva a cabo la termogénesis adaptativa, proceso de producción de calor que ayuda a mantener la temperatura corporal de un individuo. Este proceso fue descrito en pequeños mamíferos que, durante el invierno, deben mantener su temperatura a pesar de la disminución de la temperatura ambiental. La presencia de este tejido en humanos inicialmente se describió en neonatos, que poseen grandes cantidades de TAM especialmente en la zona interescapular. En humanos adultos se ha visto que las zonas de TAM clásico y de *browning* son mucho más dispersas (Sacks & Symonds, 2013).

El TAM está formado principalmente por adipocitos marrones y es un tejido con una gran inervación e irrigación. Su activación está controlada por los terminales nerviosos de las neuronas noradrenérgicas del sistema nervioso simpático (Morrison et al., 2014). Además, necesita un suministro continuo de oxígeno y sustratos para que la termogénesis tenga lugar. Por otra parte, la gran irrigación de capilares alrededor de los adipocitos marrones favorece la transmisión del calor producido por estos, haciendo que la sangre eferente esté a una mayor temperatura que la sangre aferente (Sacks & Symonds, 2013). En el caso del fenómeno de *browning* en el TAB, la aparición de adipocitos beige viene acompañada de un incremento en la irrigación e inervación alrededor de estos.

##### **1.4.2.1. Termogénesis**

La termogénesis adaptativa no asociada a temblor es un proceso gracias al cual la mayoría de los mamíferos pueden mantener durante largos períodos de tiempo su

temperatura corporal estable a pesar de que existan condiciones de frío, mediante un aporte extra de calor producido por el TAM y por las zonas del TAB donde se haya producido *browning*.

En condiciones de termoneutralidad, cuando el metabolismo basal es suficiente para el mantenimiento de la temperatura corporal, el TAM se encuentra inactivo: se produce la fusión de sus vesículas lipídicas, se pierden proteínas mitocondriales necesarias para llevar a cabo la función termogénica y el aspecto de los adipocitos, sobre todo en el caso de los adipocitos beige, pasa a ser similar al de los adipocitos blancos. Este proceso se denomina *whitening* (Feldmann et al., 2009).

El rango de temperaturas correspondientes a la termoneutralidad varía dependiendo del organismo, de su tamaño, de su capacidad de aislamiento gracias al TAB y de su metabolismo basal. En ratones adultos se consideran condiciones de termoneutralidad alrededor de 30 °C (Cannon & Nedergaard, 2011).

Ahora bien, cuando se produce una disminución de la temperatura ambiental, las terminaciones nerviosas de la piel envían una señal a nivel central, que implica al hipotálamo, y que da lugar a las señales efectoras reguladoras de la temperatura. Cuando el estímulo de frío es a corto plazo, la respuesta será aguda: habrá un aumento de la actividad simpática, provocando una rápida vasoconstricción periférica para evitar una disminución de la temperatura corporal, se activará la generación de calor por contracción de las fibras musculares (temblor), se activará el TAM y aumentará el flujo de sangre hacia el tejido (Haman, 2006). Cuando el estímulo es más persistente, la actividad termogénica del TAM, dando lugar a calor, suple la termogénesis asociada a temblor de origen muscular y pasa a ser el principal responsable de la termogénesis adaptativa.

Dependiendo de la exposición previa que haya sufrido el mamífero a temperaturas bajas (por debajo del rango de la termoneutralidad), su TAM estará capacitado para generar calor en mayor o menor medida. Cuando debido a largas exposiciones previas a frío los niveles de UCP1 se encuentran elevados, el individuo ya ha sufrido un proceso de adaptación y será capaz de activar su TAM y el proceso de *browning* con mayor rapidez (Cannon & Nedergaard, 2011). En el caso de que la exposición a frío sea crónica, se



experimentará un reclutamiento de nuevos adipocitos marrones (hiperplasia), aumento de la aparición de adipocitos beige en el TAB y una activación de la síntesis de proteínas del programa termogénico, como UCP1 o PGC1 $\alpha$ . Además, se aumentará la síntesis de enzimas para la lipólisis y la  $\beta$ -oxidación, así como la ingesta, todo ello a fin de obtener los sustratos necesarios para llevar a cabo la termogénesis sin déficit energético.

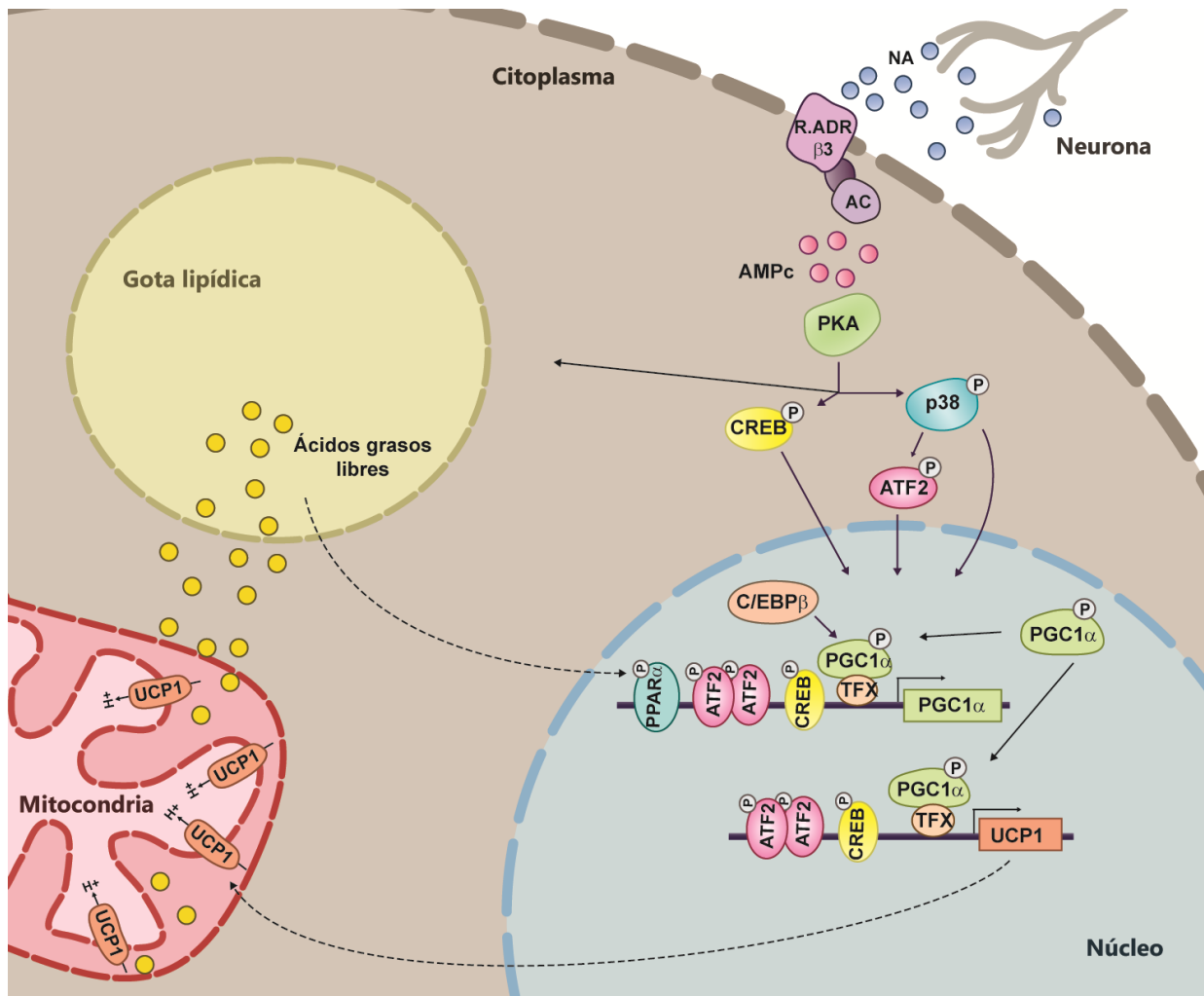
#### **1.4.2.1.1. Activación de la termogénesis por estímulos $\beta$ -adrenérgicos y su regulación**

Cuando se produce un descenso de la temperatura ambiental, este es detectado por las neuronas termorreceptoras periféricas de la piel. Mediante los canales catiónicos de potencial de transición presentes en sus membranas (TRPs), son capaces de detectar cambios los de la temperatura ambiental y, cuando es el caso, mandan la señal al área preóptica (APOH) del hipotálamo, donde se coordina la respuesta (Morrison et al., 2014; Whittle et al., 2011).

El hipotálamo provoca un aumento de la actividad de las terminaciones nerviosas simpáticas que inervan el TAM. Una vez liberada la NA, esta se une a los receptores adrenérgicos de la membrana de los adipocitos, los cuales pueden ser de tipo  $\alpha$  y  $\beta$ . Sin embargo, el mayoritario es el  $\beta$ 3 ( $\beta$ 3AR), así que la señal se transduce mediante este. El receptor adrenérgico  $\beta$ 3 es un receptor transmembrana acoplado a proteínas G, normalmente a proteínas G $\alpha$ s, aunque también puede encontrarse acoplado a proteínas del tipo inhibitorias Gi (Bouřová et al., 2000).

Cuando se produce la unión entre la NA y los receptores  $\beta$ 3 se desencadena la activación de la adelinato ciclasa, enzima que cataliza la ciclación de la adenosina mono fosfato (AMP) provocando que los niveles de cAMP aumenten e induciendo la actividad de la proteína cinasa A (PKA). Esta enzima facilitará la actividad termogénica a diferentes niveles. Primero, provoca la entrada de las lipasas al interior de las vesículas lipídicas favoreciendo así la lipólisis. Segundo, activa el programa termogénico de manera directa a través del factor de unión al elemento de respuesta a cAMP (CREB) y de ATF2, induciendo la expresión de genes como Ucp1, Dio2 o Ppargc1a. Por último, PKA también

puede activar a la p38MAPK, provocando la fosforilación de PGC1 $\alpha$ , que actuará como coactivador del gen que codifica por Ucp1 (Cao et al., 2001).



**Figura 8. Activación clásica de la termogénesis adaptativa en el tejido adiposo marrón.** Esquema de la cascada de señalización de la activación clásica noradrenérgica del adipocito (termogénesis). La NA se une al receptor noradrenérgico  $\beta_3$  con la consecuente activación de la cinasa PKA y de la p38MAPK, que lleva a la activación de la transcripción de genes termogénicos, como Ucp1. UCP1 es translocada a la mitocondria donde disipará el gradiente de  $H^+$ , generando energía en forma de calor. Por otra banda, la PKA promoverá la liberación de ácidos grasos mediante la activación de la HSL y de las perilipinas. Imagen adaptada de la tesis de la Dra. Laura Campderrós.

#### 1.4.2.1.2. Regulación no adrenérgica de la termogénesis adaptativa y del *browning*

Si bien es cierto que la NA es el principal activador de la termogénesis adaptativa mediante los receptores  $\beta_3$  adrenérgicos, no es la única. Existen vías independientes de

NA/ $\beta$ 3AR que provocan la activación de la termogénesis (Harms & Seale, 2013; Ludwig et al., 2018).

**Hormonas tiroideas:** Los adipocitos marrones son capaces de captar la T4 (tiroxina) y gracias a la enzima DIO2, la transforman en T3 (triiodotironina). La T3 tiene efectos intracelulares dentro del adipocito marrón, activando la termogénesis mediante la activación de la transcripción de UCP1 (Guerra et al., 1996; Villarroya & Vidal-Puig, 2013). Además, las hormonas tiroideas también son capaces de activar la termogénesis mediante la activación de la AMPK en el hipotálamo (López et al., 2010).

**FGF21:** Es un factor endocrino de la familia de los factores de crecimiento de fibroblastos principalmente secretado por el hígado. FGF21 puede actuar de dos maneras sobre el adipocito marrón; de manera endocrina (proveniente del hígado) o autocrina/paracrina (sintetizado por los mismos adipocitos marrones) (Hondares et al., 2011). FGF21 se une al correceptor  $\beta$ -Klotho y a su receptor FGFR1, induciendo así la termogénesis mediante la activación de PGC1 $\alpha$  y expresión de Ucp1 y Glut4 (Hondares et al., 2010). En adipocitos blancos, FGF21 promueve el *browning*, favoreciendo la aparición de los adipocitos beige en depósitos del TAB (Fisher et al., 2012). Recientemente también se ha descrito como FGF21 puede activar la termogénesis mediante efectos centrales, actuando vía Sistema Nervioso Simpático (Fisher et al., 2012).

**Prostaglandinas:** La cyclooxigenasa 2 (COX2), enzima limitante de la síntesis de las prostaglandinas, parece tener un papel en la inducción de la expresión de Ucp1 durante el fenómeno de *browning* en el TAB. Esta acción parece estar relacionada con los PPAR (Madsen et al., 2010; Vegiopoulos et al., 2010).

**PPAR agonistas:** PPAR $\gamma$  media la diferenciación de los adipocitos marrones y PPAR $\alpha$  está involucrado en la inducción de la maquinaria de la termogénesis. El uso de agonistas de ambos PPAR provocan una activación del TAM y una inducción del *browning* del TAB (Hondares et al., 2006).

**Ácidos biliares:** En respuesta a frío, se favorece la conversión del colesterol a ácidos biliares en el hígado. Al aumentar la síntesis de estos, se favorece un aumento de los ácidos biliares en circulación, así como el aumento de la excreción vía fecal de estos. Los ácidos biliares circulantes son capaces de unirse al receptor de ácidos biliares acoplado

a proteínas G (TGR5) y mediante la inducción de la proteína DIO2, promueven la termogénesis en los adipocitos marrones (Watanabe et al., 2006; Worthmann et al., 2017).

Además los ácidos biliares pueden activar la termogénesis de manera indirecta a través de sus acciones en intestino. Los ácidos biliares estimulan en el intestino la secreción del péptido similar a Glucagón 1 (GLP-1), una incretina con acciones anti-diabéticas. Se ha visto como la luraglutina, un análogo de GLP-1 utilizado en el tratamiento de la diabetes tipo II, en ratones incrementa la termogénesis y el *browning* del TAB debido a sus efectos centrales sobre el hipotálamo (Beinoa et al., 2014). Por último, se sabe que los ácidos biliares estimulan la secreción de Fgf15 (FGF19 en humanos) por parte del enterocito en el íleon, mediante la activación del Farnesoid X Receptor (FXR). La principal acción de Fgf15 recae sobre el hígado, regulando la síntesis y secreción de ácidos biliares. Existen indicios de un posible efecto similar al de FGF21 sobre el *browning* del TAB (Fang et al., 2015). Esta temática centra el desarrollo de la presente tesis y se expone con más detalle en los apartados siguientes.

### **Regulación por señales provenientes del músculo y del corazón:**

- **Irisina:** En respuesta a ejercicio físico, se produce la activación de PGC1 $\alpha$  en el músculo esquelético. Una de las dianas de esta proteína es el factor Fndc5 que, tras una serie de procesos, es liberado a la membrana y entra en circulación en su forma madura, llamada irisina. Esta citocina llega a los depósitos de TAB, donde estimula la aparición de adipocitos beige mediante el proceso de *browning* (Boström et al., 2012).
- **Ácido b-aminoisobutírico (BAIBA):** En respuesta a ejercicio físico, como en el caso de la irisina, BAIBA también aumenta y es secretado a circulación sanguínea. En este caso, BAIBA actúa a través de PPAR $\alpha$  en los adipocitos blancos promoviendo el *browning* (Roberts et al., 2014).
- **Péptidos natriuréticos cardíacos (NPs):** Los cardiomiocitos son capaces de secretar el péptido natriurético auricular (ANP) y el péptido natriurético del tipo B (BNP), hormonas que regulan la presión sanguínea. ANP y BNP señalizan en los

adipocitos a través del receptor NPR1 (Sarzani et al., 1996), activando tanto la termogénesis en el TAM como el *browning* en el TAB (Shi & Collins, 2017).

**Bone morphogenic protein 8b (BMP8b):** Existen diversos miembros de esta subfamilia que están implicados en la diferenciación de los adipocitos. Sin embargo, Bmp8b expresado en adipocitos marrones maduros y en el SNC está implicado en la regulación de la termogénesis. Tiene varias vías de actuación: puede aumentar la respuesta al estímulo adrenérgico actuando directamente sobre el adipocito marrón, la vascularización e inervación del TAM, o activando la termogénesis a nivel central actuando en el hipotálamo (Whittle et al., 2012; Pellegrinelli et al., 2018).

**Regulación por factores en la dieta:** La actividad del TAM y el *Browning* del TAB pueden ser modulados por factores incorporados en el organismo mediante la ingesta. La termogénesis inducida por la dieta se encuentra directamente relacionada con las dietas altas en grasas, con una elevada aportación calórica a causa del incremento de los niveles circulantes de metabolitos y de algunas hormonas (insulina y leptina). Además, la composición específica de la dieta determina la capacidad de la inducción termogénica más allá de los posibles efectos agudos postprandiales. El motivo por el cual existe esta inducción de la termogénesis por dieta es motivo de debate. Sin embargo, se cree que puede ser una estrategia mediada a través del TAM para prevenir la hipertrofia y la obesidad del tejido adiposo. Así, el tejido adiposo, no solo el TAM sino también el TAB, funcionaría como un regulador homeostático para controlar el estado nutricional (Kawada, 2018; Rothwell & Stock, 1981; von Essen et al., 2017). Algunos de los factores de la dieta descritos que median la activación de la termogénesis son los aminoácidos (sobre todo la restricción de metionina), los derivados de la vitamina A, como el ácido retinoico (Rosell et al., 2012), el resveratrol (Andrade et al., 2014) y la capsaicina (Yoneshiro et al., 2013) entre otros.

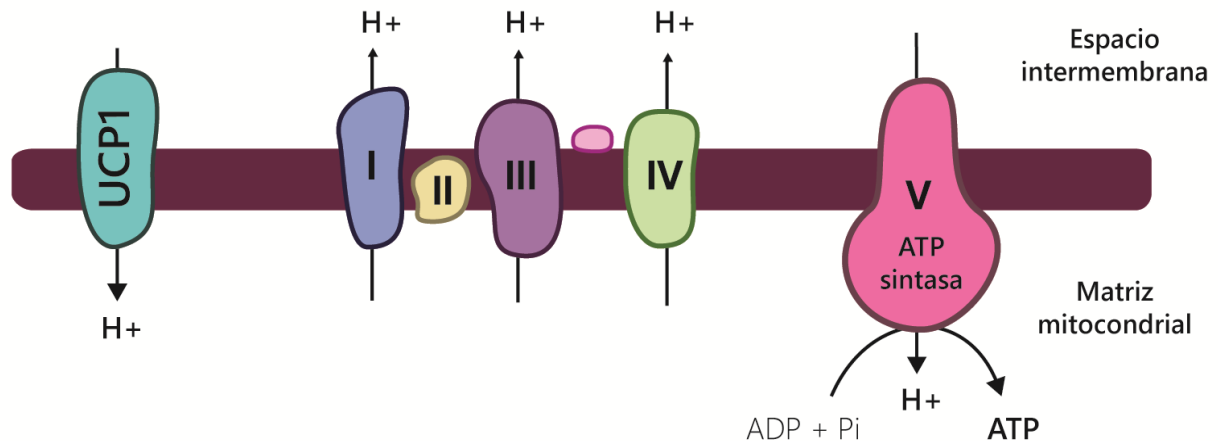
#### **1.4.2.1.3. Mecanismos de la producción de calor por parte de los adipocitos marrones y beige: la proteína UCP1**

La capacidad de generar calor que tienen los adipocitos marrones y beige es conferida por la proteína desacopladora 1 (UCP1, *deuncoupling protein 1*), de la cual es capaz de desacoplar la cadena de transporte de electrones destinada a la producción de ATP de la ATP sintasa (fosforilación oxidativa).

El metabolismo oxidativo de las células termina en la cadena respiratoria o cadena de transporte de electrones, que se lleva a cabo en la membrana mitocondrial interna. Los electrones provenientes del NADH generado en el ciclo de Krebs entrarán en la cadena de transporte de electrones donde a través de sus diferentes complejos (del I al V) se liberarán protones en el espacio intermembrana mitocondrial, generando un gradiente de protones. La diferencia de cargas generada por el gradiente de protones hará que estos entren otra vez a la matriz mitocondrial a través de la ATP sintasa (o complejo V). La fuerza protón-motriz ligada al gradiente de protones es aprovechada por la ATP sintasa para realizar la fosforilación del ADP y generar ATP, molécula que es utilizada como almacén de energía.

La presencia de UCP1 en las mitocondrias de los adipocitos marrones o beige modifica el funcionamiento de este sistema. UCP1 también permite el flujo de protones del espacio intermembrana a la matriz mitocondrial de forma no asociada a la síntesis de ATP, de forma que la energía almacenada en el gradiente electroquímico de protones se disipa en forma de calor al reentrar estos a través de UCP1. Además, en las mitocondrias acopladas, cuando aumentan los niveles de ATP celulares se inhibe el flujo de la cadena respiratoria por un mecanismo de retro-inhibición debido a la impermeabilidad de la membrana mitocondrial interna a los protones. En las mitocondrias activas, desacopladas, de los adipocitos marrones y beige, como no existe este aumento de ATP ya que se utilizan los protones para generar calor, el proceso no se encuentra inhibido. Por tanto, UCP1 acelera la oxidación de sustratos por parte de la célula, haciendo que el TAM sea un tejido que cuando está metabólicamente activo consume mucha energía (Golozoubova et al., 2001; Krauss et al., 2005).

A pesar de que existen diferentes proteínas de la familia de UCP (UCP1-5), UCP1 es la única descrita como responsable del desacoplamiento de la cadena de transporte de electrones y, por tanto, responsable de la generación de calor asociada (Nedergaard et al., 2001).



**Figura 9. Elementos de la cadena de transporte de electrones de adipocitos marrones y beige.** A diferencia de lo que sucede en células sin UCP1, en adipocitos marrones y beige el gradiente de H<sup>+</sup> se disipa generando calor gracias a UCP1. Así, la cadena de transporte de electrones se encuentra desacoplada: en lugar de generarse ATP mediante la ATP sintasa, se genera calor a través de UCP1. Imagen modificada a partir de la tesis de la Dra. Laura Campderrós, 2019.

Cabe destacar que, pese a que los adipocitos beige contienen UCP1 y tienen mitocondrias con un comportamiento bioenergético desacoplado similar a los adipocitos marrones (Shabalina et al., 2013), estudios recientes han propuesto la existencia de mecanismos adicionales de producción de calor en los adipocitos beige basados en un ciclo fútil que implica la creatina cinasa (Kazak et al., 2015).

#### 1.4.2.2. TAM como órgano secretor: las batocinas

Como ya hemos mencionado anteriormente, el tejido adiposo es un órgano endocrino activo capaz de liberar cientos de moléculas bioactivas que ejercen funciones autocrinas

(en la misma célula), paracrinas (en células de alrededor) o endocrinas (en células de tejidos distintos), estableciendo así vías de comunicación entre tejido adiposo y otros órganos, como el cerebro, el hígado o el corazón (Kershaw & Flier, 2004; Lee et al., 2019).

El tejido adiposo marrón había estado considerado un lugar de consumo metabólico capaz de generar calor en el caso en que se necesitara para mantener la temperatura corporal. Ahora bien, con la activación del TAM así como en experimentos de trasplante de TAM se han observado adaptaciones metabólicas sistémicas (reducción de la glucemia y/o sensibilización de la insulina) que no eran explicables por la actividad termogénica intrínseca del TAM. Por tanto, la hipótesis que, de la misma manera que el tejido adiposo blanco, el tejido adiposo marrón puede actuar como un órgano endocrino y secretar biomoléculas a fin de regular la respuesta termogénica entre diferentes órganos periféricos y coordinar la respuesta sistémica era perfectamente plausible (Villarroya et al., 2017). Así, tanto el TAB como el TAM tienen la capacidad de secretar dichas biomoléculas, llamadas “adipocinas” y “batocinas” respectivamente (Villarroya et al., 2019).

Los adipocitos marrones clásicos y los beige son capaces de secretar diferentes factores peptídicos y no peptídicos que pueden favorecer la actividad termogénica regulando la hipertrofia, la hiperplasia, la irrigación e inervación de las células (mejorando su vascularización) y la utilización de sustratos, necesarios para una correcta respuesta termogénica prolongada. Si bien es cierto que no existen evidencias de factores exclusivos de adipocito marrón o beige, el término batocina será utilizado para nombrar a adipocinas liberadas por uno de estos dos tipos celulares de forma preferente respecto al adipocito blanco o bien en respuesta a la actividad termogénica. Las batocinas se encuentran especialmente inducidas durante los procesos de diferenciación y activación termogénica y sus dianas principales son el SNC y el TAB, ya que sus funciones se encuentran relacionadas con la termogénesis. Sin embargo, otros tejidos como el corazón, el páncreas o los huesos también responden a dichas señales. Las batocinas además de la actividad termogénica, pueden regular otros aspectos fisiológicos, como la actividad del sistema inmune. Las principales batocinas son FGF21 (Chartoumpekis et al., 2011; Fisher et al., 2012; Hondares et al., 2011) y IL6 (Buryšek & Houštěk, 1997). Si



clasificamos las batocinas conocidas en función del principal tipo celular o tejido diana, tendríamos:

**Sistema nervioso simpático periférico:** La secreción de diferentes “batocinas”, como el factor de crecimiento de nervios (NGF) y el factor de crecimiento de fibroblastos 2 (FGF2) estimulan la inervación de los depósitos del TAM. Así se mejora la señalización simpática periférica cuando se produce la hiperplasia del tejido (Bartness et al., 2010).

**Sistema Vascular:** Además de la inervación, la vascularización es necesaria para una correcta función termogénica del TAM. Los adipocitos liberan óxido nítrico (NO) para aumentar el riego sanguíneo, promoviendo una vasodilatación local mejorando la circulación. Otro factor secretado por estas células es el factor de crecimiento del endotelio vascular A (VEGFA) que promueve el crecimiento vascular e incrementa la perfusión sanguínea (Sun et al., 2014).

**Adipocitos maduros y preadipocitos:** Algunos factores expresados por los adipocitos pueden tener efectos autocrinos sobre el proceso de diferenciación o la actividad metabólica de los adipocitos marrones o beige, como en los casos de BMP8b (Whittle et al., 2012) o FGF21, siendo esta una de las principales batocinas secretadas por los adipocitos marrones (Villarroya et al., 2017).

**Sistema inmunológico:** Las células del sistema inmunitario (macrófagos tipo M2, eosinófilos y otras) residentes dentro del TAM o en el TAB susceptible de *browning*, están implicadas en el control positivo de la respuesta termogénica del TAM y del *browning* a través de mecanismos aún poco conocidos (Villarroya et al., 2018). Durante la activación termogénica, los adipocitos marrones y/o beige también son capaces de liberar diferentes batocinas que afectarán positivamente a la termogénesis.

- **METRL:** Factor producido por músculo esquelético y adipocitos marrones en respuesta al ejercicio físico y al frío, respectivamente. Metrnl actúa sobre los eosinófilos del sistema inmunitario, aumentando la expresión y liberación por parte de estos de interleucina 4 (IL4), que promueve la aparición de macrófagos con fenotipo M2 dentro de los depósitos de TAB. A su vez, los macrófagos M2 liberarán factores que favorecen el programa termogénico, induciendo el *browning* y la aparición de adipocitos beige (Rao et al., 2014).

- **IL6:** En respuesta a daño tisular e inflamación, la interleucina 6 actúa como mediador de la respuesta aguda del sistema inmunitario. IL6 también está implicada en el desarrollo de complicaciones en procesos proinflamatorios y autoinmunes en enfermedades metabólicas como la diabetes o la aterosclerosis. La activación del receptor  $\beta$ 3 adrenérgico estimula la expresión y secreción de IL6 en adipocitos marrones de ratón (Burýšek & Houštěk, 1997). Además, existen evidencias de la importancia de esta batocina en la inflamación y la resistencia a insulina sistémica en ratones (Stanford et al., 2013).
- **CXCL14:** CXCL14 es un miembro de la familia de las citocinas CXC. Está descrita como una potente quimiocina, capaz de atraer diferentes células del sistema inmunitario (como monocitos o células dentríticas) a sitios del organismo con inflamación para llevar a cabo la respuesta inmune. En el contexto de la activación de la termogénesis, se ha descrito como los adipocitos marrones secretan CXCL14, favoreciendo así su activación e induce el *browning* del TAB mediante el reclutamiento de macrófagos activados alternativamente (M2) (Cereijo et al., 2018).
- **GDF15:** GDF15 (growth-and-differentiation factor-15) es un miembro de la familia de los TGF $\beta$  secretada por los adipocitos en respuesta a activación adrenérgica. Ejerce un efecto antiinflamatorio en los macrófagos activados clásicamente, o M1, residentes en el tejido adiposo. Los macrófagos M1 bloquean la termogénesis mediante la secreción de TNF $\alpha$ , que inhibe la transcripción de Ucp1. Como consecuencia de la acción inhibitoria de GDF15 sobre los macrófagos M1, se activa de forma indirecta la termogénesis (Campderrós et al., 2019).



## **Bloque 2: El corazón y la hipertrofia cardíaca**

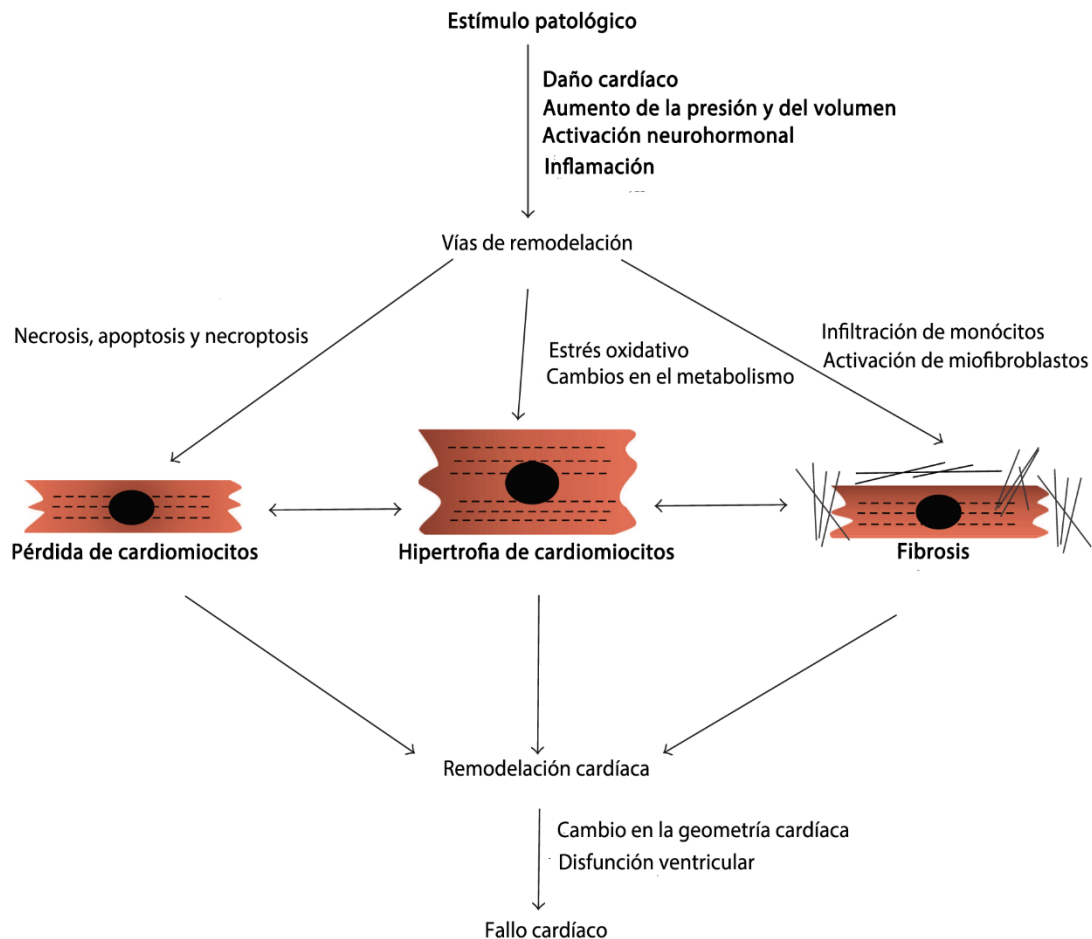
### **2.1. El corazón y la hipertrofia cardíaca**

El corazón es el órgano encargado de bombear la sangre a través de todo el sistema circulatorio, la cual provee de oxígeno y nutrientes al resto de tejidos. Esta actividad supone un alto y continuo gasto energético, con un alto consumo de oxígeno requerido para llevar a cabo esta tarea. El corazón se encuentra equipado con múltiples sistemas biológicos de gran complejidad que le permiten su adaptación a cambios en la demanda energética, siendo algunos de ellos la angiogénesis, su plasticidad metabólica y el crecimiento de los cardiomiocitos (hipertrofia). En situaciones de alta demanda energética a nivel sistémico, como por ejemplo el embarazo o el ejercicio cardíaco, el tejido cardíaco tiene la capacidad de adaptarse y aumentar su tamaño (hipertrofia fisiológica), con tal de garantizar la homeostasis del sistema circulatorio. Contrariamente al desarrollo de la hipertrofia fisiológica, donde la función cardíaca se encuentra preservada, existen una serie de acontecimientos (por ejemplo la hipertensión o la estenosis de la válvula aórtica) que conducen a la llamada hipertrofia patológica, con pérdida de la actividad cardíaca (Shimizu & Minamino, 2016).

En resumen, todo este conjunto de situaciones puede provocar un aumento en la masa del corazón, proceso conocido como hipertrofia cardíaca. Cuando el órgano recibe un aumento de la carga de trabajo y a fin de contrarrestar el incremento crónico del estrés sufrido en las paredes del corazón, este sufre un proceso de crecimiento de sus células (Cooper, 1987; Sudgen & Clerk, 1998). Así pues, cabe destacar que el aumento en la masa del corazón en la hipertrofia cardíaca es debido principalmente al incremento del tamaño celular en la masa ventricular.

El corazón está compuesto mayoritariamente por cardiomiocitos (células musculares cardíacas encargadas de la contracción del corazón), pero también por otros tipos celulares (fibroblastos, células endoteliales...). Todas ellas se encuentran inmersas en la matriz extracelular. En mamíferos, los cardiomiocitos entran en quiescencia después del nacimiento, diferenciándose totalmente y perdiendo casi por completo su capacidad proliferativa (Bergmann et al., 2017; Kajstura et al., 2010). Sin embargo, el tejido cardíaco muestra una gran plasticidad y es capaz de responder apropiadamente a las demandas

energéticas. Sus células pueden crecer, disminuir o incluso morir debido a diferentes tipos de estrés, ya sea de tipo fisiológico o patológico. El incremento de la masa del corazón dependerá del tipo, duración y potencia del estímulo recibido (Bergmann et al., 2015).



**Figura 10. Esquema de las alteraciones cardíacas sufridas durante el desarrollo de la hipertrofia patológica y la remodelación cardíaca.** Una acumulación de estas modificaciones puede llevar al fallo cardíaco. Imagen adaptada de Schirone et al., 2017.

Como hemos dicho anteriormente, existen dos tipos de hipertrofia cardíaca dependiendo de la naturaleza del estrés al que el corazón esté sometido. La hipertrofia fisiológica se caracteriza con una igual o mejorada capacidad contráctil y una organización de la estructura cardíaca normal. La hipertrofia cardíaca fisiológica incluye el crecimiento normal postnatal, el aumento de la masa cardíaca en las hembras gestantes y el inducido por ejercicio físico prolongado (Weeks & McMullen, 2011). El crecimiento fisiológico del

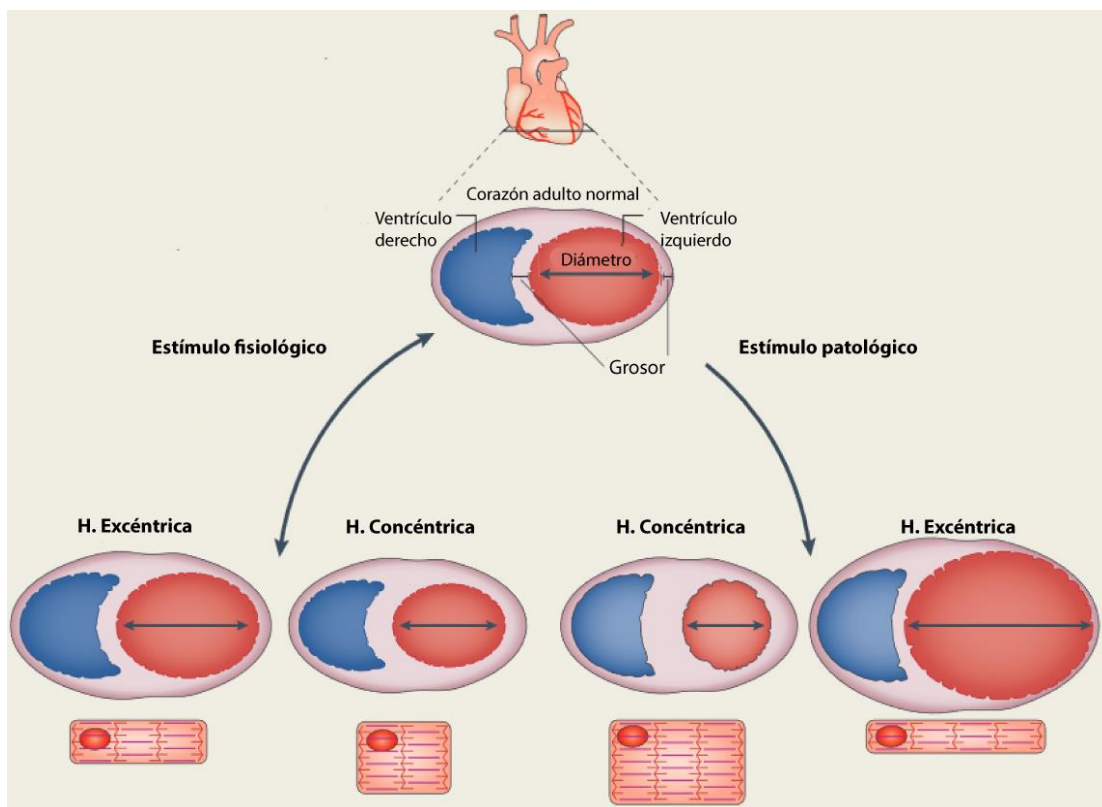
corazón puede ser reversible cuando el estímulo que provoca la hipertrofia desaparece, como es el caso del ejercicio o la gestación (Fagard, 1997). Por el contrario, la hipertrofia cardíaca patológica se encuentra asociada con procesos que pueden dar lugar a la muerte de cardiomiocitos así como a fibrosis, siendo afectada la capacidad contráctil del corazón e implicando una disminución de la función sistólica y diastólica. En caso de que no se resuelva y el estrés crónico sobre las paredes del corazón continúe, la hipertrofia puede conducir a la insuficiencia y al fallo cardíaco (Maillett et al., 2015; Shimizu & Minamino, 2016). La hipertensión, el infarto de miocardio o la isquemia asociada con la enfermedad de las arterias coronarias pueden llevar a una cardiomiopatía hipertrófica.

La hipertrofia cardíaca también puede ser subdividida en base a los cambios en la forma que sufre el corazón dependiendo del estímulo inicial (Grossman et al., 1975; Pluim et al., 2000). La hipertrofia concéntrica se refiere al incremento en la masa celular de las paredes del corazón, con una posible reducción o sin cambios en el volumen de las cámaras de las aurículas o los ventrículos. Es resultado de un aumento de la presión que reciben las paredes del corazón, donde los cardiomiocitos desarrollan un engrosamiento sin aumentar su longitud. En cambio, la hipertrofia excéntrica se refiere al incremento del tamaño de las cámaras del corazón, con una reducción de sus paredes a causa del estrés provocado por un aumento en el volumen de sangre que recibe el órgano (Grossman et al., 1975). En este tipo de hipertrofia, los cardiomiocitos aumentan su longitud. De manera que un estímulo que aumente la presión del corazón hará que se incremente el estrés sistólico recibido en sus paredes, provocando una hipertrofia concéntrica. Por otro lado, un estímulo que aumente el volumen recibido creará un estrés diastólico sobre las paredes y provocará una hipertrofia excéntrica. Estudios clínicos han sugerido que la hipertrofia excéntrica presenta un mayor riesgo para la salud del individuo que la concéntrica (Berenji et al., 2005). En la tabla 4 se resumen los tipos de estímulos fisiológicos y patológicos que causan hipertrofia.

**Tabla 4. Resumen de los tipos de estímulos fisiológicos y patológicos que causan hipertrofia (concéntrica o excéntrica).** Información obtenida de Bernardo et al., 2010

	Hipertrofia concéntrica	Hipertrofia excéntrica
Estímulo fisiológico	Ejercicio isométrico o estático (de fuerza)	Ejercicio isotónico (resistencia) Gestación
Estímulo patológico	Hipertensión Constricción aórtica	Regurgitación aórtica Fístulas arteriovenosas

Los dos principales estímulos que pueden promover la hipertrofia cardíaca son el estrés mecánico y factores neurales/humorales (Ritter & Neyses, 2003). La activación de diferentes vías de señalización por parte de estos estímulos causa hipertrofia cardíaca, con un aumento en el tamaño de los cardiomiocitos. Asociado a ello se produce una inducción de la expresión de genes fetales en el corazón, reorganización de los sarcómeros e importantes modificaciones en el metabolismo celular.



**Figura 11. Desarrollo de hipertrofia en corazón debido a estímulos de tipo fisiológico o patológico.** Esquema que muestra la remodelación que sufre el corazón, mostrando tanto los efectos en el corazón como los efectos en los sarcómeros. Imagen obtenida y modificada de Maillet et al., 2013.

### **2.1.1. Marcadores de hipertrofia cardíaca**

En humanos la hipertrofia cardíaca patológica suele ir acompañada de insuficiencia cardíaca. De hecho, la hipertrofia es un factor de riesgo independiente para el infarto de miocardio, la arritmia y la muerte súbita. En respuesta a un aumento de la carga, el corazón sufrirá un aumento en su masa para mantener una función cardíaca apropiada. Si el estímulo se cronifica y el estrés que sufre la pared del corazón no disminuye, el corazón hipertrofiado se puede dilatar, la función contráctil verse comprometida y conducir al fallo del órgano.

El aumento de las enfermedades metabólicas en sociedades industrializadas, como la diabetes o la obesidad, y el incremento de la esperanza de vida, hace que la incidencia de fallo cardíaco crezca anualmente, hasta en tasas del 10% con 70 años. Hoy en día no existe cura para el fallo cardíaco y las perspectivas de supervivencia de los pacientes tras su diagnóstico son bajas) (Bleumink et al., 2004; Cowie et al., 2000; Zannad et al., 1999; McMurray & Pfeffer, 2005). Identificar marcadores y mecanismos moleculares asociados con la hipertrofia y su transición a la insuficiencia cardíaca es de gran interés para la comunidad científica, con tal de determinar nuevas dianas de acción para su diagnóstico, prevención y tratamiento.

En modelos experimentales con roedores, existen diversas maneras de identificar un corazón hipertrofiado y en qué grado. La determinación del peso y su normalización con otro parámetro independiente (ya sea por el peso total del cuerpo o por la longitud de la tibia), es el método más directo y sencillo. Sin embargo, esta metodología no es posible en el diagnóstico en humanos. De forma indirecta, la hipertrofia se puede determinar mediante ecografía, midiendo entre otros parámetros el grosor de la pared ventricular. El ventrículo izquierdo es la cámara cardíaca con mayor sensibilidad al estrés y la que sufre hipertrofia en primera instancia, ya que es el encargado de la circulación mayor. El grosor de este ventrículo es un factor clave para determinar la hipertrofia cardíaca.

Desde final de los 70 y principios de los 80 se sabe que la hipertrofia fisiológica se encuentra asociada con una mayor actividad contráctil y, por tanto, de la actividad ATPasa de la miosina, a diferencia de la hipertrofia patológica, donde ocurre lo contrario (Rupp, 1981). Así, existe una asociación entre la expresión de genes involucrados en la



actividad contráctil con la hipertrofia, sobretodo en el ventrículo izquierdo, mostrando un perfil de expresión similar entre el estado normal del corazón y la hipertrofia fisiológica, y alterado en la patológica (Iemitsu et al., 2005). Más concretamente, la hipertrofia patológica tiene un patrón de expresión similar al que se puede encontrar durante el desarrollo embrionario, con un aumento en la expresión de la proteína contráctil de la cadena pesada de miosina  $\alpha$  ( $\alpha$ -MHC) y una disminución de la  $\beta$ -MHC, un aumento en la expresión de genes propiamente fetales como los factores natriuréticos atrial (ANF) y cerebral (BNF), y un descenso de las proteínas relacionadas la regulación de los niveles intracelulares de Calcio (como SERCA2a), un importante mensajero intracelular en la regulación de la contracción muscular (Harvey & Leinwand, 2011; Kuwahara et al., 2003).

### **2.1.2. Características estructurales y funcionales del corazón durante la hipertrofia**

La hipertrofia cardíaca se encuentra asociada con una remodelación de la estructura del corazón, sobretodo en sus paredes ventriculares. Esta remodelación es necesaria para la correcta reorganización de los cardiomiocitos tras su aumento de tamaño y los cambios producidos en la matriz extracelular.

Tanto en condiciones normales como en hipertrofia fisiológica, la matriz extracelular ayuda a mantener la integridad del tejido, facilitando así una mejor capacidad contráctil y mejorando el bombeo del corazón. Por otra parte, cuando hay hipertrofia patológica existe un aumento de la muerte de cardiomiocitos (por apoptosis o necrosis) y estos son reemplazados por un exceso de colágeno (del tipo 1 y 3 principalmente) producido por los fibroblastos cardíacos, dando lugar a la fibrosis cardíaca. La acumulación excesiva de fibras de colágeno aumenta la rigidez de los ventrículos afectando a su función diastólica e impide una correcta contracción del órgano, afectando tanto a la red eléctrica que regula el bombeo del corazón como a la densidad de los capilares, haciendo que sea más baja. Como consecuencia, se incrementa la difusión del oxígeno, seguido de isquemia del miocardio y se promueve el paso de hipertrofia a fallo cardíaco. En estas condiciones de activación de fibroblastos e inflamación crónica, se produce un aumento tanto de la

síntesis como de la activación de las metaloproteasas extracelulares, que contribuyen a la fibrosis asociada a la hipertrofia cardíaca patológica (Shimizu & Minamino, 2016).

Cuando se produce un daño cardíaco, la respuesta habitual de los fibroblastos cardíacos es su activación a fin de proteger al órgano. Ahora bien, en el marco de la hipertrofia patológica, los fibroblastos se diferencian hacia miofibroblastos, con un fenotipo parecido a las células presentes en la musculatura lisa (Wang et al., 2019). Esta diferenciación resulta perjudicial para el corazón, ya que estas células se caracterizan por su alta proliferación y migración, la secreción de señales proinflamatorias, que contribuyen al estado ya proinflamatorio en el que se encuentra el corazón en hipertrofia patológica, y la expresión de proteínas propias de músculo liso como la  $\alpha$ -actina ( $\alpha$ -SMA). Por otra parte, estos miofibroblastos son capaces de producir proteínas que contribuyen a la remodelación de la matriz extracelular (Travers et al., 2017).

### **2.1.3. Metabolismo cardíaco en la hipertrofia**

El corazón muestra cierta flexibilidad en la regulación de su tamaño en función del estado nutricional del individuo. El peso del corazón y la longitud de sus fibras pueden reducirse a causa de ayuno o de pérdida de peso severa, mientras que en alteraciones metabólicas como la obesidad, el órgano aumenta de peso. En ratones alimentados con dieta alta en grasas se ha visto una remodelación del ventrículo izquierdo en respuesta al aumento en la presión sanguínea, llevando a un estado de hipertrofia (Raheer et al., 2008). Por otra parte, se ha observado como pacientes con diabetes son capaces de desarrollar la llamada cardiomiopatía diabética (pacientes diabéticos que sufren una cardiopatía sin ser hipertensos ni tener ningún otro problema cardiovascular), que se caracteriza por la disfunción ventricular de quien la padece, además de un aumento de la fibrosis. En cuanto a la hipertrofia, estudios señalan una correlación positiva entre la diabetes y la presencia de hipertrofia cardíaca de forma independiente al peso (Shimizu & Minamino, 2016). Estos datos sugieren la existencia de mecanismos que conectan el estado nutricional del individuo con el peso de su corazón.

El corazón requiere una gran cantidad de ATP para satisfacer la elevada demanda energética derivada de su actividad contráctil. En condiciones fisiológicas, alrededor del

95% del ATP utilizado en el corazón es generado mediante fosforilación oxidativa y el 5% restante proviene de la glicólisis. Alrededor del 70-90% del ATP cardíaco proviene de la oxidación de ácidos grasos, y el otro 30-10% de la oxidación de glucosa, lactato y cuerpos cetónicos (Doenst et al., 2013). El corazón es capaz de cambiar la utilización de sustratos dependiendo de la carga de trabajo y de la concentración relativa de cada uno de estos sustratos en el riego sanguíneo (Van der Vusse et al., 1992). Esta plasticidad metabólica que tiene está considerada un mecanismo que permite al corazón obtener siempre la cantidad de ATP necesaria en cada momento, dependiendo de las condiciones fisiológicas en las que se encuentre.

La hipertrofia cardíaca patológica se encuentra asociada con un descenso de la oxidación de ácidos grasos y un incremento en el metabolismo de la glucosa (Allard et al., 1994; Christie & Rodgers, 1994; Dávila-Román et al., 2002). Este cambio en el sustrato principal de obtención de ATP puede considerarse como un método de adaptación, permitiendo al corazón obtener una mayor cantidad de ATP por de oxígeno consumida. Cuando la hipertrofia cardíaca patológica se prolonga, se produce un descenso del consumo de glucosa debido a que se convierte en resistente a la insulina. De esta manera, el corazón no será capaz de producir suficiente ATP (Neubauer, 2007; Van Bilsen et al., 2009). El uso preferente de glucosa por parte del corazón también se encuentra durante el desarrollo fetal, donde la cantidad de oxígeno es limitada y el transporte de ácidos grasos y su metabolismo están disminuidos (Ostadal et al., 1999). Así, a medida que progresa la hipertrofia cardíaca, se produce un cambio en la preferencia de sustrato, aumentando la utilización de glucosa y disminuyendo la de ácidos grasos, hasta que es incapaz de utilizar ninguno de los dos y falla completamente. La hipertrofia fisiológica, por el contrario, está asociada con una mayor utilización tanto de ácidos grasos como de glucosa (Gertz et al., 1988).

El metabolismo de los ácidos grasos y la glucosa se regulan negativamente entre sí y de forma recíproca en el llamado Ciclo de Randle (Randle, 1998). El ciclo de Randle describe la relación recíproca entre el metabolismo de los ácidos grasos y el de la glucosa. Los ácidos grasos que entran en la célula vía difusión o mediante los transportadores CD36/FATP son esterificados y utilizados como sustratos en la  $\beta$ -oxidación, produciendo acetyl-CoA, NADH y FADH. El incremento de estos disminuye la oxidación de glucosa y

piruvato mediante la inhibición de la piruvato deshidrogenasa (PDH), favoreciendo la oxidación de los ácidos grasos. Además, la glicólisis también se puede ver afectada debido a la inhibición de la enzima fosfofrutoquinasa. Por otro lado, el acetil-CoA derivado de la oxidación de la glucosa es exportado al citosol donde puede actuar como sustrato de la acetil-CoA carboxilasa (ACC), incrementando así la generación de malonil-CoA, inhibidor de la CPT-1. Así, se disminuye la oxidación de ácidos grasos mediante la  $\beta$ -oxidación y se favorece la oxidación de la glucosa (Zhang et al., 2010).

Se ha visto que cambios en los transportadores de glucosa del corazón (Glut1 en fetos y Glut4 en adultos), pueden regular la hipertrofia. La supresión de GLUT1 no provoca cambios en la hipertrofia, la fibrosis o en la rarefacción capilar en respuesta a un aumento en la presión pero sí una reducción de la oxidación de la glucosa en un 50%, con un consecuente aumento en la oxidación de los ácidos grasos. En cambio, la supresión en corazón de GLUT4 induce hipertrofia cardíaca, aumentando la expresión de marcadores como ANP y BNP (Abel et al., 1999; Pereira et al., 2013).

El metabolismo cardíaco se encuentra regulado por la familia de factores de transcripción PPAR, siendo PPAR $\alpha$  (metabolismo de los ácidos grasos) y PPAR $\beta/\delta$  (metabolismo ácidos grasos y glucosa) las más importantes y en menor medida PPAR $\gamma$  (Desvergne & Wahli, 1999). La actividad de los PPAR está regulada por PGC $\alpha$  y promueve la expresión de genes relacionados con la biogénesis mitocondrial, la cadena respiratoria y la oxidación de ácidos grasos y glucosa (Puigserver & Spiegelman, 2003). Uno de los genes claves en el ratio de utilización ácidos grasos/glucosa por parte del corazón es la piruvato deshidrogenasa cinasa 4 (PDK4), que se encuentra regulado por PGC1 $\alpha$ . Esta cinasa promueve el uso de ácidos grasos por parte de los cardiomiocitos por encima de la glucosa (Hsieh et al., 2008).

Así, el metabolismo cardíaco se modificada durante el desarrollo de hipertrofia cardíaca. En hipertrofia cardíaca patológica hay una disminución del uso relativo de ácidos grasos como sustrato metabólico, marcada por una reducción de los genes relacionados con los ácidos grasos como puede ser el caso de *Pdk4* (inactiva la PDH, inhibiendo la oxidación de glucosa y fomentando la utilización de ácidos grasos). En el caso de hipertrofia cardíaca patológica inducida por una dieta alta en grasas, a pesar de lo mencionado

anteriormente, se promueve la utilización de ácidos grasos (se aumenta la expresión de *Pdk4*).

#### **2.1.4. Hipertrofia cardíaca provocada por estrés térmico**

Globalmente se ha documentado cómo existe una prevalencia de la morbilidad y mortalidad relacionada con eventos cardiovasculares durante el invierno (Bunker et al., 2016; Fares, 2013; Song et al., 2017) o en asociación con períodos prolongados de frío (Ryti et al., 2016; Ryti et al., 2017). Además, el invierno está asociado con un aumento en la aparición de síntomas de enfermedades cardíacas como las anginas, las arritmias o las disneas (Ikäheimo et al., 2014) o eventos relacionados con la salud como los infartos de miocardio o la fallo en la función cardíaca llevando a la muerte (Sudden cardiac death, SCD) (Nagarajan et al., 2017; Ryti et al., 2017). De manera que, es importante estudiar cómo las bajas temperaturas afectan al corazón y a las enfermedades cardiovasculares.

Estudios realizados en pollo han demostrado como la exposición a frío incrementa el flujo y la presión sanguínea para mantener la temperatura corporal e incrementar la carga cardíaca. (Deaton et al., 1969). Mediante experimentos en roedores se ha visto que la exposición crónica a frío induce la hipertrofia cardíaca, tanto en animales jóvenes como adultos (Bello Roufai et al., 2007; Templeman et al., 2010). Con otros modelos, como perros o conejos, también se ha visto como el frío provoca un estado de hipertensión que de por sí puede dar lugar a hipertrofia cardíaca (Sun, 2010). Así, la exposición crónica a frío puede provocar hipertensión e hipertrofia a fin de contrarrestar el aumento de la carga de trabajo que recibe el corazón debido al estímulo térmico (Matsubara et al., 2016), aunque el papel de la hipertensión como único determinante o no de la hipertrofia asociada al frío ambiental no está claro.

**Tabla 5. Resumen de las características que diferencian la hipertrofia cardíaca patológica de la fisiológica.** Información obtenida de Bernardo et al., 2010.

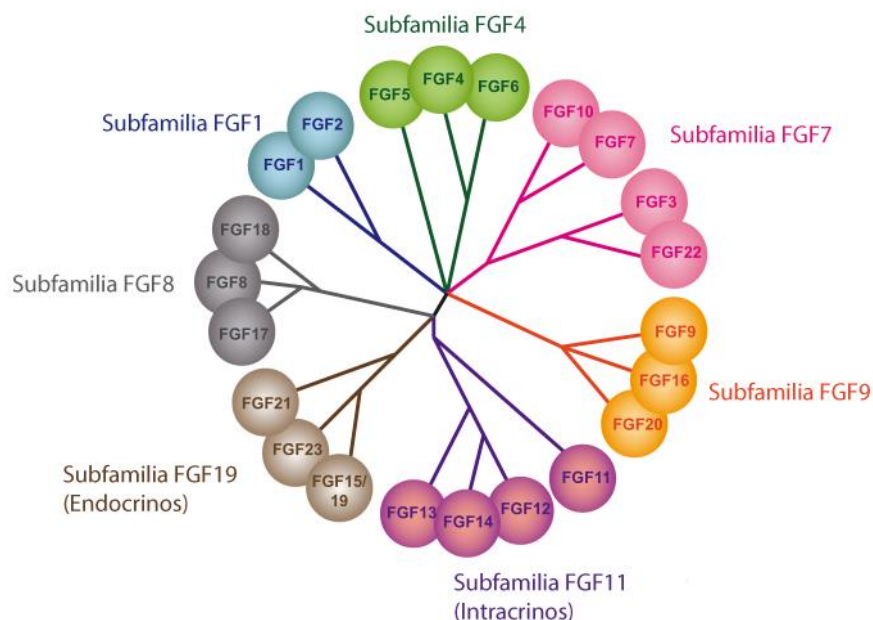
<b>Característica</b>	<b>Hipertrofia cardíaca Patológica</b>	<b>Hipertrofia cardíaca Fisiológica</b>
<b>Estímulo</b>	Aumento de la presión o el volumen en el corazón (sobrecarga)	Ejercicio aeróbico Embarazo
<b>Morfología</b>	Cardiomiopatía	Crecimiento postnatal
	Cardiomiocitos de mayor tamaño	Cardiomiocitos de mayor tamaño
	Aparición de nuevos sarcómeros	Aparición de nuevos sarcómeros
	Incremento en el tamaño del corazón	Incremento en el tamaño del corazón
<b>Fibrosis</b>	Sí	No
<b>Apoptosis</b>	Sí	No
<b>Expresión de genes fetales</b>	Aumento de la expresión de ANP, BNP, $\beta$ -MHC y $\alpha$ -actinina	Relativamente invariable
<b>Expresión de genes relacionados con la función contráctil</b>	Reducción de la expresión de SERCA2a y $\alpha$ -MHC	Normal o incrementados
<b>Función cardíaca</b>	Reducida	Normal o incrementada
<b>Metabolismo</b>	Reducción de la oxidación de ácidos grasos	Incremento de la oxidación de ácidos grasos
	Incremento de la oxidación de glucosa	Incremento de la oxidación de glucosa
<b>Reversibilidad</b>	No	Sí
<b>Asociación con fallo cardíaco y mortalidad</b>	Sí	No



## Bloque 3: FGF15/19

### 3.1. Familia de los *Fibroblast Growth Factors* (FGFs)

Los FGF (Fibroblast Growth Factors) son un grupo de polipéptidos relacionados entre ellos por su estructura involucrados en diferentes procesos biológicos, como por ejemplo el desarrollo, la organogénesis o el metabolismo (Guan et al., 2016). Esta superfamilia de proteínas incluye a 22 miembros identificados en humano y ratón, FGF1-FGF23. Los FGFs pueden ser divididos en 7 subfamilias dependiendo de su locus, su análisis filogenético y sus vías de acción (Presta et al., 2005). Entre los vertebrados, los FGFs están conservados tanto por la estructura de los genes que los codifican como por su secuencia de aminoácidos, incluso entre isoformas. Otra característica importante de los FGFs es su afinidad por los glucosaminoglicanos de heparan sulfato (HSGAG) de la membrana celular, correceptor necesario para su unión con el receptor y la transducción de señal, a excepción de la familia de FGF19 (Kurosu et al., 2007; Maddaluno et al., 2017; Porta et al., 2017).



**Figura 12. Esquema de las subfamilias FGF.** Esquema de todas las subfamilias que componen los FGF en mamíferos y su relación filogenética. Imagen obtenida de (Maddaluno et al., 2017).



La relevancia de los FGFs variará dependiendo del estado del desarrollo en el que se encuentre el organismo. Durante el desarrollo embrionario, los FGFs tendrán un papel fundamental en la regulación, proliferación, migración y diferenciación celular, con tal de garantizar un desarrollo correcto del organismo. En adultos, por otra parte, sus funciones se centran en la homeostasis del individuo, modulando la reparación tisular y la respuesta al daño celular (Itoh & Ornitz, 2011; Ornitz & Itoh, 2001).

### **3.1.1. Clasificación funcional**

Además de la clasificación anteriormente mostrada basada en la filogenia, los FGFs pueden ser divididos según su funcionalidad y mecanismos de acción. Bajo este prisma, los FGFs pueden tener acción intracrina, autocrina/paracrina o endocrina (Itoh & Ornitz, 2011).

**Tabla 6. Clasificación funcional de los diferentes FGFs dependiendo de su rango de acción.**

Tipo de FGF	Miembros	Descripción
<b>Intracrinicos</b>	FGF11/12/13/14	Este grupo de FGFs no son secretados fuera de la célula, sino que actúan como moléculas intracelulares de manera independiente de los FGFRs. Tanto su diana como su mecanismo de acción se sitúan dentro de la célula. Son capaces de interactuar con los dominios intracelulares de canales de sodio dependientes de voltaje y con proteínas MAPKs. Los miembros descritos de este grupo han sido estudiados por sus funciones sobre la regulación de la excitabilidad eléctrica de las neuronas y de otros tipos celulares (Goldfarb et al., 2010; Kyrou, 2007).
<b>Autocrinicos</b> <b>Paracrinicos</b>	FGF1/2/5 FGF3/4/6 FGF7/10/22 FGF8/17/18 FGF9/16/20	Este grupo contiene en su estructura un péptido señal de secreción N-terminal y con un lugar de interacción con moléculas HSGAG, necesarias para la correcta interacción con el receptor. El heparan-sulfato de la superficie celular retiene los FGFs alrededor de la célula secretora, favoreciendo la unión a sus propios receptores o a los de las células del entorno. Además, algunos miembros de este grupo tienen la habilidad de traslocarse directamente al núcleo y actuar de manera intracrina (Kyrou, 2017). Los miembros de este grupo de factores autocrinicos o paracrinicos participan principalmente en procesos relacionados con el desarrollo (Cicione, Degirolamo, & Moschetta, 2012; Itoh & Ornitz, 2011; Beenken, 2009).
<b>Endocrinicos</b>	FGF19/21/23	Los miembros de la subfamilia FGF19 muestran una afinidad muy reducida por el heparan sulfato de la matriz extracelular. De esta manera son capaces de escapar de los alrededores de la célula secretora, entrar en circulación y actuar como hormona en células de tejidos distantes (Kurosu et al., 2007). Los posibles tejidos diana son determinados por la presencia de algún factor Klotho.

### 3.1.2. Los receptores de FGF (FGFRs)

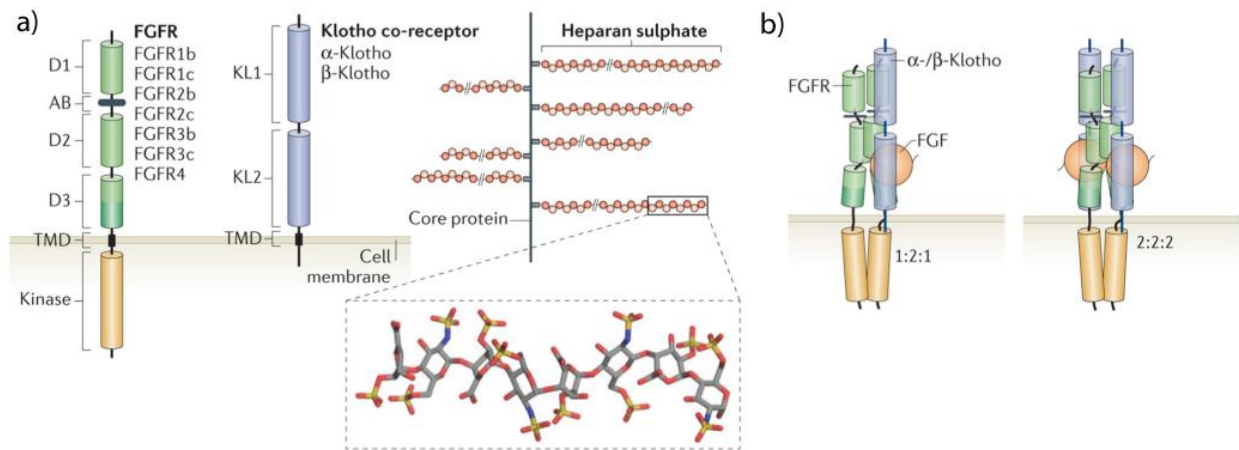
Como se ha mencionado anteriormente, los FGFs ejercen su función mediante su unión a receptores presentes en la membrana celular. Estos contienen en su estructura tres dominios extracelulares *Ig-like* de unión al ligando, un dominio de unión a heparán sulfato, un dominio transmembrana y finalmente un dominio citoplasmático con actividad tirosina cinasa. Se encuentran codificados por cuatro genes diferentes, FGFR1-4, y salvo FGFR4, pueden sufrir diferentes tipos de *splicing* para dar lugar a diversas isoformas de cada tipo de FGFR. Entre los diferentes *splicing*, el que afecta al uso alternativo de dos exones que codifican por el dominio de unión al ligando es uno de los más relevantes, dando lugar a las isoformas IIIb y IIIc (Mason, 2007; Wang et al., 1995). De esta manera, gracias al proceso de *splicing* se genera una mayor cantidad de receptores, con diferentes grados de afinidad y especificidad, y diferentes características en la modulación de la respuesta tras su activación. Además, el *splicing* también garantiza un incremento en la funcionalidad de los FGFs y una respuesta diferencial. Así, por ejemplo, las formas b están presentes en células epiteliales mientras que las c lo están en células mesenquimales (Itoh & Ornitz, 2004; Johnson et al., 1991).

La unión del ligando al complejo FGFR-Cofactor provocará la dimerización del receptor, su transfosforilación y la activación de diferentes vías de señalización, entre las que se encuentran las cinasas reguladas por señales extracelulares 1 y 2 (ERK1 y ERK2). Esta activación finalizará con diferentes respuestas celulares dependiendo del estímulo recibido (Itoh & Ornitz, 2004, 2011).

### 3.1.3. Correceptores

Según su secuencia de aminoácidos y su funcionalidad, los FGFs serán capaces de interactuar con diferentes tipos de correceptores. Estos, serán capaces de modular la migración y la estabilidad de los FGFs fuera del entorno celular y determinarán la magnitud y especificidad de la señal. Los cofactores son:

- **Proteoglicanos.** Los FGFs tienen la capacidad de interactuar con los proteoglicanos heparin y heparan sulfato, abundantes en la superficie celular y en la matriz extracelular. Debido a su localización son importantes para la estabilidad de la proteína y su retención en el tejido diana, especialmente en el caso de los FGFs con función autocrina o paracrina, puesto que impedirán su difusión y garantizarán que su efecto sea local. El complejo que forma el FGF con su receptor y el proteoglicano confiere protección al ligando frente a las altas temperaturas o la proteólisis.
- **Klotho.** Existen tres tipos de proteínas transmembrana de la familia Klotho:  $\alpha$ ,  $\beta$  y *Lactase-like*  $\gamma$ , los cuales servirán como correceptores de los FGFs endocrinos.  $\alpha$ -Klotho es necesario para la unión a FGF23, mientras que  $\beta$ -Klotho lo es para FGF15/19 y FGF21. En el caso de  $\gamma$ -Klotho, este podría ser un correceptor adicional de FGF15/19.  $\alpha$ -Klotho aparece en cerebelo, riñones y órganos reproductores, mientras que  $\beta$ -Klotho aparece en hígado, páncreas, sistema nervioso central, corazón y tanto en el tejido adiposo blanco como el marrón (Kurosu et al., 2007; Planavila et al., 2015; Fon Tacer et al., 2010). La presencia de  $\alpha$  y  $\beta$ -Klotho confiere la especificidad tisular de la actividad de los FGFs endocrinos. Es importante no solo el tipo de correceptor que está expresado, sino la cantidad del mismo en comparación con el receptor. Además, cada isoforma de FGFR tiene una afinidad diferente por cada correceptor. De manera que la capacidad para formar complejos FGF-FGFR-Klotho, de la activación y modulación de la respuesta dependerá tanto del correceptor como de su abundancia, la cantidad relativa del receptor y de su isoforma (Kurosu et al., 2007).  $\alpha$  y  $\beta$ -Klotho se unen preferentemente a las isoformas c de los receptores (Goetz & Mohammadi 2013).



**Figura 13. Representación esquemática de los receptores de FGF y de sus correceptores.**  
 a) Esquema de la organización de los dominios en un FGFR, de los de Klotho (tanto  $\alpha$  como  $\beta$ ) y de la estructura del heparán sulfato. b) Modelos de dimerización de los FGFRs los FGFs endocrinos con  $\alpha/\beta$ -Klotho. Modelos 1:2:1 y 2:2:2. Imagen modificada a partir de Goetz & Mohammadi, 2013.

### 3.2. FGFs endocrinos

Los miembros de la subfamilia FGF19 tiene efectos importantes sobre la homeostasis de los organismos y ejercen su actividad en gran variedad de tejidos. A diferencia de los llamados FGFs clásicos o canónicos, estos pueden circular por el torrente sanguíneo y actuar como hormonas en tejidos distantes (Degirolamo et al., 2016). Los niveles circulantes en humanos de estas “hormonas”, pero pueden variar a causa de que son moléculas con una gran actividad y una vida media corta (Angelin et al., 2012; Kharitonov et al., 2007).

Los FGFs endocrinos tienen funciones diversas: controlan la síntesis y liberación de ácidos biliares, el metabolismo de la glucosa y de los lípidos, modulan la homeostasis de la vitamina D y del fosfato y tiene un papel importante en la adaptación en respuesta a ayuno. FGF19 y FGF21 muestran aproximadamente un 35% de homología en su secuencia. Sin embargo, sus funciones tienen puntos de coincidencia, ya que ambos están involucrados en el mantenimiento del peso y en la homeostasis de carbohidratos y lípidos (Potthoff et al., 2012).

En la última década, los FGFs endocrinos han estado en el punto de mira de la comunidad científica debido a la participación que tienen en la comunicación entre órganos y en su

función homeostática. Además, se ha visto que alteraciones en los niveles circulantes de FGF21 y FGF19 se producen en enfermedades crónicas en humanos, como diabetes mellitus de tipo 2 (T2DM), obesidad, enfermedades coronarias y cáncer. De esta manera, los tres miembros de la subfamilia de FGF19 se han estudiado por dos motivos: por su potencial papel como biomarcador de la progresión de diferentes enfermedades y como posible diana terapéutica en el tratamiento de ellas (Degirolamo et al., 2016; Donate-Correa et al., 2016).

A pesar de su potencial terapéutico, se ha observado que la administración crónica de FGF19, FGF21 o análogos de estos tiene un potente efecto mitogénico y se pueden relacionar además con pérdida ósea (Gallego-Escuredo et al., 2017). Debido a sus efectos adversos, los esfuerzos farmacéuticos se centran en la obtención de análogos que mimeticen los efectos beneficiosos de los FGFs endocrinos sin sus dañinos efectos secundarios.

**Tabla 7. Los FGFs endocrinos.** Miembros de la subfamilia de FGF19, función de cada uno y cambios de estos en caso de enfermedad. Información obtenida de Degirolamo et al., 2016.

FGFs endocrinos	Función fisiológica	Cambios durante enfermedades (concentración)
FGF15/19	<ul style="list-style-type: none"> <li>↓ Síntesis de ácidos biliares</li> <li>↓ Gluconeogénesis</li> <li>↑ Síntesis de proteínas y glicógeno</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Incrementado en Colestasis extrahepática y hemodiálisis crónica</li> <li>Disminuido en Enfermedad inflamatoria intestinal, malabsorción de ácidos biliares primaria, NAFLD y obesidad</li> </ul>
FGF21	<ul style="list-style-type: none"> <li>↑ Oxidación de lípidos en el hígado</li> <li>↑ Ketogénesis</li> <li>↑ Gluconeogénesis</li> <li>↑ Termogénesis</li> <li>↑ Browning en el WAT</li> <li>↑ Resistencia a la hormona de crecimiento</li> <li>↑ Pérdida de peso</li> <li>↓ Ovulación</li> <li>↓ Señalización de hormonas de crecimiento</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Incrementado en T2DM, MS, NAFLD y enfermedades coronarias</li> <li>Disminuido en anorexia nerviosa</li> </ul>
FGF23	<ul style="list-style-type: none"> <li>↓ Absorción de fosfato en el riñón</li> <li>↓ Reabsorción de calcio en huesos y riñón</li> <li>↓ Síntesis de vitamina D</li> <li>↓ Secreción de PTH</li> <li>↑ Secreción de calcio</li> <li>↑ Esperanza de vida</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Incrementado en raquitismo, en osteomalacia inducida por tumores y en hipertrofia cardíaca</li> <li>Disminuido en calcinosis tumoral familiar y hemodiálisis</li> </ul>

### 3.2.1. FGF21

Esta proteína fue descrita por primera vez en embriones de ratón en el año 2000 (Nishimura et al., 2000). Unos años después, se probó que su administración provocaba la inducción del transportador de glucosa 1 (Glut1) en adipocitos, promoviendo la captación de glucosa. Gracias a este descubrimiento, se le empezó a atribuir a FGF21 un posible efecto antidiabético. Posteriormente, FGF21 también se identificó en plasma de humanos (Chen et al., 2008; Gälman et al., 2008; Kharitonov et al., 2005; Potthoff et al., 2012). Así, FGF21 se ha descrito como una hepatocina, adipocina y miocina que tiene

un papel clave en la regulación del metabolismo, con efectos protectores frente a multitud de enfermedades relacionadas con la obesidad como resistencia a insulina, T2DM y dislipidemias.

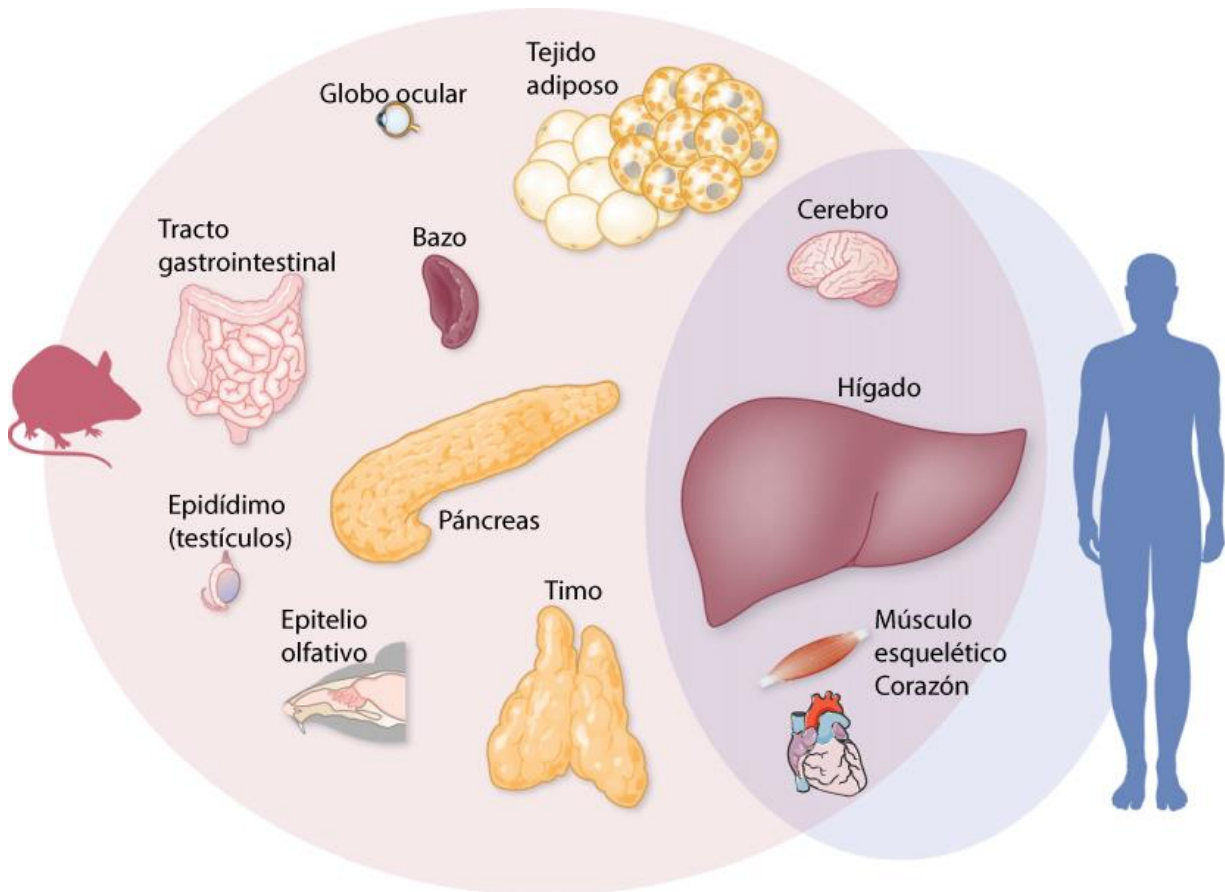
FGF21 es una proteína formada por 209 aminoácidos en humanos y 210 en ratones, con una similitud entre ellos del 81%. Es el FGF endocrino más abundante en circulación. En ratón se expresa principalmente en hígado y timo (Nishimura et al., 2000) y en menor medida en otros tejidos como páncreas (Wente et al., 2006), músculo esquelético (Izumiya et al., 2008; Ribas et al., 2014), corazón (Planavila et al., 2013) y en los tejidos adiposos blanco (Muisse et al., 2008) y marrón (Hondares et al., 2011).

En humanos se ha encontrado expresado en cerebro, hígado, músculo esquelético y cardíaco (Staiger et al., 2017) aunque su expresión en tejido adiposo blanco es mínima y un tanto mayor en tejido adiposo marrón (Hondares et al., 2014).

En modelos de roedores, la acción endocrina que tiene FGF21 provoca la inducción del transportador Glut1 (Kharitonov et al., 2005), la activación de la actividad termogénica del tejido adiposo marrón (Hondares et al., 2010), la promoción de la aparición de células beige en depósitos de tejido adiposo blanco (Fisher et al., 2012) o la función intestinal en lactantes (Gavaldà-Navarro et al., 2015). FGF21 también tiene efectos autocrinos/paracrinos, por ejemplo, favoreciendo la cetogénesis hepática (Badman et al., 2007).

El papel de FGF21 en cada tipo celular y su importancia en el metabolismo local de cada tejido o global como individuo puede explicarse mediante su regulación transcripcional, que se regula mediante diferentes mecanismos entre los cuales encontramos entre los cuales encontramos el estado nutricional del individuo o la exposición a bajas temperaturas. Se ha sugerido que FGF21 es crucial en la regulación de la utilización de sustratos en situaciones de déficit energético o de alta demanda (Degirolamo et al., 2016; Giralt et al., 2015). Por consiguiente, cada tejido presentará una regulación diferencial en la expresión de la proteína y en sus efectos.





**Figura 14. Comparación entre la expresión de FGF21 en ratón y en humano.** Imagen obtenida y modificada de Staiger et al., 2017.

### 3.2.1.1. FGF21 en hígado

El hígado es un órgano con gran importancia en la homeostasis energética. Gracias a estudios realizados en animales, se ha visto que FGF21 controla la respuesta del hígado frente a ayuno. En una situación de falta de nutrientes el tejido adiposo activa la lipólisis liberando a la circulación ácidos grasos y glicerol, el cual es sustrato de la gluconeogénesis y la cetogénesis hepática.

Así mismo, los ácidos grasos son ligandos naturales del receptor nuclear PPAR $\alpha$ , regulador clave del metabolismo lipídico y glucídico en hígado. El heterodímero PPAR $\alpha$ -RXR reconoce el elemento de respuesta a PPAR, presente en el promotor de FGF21, induciendo su síntesis. Por tanto, en condiciones de ayuno, el hígado es el principal responsable del aumento en circulación de esta proteína y de su efecto en otros tejidos (BonDurant & Potthoff, 2018). Cuando el ayuno se prolonga FGF21, vía PCG1 $\alpha$ , tendrá la

capacidad de regular varios genes relacionados con la Gluconeogénesis e inhibirla. Además se ha observado como la inducción de FGF21 en el hígado en caso de ayuno puede ser regulada por una vía dependiente de glucagón y PKA, dejando de lado la activación de la expresión por PPAR $\alpha$  (Badman et al., 2007; Iizuka et al., 2009).

La expresión de FGF21 no solamente es inducida en caso de déficit energético. Una situación opuesta, como es la sobrealimentación, altos niveles de glucosa también provocan un aumento de su expresión. Esta respuesta es mediada por la proteína de unión al elemento de respuesta a carbohidratos (ChREBP) ya que el promotor de FGF21 también contiene el elemento de respuesta a carbohidratos (ChRE) (Iizuka et al., 2009). De igual modo, en condiciones de dieta rica en grasas, los mismos ácidos grasos inducen la expresión de FGF21 en el hígado, vía la activación de PPAR $\alpha$ , y aumentan sus niveles circulantes.

La administración crónica de FGF21 en ratones obesos (ya sea inducidos por una dieta alta en grasas o ob/ob) provoca un descenso de los niveles de glucosa circulantes debido a un aumento de su captación por el hígado y otros tejidos y un aumento en la sensibilidad a la insulina. Además, FGF21 provoca la inhibición de SREBP-1, factor clave de la regulación de varios genes implicados en la lipogénesis. Como resultado, existe una mejora en el llamado hígado graso relacionado con la obesidad (Xu et al., 2009).

### **3.2.1.2. FGF21 en tejido adiposo**

FGF21 se ha descrito como un factor importante en el control de la función y del metabolismo del tejido adiposo, tanto del blanco como del marrón. Además, se ha observado como ambos tejidos son dianas de FGF21, pero también productores de este factor, con efecto autocrino o paracrino en el mismo tejido. La expresión de FGF21 en tejido adiposo está regulada por PPAR $\gamma$  y no PPAR $\alpha$  como en hígado (Arner et al., 2008; Potthoff et al., 2012; Woo et al., 2013). Sin embargo los efectos de FGF21 sobre el tejido adiposo dependen del contexto fisiológico en el que se encuentre el tejido, como por ejemplo su estado nutricional.

El mayor efecto que FGF21 ejerce sobre el tejido adiposo es el aumento en la captación de glucosa por parte de los adipocitos de una forma independiente a insulina. En la

captación de glucosa dependiente de insulina, el transportador responsable, Glut4, es translocado a la membrana plasmática por efecto de la hormona. En cambio, FGF21 induce la síntesis del transportador Glut1. Aun siendo vías independientes, FGF21 mejora la captación de glucosa tanto por Glut1 como por Glut4, haciendo de esta molécula un gran candidato para el tratamiento de la T2DM (Kharitononkov et al., 2005).

A pesar del efecto beneficioso sobre la homeóstasis de la glucosa, los niveles de FGF21 son anormalmente elevados en condiciones de obesidad, tanto en humanos como en ratones, sugiriendo que esta vía señalizadora se encuentra impedida (Fisher et al., 2010; Gallego-Escuredo et al., 2015; Villarroya et al., 2014). Este fenómeno de resistencia a FGF21 en obesidad se puede atribuir a una reducción anormal de la expresión del correceptor  $\beta$ -Klotho en tejido adiposo blanco (Díaz-Delfín et al., 2012; Fisher et al., 2010; Ge et al., 2011). El hecho de que los niveles circulantes de FGF21 en sérum se encuentren elevados en pacientes con obesidad, síndrome metabólico, T2DM, etc. sugiere a esta proteína como un potencial biomarcador de estas enfermedades (Semba et al., 2013; Zhang et al., 2019).

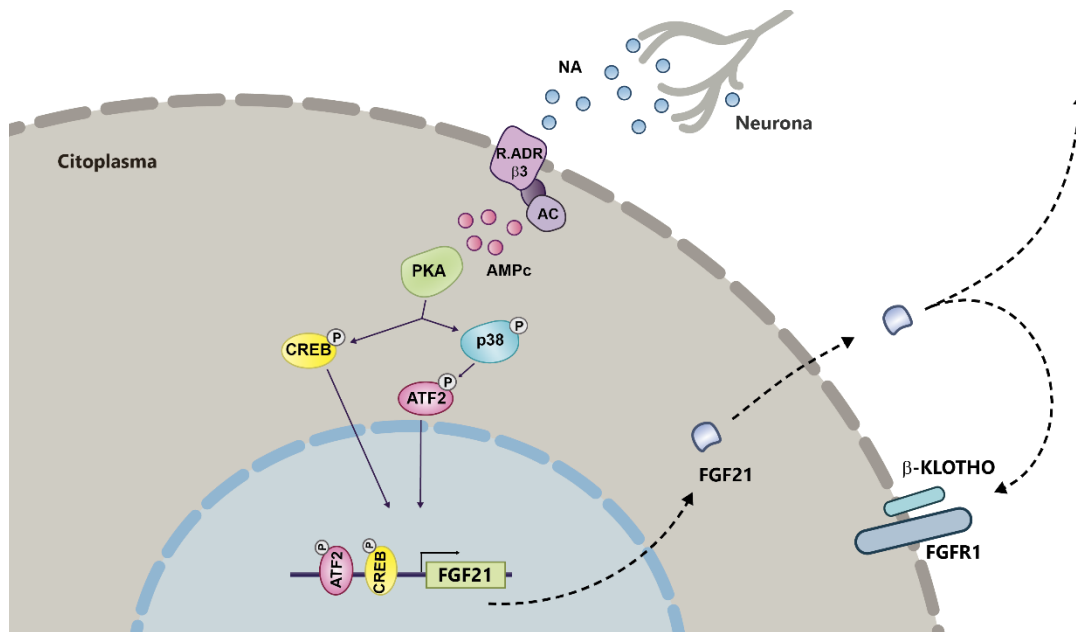
En cuanto al metabolismo lipídico, FGF21 había sido considerada inicialmente como una hormona inductora de la lipólisis, pero estudios posteriores la han descrito como un inhibidor de la vía, tanto in vivo como in vitro (Arner et al., 2008; Dutchak et al., 2012; Inagaki et al., 2005; Potthoff et al., 2012), de manera que el papel de FGF21 en la lipólisis sigue sin estar inequívocamente establecido.

Además, FGF21 regula la expresión de varias hormonas en el TAB. Así, FGF21 aumenta la expresión y secreción de adiponectina, mientras que disminuye la producción de leptina. Los efectos hipoglucemiantes y sensibilizadores a la insulina de FGF21 se pierden en modelos de ratón *knock-out* para el gen de la adiponectina, sugiriendo una estrecha relación entre ambas hormonas (Lin et al., 2013). En cuanto al estado global del organismo, el aumento de FGF21 incrementa los receptores de leptina en tejidos periféricos, contribuyendo a un descenso en el peso corporal (Holland et al., 2014; Véniant et al., 2012).

### **3.2.1.3. FGF21, tejido adiposo marrón y *browning* del tejido adiposo blanco**

FGF21 ha sido descrito como una batocina que actúa a nivel local reforzando la activación de la termogénesis en el TAM (Cereijo et al., 2015). Estudios realizados in vivo e in vitro han demostrado que bajo un estímulo termogénico, los adipocitos marrones son capaces de inducir la expresión y secreción de FGF21, y en condiciones de alta activación termogénica el TAM puede ser una fuente sustancial de FGF21 sistémico (Hondares et al., 2011).

Como ya se ha explicado en el bloque anterior, bajo un estímulo termogénico (frío), las neuronas que inervan el tejido adiposo marrón liberan NA, que activa los receptores  $\beta$ -adrenérgicos situados en la membrana de los adipocitos, iniciando la vía clásica de activación de la termogénesis, que dará como resultado la fosforilación de los factores ATF2 (por la MAPK p38) y CREB (por PKA). El promotor de FGF21 tiene elementos de respuesta de ambos factores, dando lugar a una inducción de su expresión y secreción (Hondares et al., 2011), reforzando la actividad termogénica del TAM y promoviendo el “browning”, es decir, la aparición de adipocitos beige en depósitos de tejido adiposo blanco subcutáneo (Fisher et al., 2012). En la activación de la termogénesis por FGF21 no se puede excluir que parte de este proceso ocurra con participación del SNC, el cual también es diana de dicho factor (Owen et al., 2014).



**Figura 15. Esquema de la activación de la expresión, síntesis y secreción de FGF21 en un adipocito marrón.** La activación noradrenérgica de los adipocitos marrones provoca un aumento de la síntesis y liberación de FGF21, que puede actuar tanto en la misma célula como en células de alrededor, potenciando la señal. Imagen modificada a partir de tesis Dra. Laura Campderrós.

### 3.2.1.4. FGF21 y músculo esquelético

Tanto la expresión de FGF21 como  $\beta$ -Klotho son muy bajas en el músculo esquelético. A pesar de ello, FGF21 es un biomarcador de patologías neuromusculares debidas a mutaciones patogénicas del DNA mitocondrial (Tynismaa et al., 2010), estando la concentración plasmática de FGF21 anormalmente elevada en esos pacientes. La alteración experimental de la función respiratoria mitocondrial en células musculares aumenta su expresión y secreción de FGF21 (Ribas et al., 2014). El papel de FGF21 como biomarcador de este tipo de enfermedades se encuentra en consideración para su uso en la detección de este tipo específico de enfermedades neuromusculares.

### 3.2.1.5. FGF21 y corazón

Originalmente el corazón no fue considerado ni diana ni fuente de FGF21 a causa de la baja expresión tanto de este FGF como de su correceptor  $\beta$ -Klotho a nivel de mRNA (Fon Tacer et al., 2010). A pesar de ello, existen estudios en los que se ha demostrado que

FGF21 está involucrado en la regulación de la función cardíaca. FGF21 ejerce un papel importante en la remodelación cardíaca (Liu et al., 2013; Planavila et al., 2013; Planavila, et al., 2015a), con potentes efectos cardioprotectores y antihipertróficos. FGF21 también ejerce efectos protectores tras infarto de miocardio, inhibiendo la apoptosis de los cardiomiocitos, atenuando la remodelación cardíaca patológica y reduciendo el tamaño de la zona infartada (Patel et al., 2014) Además, FGF21 modula el estrés oxidativo, uno de los causantes del fallo cardíaco (Planavila et al., 2015b).

El corazón no es solo diana, sino también productor de FGF21, el cual puede funcionar de manera autocrina y, aunque menos probablemente, endocrina. FGF21 se expresa en cardiomiocitos en respuesta a diferentes estímulos de estrés cardíaco, como hipertrofia cardíaca o infarto de miocardio. Se ha comprobado que FGF21 es secretado en estas patologías tanto en modelos animales como en pacientes humanos (Planavila et al., 2015a; Planavila et al., 2015b; Semba et al., 2013). Este incremento en caso de enfermedad ha hecho de FGF21 un potencial candidato como biomarcador tanto de enfermedades metabólicas como cardíacas. La expresión de FGF21 aumenta tanto en condiciones patológicas (infarto, hipertrofia) como en fisiológicas (frío, gestación) sugiriendo un papel cardioprotectivo para esta proteína (Redondo-Angulo et al., 2017). Además, se ha visto un papel protector de FGF21 frente a la fibrosis cardíaca asociada tanto al daño como al fallo cardíaco (Ferrer-Curriu et al., 2019).

### **3.2.1.6. FGF21 y sistema nervioso central**

FGF21 es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica y ha sido detectado en fluido cerebroespinal tanto de humanos como de roedores (Tan et al., 2011) . Además, tanto el receptor FGFR1c como el correceptor  $\beta$ -Klotho se expresan en diferentes áreas del cerebro, como hipotálamo e hipófisis (Bookout et al., 2014; Liang et al., 2014; Fon Tacer et al., 2010). El incremento de niveles de FGF21 en el cerebro activa la vía de señalización de ERK1/2 causando la liberación de diferentes hormonas en otras áreas del cerebro. Estas “hormonas secundarias” activarán en diferentes tejidos periféricos respuestas fisiológicas que contribuirán a los efectos beneficiosos atribuidas a FGF21, como por ejemplo la activación de la termogénesis en TAM o del *Browning* en TAB subcutáneo.

La inyección intracerebroventricular de FGF21 provoca un aumento del gasto energético y de la sensibilidad a insulina en ratas obesas inducidas por dieta (Sarruf et al., 2010), demostrando así que FGF21 puede actuar directamente sobre el cerebro a nivel central.

### **3.2.1.7. FGF21 en humanos**

Desde su identificación y caracterización en humanos, se ha intentado estudiar el papel de FGF21 en el metabolismo y en diferentes enfermedades con gran incidencia en nuestra sociedad. Se ha visto como FGF21 correlaciona positivamente con un incremento del peso corporal y con la presencia de síndrome metabólico, con la intolerancia a la glucosa, con T2DM, NAFLD y enfermedades cardiovasculares (An et al., 2012; Chavez et al., 2009; Chen et al., 2008; Cuevas-Ramos et al., 2010; Yang et al., 2011; Zhang et al., 2019). Además, los niveles de FGF21 se encuentran elevados en humanos en estado de lactancia, en dietas cetogénicas o altas en grasas (Gälman et al., 2008; Schoenberg et al., 2011).

Dado que en estudios realizados en modelos animales se ha observado cómo FGF21 es capaz de normalizar los niveles de glucosa y lípidos y de reducir el peso corporal, se han propuesto análogos de FGF21 como aproximación terapéutica para el tratamiento de enfermedades como la diabetes tipo 2 o la obesidad. Dado que la concentración de FGF21 en este tipo de enfermedades se encuentra incrementada respecto a controles sanos, el potencial uso terapéutico de FGF21 podría parecer contradictorio. Sin embargo, se ha descrito que este incremento en los niveles de FGF21 tiene lugar a causa de que su señalización y regulación se encuentra impedida, propia de una situación de resistencia a FGF21. Esta pérdida de respuesta asociada a obesidad y a síndrome metabólico es similar a la que encontraríamos con otras hormonas, como por ejemplo la insulina. Debido a la falta de respuesta a FGF21, los órganos secretores continúan produciendo y liberando dicha hormona, como mecanismo compensatorio (Fisher et al., 2010). A pesar de dicha resistencia, el tratamiento con FGF21 o análogos sintéticos tanto en modelos roedores obesos y/o resistentes a la insulina como en pacientes con obesidad ha resultado beneficioso a nivel metabólico (Gaich et al., 2013; Hale et al., 2012; Reinehr et

al., 2012). Ello indica que, pese a los niveles elevados de FGF21 en estas patologías, el aumento provocado por un tratamiento farmacológico mantiene efectos positivos.

### **3.2.2. FGF15/19**

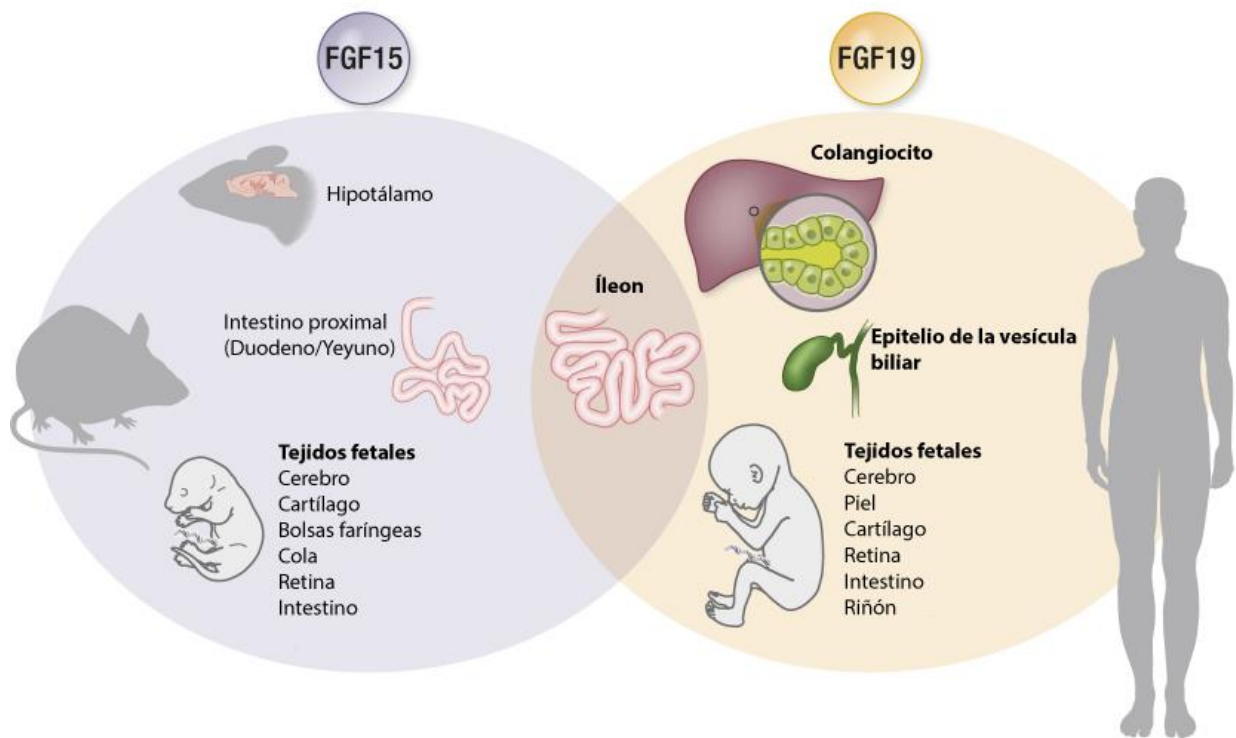
Nishimura et al. identificaron en 1999 por primera vez a FGF19 en humanos. FGF15 es el ortólogo murino de FGF19 y, a pesar de su baja homología (sobre un 40 %), hasta lo que se conoce, FGF19 y FGF15 comparten distribución y muchas de sus funciones (McWhirter et al., 1997; Nishimura et al., 1999). FGF15/19 es sintetizado de forma postprandial, especialmente en el caso de una dieta rica en grasas y participa en la retroalimentación negativa del control de la síntesis de ácidos biliares en el hígado y su consecuente secreción desde la vesícula biliar hacia el intestino.

Numerosos estudios animales han confirmado el potencial terapéutico de FGF19 en el tratamiento de trastornos metabólicos como la obesidad y la diabetes. De hecho, FGF15/19 ejerce multitud de efectos muy similares a los de la hormona insulina, como la estimulación de la síntesis de glicógeno o la inhibición de la gluconeogénesis en hígado.

#### **3.2.2.1. Expresión, regulación y función general (Regulación de los Ácidos Biliares)**

FGF15/19 ha sido caracterizada como una enterocina encargada de regular el metabolismo de los ácidos biliares en hígado. El principal lugar donde se produce la síntesis y liberación FGF15/19 es el íleon, la sección final del intestino. La expresión de FGF15/19 en enterocitos se encuentra regulada por el receptor nuclear FXR (Farnesoid X Receptor) (Inagaki et al., 2005).





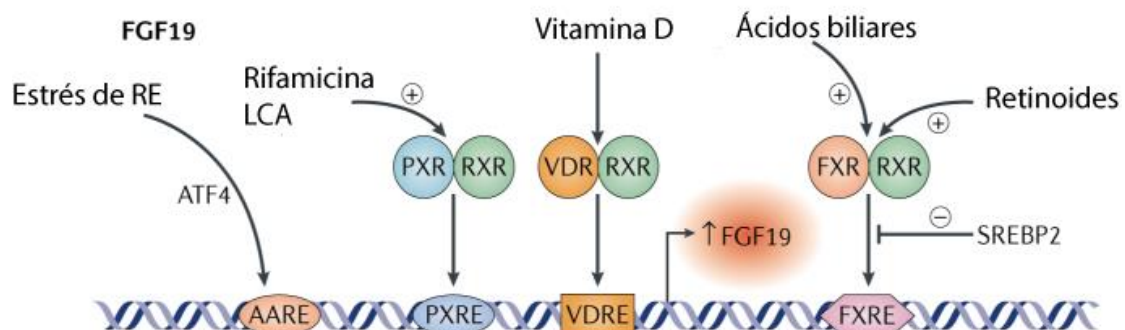
**Figura 16. La expresión de FGF15/19 en diferentes tejidos.** Comparación de los principales sitios anatómicos de la expresión de *fgf15* en ratones y la expresión de *FGF19* en humanos. Figura obtenida y modificada de Jornayvaz et al., 2018.

Los ácidos biliares son fuertes detergentes con un gran efecto emulsor, sintetizados en el hígado a partir de colesterol. Después de cada comida, la vesícula biliar se contrae liberando en el intestino los ácidos biliares que tiene almacenados en su interior. Allí permitirán la solubilización y posterior absorción de lípidos y de vitaminas liposolubles al interior de los enterocitos. A pesar de su importante función, los ácidos biliares son altamente tóxicos de manera que su síntesis tiene que estar estrictamente regulada (Johansson et al., 2018; Kir et al., 2011).

Los ligandos naturales de FXR son los ácidos biliares. En ausencia de estos, FXR forma un heterodímero con el factor nuclear Retinoid X Receptor (RXR), encontrándose ambos unidos a la región del DNA de respuesta a FXRE (FXRE) junto con varios correpressores. Cuando se produce un aumento de la concentración de ácidos biliares dentro del enterocito, especialmente tras su reabsorción postprandial, estos se unen a FXR,

promoviendo un cambio conformacional que permitirá al heterodímero FXR-RXR liberarse de los correpresores y unirse a sus coactivadores, induciendo así la expresión de FGF15/19 y su secreción (Holt et al., 2003; Inagaki et al., 2005).

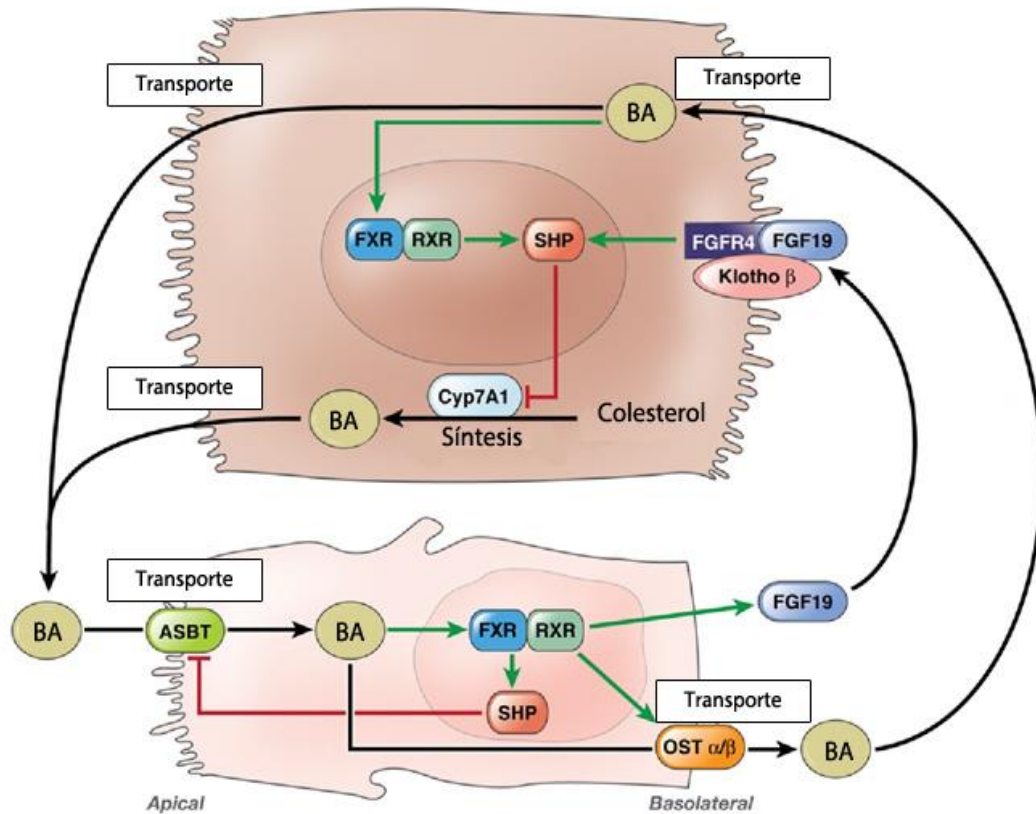
Estudios recientes han sugerido que la expresión de FGF15/19 podría estar también controlada por otros componentes derivados de la dieta como las vitaminas A y D (Schmidt et al., 2010) y el colesterol (Henkel et al., 2011). De hecho se ha visto como los receptores de Vitamina D (VDR y el receptor Pregnane X receptor (PXR) son capaces de inducir la expresión de FGF15 en ratón (Witsuba et al., 2007; Schmidt et al., 2010). Finalmente, moléculas de estrés de retículo endoplasmático (ER) han sido relacionadas con la regulación transcripcional de FGF19 (Shimizu et al., 2015). A pesar de que existe información respecto la regulación transcripcional de este FGF, los factores que regulan su secreción son motivo de investigación. Sin embargo, un estudio reciente ha identificado la proteína DIET1 como un factor post-transcripcional que modula la secreción de FGF15/19 tanto en ratón como en humano (Vergnes et al., 2013).



**Figura 17. Regulación transcripcional de la expresión de FGF19.** Esquema de los diferentes agonistas, receptores nucleares y factores que pueden activar o inhibir su transcripción. Imagen modificada a partir de Degirolamo et al., 2016.

Para que realice su función, FGF15/19 requiere la presencia de  $\beta$ -Klotho, cofactor que facilita la unión del FGF con su receptor preferente en hepatocitos, FGFR4 (Lin et al., 2007). La presencia de ambos, tanto del receptor como del cofactor, y su localización hacen del hígado la principal diana de FGF15/19, a donde llega a través de la circulación

portal. Una vez unido a su receptor, FGF15/19 inhibe la actividad de la colesterol-7- $\alpha$ -hidroxilasa (Cyp7a1), enzima que cataliza la conversión del colesterol en 7- $\alpha$ -hidroxicolesterol, etapa limitante en la biosíntesis de los ácidos biliares (Inagaki et al., 2005; Kurosu et al., 2007). Esta inhibición se efectúa vía el receptor nuclear Small Heterodimer Partner (SHP) cuya expresión es inducida por FXR. SHP no tiene un dominio de unión a DNA, pero puede interaccionar con numerosas proteínas para llevar a cabo su función reguladora. La señal provocada por FGF15/19 provoca que diferentes MAPK, como las ERK, fosforilen a SHP en diferentes localizaciones. Una vez fosforilada, esta es capaz de inhibir la modificación por histonas de CYP7A1, inhibiendo su función. Mediante estudios en ratones deficientes en genes cruciales de esta vía se ha confirmado cómo el feedback negativo existente para controlar la producción de ácidos biliares en hígado requiere la expresión de FGF15/19 en íleon (Ito et al., 2005; Tomiyama et al., 2010; Yu et al., 2000). Sin embargo, este mecanismo de regulación de la síntesis de ácidos biliares no es el único, ya que ellos mismos son capaces de inhibir su propia síntesis vía FXR en hepatocitos, ya que este receptor nuclear regula la expresión de SHP (Sinal et al., 2000).



**Figura 18. Regulación enterohepática de la síntesis de ácidos biliares mediante FGF19.** Esquema de la regulación de la biosíntesis de ácidos biliares en hígado por la acción de FGF19 y por ellos mismos. Imagen modificada de Camilleri et al., 2014.

FGF15/19 también actúa a nivel de la vesícula biliar, causando su relajación y llenando con ácidos biliares, contraponiéndose a la actividad de la Cholestecystokinín (CCK), causante de la contracción de la vesícula biliar y de la liberación de los ácidos biliares (Kir et al., 2011). En modelos de ratón deficientes en genes clave de la vía de FGF15/19, como *Fgfr4*<sup>-/-</sup>, *Klb*<sup>-/-</sup> y *Fgf15*<sup>-/-</sup>, se ha visto que sus vesículas biliares son significativamente más pequeñas, recuperando su tamaño normal después de la administración exógena de este FGF (Choi et al., 2006).

De manera que FGF15/19 regula la disponibilidad de ácidos biliares a dos niveles: inhibiendo su síntesis en hígado y favoreciendo su almacenaje en la vesícula biliar.

### 3.2.2.2. FGF15/19 y el metabolismo de los carbohidratos

El metabolismo de los carbohidratos se encuentra regulado por numerosos factores, entre los que se encuentran las hormonas de respuesta temprana: insulina y glucagón. La insulina es secretada después de la comida y estimula la captación de glucosa, la síntesis de glicógeno hepático, la lipogénesis e inhibe la gluconeogénesis. FGF19 es una hormona de respuesta tardía que también estimula la síntesis de glicógeno hepático, inhibe la gluconeogénesis pero, a diferencia de la insulina, no produce un incremento en la lipogénesis hepática (Kir et al., 2011; Zhang et al., 2015).

Como hemos visto, en respuesta a la presencia de ácidos biliares y nutrientes en el intestino, en ratón la expresión de FGF15 aumenta gradualmente en el íleon con un pico en su concentración plasmática alrededor de 1 hora después de la ingesta (Potthoff et al., 2011). En humanos, los niveles circulantes de FGF19 tienen un pico de concentración plasmática después de 2 o 3 horas de haber ingerido alimentos (Lundåsen et al., 2006; Walters et al., 2009) y FGF19 tiene una vida media de aproximadamente 30 minutos (Potthoff et al., 2012). Este pico en la concentración de FGF19 es posterior al de la insulina, que sucede alrededor de 1 hora después de la ingesta. Además, se ha visto que la insulina incrementa los niveles de FGFR4 en hígado, sugiriendo que las dos hormonas trabajan coordinadas para facilitar un apropiado almacenamiento de los nutrientes ingeridos después de comer (Kir et al., 2011). Así, FGF19 e insulina comparten funciones en relación a su acción hepática pero actúan a través de vías de señalización distintas: FGF19 activa la vía Ras/ERK1/MAPK mientras que la insulina activa la vía PI3k/AKT, permitiendo que cada una tenga además acciones biológicas diferentes.

Ratones deficientes en FGF15 o FGFR4 muestran alteraciones en la homeostasis de la glucosa, con un descenso en la síntesis de glicógeno (Kir et al., 2011; Potthoff et al., 2011). Además, animales *Fgf15* <sup>-/-</sup> muestran una menor cantidad de glicógeno hepático y problemas en mantener la concentración de glucosa en sangre comparados con animales salvajes. Estos problemas eran revertidos después de la administración de FGF19, incrementando a su vez la tolerancia a la glucosa (Kir et al., 2011).

Es bien sabido que el intestino es capaz, por otro lado, de secretar factores hormonales (enterocinas) que regulan la secreción de insulina después de la ingesta de una forma

dependiente de glucosa. Además, son capaces de controlar regular la concentración de glucosa, el metabolismo lipídico, la motilidad del intestino, el apetito y el peso corporal y el sistema inmunitario. Las dos enterocinas más estudiadas son el péptido inhibitor gástrico (GIP) y el péptido similar al glucagón tipo 1 (GLP1) (Campbell & Drucker, 2013).

### **3.2.2.3. FGF19 y la síntesis de proteínas**

FGF19 promueve la síntesis de proteínas en hígado. Gracias a su acción hepática se promueve la fosforilación de eIF4B (eukaryotic initiation factors 4B) y eIF4E, que forman el complejo eIF4F. Este complejo es el encargado de mediar la unión entre el mRNA y el ribosoma. Además de incrementar la fosforilación del complejo, FGF19 ejerce el mismo efecto sobre la subunidad ribosomal rpS6 (ribosomal protein Subunit S6), que provoca una mayor estimulación de la síntesis proteica (Kir et al., 2011).

### **3.2.2.4. FGF19 y el metabolismo lipídico**

Además de los efectos que hemos visto, FGF15/19 también tiene un papel regulador del metabolismo lipídico. Ratones transgénicos que sobreexpresan el gen de FGF19 son más delgados que los ratones salvajes, incluso con un aumento de la ingesta (Tomlinson et al., 2002). La sobreexpresión de FGF19 confiere resistencia a una dieta alta en grasas, pudiendo tener relación con el efecto de FGF19 reduciendo la capacidad de la insulina para estimular la síntesis de ácidos grasos.

FGF19 también tiene la capacidad de inhibir la expresión de SERBP-1c, factor de transcripción regulador de la expresión de varios genes de respuesta a la insulina y responsables del metabolismo de la glucosa y de la síntesis de lípidos. Asimismo, FGF19 incrementa la expresión de SHP, que a su vez inhibe la expresión de genes codificantes por enzimas lipogénicas mediante el mismo SERBP-1c (Bhatnagar et al., 2009).

Por otra parte, se ha visto que el tratamiento con FGF19 a ratones con obesidad inducida por dieta rica en grasas incrementa los triglicéridos y colesterol en sangre (Tomlinson et al., 2002). Así que se ha propuesto que dependiendo de las circunstancias y condiciones nutricionales, FGF19 puede incrementar o disminuir la concentración de lípidos.

FGF19 induce la lipólisis mediante la activación vía FGFR1c, principalmente en tejido adiposo y en otros, excepto en hígado (Henkel et al., 2011; Jahn et al., 2015). Por otra parte, FGF19 induce lipogénesis en tejidos no hepáticos vía FGFR4, en contraste con la acción inhibitoria sobre la síntesis de ácidos grasos en hígado, a diferencia de la insulina (F. Zhang et al., 2015). Esta acción dual puede atribuirse a la unión de FGF19 a diferentes receptores. La activación de la vía de FGF15/19 se ha postulado como potencial diana para el tratamiento de la esteatosis hepática, ya que ratones transgénicos para FGF19 muestran una reducción en la expresión de genes lipogénicos y tienen un menor contenido de lípidos en su hígado (Potthoff et al., 2012).

Como resumen, podemos decir que FGF15/19 promueve la oxidación de ácidos grasos, la lipogénesis en hígado, y se comporta como la insulina: como una hormona postprandial que estimula tanto la síntesis de glicógeno como la de proteínas mientras que inhibe la producción de glucosa hepática (Alvarez-Sola et al., 2017).

### **3.2.2.5. FGF19 y metabolismo energético**

Algunos estudios indicando efectos beneficiosos de FGF15/19 sobre la homeostasis energética han hecho que este FGF endocrino se postule como un interesante candidato terapéutico para el tratamiento de enfermedades metabólicas como la obesidad y la T2DM.

Estudios realizados en ratón han mostrado indicios de una acción beneficiosa tanto de FGF15 como de FGF19 en el balance energético. Como se ha mencionado anteriormente, ratones que sobreexpresan la proteína FGF19 son más delgados que los ratones control, mostrando un menor contenido de grasas a pesar de tener una mayor ingesta. Este hecho podría explicarse por un mayor consumo de oxígeno y por una mayor sensibilidad a insulina (Tomlinson et al., 2002). Además, la sobreexpresión de FGF19 también tiene efectos en ratones obesos debido a dieta rica en grasas y en ratones obesos ob/ob, en los que se describe un aumento de la actividad del TAM.

Se ha visto además que los efectos de FGF19 bajando los niveles de glucosa se dan a través del receptor FGFR1, no través de FGFR4 como ocurría en la regulación sobre la síntesis hepática de ácidos biliares (Wu et al., 2011; Wu et al., 2009). Por otra parte, la

acción de FGF15/19 sobre el metabolismo energético parece que involucra al sistema nervioso central, pudiendo ser debida a un efecto indirecto de FGF15/19 sobre el tejido adiposo vía acciones centrales (Lan et al., 2017). Ya que numerosas hormonas secretadas en el intestino actúan a nivel central para provocar u obtener efectos metabólicos (control de ingesta, gasto energético o tolerancia a la glucosa), no es extraño pensar que FGF15/19 puede tener un papel análogo en el eje intestino-cerebro (Monteiro & Batterham, 2017; Murphy et al., 2006).

En ciertas partes del cerebro, como por ejemplo el hipotálamo, se encuentran expresados tanto los receptores FGFR1 y FGFR4 como el correceptor KLB (Bookout et al., 2014; Ryan et al., 2013). El estímulo con FGF19 provoca la fosforilación de ERK en el hipotálamo (Hsuchou et al., 2013), provocando una mejorando la sensibilidad a la insulina y la glucemia, demostrando de esta manera que el SNC es capaz de responder a FGF19 (Marcelin et al., 2014; Morton et al., 2013; Ryan et al., 2013). Además, la infusión de FGF19 de manera central produce un incremento en la tasa metabólica comparable a una administración sistémica, mejorando el estado glucémico y la señalización periférica de insulina (Morton et al., 2013). Estos estudios se han realizado en modelos animales y su translación a humanos requerirá estudios posteriores.

### **3.2.2.6. FGF19 y tejido muscular**

Miembros de la familia de FGF han demostrado ser importantes reguladores de la miogénesis, la formación del tejido muscular, sobre todo durante el desarrollo embrionario (Armand et al., 2006). Aunque los niveles bajos de expresión de KLB no lo hacían sospechar, recientemente Benoit et al. descubrieron un efecto de FGF19 sobre la regulación de la masa del músculo esquelético. El tratamiento de fibras musculares con FGF19 desencadenaba la fosforilación tanto de ERK1/2 como de la cinasa encargada de la fosforilación de la subunidad ribosomal S6 (rpS6). Esta activación de la vía provocaba hipertrofia muscular, mejorando la fuerza del músculo. Cabe destacar que la hipertrofia no está relacionada con el número o el tipo de fibras, sino con la elongación de las miofibras. En mioblastos humanos, FGF19 no afecta a la proliferación celular, sino incrementa el tamaño de los miotubos. Otra acción de FGF19 sobre el tejido muscular se



encuentra en ratones avanzados de edad u obesos, donde el tratamiento con FGF19 aminoraba la atrofia muscular. Así, FGF19 se postula en relación a potenciales tratamientos en procesos asociados a pérdida muscular (Benoit et al., 2017).

### **3.2.2.7. FGF19 y enfermedades humanas**

Muchos de los estudios mencionados anteriormente se ven condicionados por las limitaciones experimentales existentes actualmente para el estudio de FGF15 y FGF19. Como se ha mencionado anteriormente, varios estudios utilizan modelos de sobreexpresión o tratamiento de modelos animales de roedores empleando FGF19 (humano), en lugar de FGF15, siendo por tanto un modelo heterólogo. Ello es debido a la no disponibilidad de FGF15 recombinante. Además, no existen herramientas estándar, basadas en anticuerpos, que permitan medir las concentraciones de FGF15 en ratones o ratas de forma fiable. Tan solo algún estudio reciente ha sido capaz de detectar FGF15 mediante la técnica de SISCAPA (Stable isotope standards and captured by anti-peptide antibodies), mostrando un patrón de concentración similar a FGF19 (Dutchak et al., 2012).

El papel de FGF19 en diferentes aspectos de la fisiología humana y en diferentes tipos de enfermedades está siendo sujeto de estudio en los últimos años y su importancia está creciendo rápidamente, como lo acreditan diversos estudios recientes en humanos. Los niveles circulantes de FGF19 tienen una variación diurna provocada por la ingesta y relacionada íntimamente con la regulación de ácidos biliares de manera postprandial (Lundåsen et al., 2006). La concentración de FGF19 aumenta unos 90-120 minutos después de la ingesta, tras el incremento postprandial de ácidos biliares y tiene una vida media de aproximadamente 30 minutos (Potthoff et al., 2012).

Se han descrito diferentes patologías que tienen asociadas alteraciones en los niveles de FGF19 en sangre. Por ejemplo, la concentración de FGF19 en pacientes con colestasis extrahepática y hemodiálisis crónica se encuentra incrementada (Reiche et al., 2010; Schaap et al., 2009), mientras que en el caso de pacientes con obesidad, infectados con VIH, con enfermedad inflamatoria intestinal, con NAFLD (non-alcoholic fatty liver

disease) y/o T2DM está reducida (Gallego-Escuredo et al., 2012; Lenicek et al., 2011; Mráz et al., 2011; Schreuder et al., 2010; Walters et al., 2009).

La **obesidad** se está convirtiendo en uno de los problemas de salud más generalizados, con una gran incidencia en países desarrollados, favoreciendo la aparición de alteraciones relacionadas con el metabolismo, como la T2DM, las enfermedades cardiovasculares, NAFLD y dislipidemias, llevando a un incremento de la morbilidad y mortalidad relacionadas con estas patologías (Gómez-Ambrosi et al., 2017). Varios estudios han indicado que los niveles basales de FGF19 en pacientes con obesidad se encuentran reducidos comparados con controles sanos, sin relación evidente con su glucemia o sensibilidad a insulina (Gómez-Ambrosi et al., 2017; Mráz et al., 2011; Renner et al., 2014). Estos hallazgos sugieren que el peso excesivo, debido a una acumulación de tejido adiposo visceral, es suficiente para provocar un descenso de los niveles de FGF19 y mostrando una correlación entre este y el nivel de adiposidad (Hu et al., 2018). Por otro lado, los niveles de expresión de KLB en tejido adiposo visceral de pacientes con obesidad se encuentran reducidos respecto a controles sanos (Gallego-Escuredo et al., 2015). Ello hace pensar que alteraciones en el sistema de respuesta a FGF19 pueden estar presentes en situaciones de obesidad.

La pérdida de peso, aunque sea modesta, gracias a cambios en el estilo de vida (reducción de la ingesta calórica y aumento del gasto calórico) (Yumuk et al., 2014), está relacionada con una mejora de las comorbilidades relacionadas con la obesidad. Sin embargo, la pérdida de peso gracias a cambios del estilo de vida a personas con obesidad no consigue restaurar los niveles circulantes de FGF19. Únicamente la pérdida de peso como resultado de la cirugía bariátrica conlleva un aumento en la concentración de FGF19 (Biemann et al., 2016; Gómez-Ambrosi et al., 2017; Mráz et al., 2011; van Nierop et al., 2017).

La correlación negativa entre FGF19 y la obesidad ha sido confirmada también en estudios con animales. La administración de este FGF a ratones con obesidad inducida por dietas altas en grasas resultó en una pérdida de peso y una reducción de la glucosa, de manera dependiente de dosis. También llevó a un aumento en la oxidación de lípidos en hígado y a un descenso de los triglicéridos hepáticos. Además, la administración prolongada de FGF19 llevó a un aumento en la expresión de genes relacionados con la

activación termogénica del TAM (Fu et al., 2004; Zhang et al., 2015). No obstante, cabe recordar el carácter heterólogo de estos estudios (tratamiento con FGF19 humano a ratones).

En cuanto a la **diabetes**, algunos estudios han descrito como los niveles de FGF19 correlacionan negativamente con el metabolismo de la glucosa o la sensibilidad a insulina, destacando cómo los pacientes con T2DM o síndrome metabólico tienen niveles inferiores a los de los controles sanos (Barutcuoglu et al., 2011; Sonne et al., 2016; Stejskal et al., 2008). Además, en el caso de mujeres embarazadas, se ha visto que aquellas mujeres con diabetes gestacional tienen niveles de FGF19 más bajos comparados con mujeres embarazadas no diabéticas (Wang et al., 2013). FGF19 también se ha encontrado que correlaciona negativamente con el BMI y otros parámetros en pacientes con diabetes y síndrome metabólico (Barutcuoglu et al., 2011). En el caso de pacientes sometidos a cirugía bariátrica, el aumento en los niveles de FGF19 y ácidos grasos es mayor en pacientes diabéticos (Barutcuoglu et al., 2011).

En modelos animales se ha visto cómo ratones transgénicos con el gen de FGF19 mostraban un aumento en la sensibilidad a insulina comparados con los ratones no transgénicos (Tomlinson et al., 2002). Asimismo, la administración exógena a ratones previene el desarrollo de alteraciones en el metabolismo de la glucosa. Además, la inyección intraventricular de FGF19 a ratones obesos provoca un descenso en la concentración de glucosa de manera independiente a insulina y a una mejora en la sensibilidad a esta. Los resultados sugieren que FGF19 puede regular los niveles de glucosa en sangre vía SNC (Zhang et al., 2015).

### **3.2.2.8. FGF19 como diana terapéutica (FGF19 proliferación y carcinoma)**

Debido al papel de FGF15/19 en la regulación de la homeostasis de la glucosa y su asociación con diferentes alteraciones metabólicas, como la obesidad y la diabetes, FGF19 se ha erigido como un potencial candidato terapéutico para enfermedades metabólicas. Sin embargo, se ha visto cómo la administración crónica de FGF19 en ratón induce proliferación celular en el hígado además de la aparición y el desarrollo de

carcinoma hepatocelular (HCC) mediante la activación de la vía FGFR4/IL6/STAT3 (Nicholes et al., 2002; Zhou et al., 2017).

La primera evidencia de la participación de FGF19 en la proliferación de los hepatocitos surgió de la observación de ratones transgénicos para este gen, los cuales mostraban un aumento de la proliferación celular y desarrollaban espontáneamente HCC a los 10-12 meses de edad. Así mismo, otros estudios han demostrado que una única administración de FGF19 recombinante es capaz de inducir proliferación de los hepatocitos o como un aumento en los niveles de FGF19 mediante sobreexpresión ectópica mediada por un virus adeno-asociado promueve la tumorigénesis hepática (Muguruma et al., 2015; Zhou et al., 2014).

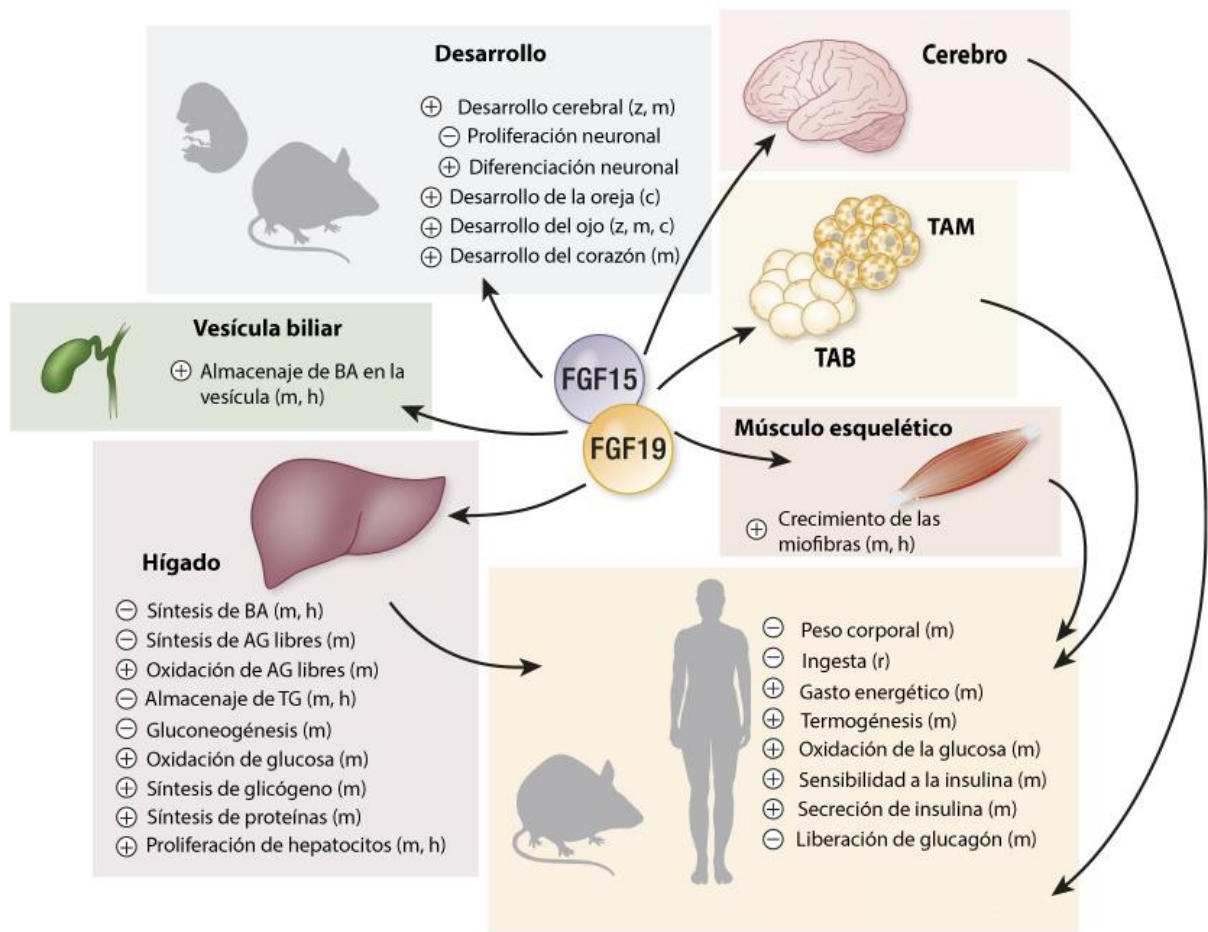
El efecto pro-proliferativo de FGF19 a nivel hepático no es necesariamente patológico. Estudios centrados en la regeneración hepática han investigado el papel de FGF15/19 tras un daño hepático. La falta de FGF15 provoca una importante disfunción en la regeneración de las células hepáticas, llegando incluso a aparecer necrosis en sus hígados al no poder regenerarse apropiadamente (Kong et al., 2014). Además, la administración de FGF19 en ratones con el hígado dañado puede impulsar la proliferación en este tipo celular y hacer que aumente el tamaño del órgano. A pesar de los prometedores resultados que diversos estudios ofrecen, el principal problema que sigue teniendo FGF19 como herramienta terapéutica para el metabolismo o la regeneración hepática es su capacidad para favorecer el desarrollo de HCC, especialmente tras una exposición crónica (Alvarez-Sola et al., 2017; Shan et al., 2018).

Mediante el bloqueo o la supresión de FGFR4, utilizando anticuerpos o ratones deficientes en este gen respectivamente, se ha visto cómo este receptor es necesario en el hígado para el efecto proliferativo debido a niveles suprafisiológicos de FGF19 (Desnoyers et al., 2008; French et al., 2012). Gracias a esto, el interés de la industria farmacéutica sobre los efectos terapéuticos de FGF19 se ha distanciado de la proteína en sí para centrarse en la creación de variantes no mitogénicas que mantengan los efectos beneficiosos sin inducir proliferación en los hepatocitos, por ejemplo, de una forma independiente de FGFR4 o STAT3. Mediante ingeniería de proteínas se ha obtenido la variante M70 (NGM282), la cual retiene la capacidad de suprimir la actividad de CYP7A1

y la síntesis de ácidos biliares en modelos animales, además de protegerlos de daño hepático (Luo et al., 2014; Zhou et al., 2016, 2014).

Pruebas realizadas en voluntarios sanos han indicado que el uso de M70 provoca una disminución de la concentración de ácidos biliares después de la ingesta, de la misma manera que haría FGF19 (Gälman et al., 2003; Harrison et al., 2018; Luo et al., 2014). M70 es capaz de reducir la concentración de lípidos en el hígado en pacientes con esteatosis hepática no-alcohólica (NASH) participantes en un ensayo clínico en fase 2 con esta variante. Actualmente, se están estudiando los efectos beneficiosos de M70 en pacientes con cirrosis o diabetes (Degirolamo et al., 2016; Harrison et al., 2018).

Los resultados hallados en la investigación básica y trasladada a clínica son verdaderamente esperanzadores. Sin embargo, debido a que el uso de terapias basadas en FGF19 se encuentran asociadas a graves efectos, su uso terapéutico requiere todavía de más investigación.



**Figura 19. Resumen de las funciones que ejercen FGF15 y FGF19 en animales y humanos.** Los efectos estimulatorios han sido indicados con (+) y los inhibitorios con (-). Las funciones en cada especie se identifican en la figura, siendo en humanos (h), en ratón (m), en rata (r) y en zebrafish (z). Figura obtenida y modificada de Jornayvaz et al., 2018.

### 3.2.3. Relación entre FGF21 y FGF19

FGF15/19 y FGF21 pertenecen a la subfamilia de FGF endocrinos y juegan un papel importante en la regulación del metabolismo (Coskun et al., 2008; Kharitononkov et al., 2005; Tomlinson et al., 2002). Ambos factores tienen efectos similares a varios niveles. Farmacológicamente se ha descrito que ambas moléculas tienen la capacidad de reducir los niveles de glucosa, triglicéridos y colesterol en sangre, mejorando la sensibilidad a insulina y disminuyendo el peso corporal, sobretodo en caso de enfermedades

metabólicas como la T2DM o la obesidad (Fu et al., 2004; Kharitononkov et al., 2007; Xu et al., 2009).

**Tabla 8. Efectos farmacológicos producidos por la administración de FGF15/19 y FGF21.** Información obtenida de Owen et al., 2016.

<b>FGF15/19</b>	<b>FGF21</b>
<p>Beneficiosos:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>↓ Síntesis de ácidos biliares</li> <li>↓ Gluconeogénesis</li> <li>↑ Síntesis de glicógeno</li> <li>↑ Termogénesis y pérdida de peso</li> <li>↑ Sensibilidad a insulina</li> <li>↓ Triglicéridos en sangre</li> <li>↓ Colesterol en sangre</li> </ul> <p>Adversos:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>↑ Proliferación celular hepática</li> <li>↑ Aparición de neoplasia</li> </ul>	<p>Beneficiosos:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>↑ Browning del TAB subcutáneo</li> <li>↑ Captación de glucosa</li> <li>↑ Termogénesis y pérdida de peso</li> <li>↑ Sensibilidad a insulina</li> <li>↓ Triglicéridos en sangre</li> <li>↓ Colesterol en sangre</li> <li>↑ Esperanza de vida</li> </ul> <p>Adversos:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>↑ Pérdida de masa ósea</li> <li>↑ Aumento de glucocorticoides</li> </ul>

A pesar de compartir ciertos efectos sobre la regulación del metabolismo de la glucosa y de los lípidos, existen diferencias entre estos dos. FGF15/19 tiene la capacidad de regular la síntesis de ácidos biliares mediante FGFR4- $\beta$ Klotho, mientras que FGF21 no (Kurosu et al., 2007; Yang et al., 2012). Sin embargo, estudios con AAV han indicado que la sobreexpresión de FGF21 puede provocar el incremento de la expresión de Cyp7A1, comportándose así como antagonista de FGF15/19 y sugiriendo una posible regulación cruzada entre ambos FGFs endocrinos. El estudio llevado a cabo por Zhang et al. mantiene la hipótesis de que la sobreexpresión de FGF21 (por encima de niveles fisiológicos) puede impedir la unión de FGF19 con FGFR4 debido a la competencia por el

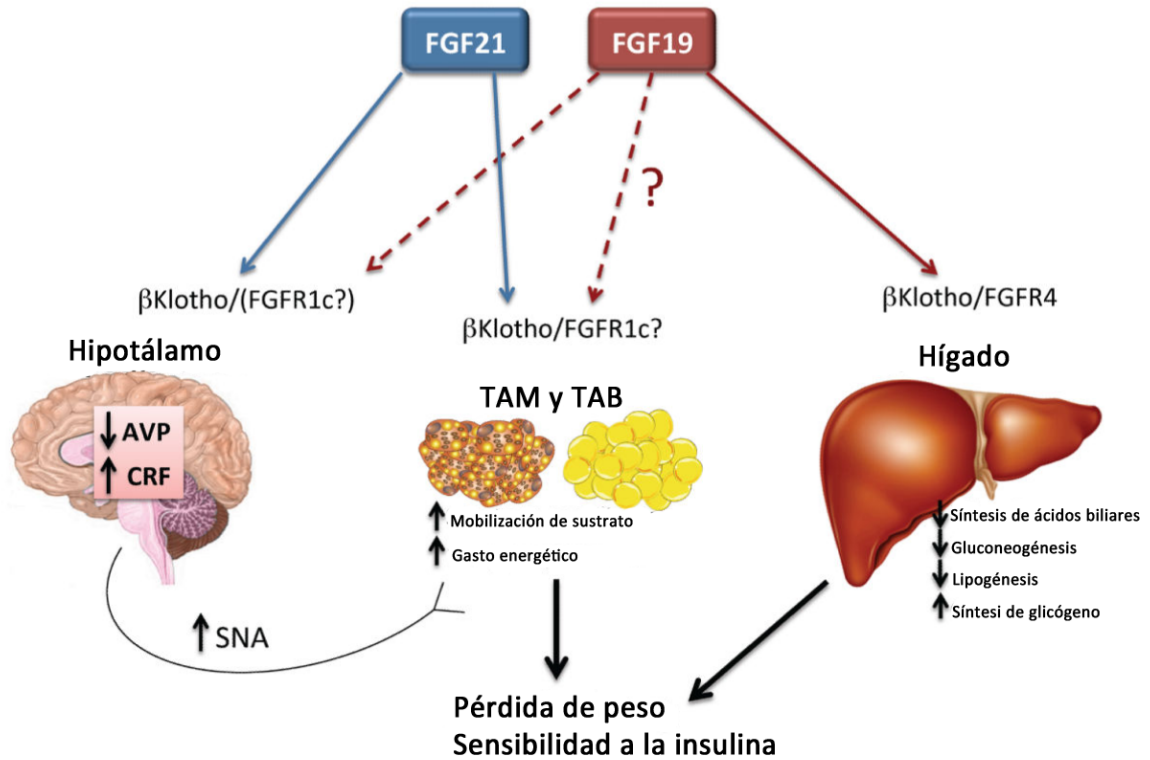
correceptor  $\beta$ Klotho, inhibiendo así de forma indirecta la función de FGF19 y favoreciendo la síntesis y secreción de ácidos biliares (Zhang et al., 2017). Por otra parte, los efectos inductivos de la proliferación hepática debidos en algunos casos a la acción de FGF19, no se producen en el caso de FGF21.

En humanos podemos observar cómo FGF19 y FGF21 tienen un comportamiento opuesto en diferentes condiciones. En enfermedades donde los niveles de FGF21 se encuentran elevados, como obesidad, T2DM o en infección con VIH, los niveles de FGF19 se encuentran sistemáticamente reducidos. De la misma manera, en situaciones como en desarrollo o envejecimiento, también vemos cómo cuando la concentración de FGF21 aumenta, la de FGF15/19 disminuye y viceversa (Gallego-Escuredo et al., 2015; Gallego-Escuredo et al., 2012; Gómez-Ambrosi et al., 2017; Sánchez-Infantes et al., 2015).

Dejando de lado estas diferencias, la acción coordinada de FGF19 y FGF21, mediante su acción en diferentes tejidos como el hígado, el tejido adiposo y el hipotálamo, provocan un aumento de la sensibilidad a insulina, una reducción del peso corporal y una mejora de la homeostasis energética del organismo.

No obstante, el “cross-talk” de ambos factores, su interacción vía compartición de  $\beta$ Klotho y receptores de FGF no se encuentra aún definida con claridad.





**Figura 20. Representación esquemática de los efectos beneficiosos que tienen FGF19 y FGF21 como tratamiento farmacológico.** En animales obesos la administración tanto de FGF19 como de FGF21 provoca pérdida de peso e incrementan la sensibilidad a insulina. Imagen obtenida y modificada a partir de Owen et al., 2016.

# Objetivos



## **Objetivos de la presente tesis doctoral**

El objetivo de la presente tesis se basa en establecer, mediante el uso de modelos experimentales animales y celulares, cuál es el papel de la enterocina FGF15/19:

a) en la adiposidad y plasticidad de los tejidos adiposos en respuesta al estímulo termogénico.

b) en la plasticidad cardiaca frente a estímulos fisiológicos y patológicos.



# **Materiales y métodos**



## **1. Modelos animales**

Los ratones deficientes en el gen *Fgf15* (a los que se referirá como *Fgf15*-null) y los ratones salvajes (WT) que servirán de controles pertenecen a una cepa mezclada C57BL/6J/129/Sv, obtenida mediante entrecruzamientos durante más de 14 generaciones. Estos ratones han sido generosamente cedidos por el Dr. Matías A. Ávila (CIMA-UNAV) (Álvarez-Sola et al., 2017). La generación de los ratones *Fgf15*-null se realizó mediante la delección del exón 3 del gen de *Fgf15*, tal como se describe en Wright et al., 2004.

Los ratones utilizados en los modelos de intervención con adenovirus o virus adeno-asociado fueron ratones WT de la cepa C57BL/6J pura.

Los ratones fueron mantenidos en condiciones estándar de temperatura (21 °C), en ciclos de 12 h/12 h de oscuridad/luz, y con acceso *ad libitum* a agua y comida (Teklad Global 18% Protein Rodent Dier, Harlan; IN, EEUU). Todos los procedimientos fueron aprobados por el Comité Ético de experimentación de la Universitat de Barcelona (CEEA-UB) y cumplieron los criterios de la “Directriz 86/609/EEC” del Consejo de la Unión Europea y de la “Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio” del Instituto Nacional de Salud de los EEUU (NIH).

### **1.1. Modelos de intervención en animales**

#### **1.1.1. Experimento de inducción de la termogénesis por frío y de adaptación a la termoneutralidad**

Ratones WT y *Fgf15*-null de 3 meses de edad fueron transferidos de temperatura ambiente (21 °C aproximadamente) a 4 °C (frío) o 30 °C (temperatura de termoneutralidad en ratones) y fueron mantenidos bajo estas condiciones durante 7 días hasta de su sacrificio. Cada grupo constó de 6 ratones.



### **1.1.2. Sobreexpresión de FGF15: Ad-FGF15 y Ad-Control**

Ratones WT C57BL/6J de 3 meses de edad fueron infectados con un adenovirus control (Ad5-Control) o un adenovirus portador del gen *Fgf15* (Ad5-FGF15) ( $2 \times 10^9$  partículas/g peso corporal), mediante una inyección retroorbital, y la sobreexpresión de *Fgf15* se mantuvo durante una semana. Los adenovirus fueron generosamente proporcionados por el laboratorio del Dr. Matías A. Ávila (CIMA-UNAV) (Álvarez-Sola et al., 2017). Cada grupo constó de 5 ratones.

La región codificante por FGF15 fue clonada en un vector pACCMVpLpA entre *Xba*I y *Hind*III, tal como se describe en Inagaki et al., 2005. El virus fue preparado mediante recombinación Cre/loxP con un cosmid adenoviral dl309 en células 911. Después se procedió a su purificación mediante columnas de Sepharosa CL-4B.

### **1.1.3. Sobreexpresión de FGF19: AAV8-FGF19 y AAV8-Control**

Ratones WT C57BL/6J de 3 meses de edad fueron infectados por un virus adeno-asociado control (AAV8-Control) o con *Fgf19* (AAV8-FGF19) ( $1 \times 10^9$  partículas/g peso corporal, mediante una inyección retroorbital). La sobreexpresión de FGF19 se mantuvo durante tres semanas. Los virus adeno-asociados fueron generosamente proporcionados por el Dr. Matías A. Ávila (CIMA-UNAV) (Uriarte et al., 2013). Los grupos infectados con el AAV8-Control constaron de 5 ratones y los infectados con el AAV8-FGF19 constaron de 6 ratones.

El cDNA de FGF19 fue sintetizado por GenScript (Piscataway, NJ, USA) y fue clonado en virus adeno-asociado AAV8, bajo un promotor específico del hígado. La amplificación del virus se llevó a cabo en células HEK-293, tal como se describe en Álvarez-Sola et al., 2017 (material suplementario).

### **1.1.4. Inducción de la hipertrofia cardíaca**

A fin de inducir hipertrofia cardíaca en los ratones *Fgf15*-null, grupos de 6 animales WT y animales *Fgf15*-null se anestesiaron con 1,5% de isoflurano (Ecuphar; Bélgica). Una

vez dormidos se implantaron minibombas osmóticas (Alzet, 1007D; CA, EEUU) en la región interescapular del ratón de manera subcutánea. Estas minibombas contenían en su interior tampón salino (PBS) o isoproterenol (ISO) (Sigma-Aldrich, 16504; MO, EEUU) 0,1 mg/μl en PBS. Se ajustaron a fin de liberar el fármaco a una velocidad constante de 15 mg/kg y día durante una semana. Después del tiempo establecido, los ratones fueron sacrificados.

En el caso de los procedimientos en los que se combinó la sobreexpresión de FGF15 o FGF19 con la inducción de la hipertrofia cardíaca, las minibombas osmóticas se implantaron la última semana del experimento una vez los ratones ya habían sido inyectados con el adenovirus o con el virus adeno-asociado correspondiente.

#### **1.1.5. Tratamiento con el agonista específico del receptor adrenérgico β3 CL316,243**

Ratones WT y Fgf15-null de 3 meses de edad fueron tratados durante 14 días con CL316,243 (Sigma-Aldrich Cat. #C5976), agonista específico del receptor adrenérgico β3. El tratamiento se llevó a cabo mediante una inyección diaria intraperitoneal de 1mg de CL316,243/kg del ratón disuelto en salino. Los controles fueron inyectados de la misma manera con un volumen similar de salino. Los ratones inyectados con salino constaron de 7 animales cada grupo y los inyectados con CL, 8 animales cada grupo.

#### **1.1.6. Alimentación de ratones deficientes en Fgf15 con una dieta alta en grasas**

Ratones WT y Fgf15-null fueron alimentados durante 13 semanas *ad libitum* con una dieta alta en grasas, HFD de un 45% kcal en forma de lípidos (Envigo, 12451; Reino Unido). Los controles fueron alimentados con la dieta estándar mencionada anteriormente (LFD). Cada grupo constó de 8 ratones.

### **1.1.7. GTT**

Se realizó una GTT (Glucose Tolerance Test) en ratones WT y Fgf15-null. Los ratones se mantuvieron en ayuno aproximadamente 16 horas antes del procedimiento. A continuación se calculó la dosis de glucosa (2,5 g/kg de peso corporal del ratón a partir de una preparación de glucosa de concentración 250 mg/ml). Se midió la glucosa basal (mg/dl) a tiempo 0 y se procedió a inyectar a los ratones con la dosis de glucosa correspondiente a cada uno. A partir de allí, se midió la glucosa a tiempo 15, 30, 60, 90, 120 y 150 minutos.

### **1.1.8. ITT**

Se realizó una ITT (Insulin Tolerance Test) en ratones WT y Fgf15-null. Los ratones se mantuvieron en ayuno aproximadamente 4 horas antes del procedimiento. A continuación se calculó la dosis de insulina (0,75 U/kg de peso corporal del ratón a partir de una preparación de insulina de concentración 0,25 U/ml). Se midió la glucosa basal (mg/dl) a tiempo 0 y se procedió a inyectar a los ratones con la dosis de insulina correspondiente a cada uno. A partir de allí, se midió la glucosa a tiempo 15, 30, 45, 60, 90 y 120 minutos. En caso de que la glucosa descendiera en el ratón a niveles inferiores a 30 mg/dl (o si se observara una hipoglucemia en los ratones), se prepararía una inyección de glucosa para restablecer sus niveles (preparada como se ha explicado en el apartado de la GTT).

## **1.2. Obtención de muestras**

Al final de cada intervención con modelos animales se realizó el sacrificio y la obtención de muestras de los tejidos correspondientes. Se obtuvo plasma de los animales en el momento del sacrificio y se midieron los niveles de glucosa (mg/dl) y triglicéridos (mg/ml). El resto de los tejidos obtenidos fueron extraídos, pesados y congelados rápidamente mediante su inmersión en nitrógeno líquido. A continuación se almacenaron a -80 °C.

### **1.3. Análisis histológico e inmunohistoquímico**

Fragmentos frescos de los diferentes tejidos fueron fijados en formalina al 4% tamponada a pH neutro durante 24 horas (tejidos adiposos) o 48 horas (hígado y corazón). En el caso del corazón, estos fueron cortados transversalmente a media altura, tras retirar aurículas. Una vez fijados, los tejidos fueron conservados en etanol al 70%. Para realizar los cortes, los tejidos fueron incluidos en parafina y varias secciones de cada tejido fueron obtenidas mediante cortes con un micrótopo rotativo para bloques de parafina. Una vez seccionados, los cortes fueron desparafinados y teñidos con hematoxilina y eosina (H&E).

Con los cortes de corazón, se determinó el área de los cardiomiocitos (CSA) del ventrículo izquierdo utilizando el software de código abierto ImageJ (NIH).

La fibrosis cardíaca fue evaluada mediante la tinción tricómica de Masson (Panreac, Barcelona, España) de los cortes. Las regiones afectadas por la fibrosis, marcadas en azul por esta tinción, se midieron utilizando el software antes mencionado y corrigiendo respecto al área total de cada imagen.

## **2. Cultivos celulares**

### **2.1. Cultivos de adipocitos SGBS**

Las células SGBS humanas (Wabitsch et al., 2001) fueron mantenidas en medio en una incubadora humidificada con una atmósfera de aire/CO<sub>2</sub> al 95%/5% y a 37 °C. Para la realización de los experimentos, se sembraron las células en el mismo medio de mantenimiento hasta alcanzar una confluencia del 80% en los pocillos. El mantenimiento de los cultivos sin diferenciar se hizo con DMEM/F12 (Life technologies; Paisley, Reino Unido) suplementado al 10 % con FCS inactivado (Life technologies). Para la inducción de la diferenciación de preadipocitos a adipocitos beige se siguió el protocolo especificado en Yeo et al., 2007. Brevemente, una vez conseguida dicha confluencia, se indujo la diferenciación con el medio de diferenciación 1 durante 7 días (con renovación del medio a los 3-4 días). Pasado este período de tiempo, se cambió el medio de diferenciación 1 por el medio de diferenciación 2 durante un período de 7 días (Tabla 9).

**Tabla 9. Medios de mantenimiento y diferenciación para los cultivos de adipocitos humanos SGBS.**

Medio de mantenimiento		Medio de diferenciación (1)		Medio de diferenciación (2)	
Compuesto	Concentración final	Compuesto	Concentración final	Compuesto	Concentración final
DMEM/F12		DMEM/F12		DMEM/F12	
Biotina	32,7 $\mu$ M	Biotina	32,7 $\mu$ M	Biotina	32,7 $\mu$ M
Pantotenato	16,78 $\mu$ M	Pantotenato	16,78 $\mu$ M	Pantotenato	16,78 $\mu$ M
P/S	100 $\mu$ l/ml	P/S	100 $\mu$ l/ml	P/S	100 $\mu$ l/ml
FCS (inactivado)	10 %	Dexametasona	25 nM	Transferrina humana	0,01 mg/ml
		IBMX	500 $\mu$ M	Insulina humana	20 nM
		Rosiglitazona	2 $\mu$ M	Cortisol	100 nM
		Transferrina humana	0,01 mg/ml	T3	0,2 nM
		Insulina humana	20 nM		
		Cortisol	100 nM		
		T3	0,2 nM		

## 2.2. Cultivo de cardiomiocitos de rata

Los corazones utilizados para realizar los cultivos de cardiomiocitos fueron extraídos de ratas Sprague-Dawley neonatas (de 1 a 3 días de edad). A continuación, estos fueron digeridos en una solución de colagenasa (Colagenasa tipo I; Life Technologies) y pancreatina (Sigma). A fin de separar los cardiomiocitos de los fibroblastos, la digestión fue plaqueada en un frasco con revestimiento diferencial.

Los cardiomiocitos fueron sembrados en placas de 6 pocillos recubiertas al 1% con gelatina alcanzando la densidad de  $0.5 \times 10^6$  células/pozo. Durante la noche de la siembra se mantuvieron con medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Life Technologies) suplementado al 10% de suero de caballo, 5% de suero bovino neonatal, 50 mg/L de gentamicina y 10  $\mu$ M de citosina  $\beta$ -D-arabinofuranósido (AraC). El AraC se

mantuvo durante todo el cultivo celular a fin de impedir el crecimiento de los posibles fibroblastos restantes.

Tras 16 horas del aislamiento y siembra de las células, los cardiomiocitos neonatales (NCM) fueron incubados en un medio sin suero de DMEM y gentamicina (50 mg/L) durante 24 horas. Al día siguiente el medio fue remplazado por un medio experimental consistente en DMEM sin suero suplementado con L-carnitina 0,25 mM, insulina 0,25 mU/mL y albúmina de suero bovino al 1% (BSA; Sigma).

Las células fueron pretratadas con FGF19 durante 24h. Posteriormente, a fin de inducir la hipertrofia en los cardiomiocitos de rata, las células fueron tratadas con el agonista  $\alpha$ 1 adrenérgico fenilefrina (PE) (10  $\mu$ M; Sigma), conocido factor de crecimiento hipertrófico, durante 24 horas.

Ninguno de los tratamientos en las concentraciones utilizadas en los cultivos indujo una pérdida celular significativa.

### **2.3. Cultivos de fibroblastos cardíacos de rata**

Los fibroblastos cardíacos procedentes de ratas neonatales (CF) fueron aislados a partir de la digestión explicada anteriormente. Las células de pase 1 (P1) y pase 3 (P3) se sembraron en placas de cultivo con una densidad de  $0,3 \times 10^5$  por  $\text{cm}^2$ . Tras 24 horas, se sustituyó el medio por otro sin suero durante 24 horas. Después, se realizó el procedimiento experimental correspondiente. Se trataron durante 24 horas con FGF19 recombinante, tras lo cual fueron recolectadas.

### **2.4. Tratamiento con FGF19 *in vitro***

Para los tratamientos *in vitro* de adipocitos SGBS o cardiomiocitos con FGF19 humano recombinante (R&D Systems; MN, EEUU), las células fueron incubadas con FGF19 a una concentración de 50 ng/mL durante el tiempo especificado en cada protocolo.

### 3. Análisis de la expresión génica

#### 3.1. Aislamiento de RNA

Los cambios de niveles de expresión de los genes de interés analizados en la presente tesis doctoral se realizaron mediante la cuantificación de los niveles de ARNm por PCR cuantitativa a tiempo real, siguiendo el protocolo descrito a continuación:

- a) **Purificación del RNA mediante columnas de afinidad.** Para la purificación del RNA a partir de tejidos y de cultivos celulares se utilizó el kit *NucleoSpin RNA* (Macherey-Nagel, Düren, Alemania) siguiendo el protocolo establecido ya por la casa comercial, con tratamiento con DNasa en la propia columna y elución del RNA con agua. Previamente, para homogenizar los tejidos a fin de comenzar su análisis se utilizó el TissueLyser (Qiagen; Hilden, Alemania) con tampón de lisis (RA1 del kit *NucleoSpin RNA* y 1% de  $\beta$ -mercaptoetanol).
  
- b) **Purificación del RNA mediante método de fenol-cloroformo.** En el caso del corazón y los cultivos de cardiomiocitos y fibroblastos cardíacos se ha utilizado el método de fenol-cloroformo. Con este método se puede obtener una lisis más eficiente que con el sistema de columnas debido a la naturaleza fibrosa del tejido muscular. Para este método se utilizó el *TriPure Isolation Reagent* (Roche), siguiendo las indicaciones de la casa comercial.

El RNA obtenido mediante los dos sistemas ha sido cuantificado con un Nanodrop (Nanodrop Technologies; DE, EEUU).

#### 3.2. Transcripción inversa

El RNA purificado y cuantificado fue transcrito a cDNA (DNA complementario) a partir de 500 ng de RNA mediante la transcripción inversa utilizando el kit *High Capacity RNA-to-cDNA* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EEUU) en un volumen final de 20  $\mu$ L.

### 3.3. PCR cuantitativa en tiempo real

Los niveles de transcrito fueron determinados por PCR cuantitativa a tiempo real utilizando el aparato de PCR en tiempo real 7500 (Applied Biosystems) y mediante sondas TaqMan™. Esta técnica cuantifica a tiempo real el producto que se genera durante la reacción gracias a la actividad de un fluoróforo, que emite una cantidad de fluorescencia proporcional al producto específico presente en cada momento. A su vez, este producto depende de la cantidad específica de cada uno de los cDNAs utilizados como molde. El termociclador detecta la fluorescencia emitida por el fluoróforo.

La mezcla de reacción utilizada en este caso fue la siguiente:

- 10 µL de *Platinum qPCR Super-Mix-UDG with ROX* (Applied Biosystems)
- 1 µL de la sonda *TaqMan Gene Expression Assay* específica para cada gen (Applied Biosystems)
- 8 µL de agua
- 1 µL de cDNA

De cada muestra se analizó la expresión relativa de cada gen de interés respecto a un gen de referencia o *housekeeping*, en nuestro caso ciclofilina A (Ppia). A fin de normalizar los niveles de RNA del gen de interés, se utilizó el método comparativo  $2^{-\Delta CT}$ , siguiendo las instrucciones de análisis de la casa comercial. El método utilizado fue Taqman (Thermo Fisher Scientific; MA, EEUU) y los genes analizados fueron los mostrados en la tabla X.



**Tabla 10. Genes analizados durante la tesis doctoral mediante sondas Taqman.**

Especie	Gen	Referencia	Especie	Gen	Referencia
Humano	<i>DIO2</i>	Hs05050546_s1	Ratón	<i>Col3 (Col3a1)</i>	Mm00802300_m1
Humano	<i>EGR1</i>	Hs00152928_m1	Ratón	<i>Col6 (Col6a1)</i>	Mm00487160_m1
Humano	<i>FGF19</i>	Hs00192780_m1	Ratón	<i>Cyp7a1</i>	Mm00484150_m1
Humano	<i>FGFR1</i>	Hs00241111_m1	Ratón	<i>Cxcl14</i>	Mm00444699_m1
Humano	<i>FGFR4</i>	Hs01106910_g1	Ratón	<i>Dio2</i>	Mm00515664_m1
Humano	<i>KLB</i>	Hs00545621_m1	Ratón	<i>Fgf15</i>	Mm00433278_m1
Humano	<i>PPARGC1A</i>	Hs00173304_m1	Ratón	<i>Fgf21</i>	Mm00840165_g1
Humano	<i>RPLP0</i>	Hs00420895_g1	Ratón	<i>G6pc</i>	Mm00839363_m1
Humano	<i>UCP1</i>	Hs01084772_m1	Ratón	<i>Gdf15</i>	Mm00442228_m1
Rata	<i>Actinin (Actc1)</i>	Rn01513700_g1	Ratón	<i>Glut1</i>	Mm00441480_m1
Rata	<i>Anf (Nppa)</i>	Rn00561661_m1	Ratón	<i>Mmp9</i>	Mm00442991_m1
Rata	<i>Fgfr1</i>	Rn00577234_m1	Ratón	<i>Pck1</i>	Mm01247058_m1
Rata	<i>Fgfr4</i>	Rn01441812_m1	Ratón	<i>Pdk4</i>	Mm01166879_m1
Rata	<i>Pdk4</i>	Rn00585577_m1	Ratón	<i>Ppargc1a</i>	Mm00447183_m1
Rata	<i>Ppia</i>	Rn00690933_m1	Ratón	<i>Ppia</i>	Mm02342430_g1
Ratón	<i>Actinin (Actc1)</i>	Mm01333821_m1	Ratón	<i>Slc10a2</i>	Mm00488258_m1
Ratón	<i>Anf (Nppa)</i>	Mm01255747_g1	Ratón	<i>TgfB (TgfB1)</i>	Mm00473657_m1
Ratón	<i>Bmp8b</i>	Mm00432115_g1	Ratón	<i>Ucp1</i>	Mm00494069_m1

#### 4. Extracción de proteínas y Western Blot

Los niveles de proteína se determinaron mediante western blot. Con esta técnica se puede detectar la proteína deseada mediante la utilización de anticuerpos generados contra epítomos concretos de la proteína de interés, haciendo así posible distinguirla de todo el conjunto de proteínas (obtenidas a partir de un lisado celular o tisular), tras su separación según peso molecular mediante electroforesis en un gel de poliacrilamida/SDS (dodecilsulfato sódico), y su transferencia e inmovilización en una membrada de PVDS (*Immobilon-P polyvinylidene difluoride membranes*; Millipore; MA EEUU).

##### 4.1. Obtención de los extractos proteicos a partir de cultivos celulares y de muestras de tejido

Los extractos celulares y los tejidos se prepararon para su homogenización en tampón RIPA utilizando el sistema TissueLyser:

- Tris HCl 50 mM (pH 7,4)
- NaCl 150 mM
- 1 % NP40-Igepal
- 0,1 % SDS
- EDTA 2 mM
- Ortovanadat 2 mM
- B-glicerolfosfat 40 mM
- PMSF 1 mM
- Cóctel de inhibidores (Roche Diagnostics, Basilea, Suiza)

La proteína total se midió utilizando el kit de ensayo mediante ácido bicinconínico (BCA) de *Pierce*<sup>TM</sup> (Waltham, MA, EEUU) siguiendo las indicaciones de la casa comercial. Las absorbancias se midieron con un lector de placas ELISA *Benchmark Plus microplate spectrophotometer* (BIO-RAD; CA, EEUU).

#### 4.2. Electroforesis, transferencia e inmunodetección

Las proteínas de interés se detectaron mediante anticuerpos específicos siguiendo estos pasos:

- **Preparación de las muestras.** Se adicionó el volumen necesario de extracto que contuviera entre 25 y 30 ug de proteína más una quinta parte de tampón de ruptura (Tris-HCl 100 mM, pH 6,8, glicerol 20%,  $\beta$ -mercaptoetanol 2 %, SDS 2% y azul de bromofenol 0,1%).
- **Electroforesis.** Se realizó en geles del 12-15% de poliacrilamida en presencia de SDS. El amperaje se mantuvo fijo a 40 mA y la electroforesis se mantuvo durante 2 horas aproximadamente.
- **Transferencia y bloqueo.** Las proteínas separadas en el gel de poliacrilamida se transfirieron a una membrana de PVDF. La membrana se activó previamente con metanol durante 1 minuto. La transferencia se mantuvo a 400 mA durante 1 hora.

A continuación se bloqueó la membrana mediante una solución al 5% de leche en polvo durante 1 hora a temperatura ambiente.

- **Inmunodetección.** Incubación de las membranas con anticuerpos primarios específicos, seguidos de lavados y de la incubación de anticuerpo secundario conjugado con una peroxidasa. La detección se realizó a través de la incubación con el sustrato quimioluminiscente de la peroxidasa (EMD Millipore) en el aparato *LAS 3000 Imager* (Fujifilm. Tokio, Japón).
  - UCP1 como anticuerpo primario de Abcam 1:1000 (ab10983; Cambridge, Reino Unido). El anticuerpo secundario utilizado es el anticuerpo anti-rabbit IgG 1:5000 de Abcam (ab6721). El anticuerpo primario se incubó 16 horas a 4°C y el secundario 1 hora a temperatura ambiente.

Los **análisis densiométricos** se realizaron mediante la utilización del programa Multi Gauge V3.0 (Fujifilm).

## **5. Cuantificación de proteínas solubles y análisis de metabolitos en plasma**

Los niveles de insulina en plasma de ratón se midieron mediante dos métodos. En el experimento de frío se utilizó el sistema MILLIPLEX MAP (MADKMAG-71K, Merk-Millipore, Billerica, MA, USA), método que también permitió cuantificar los niveles de leptina y MCP1 en la misma muestra. En el resto de experimentos, los niveles de insulina se midieron mediante el kit de ELISA específico de ratón de Mercodia (Mouse Insulin ELISA 10-1247-01; Uppsala, Suecia).

Los niveles de FGF21 secretados se midieron mediante los kits de ELISA tipo sándwich de Biovendor (República Checa) específicos para ratón (RD291108200R) y para humano (RD191108200R). Los niveles plasmáticos de FGF19 secretados en humanos se midieron mediante el kit de ELISA tipo sándwich de Biovendor (RD191107200R).

Los niveles de glucosa y triglicéridos en el momento del sacrificio o extraídos durante la ejecución de los tests de tolerancia a la glucosa (GTT) o a la insulina (ITT) se midieron utilizando el sistema de Accutrend Technology (Roche Diagnostics, Basilea, Suiza).

Los niveles de ácidos biliares totales en plasma se midieron mediante el kit Mouse Total Bile Acids Assay Kit (Crystal Chem Inc, 80470; IL, EEUU).

## **6. Determinación de la temperatura mediante cámara térmica**

Las imágenes termográficas de los ratones se registraron utilizando una cámara termográfica digital infrarroja T335 (FLIR Systems, Wilsonville, OR, EE.UU.), que presenta una sensibilidad térmica de 0,1 °C y una resolución de imagen de 640×480 píxeles. Los parámetros ambientales (como la humedad relativa, la temperatura ambiente y la temperatura aparente reflejada) se midieron *in situ* y se configuraron en la cámara como entradas paramétricas del experimento. Las imágenes fueron tomadas por duplicado en animales no anestesiados a una distancia aproximada de 30 cm. Los ratones adultos utilizados fueron afeitados 48 horas antes de las mediciones termográficas. Las imágenes obtenidas fueron analizadas utilizando el paquete de software FLIR QuickReport 1.2 (Sistemas FLIR) a fin de normalizar los rangos de temperatura y cuantificar los valores. Se obtuvieron así los valores máximos de temperatura de las áreas interescapular y dorso-lumbar. Los niveles de temperatura central se determinaron a través de una medición no invasiva de la temperatura del ojo (Suárez-Zamorano et al., 2015; Quesada-López et al., 2016) después de la validación previa con la medición de la temperatura rectal utilizando un registrador de temperatura KM-1420 (Kane-May, Reino Unido).

## **7. Determinación de la fosforilación de proteínas cinasas**

Para la evaluación de los niveles de fosforilación de las proteínas Erk/MAPK 1/2, Akt, STAT3, JNK, p70 S6 cinasa, NFκB, STAT5A/B, CREB y p38 en extractos de cultivos de cardiomiocitos, se compararon los niveles de proteína total y fracción fosforilada

cuantificados mediante el kit Milliplex MAP 9-plex Multi-Pathway Signaling Magnetic Bead (Merck-Millipore). Se siguieron las instrucciones facilitadas por el fabricante.

## **8. Estudios en humanos**

### **8.1. Determinación de los niveles circulantes de FGF19 en muestras de plasma de pacientes con dolencias cardíacas**

Las muestras de plasma pertenecientes a pacientes tratados tras presentar insuficiencia cardíaca provienen del Hospital Germans Trias y Pujol (Badalona) durante el período de tiempo comprendido entre mayo de 2009 y abril de 2014. Dichos pacientes dieron su consentimiento informado por escrito y el estudio fue aprobado por el comité ético local. Además, todos los procedimientos que se incluyeron en el estudio se ajustaron a los estándares éticos descritos en la Declaración de Helsinki (1975) y en su posterior revisión (1983). Las muestras fueron obtenidas entre las 9:00 y las 12:00 y mantenidas sin ciclos de congelación/descongelación a -80 °C. Todos los análisis de biomarcadores se realizaron sobre la misma muestra en cada caso.

Todos los pacientes realizaron visitas periódicas a fin de controlar su seguimiento. Dichas visitas fueron incrementadas en caso necesario. El punto final del estudio fue el fallecimiento por cualquier causa. Los datos de los pacientes y la causa de la muerte fueron verificados mediante la comparación con los registros de las bases de datos de los sistemas de salud catalán y español. El seguimiento de los pacientes se cerró el día 30 de septiembre del año 2017.

**Tabla 11. Datos metabólicos sobre los pacientes proporcionados por el hospital Germans Trias y Pujol.**

<b>Edad (años)</b>	66,7 ( $\pm$ 13,1)
<b>% de mujeres, n (%)</b>	123 (27,6)
<b>Etiología, n (%)</b>	
<b>Enfermedad isquémica del corazón</b>	202 (45,3)
<b>CM dilatado</b>	78 (17,5)
<b>CM hipertensivo</b>	41 (9,2)
<b>CM Alcohol</b>	26 (5,8)
<b>Valvular</b>	39 (8,7)
<b>Otros</b>	60 (13,4)
<b>Duración del Fallo cardíaco (meses)</b>	7 (2-39,5)
<b>LVEF, %</b>	34,8 ( $\pm$ 14,0)
<b>LVEF &lt; 45%, n (%)</b>	362 (81,2)
<b>NYHA III-IV, n (%)</b>	91 (20,4)
<b>Hipertensión, n (%)</b>	293 (65,7)
<b>Diabetes Mellitus, n (%)</b>	192 (43,0)
<b>COPD</b>	72 (16,1)
<b>MetrnI, pg/ml</b>	348,5 (265-466)
<b>Tratamientos (FU), n (%)</b>	
<b>ACEI o ARB</b>	377 (84,5)
<b>Beta-Blocker</b>	410 (91,9)
<b>MRA</b>	300 (67,3)
<b>Loop Diuretic</b>	399 (89,5)
<b>Digoxin</b>	168 (37,7)
<b>Sacubitril/Valsartan</b>	26 (5,8)
<b>Ivabrandine</b>	120 (26,9)
<b>CRT</b>	64 (14,3)
<b>ICD</b>	83 (18,6)

## **8.2. Muestras humanas de pacientes para determinar los niveles circulantes de FGF19 y su correlación con diferentes genes en tejido adiposo subcutáneo**

Las muestras de este estudio provienen de sujetos reclutados por el servicio de Endocrinología del Hospital Dr. Josep Trueta (Girona). Los sujetos eran de origen caucásico y con un peso corporal estable al menos 3 meses antes del estudio. Los pacientes no tenían otra enfermedad sistémica que la obesidad y todos se encontraban libres de infecciones el mes anterior al estudio. Enfermedades hepáticas (tumoraes e infección por el virus de la hepatitis C) y disfunción tiroidea fueron motivos de exclusión del estudio mediante el análisis bioquímico de los candidatos. Todos los sujetos que formaron parte del estudio dieron su consentimiento informado por escrito, validado y aprobado por el Comité de Ética del Hospital Dr. Josep Trueta. Los pacientes fueron debidamente informados sobre el propósito del estudio. Las muestras de tejido adiposo utilizadas para realizar el análisis de expresión génica se obtuvieron de la cohorte 1. Estas fueron obtenidas de depósitos subcutáneos de tejido adiposo durante procedimientos quirúrgicos (Colecistectomía, cirugía de hernia abdominal y cirugía de derivación gástrica). Una vez obtenidas, las muestras fueron transportadas inmediatamente al laboratorio, en un período de tiempo de 5 a 10 minutos. El tejido se manipuló en condiciones estrictamente asépticas. Las muestras fueron lavadas con PBS, cortadas con fórceps y bisturí en trozos pequeños (100 mg aproximadamente) y congeladas en nitrógeno líquido antes de almacenarse a -80 °C.

**Tabla 12. Datos metabólicos sobre los pacientes proporcionados por el hospital Dr. Josep Trueta.**

Cohortes	n	Sexo M/F (n)	Edad (años)	BMI (kg/m <sup>2</sup> )	Glucosa en ayuno (mg/dl)	Colester ol total (mg/dl)	Colester ol LDL (mg/dl)	Colester ol HDL (mg/dl)	TG en ayuno (mg/dl)
<b>Cohorte 1</b>									
Sujetos totales	38	10/28	47,7±8,9	45,1±6,4	98,5 (90-105,2) <sup>a</sup>	192,8±32,8	122,3±30,1	45,9±10,3	106,5 (76,2-152,2) <sup>a</sup>
r	-	-	-0,09	0,19	-0,26	0,36	0,43	-0,16	0,11
P	-	-	0,6	0,2	0,1	0,02	0,006	0,3	0,5
<b>Cohorte 2</b>									
Sujetos totales	73	28/45	52,2±7,3	46,5±8,1	100,4±8,4	204±38,1	128±25,8	48,7±9,8	129±39
r	-	-	-0,1	0,15	-0,13	0,531	0,610	-0,324	0,09
P	-	-	0,5	0,3	0,4	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,7
<b>Cohorte 3</b>									
Basal	20	12/8	52,5±6,9	42,8±5,5	94,3±8	262±43	147±24	42±10	156±42
6 meses	20	12/8	-	43,1±5,7	97,2±12	224±37	133±29	46±11	139±55
P	-	-	-	0,8	0,6	0,04	0,03	0,05	0,2
<b>Cohorte 4</b>									
Antes pérdida de peso	15	6/9	46,2±2,5	34,5±1,8	99,5±6,2	193±21	115±26	43±8,5	121±27
Después pérdida de peso	15	6/9	-	32,8±2,1	93,9±9,5	199±32	118±28	49±5,6	115±24
P	-	-	-	0,03	0,14	0,4	0,7	0,04	0,2



## 9. Ecocardiografías

Para la evaluación del desarrollo de hipertrofia cardíaca mediante ecocardiografía, los ratones WT y Fgf15-null fueron previamente anestesiados con isoflurano al 1,5 % y se realizó la ecocardiografía con el equipo VividQ (GE Healthcare, Piscataway, NJ, EEUU) con una sonda lineal de 12 MHz. Los resultados son fruto de tres ciclos cardíacos diferentes mediante el modo M y Doppler (los resultados se presentan como valores promedio). Los análisis de las imágenes fueron realizados ciegamente por dos observadores distintos.

Los datos obtenidos fueron: grosor del septo interventricular (IVS), de la pared posterior del ventrículo izquierdo (LVPW) y diámetro interno del ventrículo izquierdo (LVID), después de la sístole y después de la diástole. También se calculó la fracción de eyección (EF), la fracción de acortamiento (FS), la frecuencia cardíaca (HR), el volumen del ventrículo izquierdo tras la diástole (EDV) y tras la sístole (ESV), la relación existente entre el grosor de la pared y el radio del ventrículo (H/R), el índice de esfericidad del corazón (SI) y la masa del ventrículo izquierdo (LVm).

## 10. Estadística

Los datos se presentan como medias  $\pm$  SEM. A fin de comprobar la distribución normal, se aplicó la prueba de *Kolmogorov-Smirnov*, especialmente en el caso de muestras humanas. Las diferencias entre grupos se analizaron utilizando el test t-student en caso de datos no apareados o el test *Mann-Whitney U* dependiendo de si fueran variables con distribución normal o no paramétricas, respectivamente.

Para el cálculo de correlaciones, estas se analizaron mediante *Pearson* (distribución paramétrica) o *Spearman* (distribución no-paramétrica).

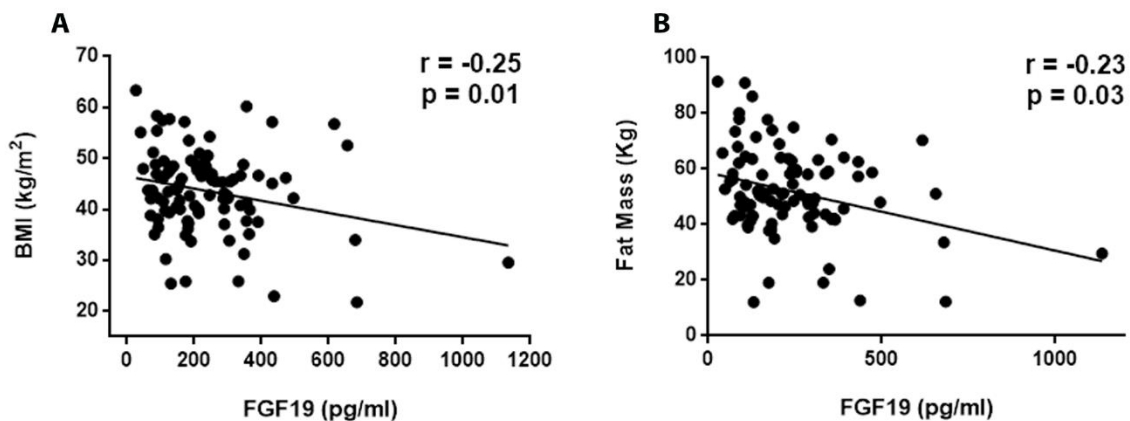
Para la comparación de tres o más grupos experimentales, se realizó un análisis ANOVA, de uno o de dos factores junto con los tests post-hoc *Dunnet* o *Turkey*. Todos los análisis estadísticos se realizaron con el programa estadístico *GraphPad* (Graphpad Software, San Diego, CA). Se consideró estadísticamente significativo un valor de p menor a 0,05.

**Resultados:**  
**FGF15/19 y la plasticidad en  
tejido adiposo**



## 1. Los niveles circulantes de FGF19 correlacionan con la expresión génica de UCP1 en tejido adiposo subcutáneo en humanos.

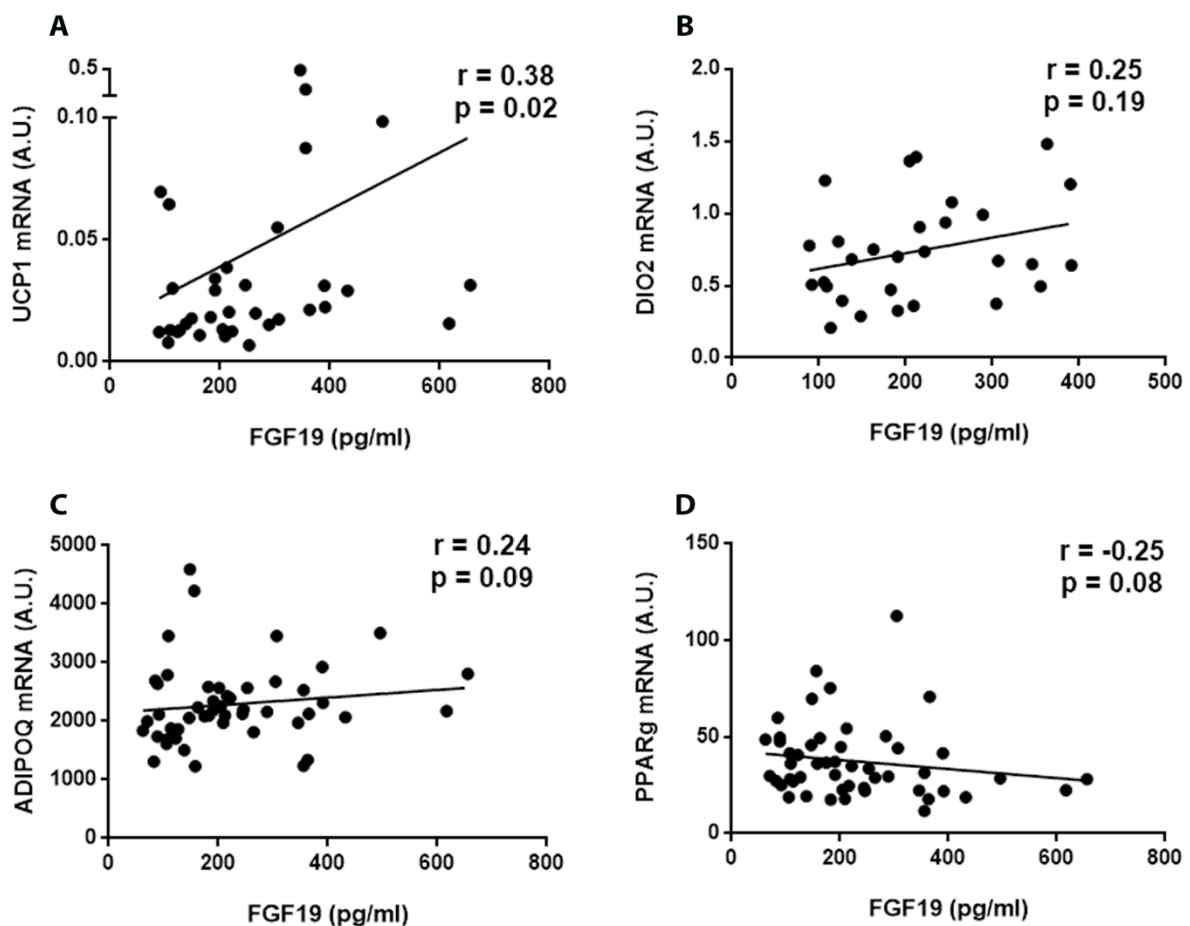
Anteriormente, nuestro grupo había descrito cómo los niveles circulantes de FGF19 correlacionaban negativamente con el grado de obesidad en humanos (Gallego-Escuredo et al., 2015). A fin de profundizar en el papel de FGF19 en la adiposidad humana, gracias a una colaboración establecida con el grupo del Dr. Fernández-Real (IdIBGi), se pudo disponer de muestras provenientes de una cohorte de pacientes con un amplio rango de BMI, desde 22 (normopeso) hasta 63 (obesidad de clase III). La cuantificación de los niveles circulantes de FGF19 mostró una reducción significativa de los niveles de FGF19 en pacientes obesos en relación con controles delgados sanos, de acuerdo con lo ya indicado en artículos anteriores (Gallego-Escuredo et al., 2015). Además, existe una correlación inversa significativa de los niveles de FGF19 y el BMI (Figura 21A). También existe una correlación inversa entre la concentración de FGF19 y la masa de tejido adiposo (grasa corporal), observación que concuerda con el resultado anterior (Figura 21B).



**Figura 21. Los niveles sistémicos de FGF19 correlacionan negativamente con el BMI y la masa del tejido adiposo en humanos.** Correlación entre los niveles sistémicos de FGF19 (pg/mL) y A) BMI (kg/m<sup>2</sup>) (Pearson) o B) masa del tejido adiposo (kg) (Spearman).

Así mismo, se tuvo acceso a biopsias de tejido adiposo subcutáneo de un subconjunto de pacientes de esta misma cohorte. Se analizó la expresión de genes marcadores de distintos procesos asociados con la fisiopatología del tejido adiposo y se estudió la

correlación de expresión de estos genes marcadores con los niveles en sangre de FGF19. Curiosamente, los niveles de RNAm de *UCP1*, gen marcador de actividad termogénica en adipocitos, mostraron una correlación estadísticamente significativa con los niveles circulantes de FGF19 (Figura 22A). Otros genes marcadores de TAM/fenotipo beige, como *DIO2*, también mostraron una tendencia a una correlación positiva (aunque no significativa) (Figura 22B). Por el contrario, los niveles de transcripción de genes que codifican proteínas relacionadas con la adipogénesis general, tanto blanca como marrón/beige, tales como la adiponectina o *PPARγ*, no se correlacionaron con los niveles circulantes de FGF19 (Figura 22C y 22D).



**Figura 22. Los niveles sistémicos de FGF19 correlacionan positivamente con los niveles de expresión de genes termogénicos en tejido adiposo subcutáneo.** Correlación (Spearman) entre los niveles sistémicos de FGF19 (pg/mL) y los niveles de expresión en tejido adiposo subcutáneo de A) *UCP1*, B) *DIO2*, C) *ADIPOQ* y D) *PPARG*.

## **2. FGF15 es necesario para la termogénesis adaptativa de tejido adiposo blanco en ratones a temperatura ambiente.**

Los resultados anteriores nos llevaron a investigar el papel de FGF19, y su ortólogo en roedores FGF15, en la biología del tejido adiposo marrón y beige. Durante el transcurso de esta tesis doctoral se utilizaron ratones con invalidación dirigida de FGF15 (ratones *Fgf15*-null) como modelo de pérdida de función para FGF15/FGF19. Originalmente, la deficiencia de *Fgf15* provocaba letalidad embrionaria (Wright et al., 2004). Sin embargo, la invalidación del gen en el contexto de la cepa C57BL/6J/129/Sv dio lugar a ratones *Fgf15*-null viables, siendo por tanto un modelo de investigación muy útil en el estudio del papel de FGF15, utilizado hasta el momento sobre todo para el análisis de su función hepática (Álvarez-Sola et al., 2017).

Primeramente, se decidió estudiar las consecuencias de la invalidación de FGF15 sobre la homeostasis del tejido adiposo en ratones estabulados en condiciones estándar de temperatura (21 °C) y dieta. Los ratones *Fgf15*-null mostraron una adiposidad levemente reducida en comparación con ratones salvajes, o *wild type* (WT), evidenciada por un menor peso de los depósitos de TAB inguinal (TABi) como modelo de TAB subcutáneo y TAB epididimal (TABe) como modelo de TAB visceral, siendo estadísticamente significativo en el caso del TABi. Otros parámetros, como el peso corporal, la ingesta energética diaria, la trigliceridemia, la glucemia y la insulinemia, no se vieron modificados en los ratones *Fgf15*-null en relación con los WT. Así mismo, las pruebas de tolerancia a la glucosa e insulina no mostraron cambios significativos. Los niveles en plasma de FGF21 no se modificaron significativamente en ratones *Fgf15*-null, aunque mostraron una tendencia a aumentar sus niveles ( $p = 0,06$  con t-student) (Tabla 13).

**Tabla 13. Caracterización de los animales WT y Fgf15-null. Los ratones se estabularon con dieta y condiciones estándar.** Todas las medidas se expresan como media  $\pm$  SEM (n = 7 por grupo). Análisis estadístico realizado con t-student (\* p<0,05).

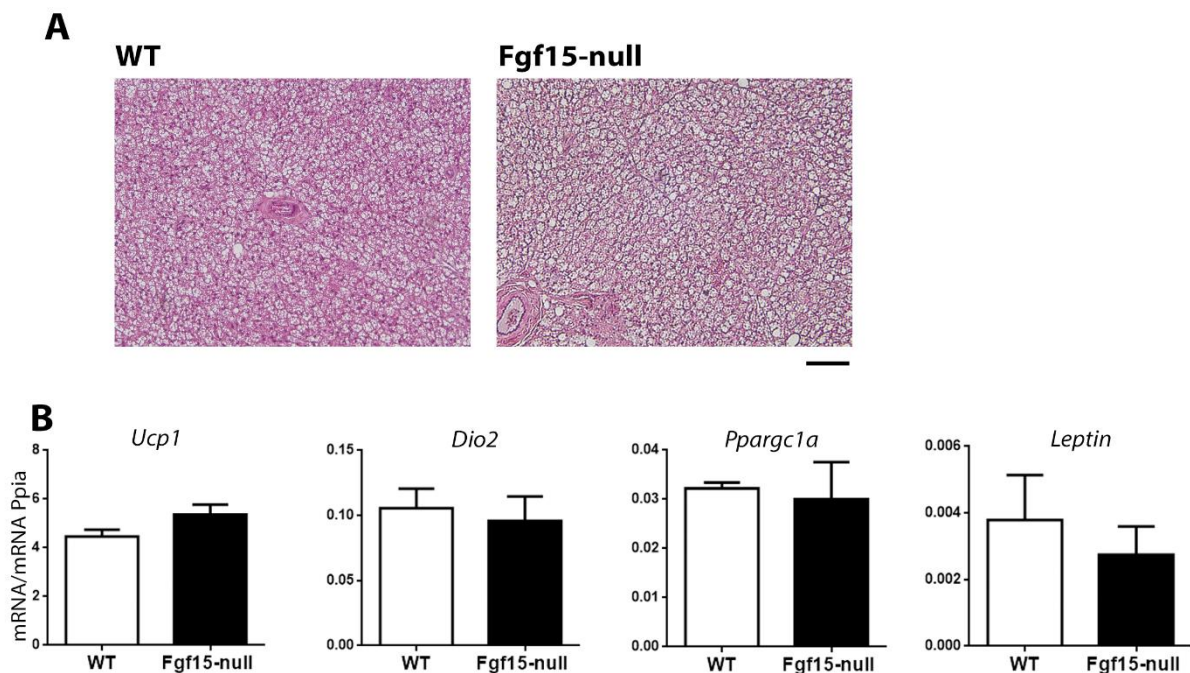
	WT	Fgf15-null
<b>Peso corporal (g)</b>	30,5 $\pm$ 0,9	29,7 $\pm$ 0,8
<b>Energía consumida (KJ/ratón*día)</b>	51,12 $\pm$ 1,92	49,21 $\pm$ 1,30
<b>TAM interescapular (mg)</b>	85,6 $\pm$ 3,8	92,93 $\pm$ 5,2
<b>TABi (mg)</b>	260,0 $\pm$ 17,7	202,5 $\pm$ 3,9 *
<b>TABe (mg)</b>	387,6 $\pm$ 32,3	315,6 $\pm$ 34,5
<b>Hígado (mg)</b>	1409,1 $\pm$ 58,3	1530,5 $\pm$ 66,2
<b>Glucosa (mg/dL)</b>	161,7 $\pm$ 7,9	159,6 $\pm$ 9,0
<b>Insulina (pg/mL)</b>	1064 $\pm$ 120	935 $\pm$ 113
<b>GTT (Área bajo de la curva)</b>	42054 $\pm$ 3313	40099 $\pm$ 2790
<b>ITT (Área bajo de la curva)</b>	3341,5 $\pm$ 206,3	3409,0 $\pm$ 157,0
<b>Triglicéridos (mg/dL)</b>	178,0 $\pm$ 15,3	170,6 $\pm$ 14,9
<b>Ácidos biliares totales (<math>\mu</math>mols/L)</b>	17,3 $\pm$ 3,4	19,3 $\pm$ 2,6
<b>FGF21 (pg/mL)</b>	76,60 $\pm$ 12,40	159,60 $\pm$ 38,10 (p=0,06)

Por otra parte, la expresión del gen hepático *Cyp7a1* (diana directa de FGF15) se vio fuertemente inducida en los ratones Fgf15-null, consistente con la ausencia de la acción represiva mediada por FGF15 de este gen clave en la síntesis de los ácidos biliares. Sin embargo, el nivel total de ácidos biliares no se vio modificado en ratones Fgf15-null (Tabla 14).

**Tabla 14. Niveles de expresión de mRNA de genes relacionados con el metabolismo hepático y con la acción represiva de FGF15** (expresión relativa multiplicada por 1000). Todos los resultados se expresan como media  $\pm$  SEM (n=7 por grupo). Análisis estadístico realizado por t-student (\* p < 0,05; \*\* p < 0.01).

	WT	Fgf15-null
<b><i>Cyp7a1</i></b>	42,0 $\pm$ 8,2	170,0 $\pm$ 42,0 **
<b><i>Fgf21</i></b>	1,20 $\pm$ 0,15	2,50 $\pm$ 0,82
<b><i>Pck1</i></b>	270 $\pm$ 54	270 $\pm$ 67
<b><i>G6pc</i></b>	2,50 $\pm$ 0,45	2,60 $\pm$ 0,45
<b><i>Slc10a2</i></b>	76,0 $\pm$ 0,1	140,0 $\pm$ 33,0

El análisis histológico del TAM de ratones *Fgf15*-null no reveló cambios importantes (Figura 23A), mostrando un tamaño de los adipocitos y del contenido lipídico similares. De la misma manera, los niveles de expresión de genes claves de la termogénesis en el TAM, como *Ucp1*, *Dio2* o *Ppargc1a* (gen que codifica por la proteína PGC1 $\alpha$ ) no estuvieron alterados en los ratones deficientes en FGF15 en comparación con ratones WT (Figura 23B).

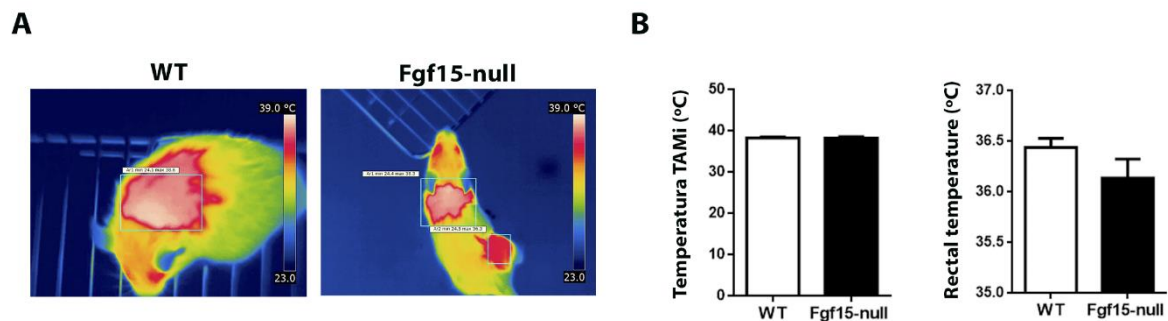


**Figura 23. La falta de FGF15 no provoca cambios en TAM a temperatura ambiente.** Caracterización del TAM de ratones WT y *Fgf15*-null a temperatura ambiente (21°C). **A.** Secciones histológicas representativas de TAM de ratones WT y *Fgf15*-null teñidas con hematoxilina y eosina (H&E). 10x aumentos, escala 100  $\mu$ m. **B.** Niveles de expresión del RNAm de diferentes marcadores termogénicos (*Ucp1*, *Dio*, *Ppargc1* y *Leptin*). Los resultados se expresan como media  $\pm$  SEM (n = 7). Análisis estadístico realizado con t-student.

La termografía mediante infrarrojos permite cuantificar la temperatura de la superficie corporal, lo que se puede utilizar como un indicador indirecto de la actividad termogénica de una determinada región corporal (Crane et al., 2014). La evaluación de la producción de calor en la región interscapular, región coincidente con la localización del depósito interscapular del tejido adiposo marrón (TAMi), no mostró diferencias entre ambos genotipos, lo que está en concordancia con las observaciones obtenidas a nivel histológico y transcriptómico. Tampoco se vieron diferencias entre los dos genotipos en

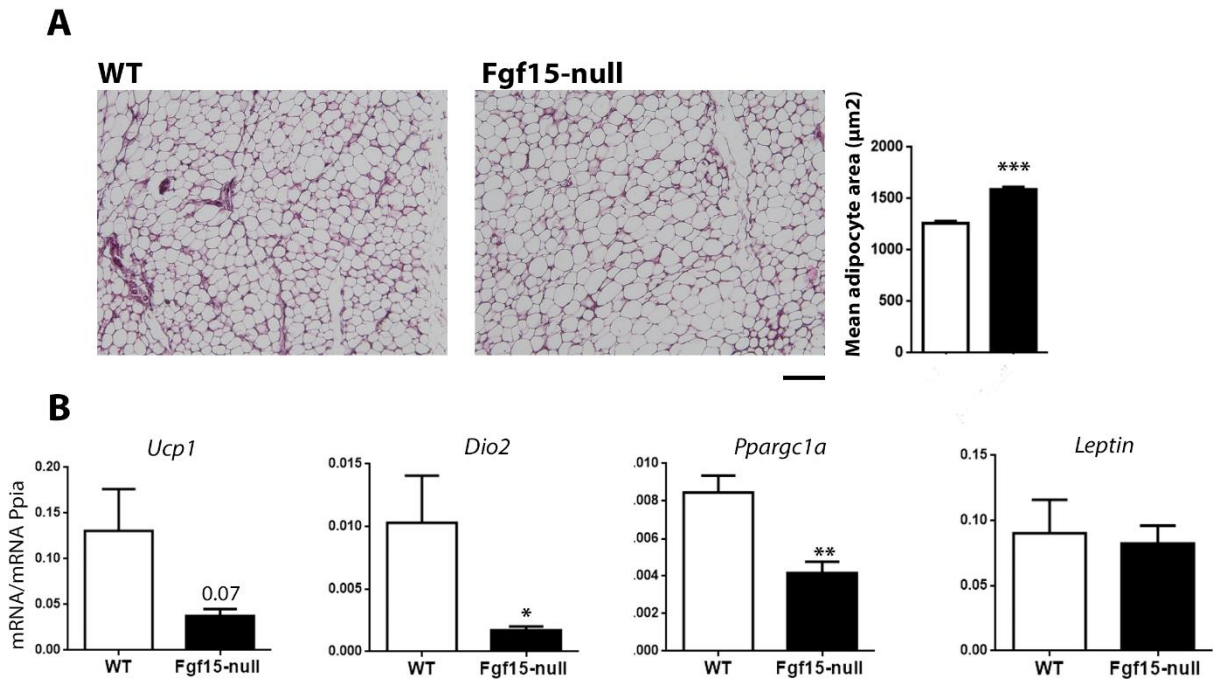


cuanto a temperatura rectal, aunque se observó una tendencia a ser menor en el caso de los ratones Fgf15-null ( $p = 0,13$ ) (Figura 24).



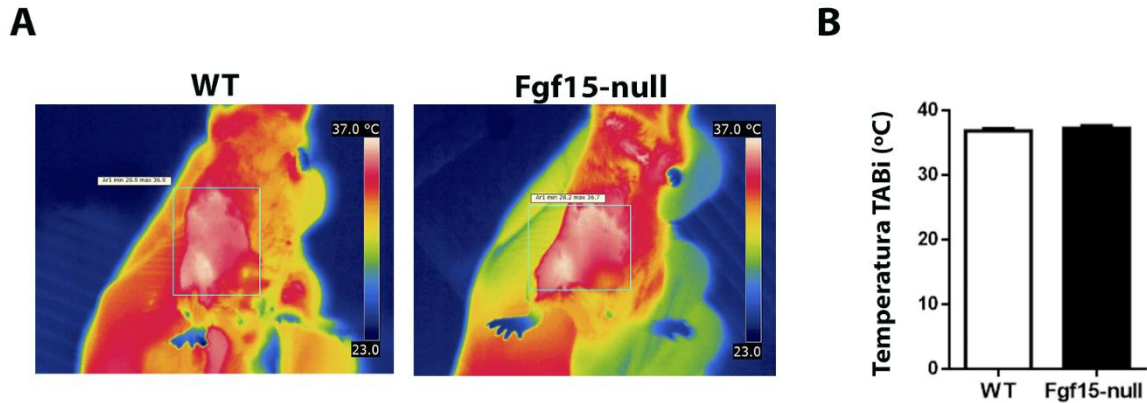
**Figura 24. No hay diferencias entre genotipos en cuanto a la temperatura del TAMi. A.** Termografías representativas realizadas en ratones WT y Fgf15-null. **B.** Cuantificación de la temperatura del TAMi y de la temperatura rectal de ratones WT y Fgf15-null. Los resultados se expresan como media  $\pm$  SEM ( $n = 10$ ). Análisis estadístico realizado con t-student.

En contraste con lo visto en la figura 2A, el examen histológico del TABi reveló un mayor tamaño de los adipocitos en ratones Fgf15-null (Figura 25A). Los niveles de transcripción de genes relacionados con la termogénesis adaptativa (*browning*) y con el llamado fenotipo beige (*Ucp1*, *Dio2* y *Ppargc1a*) fueron más bajos en el TABi de los ratones Fgf15-null en relación con los controles WT (Figura 25B).



**Figura 25. FGF15 es requerido en TABi para la termogénesis adaptativa en ratones a temperatura ambiente.** Caracterización del TAB de ratones WT y Fgf15-null a temperatura ambiente (21°C). **A.** Secciones histológicas representativas de TAB de ratones WT y Fgf15-null teñidas con hematoxilina y eosina (H&E). 10x aumentos, escala 100 µm. Área de los adipocitos (calculada en µm<sup>2</sup>). **B.** Niveles de expresión del RNAm de diferentes marcadores termogénicos (*Ucp1*, *Dio2*, *Ppargc1a* y *Leptin*). Los resultados se expresan como media ± SEM (n = 7). Análisis estadístico realizado con t-student (\* p<0,05; \*\* p <0,01; \*\*\* p <0,001).

De la misma manera que en el caso anterior, se evaluó la producción de calor de la zona correspondiente al TABi mediante termografía infrarroja. A pesar de los resultados obtenidos a nivel de expresión génica, no se detectaron diferencias de temperatura entre ambos genotipos (Figura 26).



**Figura 26. No hay diferencias entre genotipos en cuanto a la temperatura del TABi. A.** Termografías representativas realizadas en ratones WT y Fgf15-null. **B.** Cuantificación de la temperatura del TABi de ratones WT y Fgf15-null. Los resultados se expresan como media  $\pm$  SEM (n = 10). Análisis estadístico realizado con t-student.

### 3. La adaptación termogénica de los tejidos adiposos está alterada en ratones Fgf15-null.

Debido a las evidencias obtenidas en los ratones Fgf15-null mantenidos a 21°C en referencia a las alteraciones en la morfología y a indicios de impedimento del grado de *browning* en el TABi, realizamos un análisis de la capacidad de respuesta adaptativa de los ratones deficientes en FGF15 a un desafío termogénico más severo. A fin de llevar a cabo este propósito, se mantuvieron ratones WT y Fgf15-null a una temperatura ambiente de 4°C durante una semana, protocolo que exige a los ratones a desarrollar una adaptación de alto requerimiento termogénico. Tanto los ratones WT como Fgf15-null se adaptaron correctamente al frío, sin comprometer su viabilidad y sin signos evidentes de hipotermia. Tras permanecer una semana a 4 °C, los ratones Fgf15-null mostraron una tendencia no significativa a incrementar la masa de TABi y TABe en relación con los WT. Mientras que la glucemia no fue diferente entre ratones WT y Fgf15-null expuestos al frío, la insulinemia en ratones Fgf15-null fue mayor que en ratones WT (Tabla 15). De hecho, los ratones Fgf15-null no fueron capaces de reducir los niveles de insulina en respuesta a 4 °C (efecto de sensibilización a la insulina a causa del frío) como así lo hacen los ratones WT (1064  $\pm$ 120 a 21 °C y 656  $\pm$  117 a 4 °C en ratones WT, ver Tabla 13).

**Tabla 15. Caracterización de los animales WT y Fgf15-null sometidos 7 días a un requerimiento termogénico de 4°C.** Los ratones se estabularon con dieta estándar. En la tabla se muestran datos concernientes a los pesos de los animales (tanto peso corporal como el peso de los diferentes tejidos), parámetros metabólicos y la expresión génica en hígado de diferentes genes (expresión relativa y multiplicada por 1000). Todas las medidas se expresan como media  $\pm$  SEM (n = 6 por grupo). Análisis estadístico realizado con t-student (\* p<0,05; \*\* p <0,01; \*\*\* p <0,001).

	21°C a 4 °C	
	WT	Fgf15-null
<b>Peso corporal (g)</b>	30,2 $\pm$ 1,0	28,8 $\pm$ 0,7
<b>Energía consumida (KJ)/ratón*día)</b>	88,0 $\pm$ 9,2	74,1 $\pm$ 5,2
<b>TAM interescapular (mg)</b>	125,8 $\pm$ 3,5	136,8 $\pm$ 4,0 (p=0,07)
<b>TABi (mg)</b>	208,3 $\pm$ 23,1	306,8 $\pm$ 40,7 (p=0,08)
<b>TABe (mg)</b>	324,3 $\pm$ 108,2	507,6 $\pm$ 89,0
<b>Hígado (mg)</b>	1561,1 $\pm$ 60,6	1412,8 $\pm$ 54,7 (p=0,1)
<b>Glucosa (mg/dL)</b>	172,2 $\pm$ 8,9	147,5 $\pm$ 10,8
<b>Insulina (pg/mL)</b>	656 $\pm$ 117	1509 $\pm$ 249*
<b>Triglicéridos (mg/dL)</b>	178,3 $\pm$ 13,7	173,6 $\pm$ 10,4
<b>NEFA (mg/dL)</b>	18,2 $\pm$ 1,4	15,0 $\pm$ 0,9 (p=0,08)
<b>Ácidos biliares totales (μmols/L)</b>	22,0 $\pm$ 2,4	19,6 $\pm$ 3,6
<b>FGF21 (pg/mL)</b>	149,9 $\pm$ 32,7	66,2 $\pm$ 7,5 *
<b>Cyp7a1 Hepático</b>	100,0 $\pm$ 19,0	380,0 $\pm$ 29,0 ***
<b>Fgf21 Hepático</b>	1,10 $\pm$ 0,18	0,51 $\pm$ 0,10*
<b>Pck1 Hepático</b>	590 $\pm$ 43	570 $\pm$ 92
<b>G6pc Hepático</b>	4,30 $\pm$ 0,59	4,10 $\pm$ 0,39
<b>Slc10a2 Hepático</b>	16,0 $\pm$ 2,6	29,0 $\pm$ 4,1

Por otra parte, también analizamos el proceso de adaptación de ratones mantenidos a 21 °C a 30 °C, que corresponde a la temperatura de termoneutralidad en ratones, como un segundo modelo complementario de estudio de la plasticidad adaptativa del tejido adiposo en este caso en el sentido opuesto a la exposición a 4 °C: adaptación a la represión de la actividad termogénica (Altshire-Keylin et al., 2016; Cairó et al., 2019). El peso corporal de los ratones Fgf15-null respecto a los WT expuestos a la misma temperatura no mostraba cambios. Sin embargo, la masa de los depósitos de TAB inguinal y epididimal

fue significativamente mayor en ratones Fgf15-null. La masa de TAM también aumentó en los ratones deficientes en FGF15, debido probablemente a un aumento en el contenido lipídico (ver más abajo). En cuanto a los parámetros sistémicos, los niveles de triglicéridos, NEFA y FGF21 disminuyeron en ratones Fgf15-null con respecto a ratones WT adaptados a 30 °C (Tabla 16).

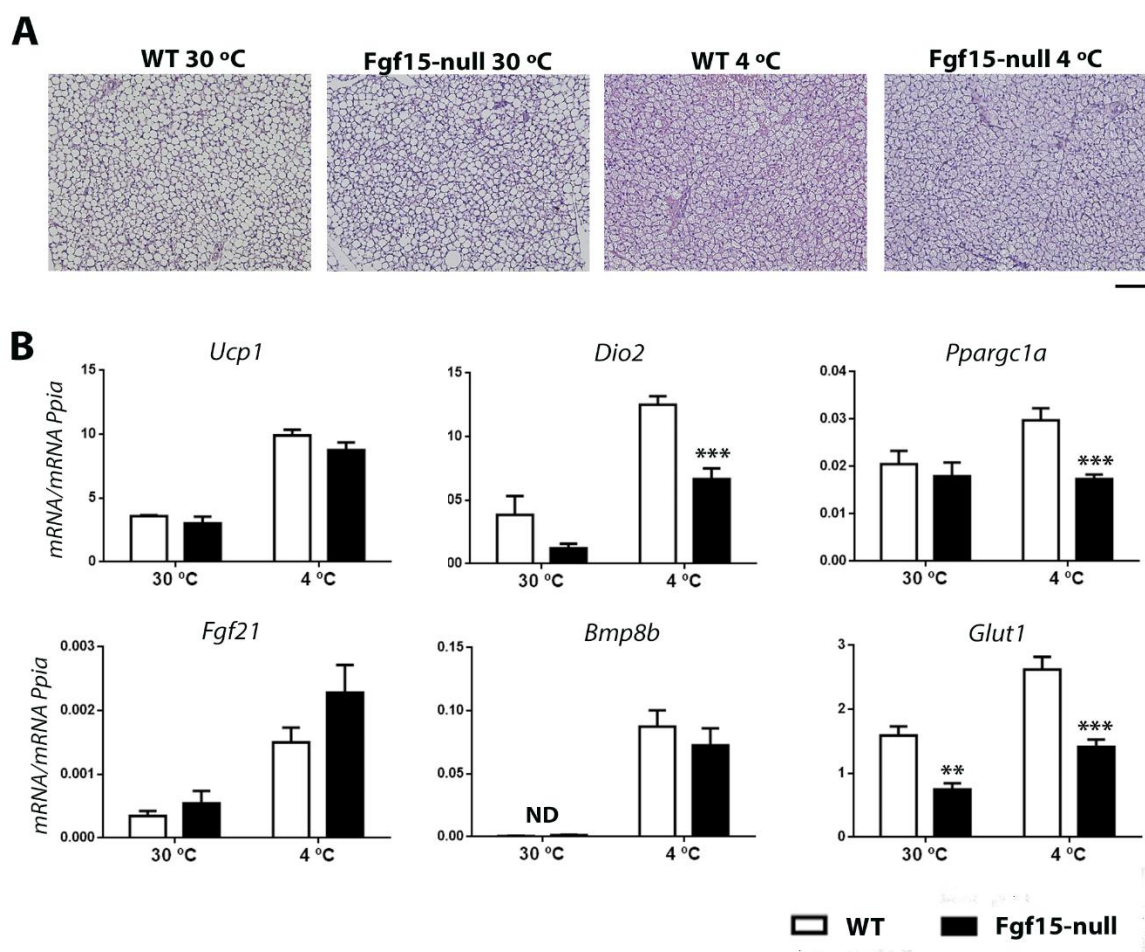
**Tabla 16. Caracterización de los animales WT y Fgf15-null mantenidos 7 días a termoneutralidad (30 °C).** Los ratones se estabularon con dieta estándar. En la tabla se muestran datos concernientes a los pesos de los animales (tanto peso corporal como el peso de los diferentes tejidos), parámetros metabólicos y la expresión génica en hígado de diferentes genes (expresión relativa y multiplicada por 1000). Todas las medidas se expresan como media  $\pm$  SEM (n = 6 por grupo). Análisis estadístico realizado con t-student (\* p<0,05; \*\* p <0,01; \*\*\* p <0,001).

	21°C a 30 °C	
	WT	Fgf15-null
<b>Peso corporal (g)</b>	30,7 $\pm$ 1,3	29,8 $\pm$ 0,8
<b>Energía consumida (KJ)/ratón*día)</b>	41,3 $\pm$ 3,2	42,5 $\pm$ 2,0
<b>TAM interescapular (mg)</b>	69,8 $\pm$ 2,4	128,9 $\pm$ 13,9 **
<b>TABi (mg)</b>	262,2 $\pm$ 43,7	379,1 $\pm$ 29,9 (p=0,05)
<b>TABe (mg)</b>	357,3 $\pm$ 78,2	725,6 $\pm$ 80,5 **
<b>Hígado (mg)</b>	1482,9 $\pm$ 91,9	1399,8 $\pm$ 61,0
<b>Glucosa (mg/dL)</b>	166,8 $\pm$ 6,0	165,3 $\pm$ 7,1
<b>Insulina (pg/mL)</b>	1744 $\pm$ 231	1386 $\pm$ 235
<b>Triglicéridos (mg/dL)</b>	331,5 $\pm$ 50,1	212,7 $\pm$ 12,3 *
<b>NEFA (mg/dL)</b>	32,9 $\pm$ 4,1	22,9 $\pm$ 2,4 (p=0,06)
<b>Ácidos biliares totales (μmols/L)</b>	20,3 $\pm$ 1,8	21,0 $\pm$ 2,4
<b>FGF21 (pg/mL)</b>	214,3 $\pm$ 26,1	111,7 $\pm$ 11,5 **
<b>Cyp7a1 Hepático</b>	36,0 $\pm$ 7,9	200,0 $\pm$ 26,0
<b>Fgf21 Hepático</b>	2,30 $\pm$ 0,49	2,00 $\pm$ 0,57 ***
<b>Pck1 Hepático</b>	110 $\pm$ 25	200 $\pm$ 38 (p=0,08)
<b>G6pc Hepático</b>	4,00 $\pm$ 0,25	3,20 $\pm$ 0,49
<b>Slc10a2 Hepático</b>	20,00 $\pm$ 0,25	37,00 $\pm$ 6,10

En lo que concierne al TAM, observamos que el tejido de los ratones Fgf15-null mostró algunos signos leves de falta de capacidad para responder al desafío termogénico a 4 °C,

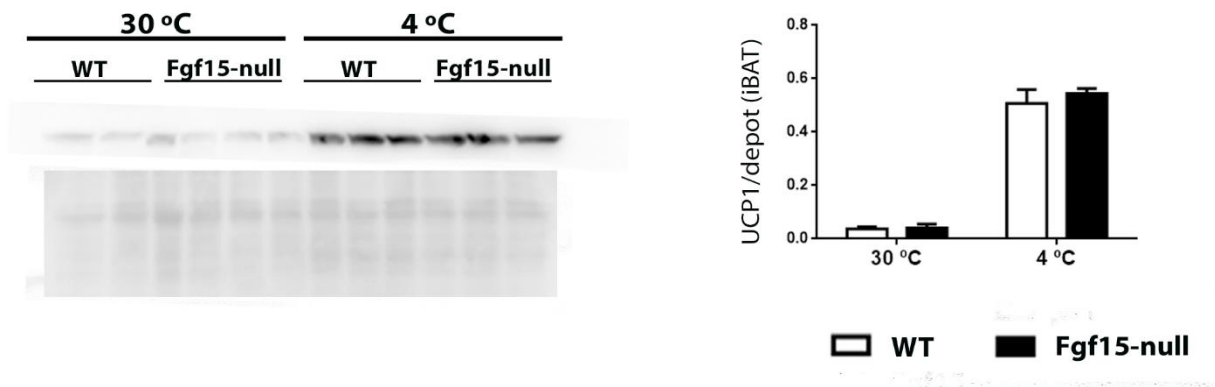
como lo demuestra la expresión reducida de los genes relacionados con la respuesta termogénica *Dio2*, *Pparg1a* y *Glut-1* (Figura 27B). Sin embargo, ni la morfología histológica (Figura 27A) ni los niveles de RNAm de *Ucp1* (Figura 27B) mostraron alteraciones en ratones deficientes en *Fgf15* en comparación con ratones salvajes.

En TAM de ratones expuestos a termoneutralidad, el análisis histológico y el perfil de expresión de genes relacionados con la termogénesis mostraron cambios menores debido a la ausencia de FGF15, observándose una disminución significativa solamente en la expresión de *Glut1*.



**Figura 27. La falta de FGF15 no impide la activación termogénica del TAM en ratones a 4 °C.** Caracterización del TAM de ratones WT y Fgf15-null a 30 °C o 4 °C. **A.** Secciones histológicas representativas de TAM de ratones WT y Fgf15-null a los diferentes desafíos termogénicos teñidas con hematoxilina y eosina (H&E). 10x aumentos, escala 100 µm. **B.** Niveles de expresión de RNAm de diferentes marcadores termogénicos (*Ucp1*, *Dio2*, *Pparg1a*, *Fgf21*, *Bmp8b* y *Glut1*). Los resultados se expresan como media ± SEM (n = 6). Análisis estadístico realizado con t-student entre genotipos a igual condición ambiental (\* p<0,05; \*\* p<0,01; \*\*\* p<0,001).

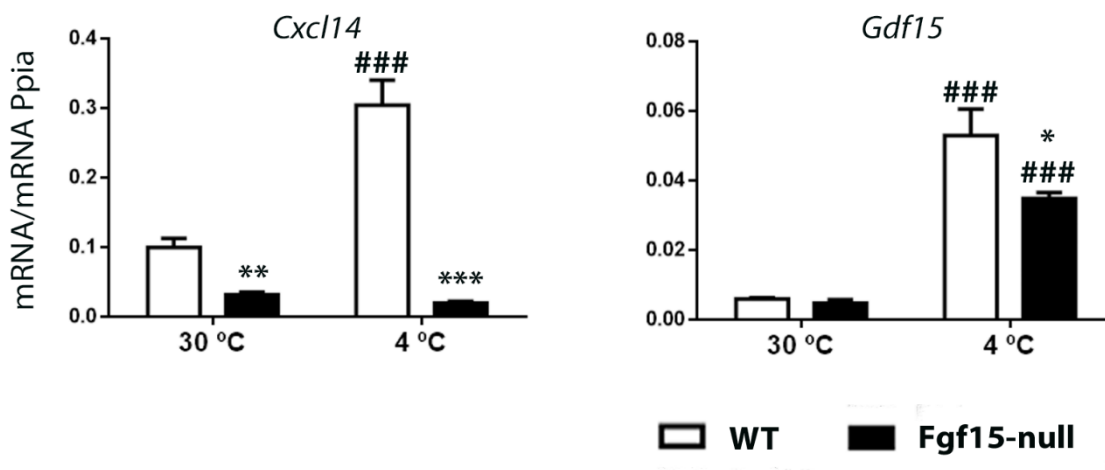
Además, se evaluaron los niveles proteicos de UCP1 en el TAM de los ratones mantenidos durante una semana a 30 °C o 4 °C y no se observaron alteraciones entre ratones WT y Fgf15-null, tal como se había visto a nivel de expresión génica (Figura 28).



**Figura 28. Los niveles proteicos de UCP1 no se encuentran alterados en TAM ante el déficit de *Fgf15*.** Inmunoblot representativo de los niveles de la proteína UCP1 en TAM, imagen de su Ponceau y cuantificación relativa de UCP1. Los resultados se expresan como media  $\pm$  SEM (n = 6). Análisis estadístico realizado con t-student entre genotipos a igual condición ambiental.

Paralelamente con *Fgf21*, analizamos la expresión de otras batocinas estudiadas en el laboratorio: CXCL14 (Cereijo et al., 2018) y GDF15 (Campderrós et al., 2019). La expresión de ambas batocinas se encuentra incrementada en animales WT a 4°C. En el caso de *Cxcl14*, los animales Fgf15-null muestran una expresión reducida de manera drástica, tanto a 30 °C como a 4 °C (siendo  $p < 0,0001$  el factor Fgf15-null con two way ANOVA). En el caso de *Gdf15*, su expresión en Fgf15-null también se encuentra alterada, aunque en menor medida que en *Cxcl14* ( $p = 0,04$ ). Los resultados nos indican que a pesar de que la termogénesis del TAMi aparentemente no se encuentra impedida, la función de órgano secretor y la liberación de batocinas de TAMi de animales Fgf15-null sí que se ve afectada (Figura 29).

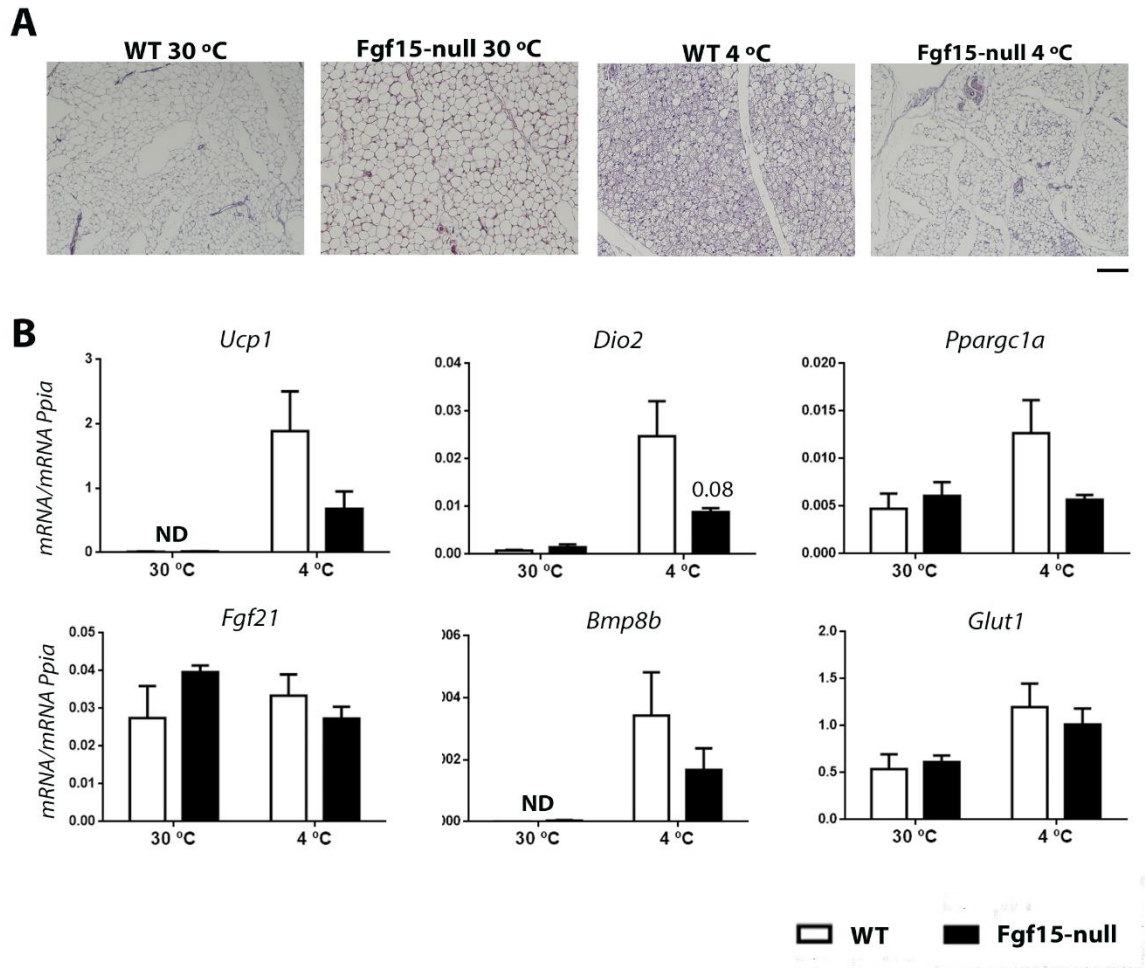




**Figura 29. La expresión de batocinas en el TAMi se ve alterada en ratones Fgf15-null.** Niveles de expresión de RNAM de *Cxcl14* y *Gdf15*. Los resultados se expresan como media  $\pm$  SEM (n = 6). Análisis estadístico realizado con t-student. \* muestra diferencias entre genotipo y # muestra diferencias entre temperatura (\* p<0,05; \*\* p<0,01; \*\*\* p<0,001; # p<0,05; ## p<0,01; ### p<0,001).

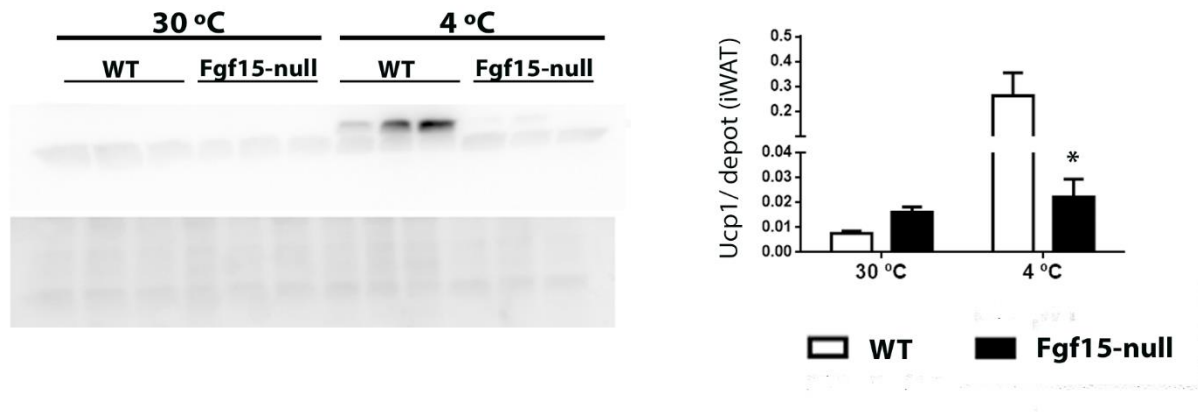
En contraste con las observaciones realizadas en TAM, indicativas de un impacto moderado por la falta de FGF15 con relación a la adaptación termogénica, el TABi de los ratones Fgf15-null experimentó mayores cambios debido al desafío termogénico respecto a ratones WT. El análisis histológico reveló la existencia de un *browning* masivo (aparición de adipocitos multiloculares de tipo beige) en el TABi de ratones WT expuestos a 4 °C, mientras que en el caso de los Fgf15-null expuestos a frío, el *browning* fue mucho menor (Figura 30A). El grado de inducción de la expresión de *Ucp1*, *Dio2* y *Ppargc1a* se vio significativamente afectado en el TABi de ratones Fgf15-null expuestos al frío (Figura 30B). La expresión de genes implicados en la termogénesis adaptativa (como *Ucp1*, *Dio2* y *Bmp8b*), resultó ser muy baja en TABi de ratones expuestos a 30 °C en comparación a los ratones mantenidos a 4°C, tanto en ratones WT como en Fgf15-null (Figura 30B).





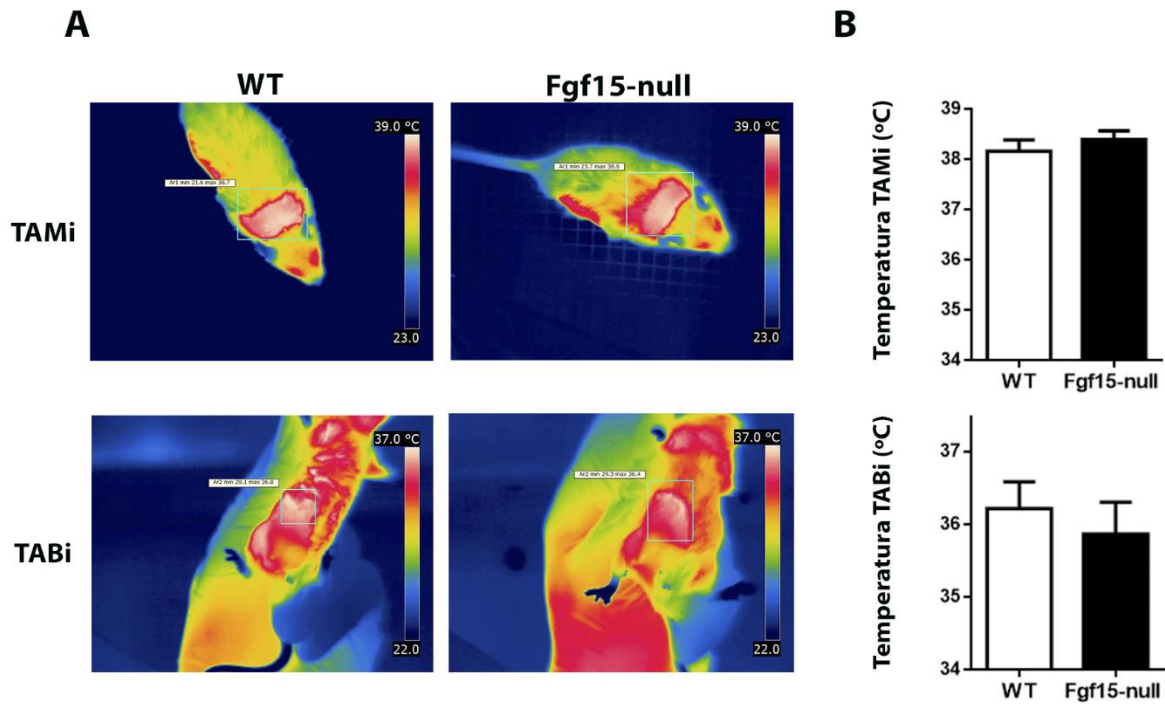
**Figura 30. La adaptación del TABi al desafío termogénico se encuentra impedida en ratones Fgf15-null.** Caracterización del TAB inguinal (modelo de subcutáneo) de ratones WT y Fgf15-null a 30 °C o 4 °C. **A.** Secciones histológicas representativas de TAB de ratones WT y Fgf15-null a los diferentes desafíos termogénicos teñidas con hematoxilina y eosina (H&E). 10x aumentos, escala 100  $\mu$ m. **B.** Niveles de expresión de RNAm de diferentes marcadores termogénicos (Ucp1, Dio2, Ppargc1a, Fgf21, Bmp8b y Glut1). Los resultados se expresan como media  $\pm$  SEM (n = 6). Análisis estadístico realizado con t-student entre genotipos a igual condición ambiental (\* p<0,05; \*\* p<0,01; \*\*\* p<0,001).

La evaluación de los niveles de proteína UCP1 confirmó un potente bloqueo del proceso de *browning* en TABi de ratones Fgf15-null, ya que los niveles de UCP1 se ven drásticamente reducidos (apenas a un 10 %) en comparación con los WT (p = 0,04 analizando el efecto del genotipo con Two way ANOVA) (Figura 31).



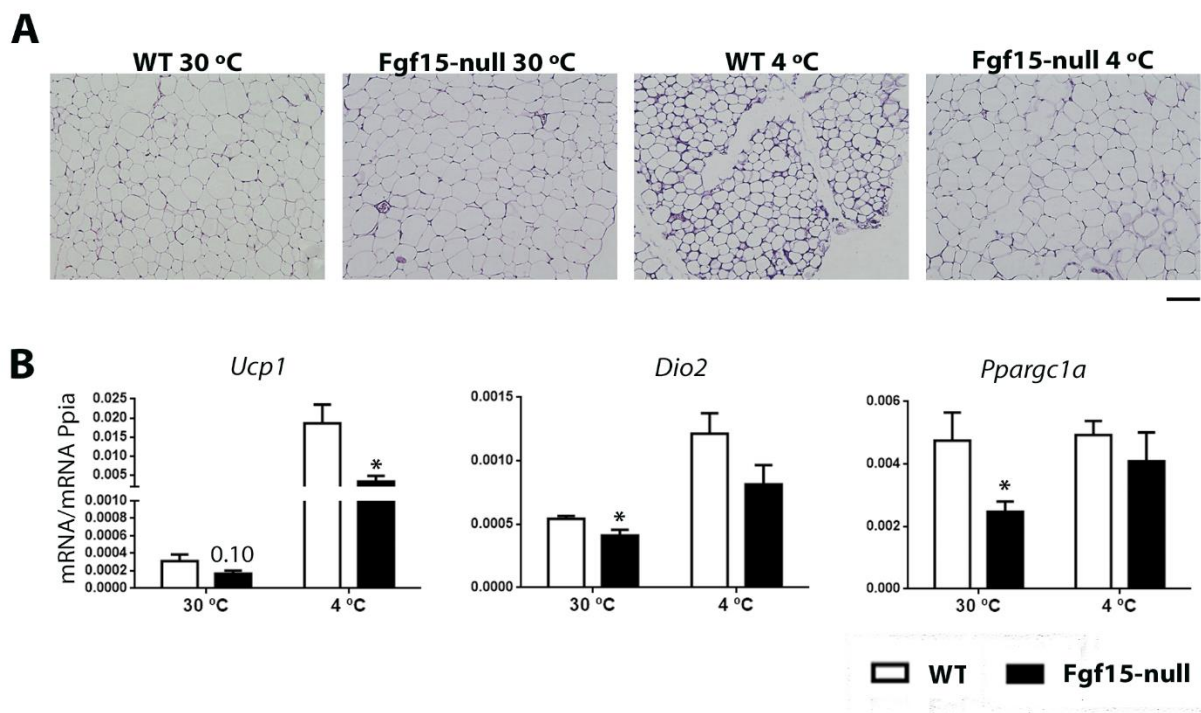
**Figura 31. Los niveles proteicos de UCP1 se encuentran alterados en TABi ante el déficit de *Fgf15*.** Inmunoblot representativo de los niveles de la proteína UCP1 en TABi, imagen de su Ponceau y cuantificación relativa de UCP1. Los resultados se expresan como media  $\pm$  SEM (n = 6). Análisis estadístico realizado con t-student entre genotipos a igual condición ambiental (\* p < 0,05).

En estos ratones también se evaluó la producción de calor en la región interescapular (región coincidente con la localización del TAMi) y en la región correspondiente al TABi, evaluada mediante termografía infrarroja. En ambas regiones, la producción de calor no fue diferente entre ratones *Fgf15*-null expuestos a 4°C y ratones WT también expuestos a 4 °C (Figura 32).



**Figura 32. El déficit de Fgf15-null no impide mantener la temperatura en las regiones del TAMI y TABi.** **A.** Termografías representativas de ratones WT y Fgf15-null expuestos a 4 °C durante 7 días. **B.** Cuantificación de la temperatura absoluta del TAMI y TABi de estos ratones. Los resultados se expresan como media  $\pm$  SEM (n = 6). Análisis estadístico realizado con t-student.

Los resultados obtenidos en el caso del TABe, un depósito de TAB visceral menos propenso al *browning* que el TABi, fueron similares a los observados en TABi. A pesar de que la exposición durante una semana a 4 °C no produjo evidentes signos de *browning* a nivel histológico ni en ratones WT ni en ratones Fgf15-null (Figura 33A), el análisis de expresión génica sí reveló una fuerte inducción de los niveles de RNAm tanto de *Ucp1* como de *Dio2* solamente en ratones WT y no en ratones Fgf15-null expuestos al frío (Figura 33B).



**Figura 33. La adaptación del TABe al desafío termogénico se encuentra impedida en ratones Fgf15-null.** Caracterización del TAB epididimal (modelo de visceral) de ratones WT y Fgf15-null a 30 °C o 4 °C. **A.** Secciones histológicas representativas de TABe de ratones WT y Fgf15-null a los diferentes desafíos termogénicos teñidas con hematoxilina y eosina (H&E). 10x aumentos, escala 100  $\mu$ m. **B.** Niveles de expresión de RNAm de diferentes marcadores termogénicos (*Ucp1*, *Dio2* y *Pparg1a*). Los resultados se expresan como media  $\pm$  SEM (n = 6). Análisis estadístico realizado con t-student entre genotipos a igual condición ambiental (\* p<0,05).

Con todo lo obtenido en TAM, TABi y TABe, llegamos a la conclusión de que la supresión de *Fgf15* inducida experimentalmente produce un impedimento en la capacidad de inducción del *browning* del TAB en ratones sometidos a un desafío termogénico, como es el frío.

#### 4. La sobreexpresión de FGF15 y FGF19 provocan *browning* en el TABi.

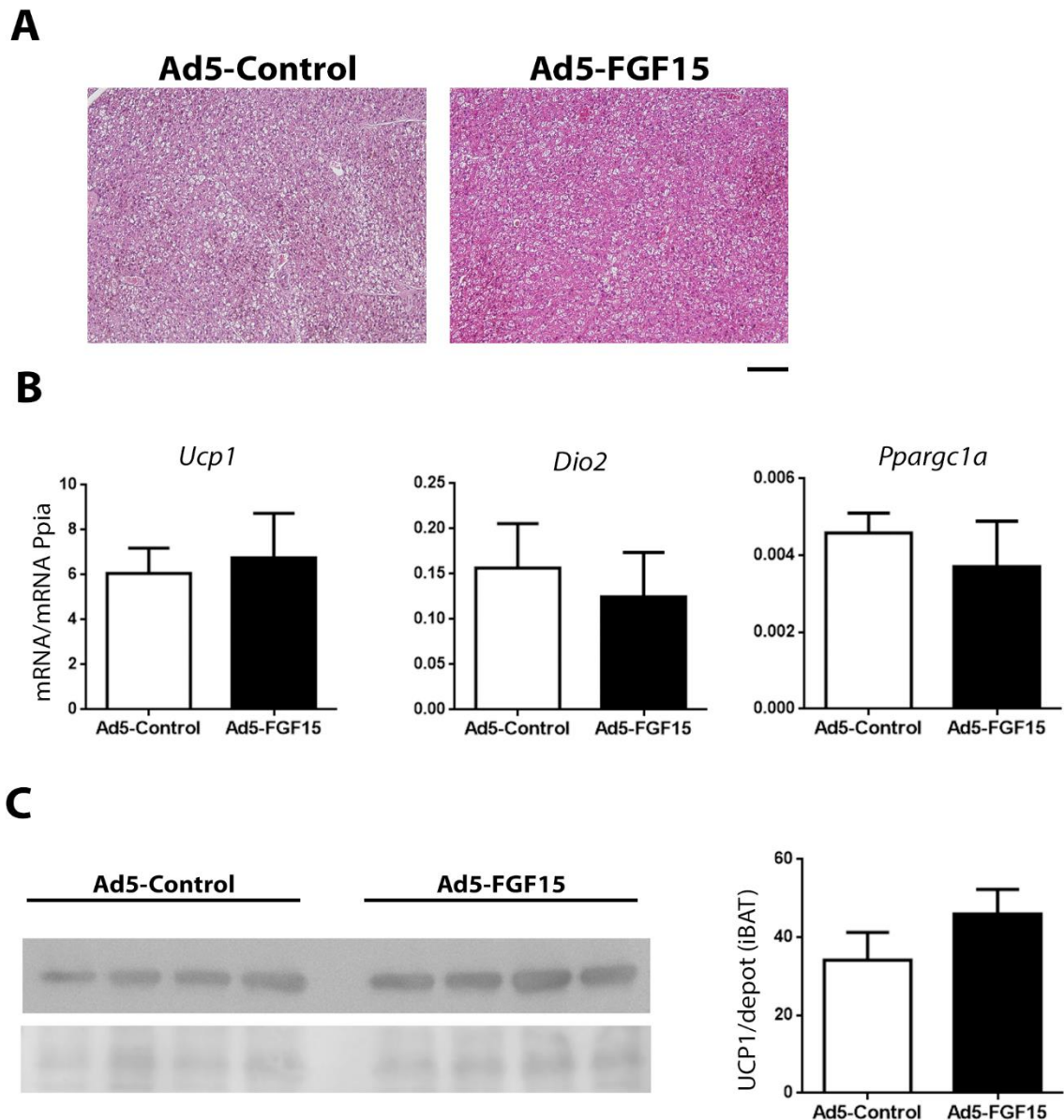
Los resultados anteriores, basados en el modelo de pérdida de función de FGF15, sugieren un papel positivo de FGF15 en el control de la termogénesis adaptativa,

especialmente en la plasticidad del TAB para realizar el *browning*. Por consiguiente, a continuación quisimos determinar si FGF15 puede promover directamente el *browning* en los tejidos adiposos. A fin de cumplir este propósito, y siguiendo un método comúnmente utilizado para lograr la síntesis y secreción al plasma de proteínas heterólogas cuando se carece de proteína recombinante (Boström et al., 2012; Rao et al., 2014), se realizaron inyecciones retroorbitales con un vector adenoviral para administrar una construcción de FGF15 de longitud completa (Ad5-FGF15) o con un vector adenoviral vacío (Ad5-Control). El principal tejido diana de infección es el hígado, siendo un método comúnmente utilizado para lograr la síntesis y secreción al plasma de proteínas heterólogas (Wei et al., 2008; Rao et al., 2014). Una semana después de la inyección, el análisis de transcripción confirmó una inducción de más de 100 veces de los niveles de RNAm de FGF15 en el hígado sobre los niveles basales, prácticamente indetectables. Además, la expresión de *Cyp7a1*, gen hepático diana de FGF15, se encontraba fuertemente reprimida ( $12,0 \pm 4,8$  en controles respecto a  $2,1 \pm 0,3$  en ratones inyectados con Ad5-FGF15), evidenciando la acción biológica de la sobreexpresión de *Fgf15*. Al observar en estudios anteriores cómo la expresión de *Fgf21* aumentaba en el caso de ratones *Fgf15*-null, se analizó la expresión en este caso. Sin embargo, no se observaron grandes cambios en cuanto a la expresión de *Fgf21* en este contexto experimental. Asimismo, la inyección con Ad5-FGF15 no modificó significativamente el peso corporal, el tamaño de los depósitos de tejido adiposo o parámetros bioquímicos estándar, como la glucemia, la insulinemia y la trigliceridemia (Tabla 17).

**Tabla 17. Caracterización de animales WT con una inyección retroorbital con la construcción Ad5-Control o Ad5-FGF15, provocando la sobreexpresión de *Fgf15* en hígado durante una semana. Los ratones se estabularon con dieta y condiciones estándar. En la tabla se muestran datos concernientes a los pesos de los animales (tanto peso corporal como el peso de los diferentes tejidos), parámetros metabólicos y la expresión génica en hígado de diferentes genes (expresión relativa y multiplicada por 1000). Todas las medidas se expresan como media  $\pm$  SEM (n = 5 por grupo). Análisis estadístico realizado con t-student (\* p<0,05; \*\* p <0,01).**

	<b>Ad5-Control</b>	<b>Ad5-FGF15</b>
<b>Peso corporal (g)</b>	22,3 $\pm$ 0,1	22,1 $\pm$ 0,7
<b>TAM interescapular (mg)</b>	50,8 $\pm$ 3,7	54,6 $\pm$ 3,5
<b>TABi (mg)</b>	102,9 $\pm$ 6,7	113,4 $\pm$ 13,5
<b>TABe (mg)</b>	116,0 $\pm$ 5,0	116,0 $\pm$ 16,3
<b>Hígado (mg)</b>	2173,2 $\pm$ 61,3	1707,0 $\pm$ 143,7*
<b>Glucose (mg/dL)</b>	106,6 $\pm$ 12,0	103,3 $\pm$ 5,0
<b>Insulina (pg/mL)</b>	421,3 $\pm$ 43,8	410,3 $\pm$ 51,4
<b>Triglicéridos (mg/dL)</b>	92,5 $\pm$ 5,4	85,9 $\pm$ 4,7
<b>FGF21 (pg/mL)</b>	2883,2 $\pm$ 426,2	1653,3 $\pm$ 206,2*
<b>Fgf15 Hepático</b>	0,7 $\pm$ 0,3	1800,0 $\pm$ 390,0**
<b><i>Cyp7a1</i> Hepático</b>	12,0 $\pm$ 4,8	2,1 $\pm$ 0,3
<b><i>Fgf21</i> Hepático</b>	6,09 $\pm$ 0,79	5,60 $\pm$ 1,60

No se encontraron alteraciones en el TAM de los animales debido al aumento de FGF15 tras la inyección, como se puede ver a nivel histológico (Figura 34A), en el perfil de expresión génica de genes relacionados con la termogénesis (Figura 34B) y en los niveles proteicos de UCP1 (Figura 34C).

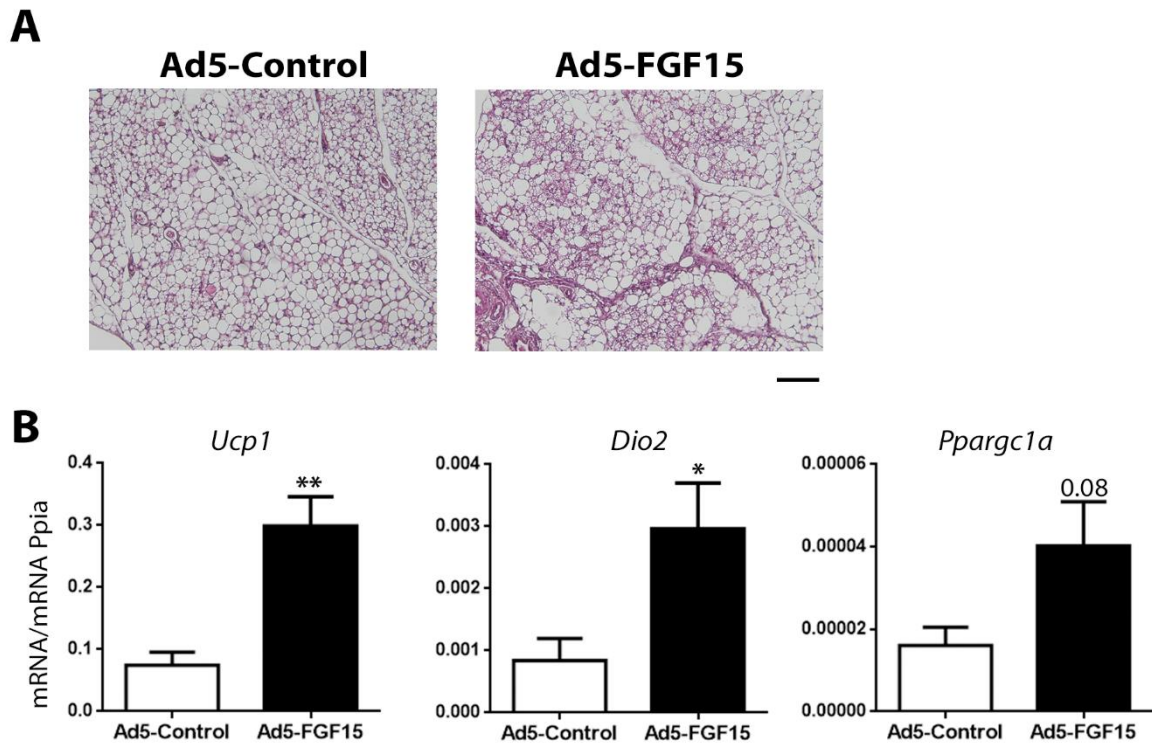


**Figura 34. La sobreexpresión sistémica de FGF15 no provoca cambios en el TAM.** Caracterización del TAM de ratones WT inyectados con un Ad5-Control o Ad5-FGF15, con una sobreexpresión de 1 semana. **A.** Secciones histológicas representativas de TAM de ratones Ad5-Control o Ad5-FGF15 teñidas con hematoxilina y eosina (H&E). 10x aumentos, escala 100  $\mu$ m. **B.** Niveles de expresión del RNAm de diferentes marcadores termogénicos (*Ucp1*, *Dio2* y *Ppargc1a*). **C.** Inmunoblot representativo de los niveles de la proteína UCP1 en TAM y cuantificación relativa de UCP1. Los resultados se expresan como media  $\pm$  SEM (n = 5). Análisis estadístico realizado con t-student.

A diferencia de los resultados mostrados en el TAM, en el TABi de estos animales el aumento de los niveles sistémicos de FGF15 provocó un marcado aumento del *browning*



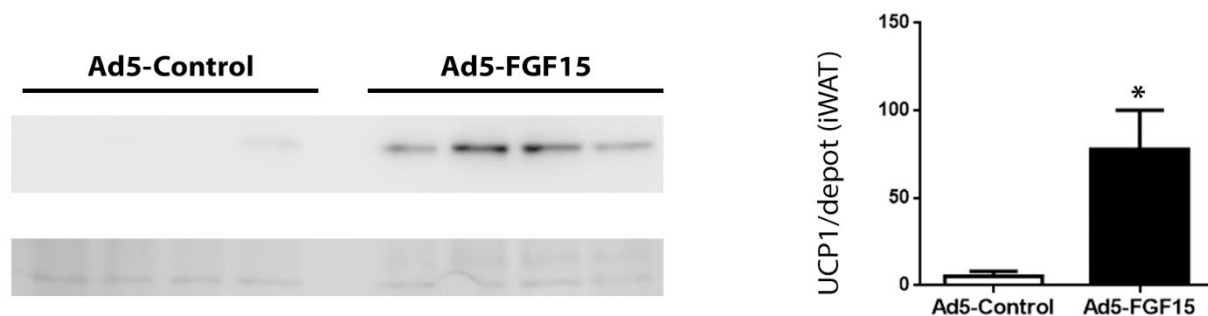
del TABi. A nivel histológico se puede observar un aumento del número de adipocitos multiloculares (Figura 35A) y un aumento de la expresión de genes marcadores de fenotipo beige relacionados con la termogénesis, como *Ucp1*, *Dio2* y *Ppargc1a* (Figura 35B).



**Figura 35. La sobreexpresión sistémica de Fgf15 provoca un aumento del *browning* en TABi.** Caracterización del TABi de ratones WT inyectados con un Ad5-Control o Ad5-FGF15, con una sobreexpresión de 1 semana. **A.** Secciones histológicas representativas de TABi de ratones Ad5-Control o Ad5-FGF15 teñidas con hematoxilina y eosina (H&E). 10x aumentos, escala 100  $\mu$ m. **B.** Niveles de expresión del RNAm de diferentes marcadores termogénicos (*Ucp1*, *Dio2* y *Ppargc1a*). Los resultados se expresan como media  $\pm$  SEM (n = 5). Análisis estadístico realizado con t-student (\* p<0,05; \*\* p <0,01).

Además, se pudo observar una fuerte inducción de los niveles proteicos de UCP1 en TABi de animales inyectados con el adenovirus que provocaba la sobreexpresión de FGF15, confirmando así el aumento de *browning* en estos ratones (Figura 36).





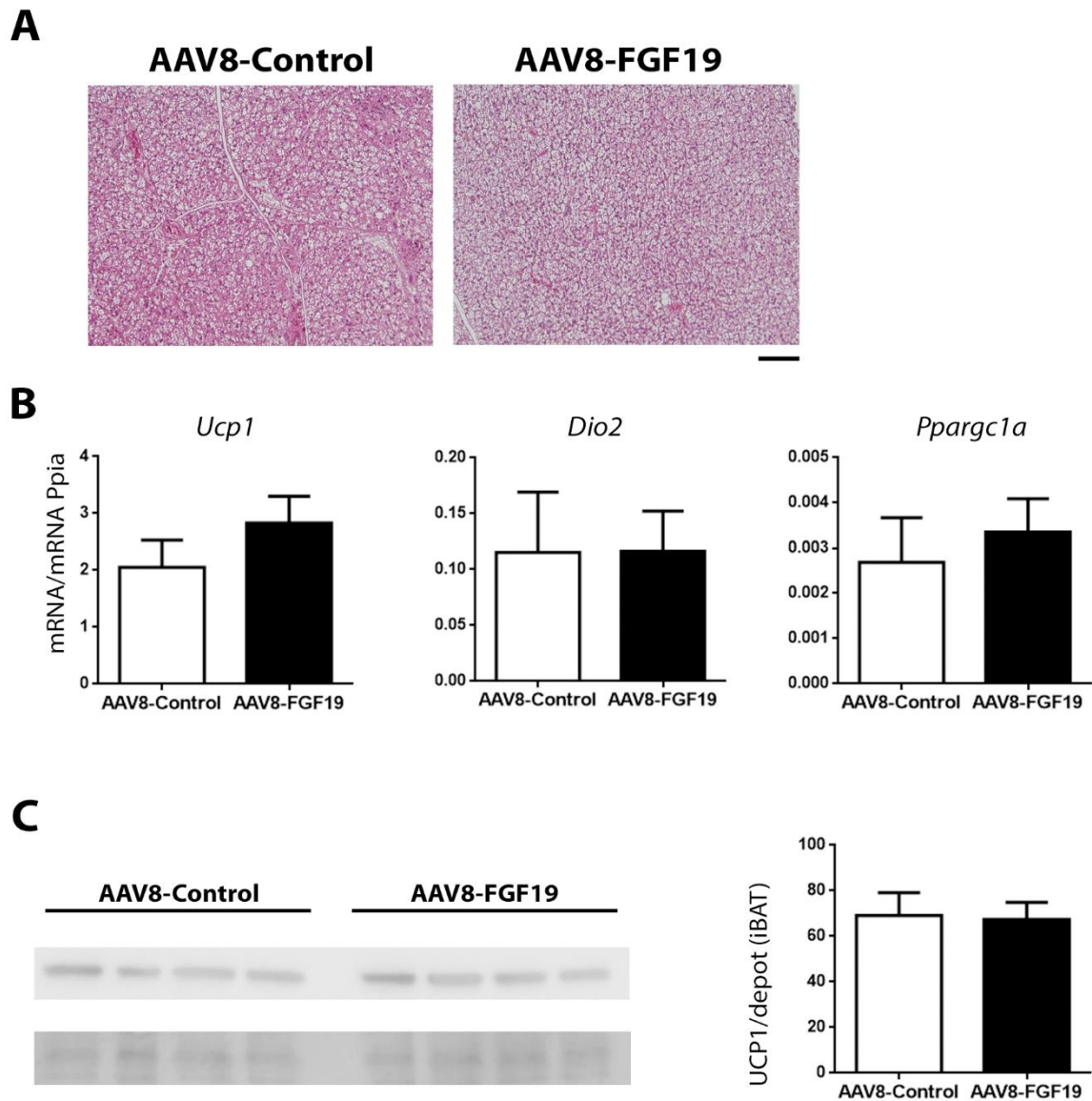
**Figura 36. La sobreexpresión de FGF15 provoca un aumento de los niveles de UCP1 en TABi.** Inmunoblot representativo de los niveles de la proteína UCP1 en TABi y cuantificación relativa de UCP1. Los resultados se expresan como media  $\pm$  SEM (n = 5). Análisis estadístico realizado con t-student (\*  $p < 0,05$ )

Teniendo en cuenta que existen ciertas diferencias funcionales entre los ortólogos FGF15 (ratones) y FGF19 (humanos), analizamos los efectos de la sobreexpresión de FGF19 utilizando un enfoque similar a la sobreexpresión de FGF15 mediante infección adenovírica: sobreexpresión de *FGF19* mediada por un virus adenoasociado de serotipo 8 (AAV8), con tropismo preferencial por el hígado, y su posterior secreción sistémica. Así, se infectaron ratones WT mediante inyección retroorbital con AAV8 vacíos (AAV8-Control) o portadores de *FGF19* (AAV8-FGF19) y se permitió la sobreexpresión de la proteína durante tres semanas. A diferencia de FGF15, las herramientas existentes de inmunodetección sí nos permitieron determinar los niveles de FGF19 circulantes resultantes del tratamiento, y se determinó que la inyección condujo a  $170,63 \pm$  pg/mL FGF19 en plasma de ratón (en comparación con  $296,53 \pm 35,87$  pg/mL en plasma de humanos normopeso). En este caso, se observó cómo la sobreexpresión de FGF19 reduce el tamaño de los depósitos de TAMi y TABi, a pesar de que no se observaron diferencias importantes en el peso corporal de ambos grupos experimentales. La glucemia y la trigliceridemia tampoco se vieron alteradas, mientras que los niveles de insulina disminuyeron en ratones infectados con AAV8-FGF19. Tal como se vio anteriormente en el caso del Ad5-FGF15, la expresión del gen hepático *Cyp7a1* fue claramente reprimida en ratones inyectados con AAV8-FGF19, demostrando así que la acción biológica esperada de FGF15 puede compararse a este nivel mediante la sobreexpresión de su ortólogo FGF19. Por otra parte, tanto la expresión hepática como los niveles circulantes de FGF21 no se vieron alterados (Tabla 18).

**Tabla 18. Caracterización de animales WT con una inyección retroorbital con la contrucción AAV8-Control o AAV8-FGF19, provocando la sobreexpresión de FGF19 en hígado durante tres semanas. Los ratones se estabularon con dieta y condiciones estándar. En la tabla se muestran datos concernientes a los pesos de los animales (tanto peso corporal como el peso de los diferentes tejidos), parámetros metabólicos y la expresión génica en hígado de diferentes genes (expresión relativa y multiplicada por 1000). Todas las medidas se expresan como media  $\pm$  SEM (n = 6 por grupo). Análisis estadístico realizado con t-student (\* p<0,05; \*\* p <0,01; \*\*\* p <0,001).**

	<b>AAV8-Control</b>	<b>AAV8-FGF19</b>
<b>Peso corporal (g)</b>	27,9 $\pm$ 0,8	26,8 $\pm$ 0,5
<b>TAM interscapular (mg)</b>	93,3 $\pm$ 10,3	66,7 $\pm$ 4,1 *
<b>TABi (mg)</b>	290,1 $\pm$ 16,6	229,5 $\pm$ 5,9 **
<b>TABe (mg)</b>	300,5 $\pm$ 24,8	180,8 $\pm$ 9,3 ***
<b>Hígado (mg)</b>	1354,4 $\pm$ 80,5	1288,8 $\pm$ 53,5
<b>Glucose (mg/dL)</b>	168,6 $\pm$ 7,7	159,6 $\pm$ 8,6
<b>Insulina (pg/mL)</b>	1390,7 $\pm$ 437,0	563,0 $\pm$ 57,5
<b>Triglicéridos (mg/dL)</b>	127,7 $\pm$ 20,7	113,0 $\pm$ 11,4
<b>FGF21 (pg/mL)</b>	46,7 $\pm$ 35,3	65,6 $\pm$ 30,0
<b>FGF19 Hepático</b>	0,015 $\pm$ 0,002	5,600 $\pm$ 0,180 ***
<b>Cyp7a1 Hepático</b>	25,00 $\pm$ 1,20	0,79 $\pm$ 0,16 ***
<b>Fgf21 Hepático</b>	1,20 $\pm$ 0,29	1,50 $\pm$ 0,27

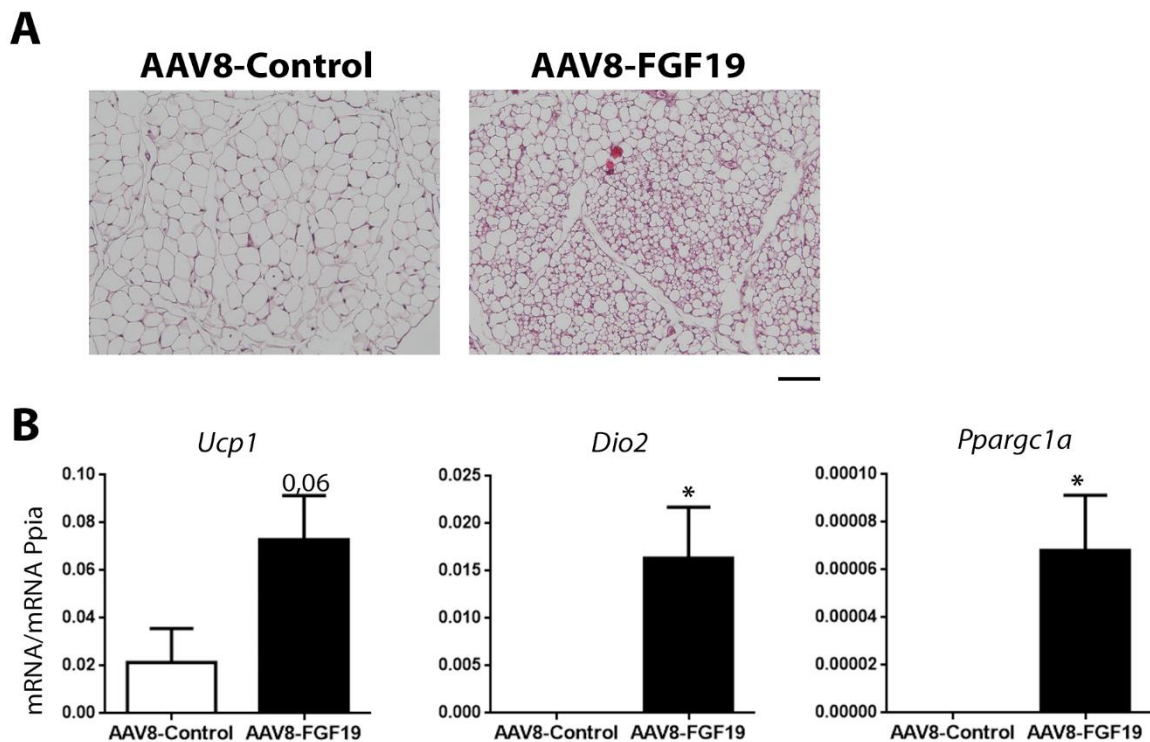
La inyección de los animales con el AAV8-FGF19 no implicó cambios significativos en el TAM, ni a nivel histológico, ni en el perfil de expresión génica de marcadores de termogénesis (*Ucp1*, *Dio2*, *Ppargc1c*), ni a niveles proteicos de UCP1 (Figura 37).



**Figura 37. La sobreexpresión sistémica de FGF19 no provoca cambios en el TAM.** Caracterización del TAM de ratones WT inyectados con un AAV8-Control o AAV8-FGF19, con una sobreexpresión de 3 semanas. **A.** Secciones histológicas representativas de TAM de ratones AAV8-Control o AAV8-FGF19 teñidas con hematoxilina y eosina (H&E). 10x aumentos, escala 100  $\mu$ m. **B.** Niveles de expresión del RNAm de diferentes marcadores termogénicos (*Ucp1*, *Dio2* y *Ppargc1a*). **C.** Inmunoblot representativo de los niveles de la proteína UCP1 en TAM y cuantificación relativa de UCP1. Los resultados se expresan como media  $\pm$  SEM (n = 6). Análisis estadístico realizado con t-student.

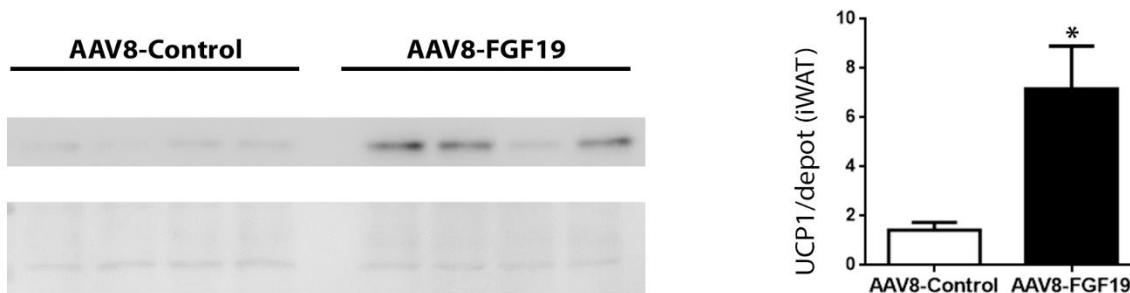
Por el contrario, tal como ya se vio anteriormente con el uso del Ad5-FGF15, el TABi experimentó una potente respuesta a la sobreexpresión de FGF19, con una masiva

aparición de adipocitos multiloculares de tipo beige (Figura 38A), y con una sólida inducción de la expresión de *Ucp1*, *Dio2* y *Ppargc-1a* (Figura 38B).



**Figura 38. La sobreexpresión sistémica de FGF19 provoca un aumento del *browning* en TABi.** Caracterización del TABi de ratones WT inyectados con un AAV8-Control o AAV8-FGF19, con una sobreexpresión de 3 semanas. **A.** Secciones histológicas representativas de TABi de ratones AAV8-Control o AAV8-FGF19 teñidas con hematoxilina y eosina (H&E). 10x aumentos, escala 100  $\mu$ m. **B.** Niveles de expresión del RNAm de diferentes marcadores termogénicos (*Ucp1*, *Dio2* y *Ppargc1a*). Los resultados se expresan como media  $\pm$  SEM (n = 6). Análisis estadístico realizado con t-student (\* p<0,05).

Asimismo, los niveles proteicos de UCP1 también se vieron inducidos de manera significativa por la sobreexpresión de FGF19 en TABi, resultado que confirma el aumento del *browning* en este tejido (Figura 39). Por lo tanto, el efecto observado mediante la sobreexpresión de FGF19 es similar al obtenido con la sobreexpresión de FGF15.



**Figura 39. La sobreexpresión de FGF19 provoca un aumento de los niveles de UCP1 en TABi.** Inmunoblot representativo de los niveles de la proteína UCP1 en TABi y cuantificación relativa de UCP1. Los resultados se expresan como media  $\pm$  SEM (n = 6). Análisis estadístico realizado con t-student (\* p<0,05).

### 5. Efectos de FGF15/19 sobre la respuesta de los tejidos adiposos a activadores adrenérgicos.

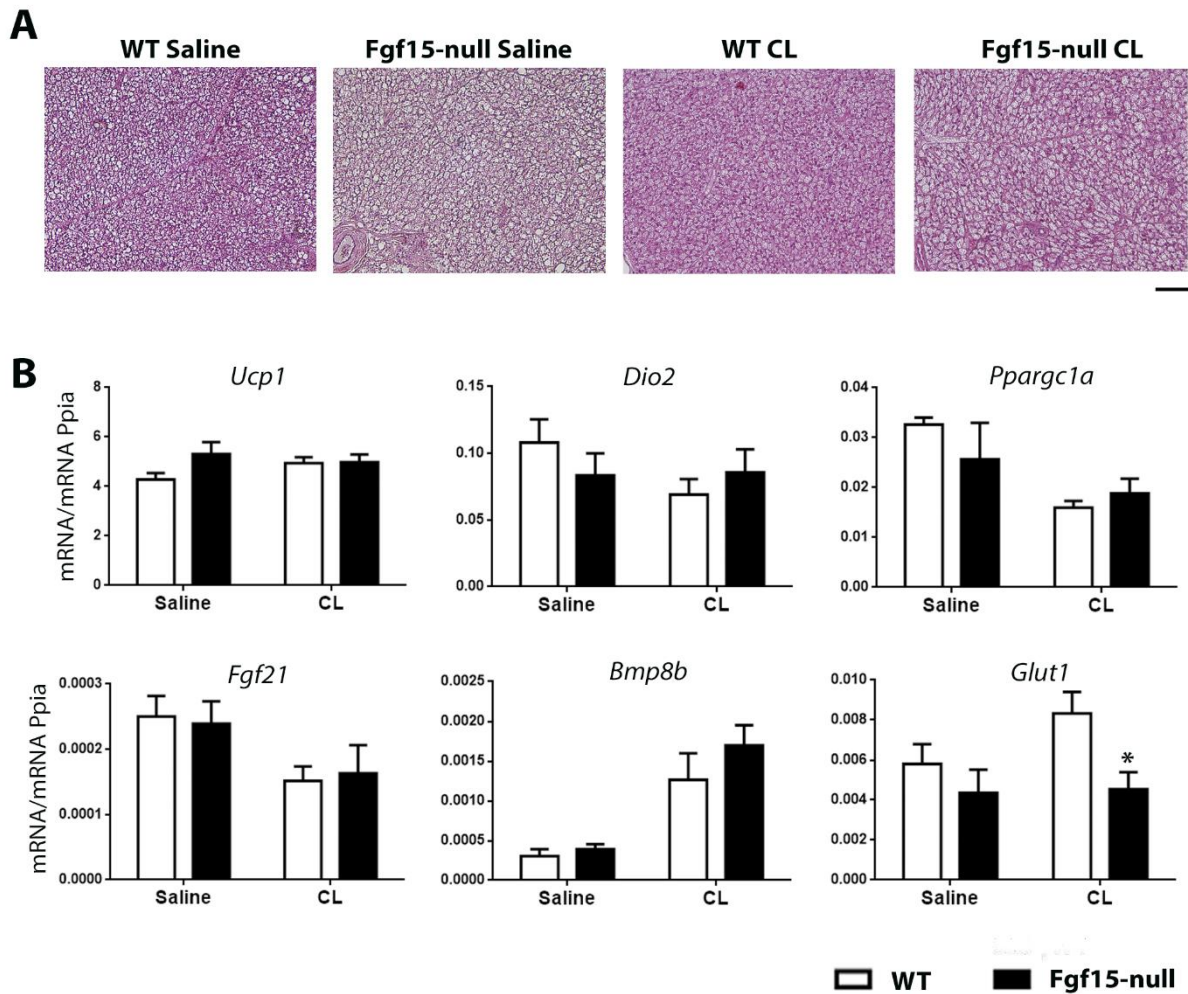
Tras la observación de la existencia de alteraciones en la plasticidad adaptativa del tejido adiposo en ratones que carecen de FGF15 y los efectos positivos de FGF15/19 en la inducción del *browning* del TAB, nos planteamos estudiar si dichas alteraciones son intrínsecas a la sensibilidad de los depósitos adiposos a FGF15 frente al desafío termogénico. Con el fin de caracterizar la capacidad de respuesta a estímulos adrenérgicos de los tejidos adiposos independientemente de la actividad del sistema nervioso simpático (clave en la respuesta al frío), ratones WT y Fgf15-null fueron tratados crónicamente durante 14 días con CL316,243 (CL), un agonista específico  $\beta$ 3-adrenérgico, mediante inyecciones intraperitoneales.

El tratamiento con CL no comportó cambios en el peso corporal o en la masa de los depósitos adiposos e hígado. Los niveles de glucosa en sangre no mostraron alteraciones (Tabla 19).

**Tabla 19. Caracterización de animales WT y Fgf15-null tratados durante 14 días con CL mediante inyecciones intraperitoneales o con salino.** Los ratones se estabularon con dieta y condiciones estándar. En la tabla se muestran los datos concernientes a los pesos de los animales (tanto peso corporal como el peso de los diferentes tejidos), parámetros metabólicos y la expresión génica en hígado de diferentes genes (expresión relativa y multiplicada por 1000). Todas las medidas se expresan como media  $\pm$  SEM (n = 7 por grupo). Análisis estadístico realizado con t-student entre grupos, \* señalando diferencias entre genotipos y # señalando diferencias entre tratamientos (\* p<0,05; \*\* p <0,01; # p<0,05; ## p <0,01).

	WT		Fgf15-null	
	Salino	CL	Salino	CL
<b>Peso corporal (g)</b>	30,6 $\pm$ 1,0	30,8 $\pm$ 0,9	29,7 $\pm$ 0,9	30,7 $\pm$ 0,7
<b>TAM interescapular (mg)</b>	86,6 $\pm$ 4,4	97,5 $\pm$ 4,6	94,1 $\pm$ 6,0	87,3 $\pm$ 3,8
<b>TABi (mg)</b>	272,1 $\pm$ 15,1	239,0 $\pm$ 18,1	202,5 $\pm$ 3,9 **	262,0 $\pm$ 35,4
<b>TABe (mg)</b>	402,4 $\pm$ 33,9	308,3 $\pm$ 32,3 (#p=0,07)	299,9 $\pm$ 37,6 (*p =0,07)	335,1 $\pm$ 53,2
<b>Hígado (mg)</b>	1406,5 $\pm$ 68,9	1493,7 $\pm$ 63,2	1531,2 $\pm$ 78,3	1606,5 $\pm$ 60,7
<b>Glucosa (mg/dL)</b>	159,5 $\pm$ 9,2	163,1 $\pm$ 6,5	157,3 $\pm$ 10,3	149,5 $\pm$ 6,0
<b>Insulina (pg/mL)</b>	1086,7 $\pm$ 139,2	819,1 $\pm$ 89,2	958,8 $\pm$ 135,6	103,6 $\pm$ 6,8
<b>GTT (Área bajo de la curva)</b>	1764,6 $\pm$ 115,2	1383,9 $\pm$ 73,7 #	1573,6 $\pm$ 104,3	1362,9 $\pm$ 112,7
<b>ITT (Área bajo de la curva)</b>	246,8 $\pm$ 14,1	225,3 $\pm$ 16,0	227,3 $\pm$ 10,5	204,5 $\pm$ 5,7 (#p=0,07)
<b>Triglicéridos (mg/dL)</b>	168,7 $\pm$ 14,3	120,3 $\pm$ 8,8 #	167,5 $\pm$ 17,3	103,6 $\pm$ 6,8 ##
<b>FGF21 (pg/mL)</b>	70,2 $\pm$ 12,5	13,7 $\pm$ 7,1###	128,9 $\pm$ 26,6 (*p=0,06)	171,9 $\pm$ 38,4 ***
<b>Cyp7a1 Hepático</b>	42,27 $\pm$ 9,57	39,53 $\pm$ 3,24	136,72 $\pm$ 27,56 **	261,49 $\pm$ 44,13 #****
<b>Fgf21 Hepático</b>	1,19 $\pm$ 0,18	0,50 $\pm$ 0,09 ##	1,81 $\pm$ 0,47	2,15 $\pm$ 0,58 *

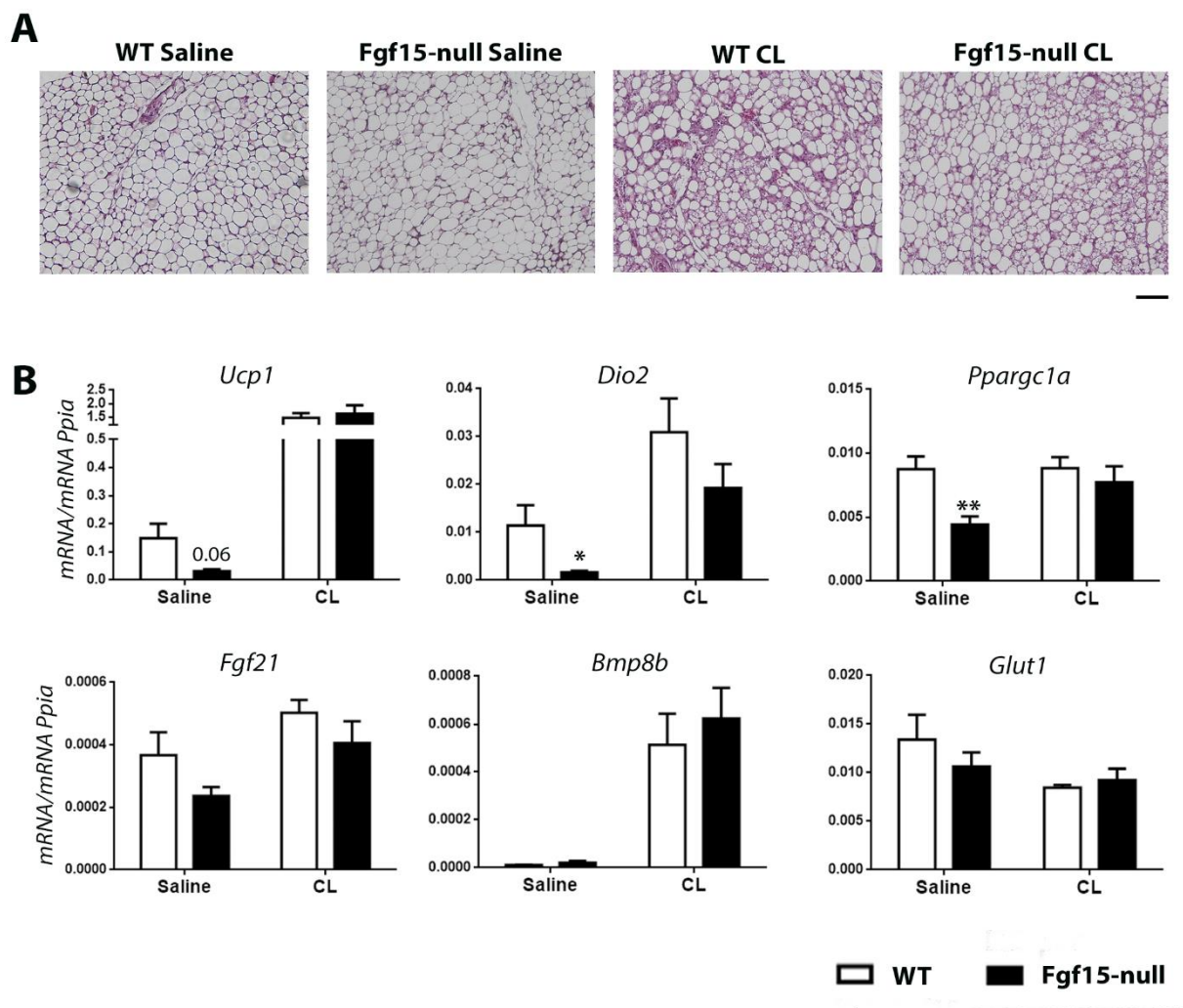
La morfología histológica del TAM no se vio alterada ni por el tratamiento con CL ni por la falta de FGF15 (Figura 40A). La expresión génica de los marcadores de termogénesis tampoco sufrió cambios significativos (Figura 40B). La expresión de *Bmp8b*, que se mostró fuertemente regulada en respuesta a CL en TAM, no mostró modificaciones en su aumento entre ratones WT y Fgf15-null.



**Figura 40. El tratamiento crónico con CL (agonista del receptor adrenérgico  $\beta$ 3) no provoca cambios en el TAM entre ratones WT y Fgf15-null.** Caracterización del TAM de ratones WT y Fgf15-null tratados durante 14 días con salino o CL. **A.** Secciones histológicas representativas de TAM de ratones WT y Fgf15-null con salino o CL teñidas con hematoxilina y eosina (H&E). 10x aumentos, escala 100  $\mu$ m. **B.** Niveles de expresión de diferentes marcadores termogénicos (*Ucp1*, *Dio2*, *Pparg1a*, *Fgf21*, *Bmp8b* y *Glut1*). Los resultados se expresan como media  $\pm$  SEM (n = 7). Análisis estadístico realizado con t-student entre genotipos a igual condición ambiental (\* p<0,05).

El TABi de ratones tratados con CL mostró un marcado *browning*. A pesar de ello, la abundancia de adipocitos multiloculares beige no resultó diferente en ratones Fgf15-null tratados con CL en relación con los ratones WT tratados también con CL (Figura 41A). Esto fue confirmado por el perfil de expresión génica: la dramática inducción de *Ucp1*, *Dio2* y *Bmp8b* como consecuencia del tratamiento con CL se produjo en un grado similar en ratones de ambos genotipos (Figura 41B).





**Figura 41. El tratamiento crónico con CL (agonista del receptor adrenérgico  $\beta 3$ ) no provoca cambios en el TABi entre ratones WT y Fgf15-null.** Caracterización del TABi de ratones WT y Fgf15-null tratados durante 14 días con salino o CL. **A.** Secciones histológicas representativas de TABi de ratones WT y Fgf15-null con salino o CL teñidas con hematoxilina y eosina (H&E). 10x aumentos, escala 100  $\mu$ m. **B.** Niveles de expresión de diferentes marcadores termogénicos (*Ucp1*, *Dio2*, *Ppargc1a*, *Fgf21*, *Bmp8b* y *Glut1*). Los resultados se expresan como media  $\pm$  SEM (n = 7). Análisis estadístico realizado con t-student entre genotipos a igual condición ambiental (\* p<0,05; \*\* p <0,01).

A la luz de los resultados producidos por el agonista específico  $\beta 3$ -adrenérgico CL316,243, se realizó una aproximación experimental complementaria. Ratones WT y Fgf15-null fueron tratados con salino o con isoproterenol (agonista de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos) durante 7 días mediante la implantación de una bomba osmótica (minipump) en la zona interescapular. Dado los resultados anteriores en diferentes



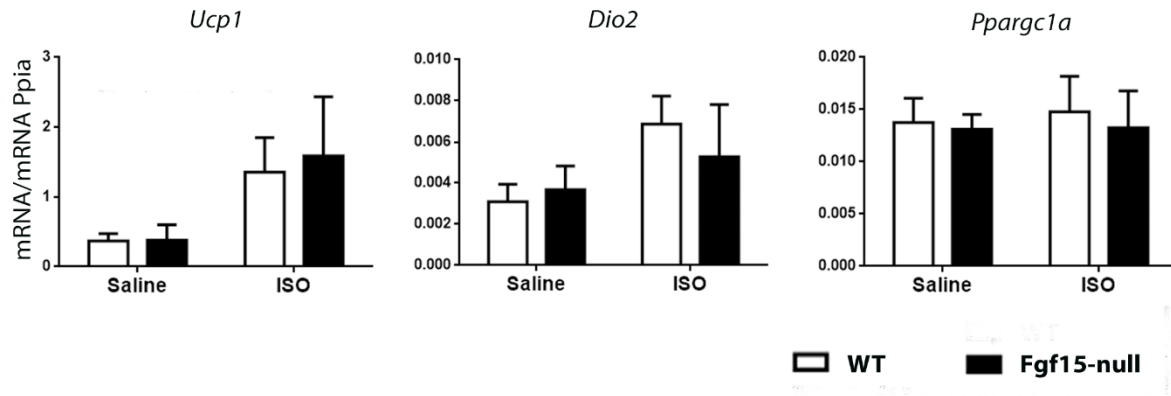
tejidos adiposos, se procedió a examinar el TABi como el tejido adiposo más sensible a la ausencia de FGF15.

El tratamiento con ISO provocó una disminución tanto del peso corporal como de los diferentes depósitos de tejido adiposo en ambos genotipos, acompañado de un descenso de los triglicéridos en sangre. Por otro lado, los niveles de FGF21 sistémicos fueron significativamente más altos en ratones *Fgf15*-null (con una  $p = 0,0002$  con Two way ANOVA) (Tabla 20).

**Tabla 20. Caracterización de animales WT y *Fgf15*-null tratados durante 7 días con salino o ISO.** En la tabla se muestran los datos concernientes a los pesos de los animales y parámetros metabólicos. Todas las medidas se expresan como media  $\pm$  SEM ( $n = 6$ ). Análisis estadísticos realizados con t-student. # muestra diferencias entre tratamiento y \* diferencias entre genotipo (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; #  $p < 0,05$ ; ##  $p < 0,01$ ).

	WT		Fgf15-null	
	Salino	ISO	Salino	ISO
<b>Peso corporal (g)</b>	39,2 $\pm$ 1,4	34,9 $\pm$ 1,0#	42,2 $\pm$ 1,3	35,8 $\pm$ 1,7#
<b>TAM interescapular (mg)</b>	165,5 $\pm$ 18,2	121,2 $\pm$ 6,6#	199,1 $\pm$ 9,1	103,9 $\pm$ 17,1 ##
<b>TABi (mg)</b>	857,6 $\pm$ 150,2	471,2 $\pm$ 86,6#	1017,8 $\pm$ 78,1	747,5 $\pm$ 160,9
<b>TABe (mg)</b>	1431,6 $\pm$ 251,6	781,4 $\pm$ 92,4#	1629,5 $\pm$ 172,7	945,0 $\pm$ 253,4 (# $p=0,07$ )
<b>Hígado (mg)</b>	1725,4 $\pm$ 74,3	1553,7 $\pm$ 39,0 (# $p=0,07$ )	2131,1 $\pm$ 151,4*	1628,2 $\pm$ 138,0#
<b>Glucosa (mg/dL)</b>	147,7 $\pm$ 6,3	132,0 $\pm$ 6,9	165,2 $\pm$ 16,5	110,2 $\pm$ 9,7# (* $p=0,1$ )
<b>Triglicéridos (mg/dL)</b>	247,3 $\pm$ 15,6	147,5 $\pm$ 26,1##	199,7 $\pm$ 15,7 (* $p=0,07$ )	103,5 $\pm$ 12,2##
<b>FGF21 (pg/mL)</b>	374,7 $\pm$ 74,7	246,9 $\pm$ 99,8	826,82 $\pm$ 100,8**	555,4 $\pm$ 138,3 (* $p = 0,1$ )

Los ratones tratados con ISO mostraban un aumento de la expresión de genes relacionados con la termogénesis (*Ucp1* y *Dio2*). Sin embargo, la falta de *Fgf15* no se asoció a diferencias de expresión en estos genes, tal como ya se había determinado en el tratamiento con CL (Figura 42).



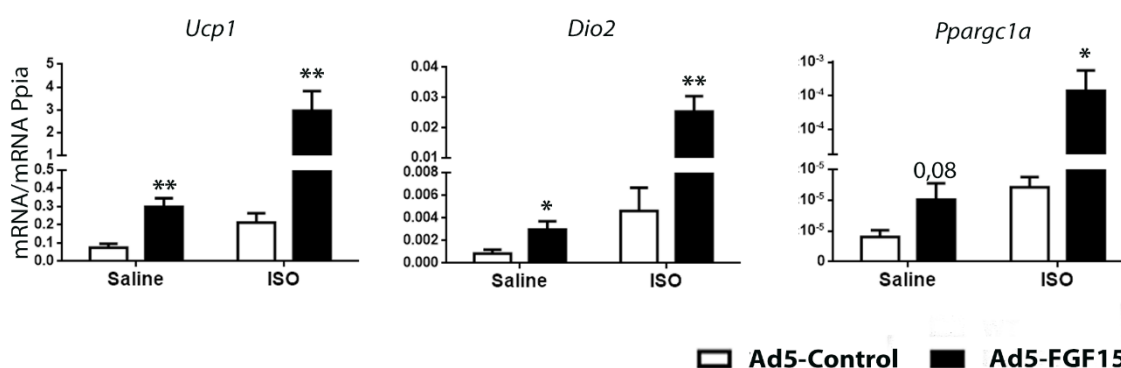
**Figura 42. El tratamiento con ISO (agonista de los receptores adrenérgico  $\beta$ ) no provoca cambios en el TABi entre ratones WT y Fgf15-null.** Caracterización del TABi de ratones WT y Fgf15-null tratados durante 7 días con salino o ISO. Niveles de expresión de diferentes marcadores termogénicos (*Ucp1*, *Dio2*, *Pparg1a*). Los resultados se expresan como media  $\pm$  SEM (n = 6). Análisis estadístico realizado con t-student entre genotipos.

Teniendo en cuenta las herramientas disponibles, se planteó un modelo de ganancia de función a fin de determinar si la acción de FGF15/19 sobre el TABi se produce de forma directa o indirecta. Ratones WT C57BL/6J fueron inyectados con el adenovirus Ad5-Control o Ad5-FGF15, permitiendo la sobreexpresión de FGF15 durante una semana. Al mismo tiempo, se implantaron bombas osmóticas para el tratamiento de los ratones con Salino o ISO (Tabla 21).

**Tabla 21. Caracterización de animales Ad5-Control y Ad5-FGF15 tratados durante 7 días con salino o ISO.** En la tabla se muestran los datos concernientes a los pesos de los animales y parámetros metabólicos. Todas las medidas se expresan como media  $\pm$  SEM (n = 5). Análisis estadísticos realizados con t-student. # muestra diferencias entre tratamiento y \* diferencias entre adenovirus (\* p<0,05; \*\* p <0,01; # p<0,05; ## p <0,01).

	Ad5-Control		Ad5-Fgf15	
	Salino	ISO	Salino	ISO
Peso corporal (g)	22,3 ± 0,1	23,9 ± 1,0	22,1 ± 0,7	21,0 ± 0,2 *
TAM interescapular (mg)	50,8 ± 3,7	63,8 ± 1,7#	54,6 ± 3,5	58,9 ± 3,2
TABi (mg)	102,9 ± 6,7	110,6 ± 11,2	113,4 ± 13,5	61,0 ± 8,9**#
TABe (mg)	116,0 ± 5,0	81,1 ± 12,0	116,0 ± 16,3	49,3 ± 7,8 # (*p=0,06)
Hígado (mg)	2173,2 ± 61,3	2089,1 ± 190,5	1707,0 ± 143,7 *	1444,9 ± 62,8 *
Glucosa (mg/dL)	106,6 ± 12,0	89,3 ± 12,8	103,3 ± 5,0	109,0 ± 17,0
Triglicéridos (mg/dL)	92,5 ± 5,4	83,2 ± 7,9	85,9 ± 4,7	69,7 ± 3,5#
FGF21 (pg/mL)	2883,2 ± 426,2	2147,9 ± 367,6#	1653,3 ± 206,2	670,3 ± 153,0**##

Al realizar el análisis de la expresión génica de los genes relacionados con la termogénesis vimos cómo, en el caso de *Ucp1*, *Dio2* y *Ppargc1a*, el tratamiento con ISO aumentaba sus niveles de expresión. Ahora bien, el tratamiento con ISO en animales con sobreexpresión de FGF15 (Ad5-FGF15) mostraban un efecto sinérgico: la expresión de estos genes aumentaba a un mayor nivel en estos animales que en los Ad5-Control (Figura 43).



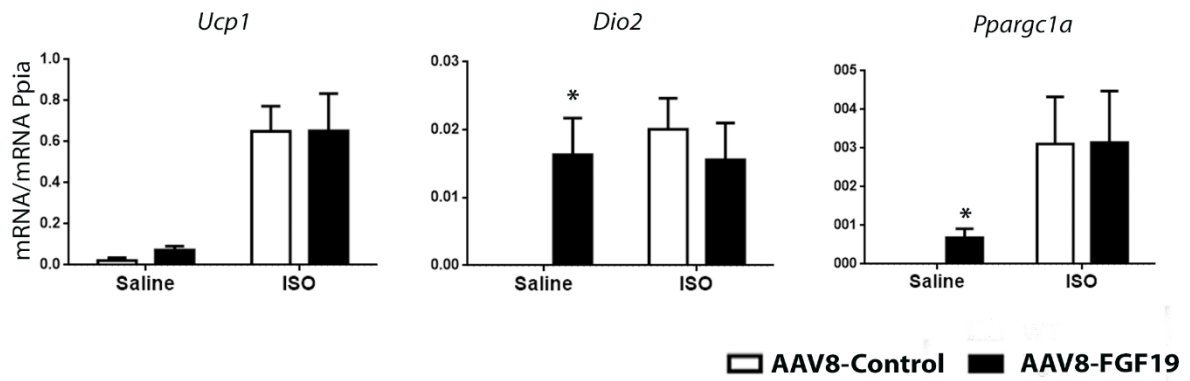
**Figura 43. La sobreexpresión de FGF15 magnifica el aumento de la expresión de genes termogénicos por el tratamiento con ISO.** Caracterización del TABi de ratones Ad5-Control y Ad5-FGF15 tratados durante 7 días con salino o ISO. Niveles de expresión de diferentes marcadores termogénicos (*Ucp1*, *Dio2*, *Ppargc1a*). Los resultados se expresan como media ± SEM (n = 5). Análisis estadístico realizado con t-student entre genotipos (\* p < 0,05; \*\* p < 0,01).

Por último, se realizó la misma aproximación pero en este caso inyectando a los animales WT C57BL/6J con AAV8-Control o AAV8-FGF19 y manteniendo la sobreexpresión durante tres semanas. Las bombas osmóticas fueron implantadas la última semana, así que el tratamiento con salino o ISO se prolongó durante 7 días (Tabla 22).

**Tabla 22. Caracterización de animales AAV8-Control y AAV8-FGF19 tratados durante 7 días con salino o ISO.** En la tabla se muestran los datos concernientes a los pesos de los animales y parámetros metabólicos. Todas las medidas se expresan como media  $\pm$  SEM (n = 6). Análisis estadísticos realizados con t-student. # muestra diferencias entre tratamiento y \* diferencias entre virus adeno-asociado (\* p<0,05; \*\* p <0,01; \*\*\* p <0,001; # p<0,05; ## p <0,01; ### p <0,001).

	AAV8-Control		AAV8-FGF19	
	Saline	ISO	Saline	ISO
<b>Peso corporal (g)</b>	27,9 $\pm$ 0,8	27,9 $\pm$ 0,5	26,8 $\pm$ 0,5	26,7 $\pm$ 0,5
<b>TAM interescapular (mg)</b>	93,3 $\pm$ 10,3	74,4 $\pm$ 1,5	66,7 $\pm$ 4,1*	79,7 $\pm$ 6,1
<b>TABi (mg)</b>	290,1 $\pm$ 16,6	168,32 $\pm$ 10,8###	229,5 $\pm$ 5,9**	211,4 $\pm$ 8,8*
<b>TABe (mg)</b>	300,5 $\pm$ 24,8	130,2 $\pm$ 13,6###	180,8 $\pm$ 9,3***	148,9 $\pm$ 8,1#
<b>Hígado (mg)</b>	1354,4 $\pm$ 80,5	1490,6 $\pm$ 39,2	1288,8 $\pm$ 53,5	1342,4 $\pm$ 37,9
<b>Glucosa (mg/dL)</b>	168,6 $\pm$ 7,7	153,1 $\pm$ 11,5	159,6 $\pm$ 8,6	147,2 $\pm$ 10,2
<b>Triglicéridos (mg/dL)</b>	127,7 $\pm$ 20,7	73,6 $\pm$ 2,1	113,0 $\pm$ 11,4	93,7 $\pm$ 7,4
<b>FGF21 (pg/mL)</b>	46,6 $\pm$ 35,3	82,9 $\pm$ 54,3	65,6 $\pm$ 30,0	25,4 $\pm$ 10,7

En este caso, a diferencia de lo visto anteriormente con la sobreexpresión de FGF15, la sobreexpresión de FGF19 no causó el mismo efecto sinérgico: el aumento de la expresión de los genes *Ucp1*, *Dio2* y *Ppargc1a* fue similar en ratones tratados con ISO independientemente si eran AAV8-Control o AAV8-FGF19 (Figura 44).



**Figura 44. La sobreexpresión de FGF19 no provoca cambios en la expresión de genes termogénicos por el tratamiento con ISO.** Caracterización del TABi de ratones AAV8-Control y AAV8-FGF19 tratados durante 7 días con salino o ISO. Niveles de expresión de diferentes marcadores termogénicos (*Ucp1*, *Dio2*, *Pparg1a*). Los resultados se expresan como media  $\pm$  SEM (n = 6). Análisis estadístico realizado con t-student entre genotipos (\* p < 0,05).

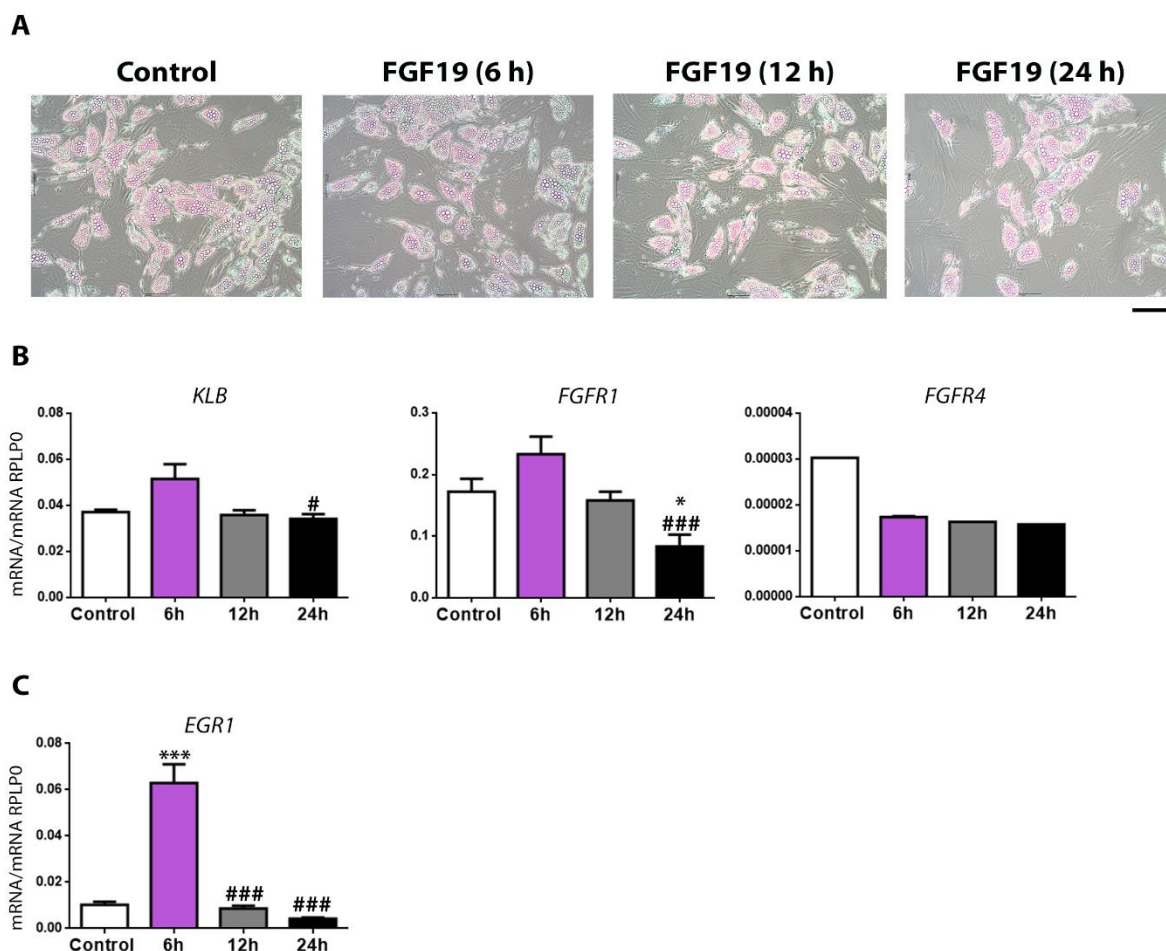
En general, no hemos observado grandes cambios en los tejidos adiposos debidos a las manipulaciones en FGF15 frente a los estímulos farmacológicos de tipo adrenérgico utilizados como inductores de adaptaciones termogénicas. Ello contrasta con los efectos diferenciales observados frente al frío en los ratones *Fgf15*-null o los efectos observados al aumentar sistémicamente los niveles de FGF15/FGF19. Este hecho podría significar que los efectos debidos a cambios en los niveles de FGF15/19 sobre el tejido adiposo podrían ser indirectos, es decir, podrían estar mediados por acciones a nivel central de FGF15/FGF19 o bien podrían implicar efectos de FGF15/FGF19 sobre los mecanismos de regulación del *browning* inducidos por frío pero distintos a la activación simpática (Villarroya & Vidal-Puig, 2013).

## 6. FGF19 no induce *browning* en adipocitos humanos *in vitro*.

Experimentalmente, la evaluación de un posible efecto directo de FGF15 sobre los adipocitos se encuentra obstaculizada por la falta de FGF15 recombinante comercial para ser utilizado en cultivos de adipocitos murinos. A fin de evitar la utilización de un sistema heterólogo, y para determinar la capacidad del sistema FGF15/19 para actuar sobre los adipocitos, se estudió el efecto de FGF19 humano recombinante en células

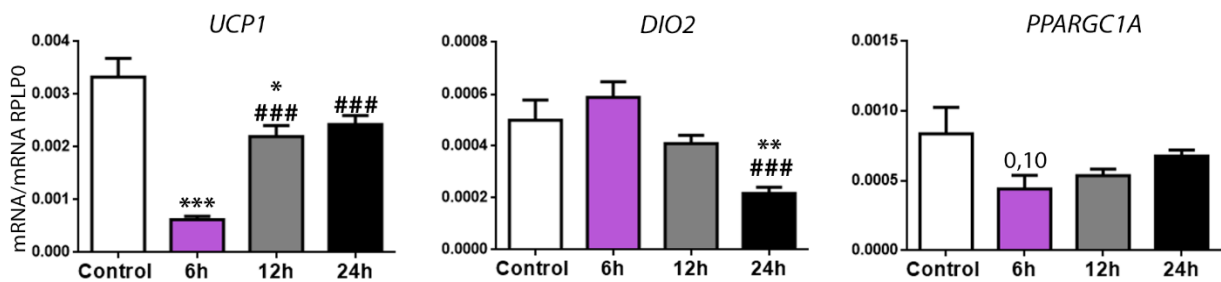
SGBS, línea celular de adipocitos humanos sensibles al desarrollo de *browning* (Yeo et al., 2017).

El tratamiento con FGF19 no alteró la morfología de las gotas lipídicas en las células (Figura 45A). Los adipocitos SGBS diferenciados mostraron niveles de expresión de los genes *KLB*, *FGFR1* y *FGFR4*, maquinaria de potencial respuesta a la acción de FGF19, incluso mayores que los presentes en tejido adiposo subcutáneo humano, a excepción de *FGFR4* que mostró un nivel de expresión muy bajo (Figura 45B). La capacidad de respuesta de los adipocitos SGBS a FGF19 se evaluó mediante la determinación de los niveles de mRNA de *EGR1*, gen de respuesta temprana a los FGFs endocrinos (Branney et al., 2009). Después de 6h de tratamiento con FGF19, hubo una inducción cercana a 6 veces en los niveles de RNAm de *EGR1*, confirmando la sensibilidad los adipocitos SGBS a la acción de FGF19 (Figura 45C).



**Figura 45. Las células SGBS responden al tratamiento con FGF19 sin comprometer por ello su morfología celular.** Las células fueron tratadas con FGF19 (50 ng/mL) durante diferentes tiempos (6h, 12h y 24h). **A.** Imágenes representativas de células SGBS a diferentes condiciones (x aumentos, escala 200  $\mu$ m). **B.** Niveles de expresión de diferentes genes relacionados con la maquinaria de FGF19 (*KLB*, *FGFR1* y *FGFR4*). **C.** Nivel de expresión de *EGR1*, gen de respuesta temprana a los FGFs endocrinos. Los resultados se expresan como media  $\pm$  SEM (n = 5). Análisis estadístico realizado con one-way ANOVA y Dunnet para ver diferencias entre condiciones. \*para representar diferencias entre los tratamientos y el control y # para representar diferencias respecto al grupo de 6 horas de tratamiento (\* p<0,05; \*\* p <0,01; \*\*\* p<0,001; # p<0,05; ## p <0,01; ### p<0,001).

Tras los experimentos *in vivo* mostrados anteriormente, la hipótesis de estudio era la existencia de un papel positivo de FGF19 sobre los genes relacionados con la termogénesis. Sin embargo, FGF19 no alteró la expresión de marcadores termogénicos. De hecho, el tratamiento con FGF19 no solo no indujo la expresión de *UCP1* o *DIO2*, sino todo lo contrario. FGF19 causó una reducción significativa en estos genes en algunos de los tiempos de exposición a FGF19 (Figura 46).



**Figura 46. El tratamiento de FGF19 en células SGBS no aumenta los niveles de expresión de genes termogénicos.** Las células fueron tratadas con FGF19 (50 ng/mL) durante diferentes tiempos (6h, 12h y 24h). Nivel de expresión de genes relacionados con la termogénesis (*UCP1*, *DIO2* y *PPARGC1A*). Los resultados se expresan como media  $\pm$  SEM (n = 5). Análisis estadístico realizado con one-way ANOVA y Dunnet para ver diferencias entre condiciones. \*para representar diferencias entre los tratamientos y el control y # para representar diferencias respecto al grupo de 6 horas de tratamiento (\* p<0,05; \*\* p <0,01; \*\*\* p<0,001; # p<0,05; ## p <0,01; ### p<0,001).

En resumen, las observaciones obtenidas de la acción de FGF19 *in vitro* refuerza los resultados obtenidos en los estudios con modelos animales: la presencia de FGF15/19 es un evento importante en el proceso adaptativo de *browning* en el tejido adiposo, aunque dicho papel probablemente no se base en una acción directa de FGF15/19 en el adipocito.



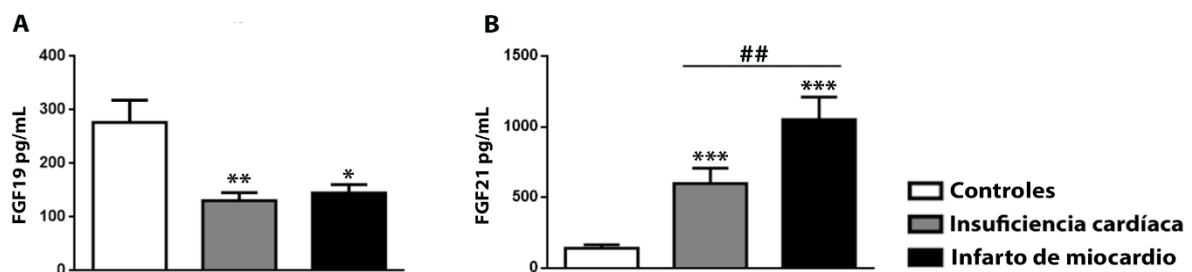


**Resultados:  
FGF15/19 y la plasticidad en  
corazón**



## 1. Los niveles de FGF19 se encuentran alterados en pacientes con patologías cardíacas.

Recientemente se ha estudiado el papel de FGF15/19 sobre el músculo esquelético, describiendo cómo promueve el crecimiento de las miofibras de dicho tejido (Benoit et al., 2017). De manera que, viendo los resultados publicados en músculo, decidimos estudiar el papel de FGF15/19 en el corazón. En colaboración con el Hospital Germans Trias i Pujol, se pudo disponer de los sueros de una cohorte de 46 pacientes con patologías cardíacas: 23 pacientes habían tenido infarto de miocardio y 23 sufrían insuficiencia cardíaca, de los cuales se cuantificaron los niveles de FGF19. Los pacientes fueron comparados con controles sanos de edad y sexo equivalentes. Los datos obtenidos evidenciaron una marcada reducción de los niveles de FGF19 en pacientes de ambas patologías cardíacas. También, se analizaron los niveles de FGF21 sistémicos, que mostraron un comportamiento opuesto, con un aumento significativo en los pacientes con insuficiencia cardíaca o víctimas de infarto de miocardio. Este perfil de cambios recíprocos es similar al de los individuos con obesidad en comparación con controles sanos (Figura 47).



**Figura 47. Niveles sistémicos en pg/mL de (A) FGF19 o (B) FGF21 en pacientes control, pacientes con insuficiencia cardíaca o con infarto de miocardio.** Los resultados se expresan como  $\pm$  SEM. Análisis estadístico realizado con el test para muestras no paramétricas Mann-Whitney. Los \* muestran diferencias con respecto a los pacientes control y los # muestran diferencias entre pacientes con insuficiencia cardíaca e infarto de miocardio (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; #  $p < 0,05$ ; ##  $p < 0,01$ ).

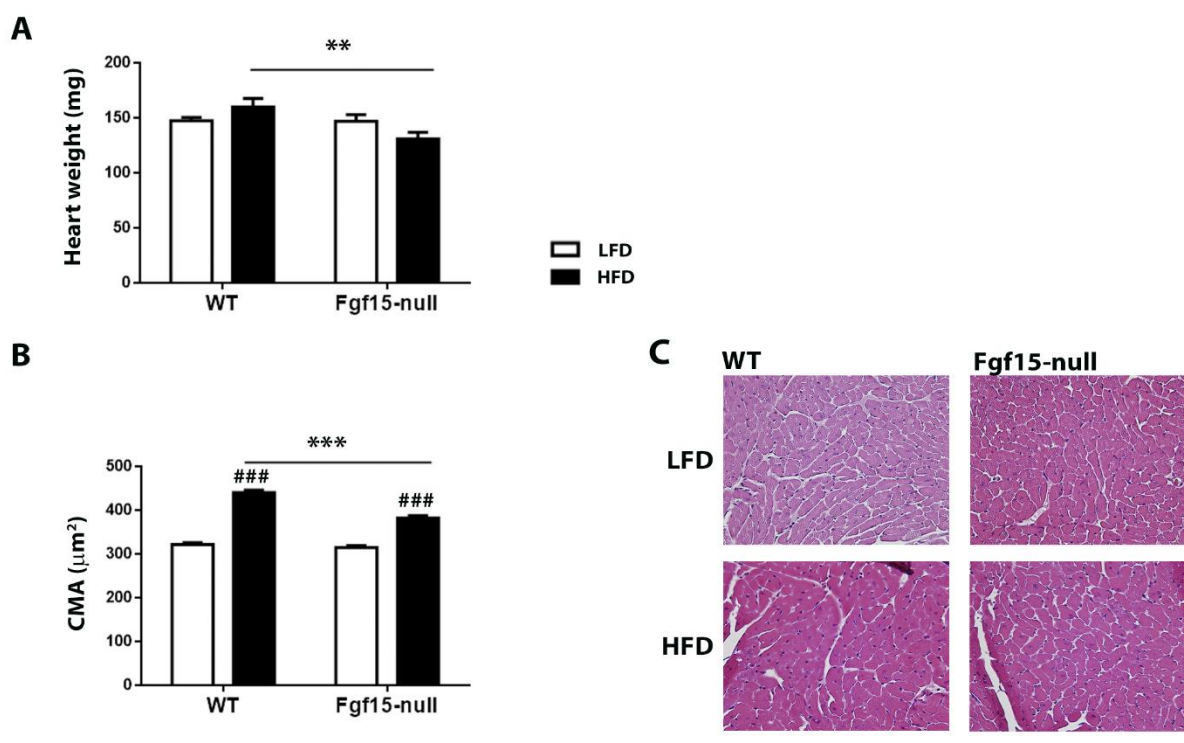
## **2. Los ratones Fgf15-null muestran alteraciones en el desarrollo de hipertrofia cardíaca inducida por obesidad.**

Dado los datos obtenidos anteriormente en pacientes y a fin de determinar el posible papel de FGF15/19 en la homeostasis cardíaca, analizamos el corazón de ratones deficientes para Fgf15 en condiciones basales y en respuesta a una dieta obesogénica (HFD), procedimiento que induce hipertrofia cardíaca patológica (Raher et al., 2008). Ratones WT y Fgf15-null de 2 meses de edad fueron alimentados durante 13 semanas con HFD o se con una dieta estándar baja en grasas (LFD). A grandes rasgos, el perfil metabólico general de los ratones Fgf15-null mantenidos en LFD no se modificó en relación con los ratones WT. Además, la respuesta obesogénica producida por la HFD no resultó diferente entre los ratones Fgf15-null y los WT: el aumento de peso corporal y el tamaño de los depósitos de tejido adiposo fue similar en ambos genotipos. Tampoco se mostraron diferencias entre genotipos en lo concerniente a la trigliceridemia, la glucemia y la hiperinsulinemia producida por la HFD. En cambio, los niveles sistémicos de FGF21 resultaron significativamente incrementados en ratones Fgf15-null bajo HFD en comparación con animales WT (Tabla 23).

**Tabla 23. Caracterización de animales WT y Fgf15-null alimentados durante 13 semanas con una dieta obesogénica HFD o mantenidos con dieta estándar LFD.** En la tabla se muestran los datos concernientes a los pesos de los animales (tanto peso corporal como el peso de los diferentes tejidos), parámetros metabólicos y la expresión génica en hígado de diferentes genes (expresión relativa y multiplicada por 1000). Todas las medidas se expresan como media  $\pm$  SEM (n = 8). Análisis estadísticos realizados con t-student. \* muestra diferencias entre genotipo y # muestra diferencias entre dieta (\* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001; # p < 0,05; ## p < 0,01; ### p < 0,001).

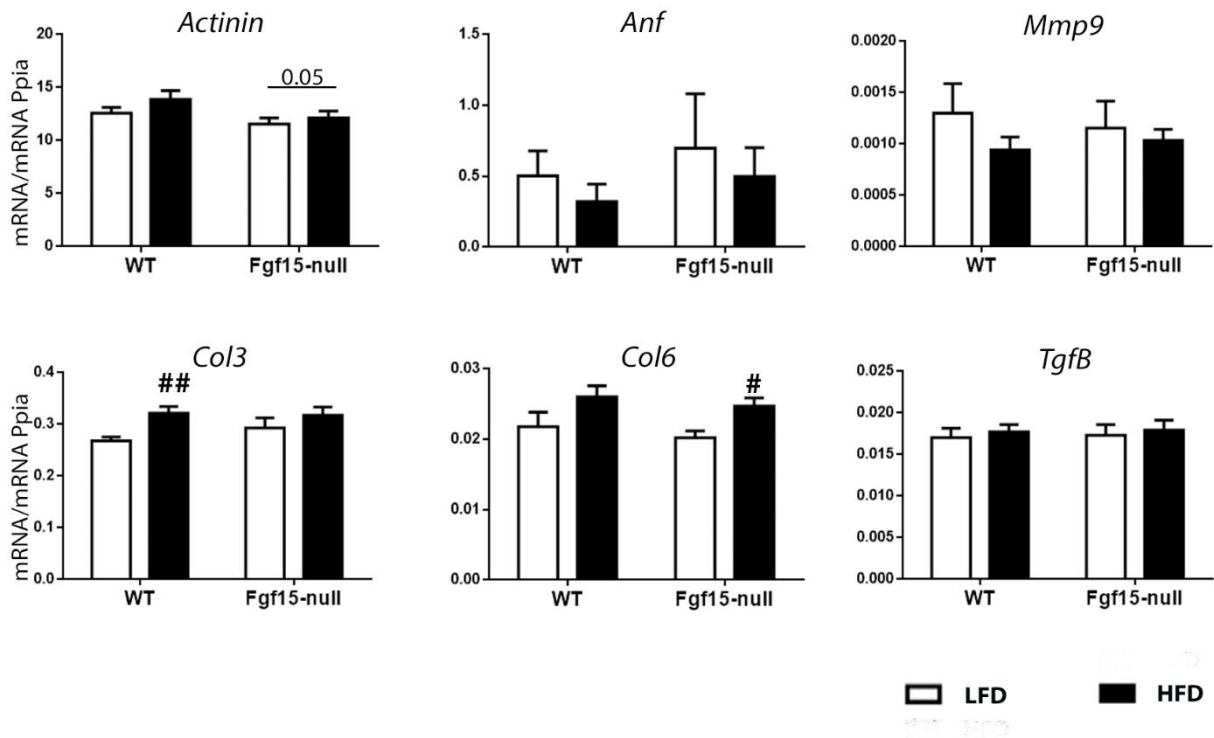
	WT		Fgf15-null	
	LFD	HFD	LFD	HFD
<b>Peso corporal (g)</b>	35,2 $\pm$ 1,7	44,8 $\pm$ 2,0 ##	33,4 $\pm$ 0,8	39,4 $\pm$ 1,2 ##*
<b>TAM interescapular (mg)</b>	184,9 $\pm$ 20,8	198,2 $\pm$ 16,9	165,5 $\pm$ 28,0	210,6 $\pm$ 14,0
<b>TABi (mg)</b>	531,7 $\pm$ 91,0	1361,3 $\pm$ 153,7 ###	557,0 $\pm$ 72,2	1238,2 $\pm$ 138,0 ##
<b>TABe (mg)</b>	1063,3 $\pm$ 181,8	1988,6 $\pm$ 176,7 ##	1153,7 $\pm$ 136,0	2107,2 $\pm$ 43,4 ###
<b>Hígado (mg)</b>	1515,2 $\pm$ 60,9	2077,0 $\pm$ 265,5 (#p=0,06)	1501,2 $\pm$ 75,4	1946,1 $\pm$ 130,1 #
<b>Glucosa (mg/dL)</b>	157,2 $\pm$ 4,3	176,5 $\pm$ 8,7(#p=0,07)	174,6 $\pm$ 14,4	183,7 $\pm$ 0,9
<b>Insulina (pg/mL)</b>	911,2 $\pm$ 133,6	7136,5 $\pm$ 1985,0 #	1420,8 $\pm$ 387,2	5291,9 $\pm$ 1153,7 #
<b>Triglicéridos (mg/dL)</b>	233,0 $\pm$ 25,8	195,1 $\pm$ 20,8	173,2 $\pm$ 6,7	187,7 $\pm$ 18,5
<b>FGF21 (pg/mL)</b>	347,2 $\pm$ 84,5	664,5 $\pm$ 125,7	718,3 $\pm$ 118,0 *	1345,4 $\pm$ 159,9 ##
<b>Cyp7a1 Hepático</b>	33,29 $\pm$ 7,08	24,15 $\pm$ 4,61	262,44 $\pm$ 37,06 **	218,32 $\pm$ 20,83 ***
<b>Fgf21 Hepático</b>	3,61 $\pm$ 0,6	7,70 $\pm$ 1,65	6,91 $\pm$ 1,16	11,74 $\pm$ 2,16

Al medir el tamaño del corazón no se encontraron diferencias entre los ratones Fgf15-null y WT en condiciones de LFD. Sin embargo, los corazones de ratones Fgf15-null alimentados con HFD eran significativamente más pequeños que los de los ratones WT bajo las mismas condiciones (Figura 48A). A fin de analizar estos cambios de peso, se obtuvieron preparaciones histológicas de cortes transversales de los corazones teñidas con hematoxilina y eosina (H&E). El análisis del área de los cardiomiocitos (CMA) permitió confirmar que, tal como pasaba con el tamaño del corazón, no se encontraron diferencias entre genotipos en condiciones de LFD. En cambio, los ratones WT alimentados con una HFD, tenían un CMA incrementado en comparación con los Fgf15-null, señalando un mayor grado de hipertrofia cardíaca en el caso de los WT. Los Fgf15-null mostraban una hipertrofia menor bajo la HFD (Figura 48B y 48C).



**Figura 48. La falta de FGF15 provoca una alteración de la hipertrofia patológica asociada a una dieta obesogénica (HFD).** Ratones WT y Fgf15-null fueron alimentados con una dieta obesogénica o mantenidos con dieta estándar (LFD) durante 13 semanas. **A.** Pesos de los corazones de ratones WT y Fgf15-null bajo LFD o HFD en el momento del sacrificio. **B.** Área de los cardiomiocitos (CMA) expresada en  $\mu\text{m}^2$ . **C.** Secciones histológicas de corazones representativas teñidas con hematoxilina y eosina (H&E). 20x aumentos, escala 50  $\mu\text{m}$ . Los resultados se expresan como media  $\pm$  SEM ( $n = 8$ ). Análisis estadísticos realizados con t-student. # muestra diferencias entre dieta y \* diferencias entre genotipo (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; #  $p < 0,05$ ; ##  $p < 0,01$ ; ###  $p < 0,001$ ).

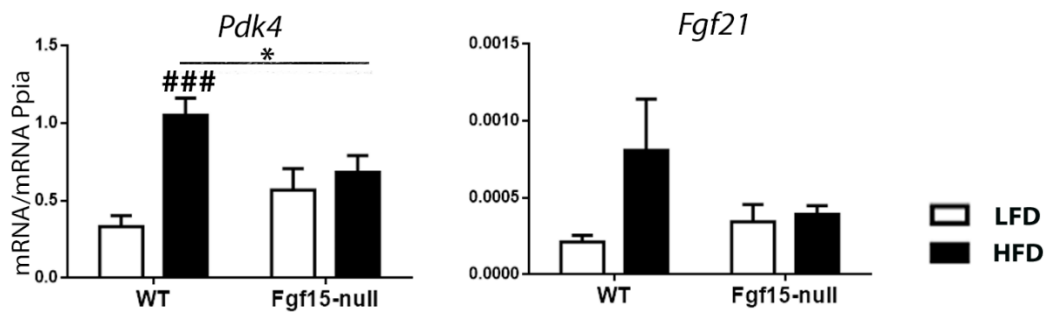
El análisis de expresión génica no reveló cambios significativos en la expresión de Anf debido a la falta de FGF15 mientras que la expresión del gen de la actinina se redujo significativamente en ratones Fgf15-null tanto en el caso de LFD como en el de HFD, según el análisis mediante two-way ANOVA ( $p < 0,05$ ). Los genes *Mmp9*, *Col3* y *Col6*, indicadores de fibrosis, no mostraron cambios importantes debido a la dieta o al genotipo (Figura 49).



**Figura 49. La falta de FGF15 en una situación de hipertrofia patológica (HFD) provoca una leve disminución de la expresión de genes relacionados con la hipertrofia.** En la figura se muestran niveles de expresión de RNAm de diferentes genes relacionados con la hipertrofia (*Actinin* y *Anf*) y con la fibrosis (*Mmp9*, *Col3*, *Col6* y *TgfB*). Los resultados se expresan como media  $\pm$  SEM (n = 8). Análisis estadísticos realizados con t-student. # muestra diferencias entre dieta y \* diferencias entre genotipo (\* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001; # p < 0,05; ## p < 0,01; ### p < 0,001). También se analizó diferencias entre factores mediante el test two-way ANOVA.

En contraste con los resultados obtenidos con los genes marcadores de hipertrofia o fibrosis del tejido cardíaco, la expresión del gen que codifica por PDK4, enzima clave en el uso relativo entre glucosa y ácidos grasos en el corazón, fue dramáticamente inducida en ratones WT alimentados con HFD, tal como ya se había descrito previamente (Newhardt et al., 2019), pero no en el caso de Fgf15-null, donde no hay inducción de PDK4 por HFD. En el caso de la expresión de FGF21, el perfil de expresión fue muy similar al de PDK4, con una inducción impedida en los ratones Fgf15-null alimentados con HFD (Figura 50).





**Figura 50. La falta de FGF15 en una situación de hipertrofia patológica (HFD) provoca una disminución de la expresión de genes relacionados con el metabolismo cardíaco.** En la figura se muestran niveles de expresión de RNAm de *Pdk4* y *Fgf21*. Los resultados se expresan como media  $\pm$  SEM (n = 8). Análisis estadísticos realizados con t-student. # muestra diferencias entre dieta y \* diferencias entre genotipo (\* p<0,05; \*\* p <0,01; \*\*\* p <0,001; # p<0,05; ## p <0,01; ### p <0,001). También se analizó diferencias entre factores mediante el test two-way ANOVA.

Al ver los cambios en la expresión de *Pdk4* se decidió analizar la expresión génica de otros genes relacionados con el metabolismo cardíaco y con el uso relativo de ácidos grasos o glucosa como sustrato: la acil-CoA deshidrogenasa de cadena media (*Acadm*) involucrada en la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos, la carnitina palmitoiltransferasa 1b muscular (*Cpt1b*), enzima que limita la incorporación de ácidos grasos en las mitocondrias, el transportados de glucosa 1 (*Slc2a1* o *Glut1*) que indica la incorporación de glucosa dentro de los cardiomiocitos y PCG1 $\alpha$  (*Ppargc1a*) que regula la expresión de *Pdk4* y *Cpt1b*. En la tabla 24 podemos ver como en los animales WT alimentados con dieta HFD hay una tendencia (aunque no significativa ni tan marcada como para *Pdk4*) a aumentar la expresión de genes como *Acadm*, *Cpt1b* y *Ppargc1a*, indicando una mayor utilización de ácidos grasos que de glucosa. Esta tendencia no se produce en animales Fgf15-null.

**Tabla 24. Niveles de expresión de mRNA de genes relacionados con el metabolismo cardíaco.** Todos los resultados se expresan como media  $\pm$  SEM (n=8 por grupo). Análisis estadístico realizado por t-student. # muestra diferencias entre dieta y \* diferencias entre genotipo (# p<0,05).

	WT		Fgf15-null	
	LFD	HFD	LFD	HFD
<b>Acadm</b>	3,90 $\pm$ 0,59	5,19 $\pm$ 0,86	4,02 $\pm$ 0,48	1,69 $\pm$ 0,69
<b>Cpt1b</b>	1,43 $\pm$ 0,02	2,22 $\pm$ 0,43 #	1,50 $\pm$ 0,16	0,59 $\pm$ 0,24
<b>Slc2a1 (Glut1)</b>	0,047 $\pm$ 0,002	0,042 $\pm$ 0,005	0,057 $\pm$ 0,008	0,043 $\pm$ 0,005
<b>Ppargc1a</b>	0,27 $\pm$ 0,03	0,41 $\pm$ 0,09	0,39 $\pm$ 0,07	0,29 $\pm$ 0,03

Los resultados referentes a la resistencia de los ratones deficientes de FGF15 a desarrollar hipertrofia cardíaca patológica, nos muestra cómo la falta de FGF15 provoca una alteración en este tipo de hipertrofia asociada a una dieta obesogénica (HFD), que se manifiesta en: menor peso del corazón, menor tamaño de los cardiomiocitos, menor expresión de actinina y una alteración en la expresión de *Pdk4*, gen clave para la utilización de sustratos para el metabolismo energético. La potenciación adaptativa de la utilización de ácidos grasos por parte del corazón debido a la HFD, evidenciada por la aumentada expresión de *Pdk4* y otros genes del catabolismo lipídico, no se produciría adecuadamente al faltar *Fgf15*.

### 3. Alteración de la hipertrofia cardíaca inducida por el frío en ratones Fgf15-null.

Gracias a los resultados obtenidos en la primera parte de esta tesis doctoral, hemos observado que el sistema FGF15/19 se encuentra involucrado en las alteraciones del tejido adiposo asociadas con la adaptación al frío. Así, estudiamos el papel de FGF15 en un segundo modelo de hipertrofia cardíaca adaptativa, en este caso correspondiente a la adaptación fisiológica que se produce en el corazón a causa de un ambiente frío.

A fin de cumplir este propósito, ratones WT y Fgf15-null fueron mantenidos durante una semana a 4 °C y fueron comparados con ratones de ambos genotipos mantenidos durante

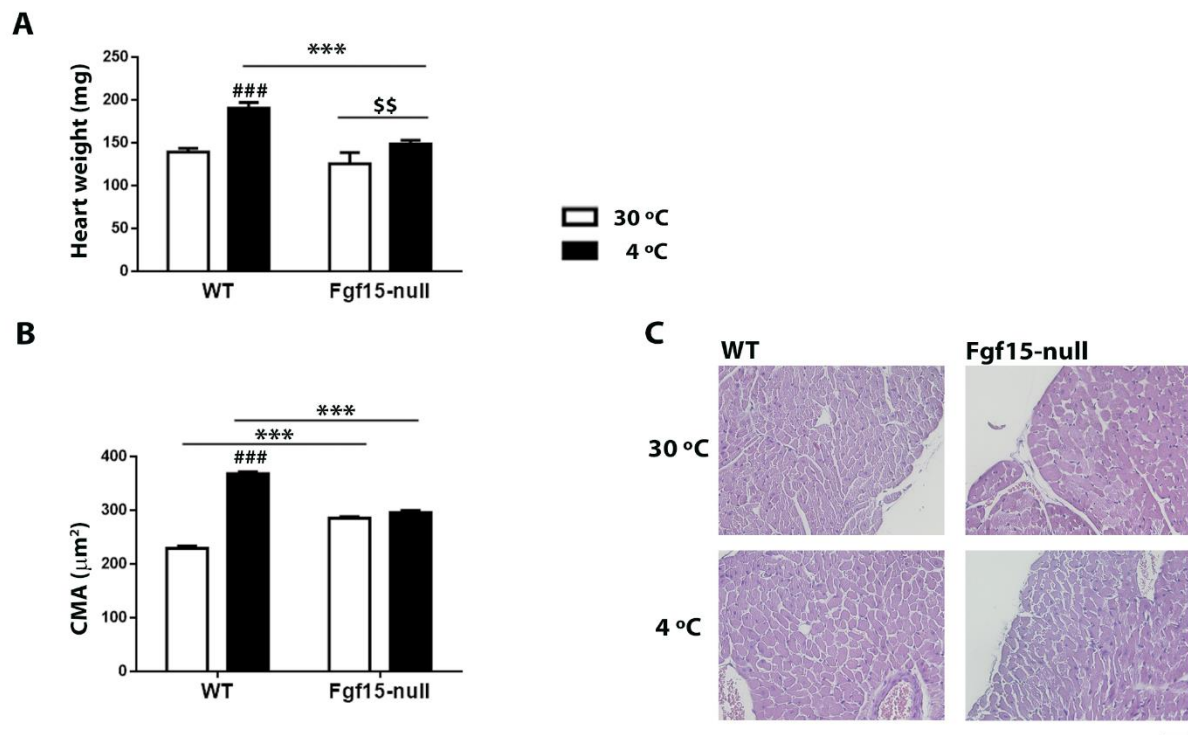
el mismo tiempo a 30 °C, temperatura a la que se suprime el estrés termogénico en ratones (termoneutralidad). Este experimento es el mismo que en el bloque anterior y en la Tabla 25 se muestran los parámetros circulantes y de adiposidad conjuntamente.

**Tabla 25. Caracterización de animales WT y Fgf15-null mantenidos durante 7 días a 30 °C o 4 °C con condiciones de alimentación estándar.** En la tabla se muestran los datos concernientes a los pesos de los animales (tanto peso corporal como el peso de los diferentes tejidos), parámetros metabólicos y la expresión génica en hígado de diferentes genes (expresión relativa y multiplicada por 1000). Todas las medidas se expresan como media  $\pm$  SEM (n = 6). Análisis estadísticos realizados con t-student. # muestra diferencias entre temperatura y \* diferencias entre genotipo (\* p<0,05; \*\* p <0,01; \*\*\* p <0,001; # p<0,05; ## p <0,01; ### p <0,001).

	WT		Fgf15-null	
	30 °C	4 °C	30 °C	4 °C
<b>Peso corporal (g)</b>	30,7 $\pm$ 1,3	30,2 $\pm$ 1,0	29,8 $\pm$ 0,8	28,8 $\pm$ 0,7
<b>Energía consumida (KJ/ratón*día)</b>	41,3 $\pm$ 3,2	88,0 $\pm$ 9,2 ##	42,5 $\pm$ 2,0	74,1 $\pm$ 5,2 ##
<b>TAM interescapular (mg)</b>	69,8 $\pm$ 2,4	125,8 $\pm$ 3,5 ###	128,9 $\pm$ 13,9 **	136,8 $\pm$ 4,0 (*p=0,07)
<b>TABi (mg)</b>	262,2 $\pm$ 43,7	208,3 $\pm$ 23,1	379,1 $\pm$ 29,9 *	306,8 $\pm$ 40,7 (*p=0,08)
<b>TABe (mg)</b>	357,3 $\pm$ 78,2	324,3 $\pm$ 108,2	725,6 $\pm$ 80,5 **	507,6 $\pm$ 89,0
<b>Hígado (mg)</b>	1482,9 $\pm$ 91,9	1561,1 $\pm$ 60,6	1399,8 $\pm$ 61,0	1412,8 $\pm$ 54,7
<b>Glucosa (mg/dL)</b>	166,8 $\pm$ 6,0	172,2 $\pm$ 8,9	165,3 $\pm$ 7,1	147,5 $\pm$ 10,8
<b>Insulina (pg/mL)</b>	1744,2 $\pm$ 231,1	656,2 $\pm$ 117,0 ##	1386,4 $\pm$ 235,5	1509,5 $\pm$ 249,0 #*
<b>Triglicéridos (mg/dL)</b>	331,5 $\pm$ 50,1	178,3 $\pm$ 13,7 #	212,7 $\pm$ 12,3 *	173,6 $\pm$ 10,4 #
<b>NEFA (mg/dL)</b>	32,9 $\pm$ 4,1	18,2 $\pm$ 1,4 ##	22,9 $\pm$ 2,4 (*p=0,06)	15,0 $\pm$ 0,9 # (*p=0,08)
<b>Ácidos biliares (μmols/L)</b>	20,3 $\pm$ 1,8	22,0 $\pm$ 2,4	21,0 $\pm$ 2,4	19,6 $\pm$ 3,6
<b>FGF21 (pg/mL)</b>	214,3 $\pm$ 26,1	149,9 $\pm$ 32,7	111,7 $\pm$ 11,54 **	66,2 $\pm$ 7,5 *
<b>Cyp7a1 Hepático</b>	36,0 $\pm$ 7,9	100 $\pm$ 19 ##	200,0 $\pm$ 26,0 ***	380 $\pm$ 29 ####
<b>Fgf21 Hepático</b>	2,30 $\pm$ 0,49	1,10 $\pm$ 0,18 #	2,00 $\pm$ 0,57	0,51 $\pm$ 0,10 #*

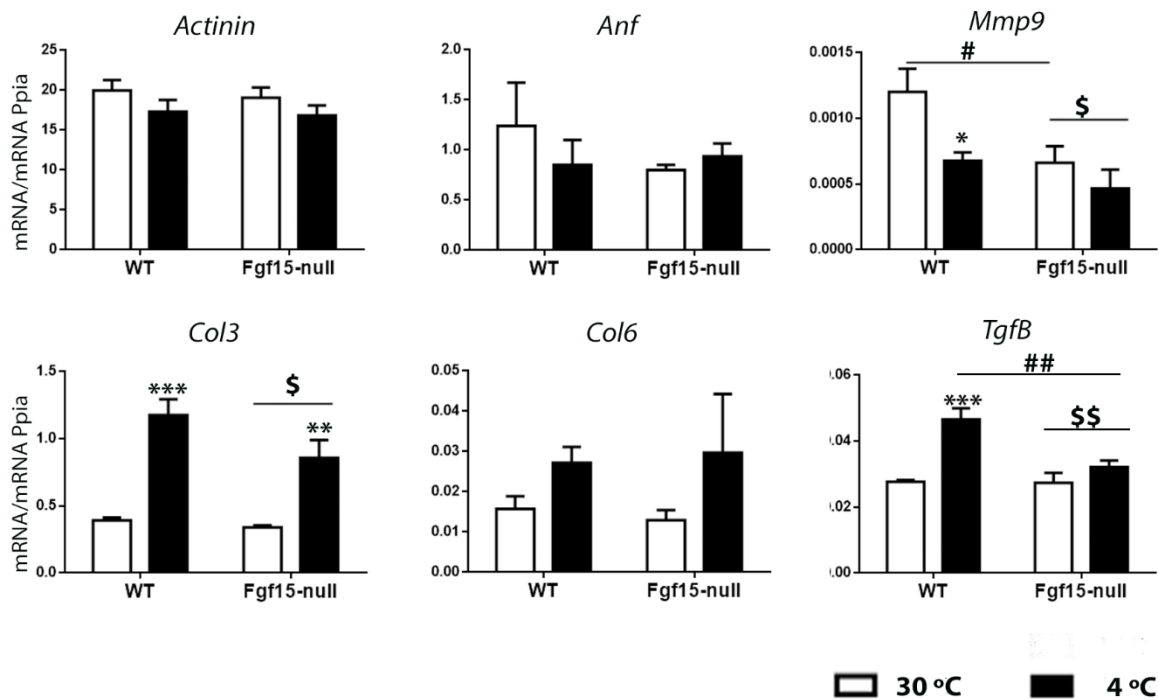
Los ratones WT a 4 °C mostraron una marcada hipertrofia cardíaca, evidenciada por el significativo aumento del tamaño del corazón (Figura 51A) y del aumento en el CMA (Figura 51B). Los ratones Fgf15-null no mostraron cambios en el tamaño del corazón en ausencia de exposición a frío (Figura 51A), aunque el tamaño de los cardiomiocitos (CMA) fue algo mayor (Figura 51B). La capacidad del corazón para agrandarse en

respuesta al frío se vio totalmente bloqueada en los ratones Fgf15-null, así como la capacidad de aumentar el área de sus cardiomiocitos (Figura 51).



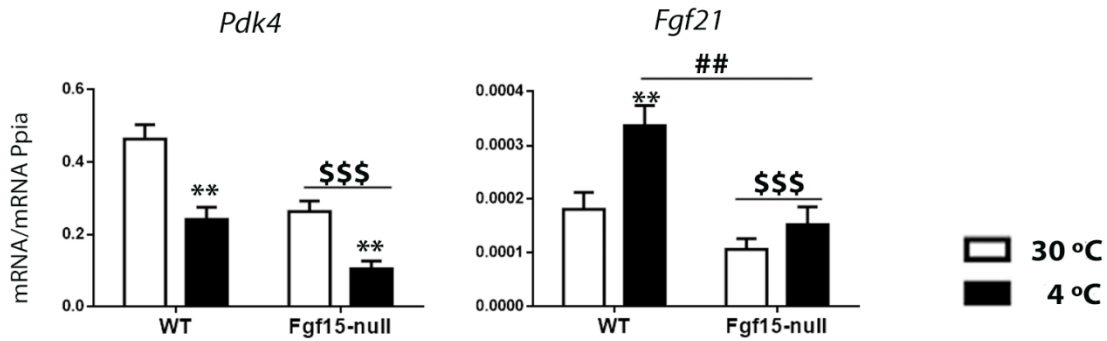
**Figura 51. La falta de FGF15 provoca una alteración de la hipertrofia fisiológica asociada a frío.** Ratones WT y Fgf15-null fueron mantenidos durante 7 días a 30 °C o 4 °C y alimentados con una dieta estándar. **A.** Pesos de los corazones de ratones WT y Fgf15-null a 30 °C o 4°C en el momento del sacrificio. **B.** Área de los cardiomiocitos (CMA) expresada en  $\mu\text{m}^2$ . **C.** Secciones histológicas de corazones representativas teñidas con hematoxilina y eosina (H&E). 20x aumentos, escala 50  $\mu\text{m}$ ). Los resultados se expresan como media  $\pm$  SEM (n = 6). Análisis estadísticos realizados con t-student. # muestra diferencias entre temperatura y \* diferencias entre genotipo. En el caso del peso del corazón, se ha realizado un análisis two way ANOVA (\$ para diferencias causadas por el factor genotipo) (\* p<0,05; \*\* p <0,01; \*\*\* p <0,001; # p<0,05; ## p <0,01; ### p <0,001; \$ p < 0,05; \$\$ p < 0,01).

Al analizar la expresión de los genes relacionados con la hipertrofia cardíaca, especialmente de tipo patológico, como Anf o actinina, no se vieron alteraciones concernientes al genotipo o por el efecto del frío. En cambio, los genes Mmp9, Col3, Col6 y TgfB, relacionados con la fibrosis y la remodelación del corazón durante la hipertrofia cardíaca, fueron fuertemente inducidos por el frío en ratones WT, mientras que los ratones Fgf15-null mostraron un menor grado de inducción (Figura 52).



**Figura 52. La falta de FGF15 en una situación de hipertrofia fisiológica (desafío termogénico) provoca una disminución de la expresión de genes relacionados con la fibrosis y remodelación de la matriz extracelular en el corazón.** En la figura se muestran niveles de expresión de RNAm de diferentes genes relacionados con la hipertrofia (*Actinin* y *Anf*) y con la fibrosis (*Mmp9*, *Col3*, *Col6* y *TgfB*). Los resultados se expresan como media  $\pm$  SEM (n = 6). Análisis estadísticos realizados con t-student. # muestra diferencias entre temperatura y \* diferencias entre genotipo (\* p<0,05; \*\* p <0,01; \*\*\* p <0,001; # p<0,05; ## p <0,01; ### p <0,001). También se analizó diferencias entre factores mediante el test two-way ANOVA. \$ para mostrar diferencias entre genotipos (\$ p<0,05; \$\$ p <0,01),

La expresión de *Pdk4* se redujo a causa de la exposición al frío, siendo significativamente menor en el caso de los ratones *Fgf15-null*, independientemente de la temperatura. Este patrón fue recíproco al comportamiento observado para la expresión de *Fgf21* (Figura 53).



**Figura 53.** La falta de FGF15 en una situación de hipertrofia fisiológica (desafío termogénico) provoca una disminución de la expresión de genes relacionados con el metabolismo cardíaco. En la figura se muestran niveles de expresión de RNAm de *Pdk4* y *Fgf21*. Los resultados se expresan como media  $\pm$  SEM (n = 6). Análisis estadísticos realizados con t-student. # muestra diferencias entre temperatura y \* diferencias entre genotipo (\* p<0,05; \*\* p<0,01; \*\*\* p<0,001; # p<0,05; ## p<0,01; ### p<0,001). También se analizó diferencias entre factores mediante el test two-way ANOVA (\$ p<0,05; \$\$ p<0,01; \$\$\$ p<0,001).

Al analizar los genes *Acadm*, *Cpt1b*, *Glut1* y *Ppargc1a*, se pudo ver como los animales mantenidos a 4°C tienen una tendencia a disminuir la expresión de *Acadm*, *Cpt1b* y *Ppargc1a*, indicando una mayor utilización de glucosa como sustrato por parte de sus cardiomiocitos. En el caso de los Fgf15-null, esta disminución tendió a ser de menor magnitud (tabla 26).

**Tabla 26.** Niveles de expresión de mRNA de genes relacionados con el metabolismo cardíaco. Todos los resultados se expresan como media  $\pm$  SEM (n=6 por grupo). Análisis estadístico realizado por t-student. # muestra diferencias entre temperatura y \* diferencias entre genotipo (\* p<0,05; # p<0,05; ## p<0,01; ### p<0,001).

	WT		Fgf15-null	
	30 °C	4 °C	30 °C	4 °C
<b>Acadm</b>	2,43 $\pm$ 0,13	1,37 $\pm$ 0,09 ###	2,30 $\pm$ 0,21	1,12 $\pm$ 0,06 ###*
<b>Cpt1b</b>	0,80 $\pm$ 0,03	0,52 $\pm$ 0,04 ###	0,76 $\pm$ 0,09	0,44 $\pm$ 0,01## (*p=0,08)
<b>Slc2a1 (Glut1)</b>	0,050 $\pm$ 0,011	0,051 $\pm$ 0,003	0,033 $\pm$ 0,008	0,040 $\pm$ 0,008
<b>Ppargc1a</b>	0,35 $\pm$ 0,06	0,17 $\pm$ 0,01 #	0,16 $\pm$ 0,02 *	0,17 $\pm$ 0,04

En el caso de la hipertrofia cardíaca fisiológica adaptativa al frío, los estudios de expresión génica sugieren que el corazón debe utilizar en menor medida los ácidos grasos como sustrato metabólico (disminución de la expresión de *Pdk4* y de otros genes del catabolismo lipídico, como *Acadm* o *Cpt1b*). Sin embargo, los ratones *Fgf15*-null presentan una disminución todavía más marcada de estos genes, sobretudo en el caso de *Pdk4*, sugiriendo que el porcentaje de utilización de lípidos puede ser incluso menor que en estos animales que en WT.

Con ambos modelos de hipertrofia cardíaca adaptativa, tanto en respuesta a dieta rica en grasa como en respuesta al frío, hemos podido observar como la ausencia de FGF15 provoca una alteración en la capacidad de remodelación y de adaptación metabólica del corazón seguramente modificando el ratio de utilización de glucosa/ácidos grasos como sustrato energético. Estas alteraciones se traducen en una disminución en el tamaño de sus corazones, provocada por una disminución del tamaño de los cardiomiocitos.

#### **4. Papel de FGF15 en hipertrofia cardíaca patológica inducida por isoproterenol.**

Dado el potencial papel de FGF15/19 en el desarrollo de la hipertrofia adaptativa, se realizó otra aproximación de inducción de hipertrofia cardíaca, mediante el tratamiento crónico con el agonista adrenérgico isoproterenol (ISO), tradicionalmente usado para la inducción de hipertrofia cardíaca patológica. Así, ratones WT y *Fgf15*-null de 4 meses fueron tratados con salino o ISO durante 7 días, con infusión continua mediante bombas osmóticas (minipump) colocadas de manera subcutánea en la zona interescapular de los ratones.

De este experimento se pudieron realizar ecografías a día 6 de tratamiento a fin de analizar la funcionalidad del corazón de los animales. Las mediciones ecocardiográficas no revelaron cambios significativos entre ratones WT y *Fgf15*-null tratados con ISO. Ahora bien, los ratones control (salino) *Fgf15*-null mostraron un comportamiento diferente en comparación de los WT: el volumen del septo (tanto en diástole, IVSd, como en sístole, IVSs) y el grosor de la pared posterior del ventrículo izquierdo (tanto en diástole LVPWd, como en sístole LVPWs) eran mayores en el caso de los *Fgf15*-null. Por otra parte, el diámetro de la aorta fue menor en el caso de los *Fgf15*-null (Tabla 27).

**Tabla 27. Parámetros ecocardiográficos de ratones WT y Fgf15-null tratados con 6 días con infusión de isoproterenol o mantenidos con salino.** Todas las medidas se expresan como media  $\pm$  SEM (n = 6). Análisis estadísticos realizados con t-student. # muestra diferencias entre tratamiento y \* diferencias entre genotipo (\* p<0,05; \*\* p <0,01; # p<0,05; ## p <0,01).

	WT		Fgf15-null	
	Saline	ISO	Saline	ISO
IVSd (mm)	0,53 $\pm$ 0,02	0,87 $\pm$ 0,02 ###	0,63 $\pm$ 0,02 **	0,83 $\pm$ 0,11
LVPWd (mm)	0,62 $\pm$ 0,04	0,84 $\pm$ 0,07 ##	0,73 $\pm$ 0,03 (*p = 0,05)	0,85 $\pm$ 0,03 #
LVIDd (mm)	4,50 $\pm$ 0,08	4,15 $\pm$ 0,12 #	4,43 $\pm$ 0,19	4,09 $\pm$ 0,39
IVSs (mm)	0,84 $\pm$ 0,01	1,45 $\pm$ 0,05 ###	1,09 $\pm$ 0,08 **	1,49 $\pm$ 0,09
LVPWs (mm)	0,82 $\pm$ 0,02	1,08 $\pm$ 0,09 #	1,01 $\pm$ 0,06 **	1,08 $\pm$ 0,07
LVIDs (mm)	3,41 $\pm$ 0,09	2,62 $\pm$ 0,14 #	3,20 $\pm$ 0,21	2,58 $\pm$ 0,44
EF (%)	54,5 $\pm$ 1,6	71,7 $\pm$ 1,9 ###	60,5 $\pm$ 3,0 (*p=0,09)	70,8 $\pm$ 2,5 #
%FS	24,3 $\pm$ 1,0	35,7 $\pm$ 1,5 ###	28,0 $\pm$ 1,9 (*p=0,1)	34,5 $\pm$ 1,9 (#p=0,05)
Heart Rate (BPM)	469,5 $\pm$ 26,9	497,0 $\pm$ 19,97	405,8 $\pm$ 21,9	444,3 $\pm$ 29,6
Peak Velocity (m/s)	1,13 $\pm$ 0,05	1,18 $\pm$ 0,10	1,07 $\pm$ 0,06	1,14 $\pm$ 0,05
VTI (cm)	4,32 $\pm$ 0,20	4,40 $\pm$ 0,45	4,25 $\pm$ 0,23	4,18 $\pm$ 0,23
Heart Rate (BPM)	485,7 $\pm$ 27,7	503,8 $\pm$ 27,0	472,0 $\pm$ 15,7	488,5 $\pm$ 31,4
E Peak (m/s)	1,11 $\pm$ 0,05	0,95 $\pm$ 0,13	0,97 $\pm$ 0,06 (*p=0,08)	1,02 $\pm$ 0,16
Deceleration Time (ms)	23,5 $\pm$ 1,26	17,4 $\pm$ 1,4 #	24,0 $\pm$ 1,8	23,8 $\pm$ 4,3
Ø Aorta (mm)	1,24 $\pm$ 0,02	1,37 $\pm$ 0,04 #	1,19 $\pm$ 0,01 (*p=0,07)	1,21 $\pm$ 0,02 *

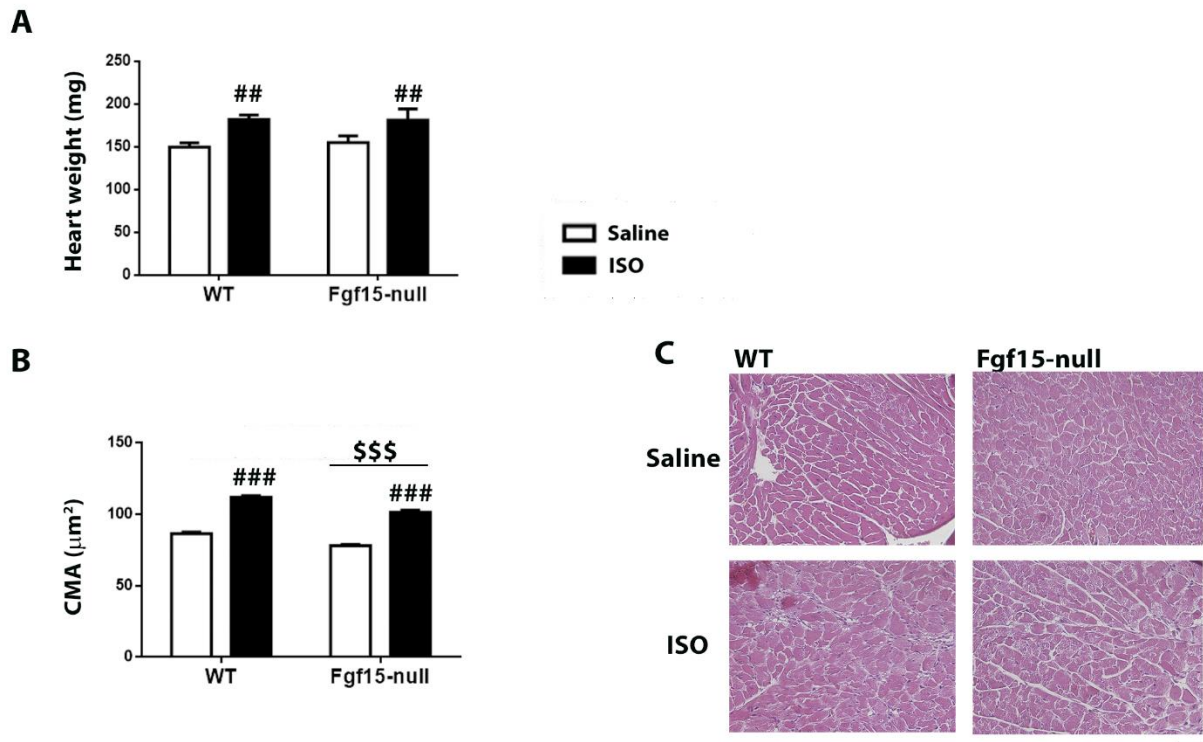
Una vez finalizado el tratamiento se procedió con el sacrificio y a recolectar los diferentes tejidos. El tratamiento con ISO provocó una disminución tanto del peso corporal como de los diferentes depósitos de tejido adiposo en ambos genotipos, acompañado de un descenso de los triglicéridos en sangre, todo ello sin diferencias significativas en función del genotipo. Por otro lado, los niveles de FGF21 sistémicos tendieron a disminuir en respuesta a ISO y fueron significativamente más altos en ratones Fgf15-null que en ratones WT (p = 0,0002 con Two way ANOVA) (Tabla 28).



**Tabla 28. Caracterización de animales WT y Fgf15-null tratados durante 7 días con salino o ISO.** En la tabla se muestran los datos concernientes a los pesos de los animales y parámetros metabólicos. Todas las medidas se expresan como media  $\pm$  SEM (n = 6). Análisis estadísticos realizados con t-student. # muestra diferencias entre tratamiento y \* diferencias entre genotipo (\* p<0,05; \*\* p <0,01; # p<0,05; ## p <0,01).

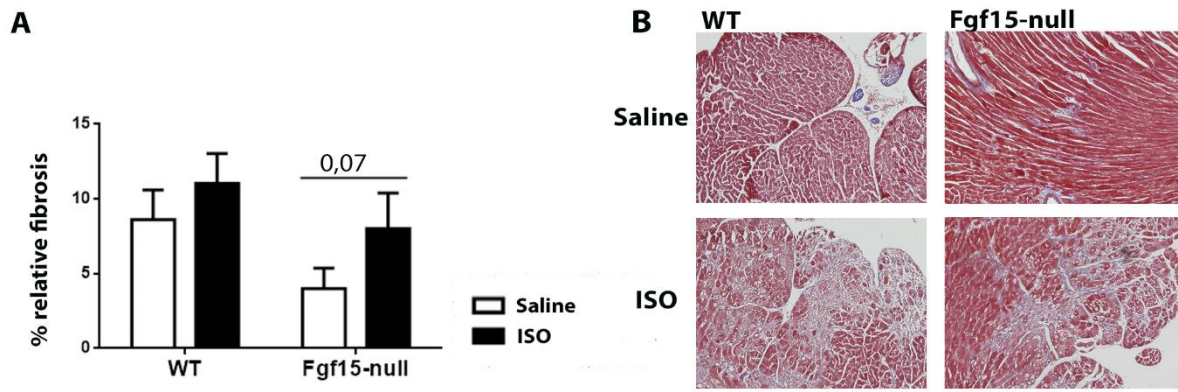
	WT		Fgf15-null	
	Salino	ISO	Salino	ISO
<b>Peso corporal (g)</b>	39,2 $\pm$ 1,4	34,9 $\pm$ 1,0#	42,2 $\pm$ 1,3	35,8 $\pm$ 1,7#
<b>TAM interescapular (mg)</b>	165,5 $\pm$ 18,2	121,2 $\pm$ 6,6#	199,1 $\pm$ 9,1	103,9 $\pm$ 17,1 ##
<b>TABi (mg)</b>	857,6 $\pm$ 150,2	471,2 $\pm$ 86,6#	1017,8 $\pm$ 78,1	747,5 $\pm$ 160,9
<b>TABe (mg)</b>	1431,6 $\pm$ 251,6	781,4 $\pm$ 92,4#	1629,5 $\pm$ 172,7	945,0 $\pm$ 253,4 (# p=0,07)
<b>Hígado (mg)</b>	1725,4 $\pm$ 74,3	1553,7 $\pm$ 39,0 (#p=0,07)	2131,1 $\pm$ 151,4*	1628,2 $\pm$ 138,0#
<b>Glucosa (mg/dL)</b>	147,7 $\pm$ 6,3	132,0 $\pm$ 6,9	165,2 $\pm$ 16,5	110,2 $\pm$ 9,7# (*p=0,1)
<b>Triglicéridos (mg/dL)</b>	247,3 $\pm$ 15,6	147,5 $\pm$ 26,1##	199,7 $\pm$ 15,7 (*p=0,07)	103,5 $\pm$ 12,2##
<b>FGF21 (pg/mL)</b>	374,7 $\pm$ 74,7	246,9 $\pm$ 99,8	826,82 $\pm$ 100,8**	555,4 $\pm$ 138,3 (*p = 0,1)

Se analizó a continuación el peso del corazón y la morfología de los cardiomiocitos. Los corazones de los ratones tratados con ISO son significativamente mayores que en el caso de los tratados con salino, independientemente de su genotipo, confirmando el efecto hipertrófico del tratamiento. Sin embargo, no se observaron diferencias en el peso del corazón entre ratones WT y Fgf15-null tras el tratamiento. Tras esto, se realizaron cortes histológicos y mediante preparaciones teñidas con hematoxilina y eosina se midieron las áreas de los cardiomiocitos. De la misma manera que en el caso del peso del corazón, el CMA era significativamente más grande en los ratones tratados con ISO que los tratados con salino. En este caso, los ratones Fgf15-null sí mostraban un CMA menor que los WT, independientemente de su tratamiento (Figura 54).



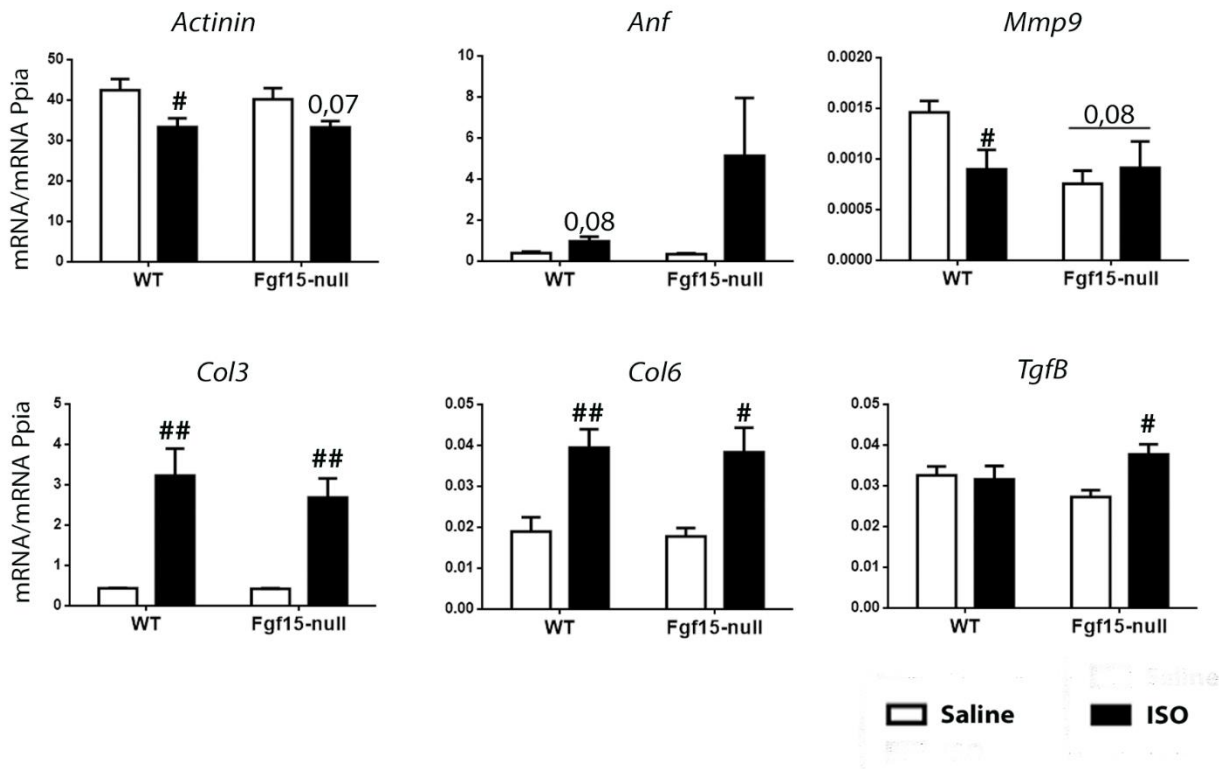
**Figura 54. La falta de FGF15 provoca una alteración de la hipertrofia patológica provocada por ISO.** Ratones WT y Fgf15-null fueron tratados durante 7 días con salino e ISO y alimentados con una dieta estándar. **A.** Pesos de los corazones de ratones WT y Fgf15-null en el momento del sacrificio. **B.** Área de los cardiomiocitos (CMA) expresada en  $\mu\text{m}^2$ . **C.** Secciones histológicas de corazones representativas teñidas con hematoxilina y eosina (H&E). (20x aumentos, escala 50  $\mu\text{m}$ ). Los resultados se expresan como media  $\pm$  SEM ( $n = 6$ ). Análisis estadísticos realizados con t-student. # muestra diferencias entre tratamiento y \* diferencias entre genotipo. En el caso del peso del corazón, se ha realizado un análisis two way ANOVA (\$ para diferencias causadas por el factor genotipo) (#  $p < 0,05$ ; ##  $p < 0,01$ ; ###  $p < 0,001$ ; \$  $p < 0,05$ ; \$\$  $p < 0,01$ ; \$\$\$  $p < 0,001$ ).

A fin de evaluar la incidencia de la fibrosis cardíaca en este modelo, se realizaron preparaciones teñidas con la tinción tricrómica de Masson en secciones transversales de corazón de ratones WT y Fgf15-null tratados con salino o con ISO. A continuación, se cuantificaron las áreas fibróticas (zonas teñidas de azul). El tratamiento con ISO provocaba el aumento de las zonas fibróticas (aunque de manera no significativa) en ambos genotipos. Sin embargo, los ratones Fgf15-null, tanto tratados con salino como con ISO, tenían una marcada tendencia a contener menos zonas fibróticas ( $p = 0,07$  con two way ANOVA) (Figura 55).



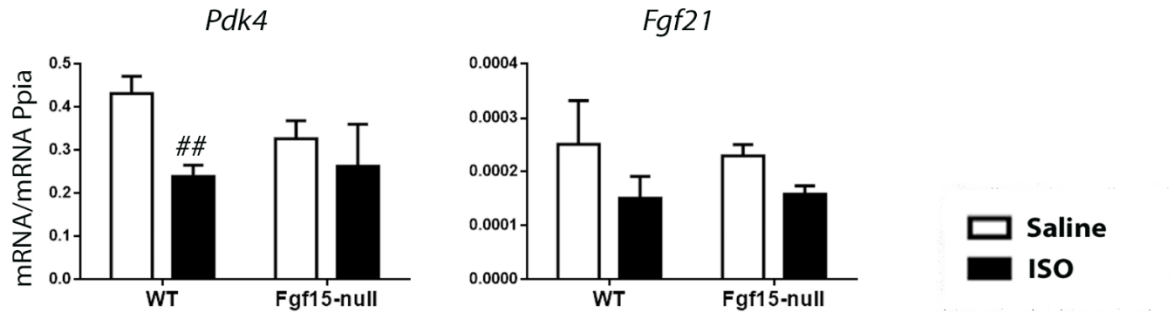
**Figura 55. La falta de FGF15 provoca una disminución de la fibrosis en hipertrofia cardíaca (por ISO).** Determinación de la fibrosis relativa en secciones histológicas de ratones WT y Fgf15-null tratados durante 7 días con salino o con ISO. Tinción tricrómica de Masson (20x, escala 50  $\mu$ m). Los resultados se expresan como media  $\pm$  SEM. Análisis estadístico realizado con two way ANOVA.

Al analizar la expresión de diferentes genes marcadores de hipertrofia cardíaca, observamos que no había afectaciones de la actinina entre genotipos pero existía una tendencia no significativa a que los ratones Fgf15-null tuvieran una mayor expresión de *Anf* ( $p = 0,12$  con two way ANOVA). Los genes marcadores de fibrosis cardíaca no se vieron afectados entre genotipos, con la excepción de *Mmp9*, que tenía una  $p = 0,08$  por el factor genotipo con two way ANOVA (Figura 56).



**Figura 56. La falta de FGF15 en una situación de hipertrofia patológica (tratamiento con ISO) no provoca cambios significativos en la expresión de genes relacionados con la fibrosis cardíaca y con la remodelación cardíaca.** En la figura se muestran niveles de expresión de RNAm de diferentes genes relacionados con la hipertrofia (*Actinin* y *Anf*) y con la fibrosis (*Mmp9*, *Col3*, *Col6* y *TgfB*). Los resultados se expresan como media  $\pm$  SEM (n = 6). Análisis estadísticos realizados con t-student. # muestra diferencias entre tratamiento y \* diferencias entre genotipo (# p<0,05; ## p <0,01). También se analizó diferencias entre factores mediante el test two-way ANOVA.

La expresión de *Pdk4* no experimentó cambios entre ratones tratados con Salino e ISO en el caso de los ratones deficientes en FGF15. En los ratones WT sí se modificó la expresión de este gen, siendo menor bajo el efecto de ISO, indicando un posible aumento del uso de la glucosa como sustrato oxidativo. La expresión de *Fgf21* no se vio modificada (Figura 57).



**Figura 57. La falta de FGF15 en una situación de hipertrofia patológica (tratamiento con ISO) no provocó cambios en la expresión de genes relacionados con el metabolismo cardíaco.** En la figura se muestran niveles de expresión de RNAm de *Pdk4* y *Fgf21*. Los resultados se expresan como media  $\pm$  SEM (n = 6). Análisis estadísticos realizados con t-student. # muestra diferencias entre tratamiento y \* diferencias entre genotipo (# p<0,05; ## p <0,01). También se analizó diferencias entre factores mediante el test two-way ANOVA.

Al analizar los genes *Acadm*, *Cpt1b*, *Glut1* y *Ppargc1a*, se pudo ver como los animales Fgf15-null tienen una mayor expresión de *Glut1* (p=0,046 por two way ANOVA), indicando un mayor transporte de glucosa en su interior, lo que sugiere que estos ratones tienen un mayor grado de utilización de glucosa como sustrato que los animales WT (Tabla 29).

**Tabla 29. Niveles de expresión de mRNA de genes relacionados con el metabolismo cardíaco.** Todos los resultados se expresan como media  $\pm$  SEM (n=6 por grupo). Análisis estadístico realizado por t-student. # muestra diferencias entre tratamiento y \* diferencias entre genotipo (\* p<0,05; # p<0,05; ## p <0,01; ### p <0,001).

	WT		Fgf15-null	
	Salino	ISO	Salino	ISO
<b>Acadm</b>	6,30 $\pm$ 0,46	1,89 $\pm$ 0,11 ####	4,87 $\pm$ 0,28 *	2,25 $\pm$ 0,30 ###
<b>Cpt1b</b>	3,42 $\pm$ 0,21	1,46 $\pm$ 0,10 ####	3,04 $\pm$ 0,29	1,95 $\pm$ 0,21 # *
<b>Slc2a1 (Glut1)</b>	0,042 $\pm$ 0,003	0,046 $\pm$ 0,005	0,043 $\pm$ 0,005	0,064 $\pm$ 0,005 # *
<b>Ppargc1a</b>	0,65 $\pm$ 0,05	0,38 $\pm$ 0,03 ##	0,50 $\pm$ 0,04 (*p=0,06)	0,54 $\pm$ 0,07 (*p=0,06)

## 5. La sobreexpresión de FGF15/19 provoca un leve aumento de la hipertrofia cardíaca inducida por isoproterenol.

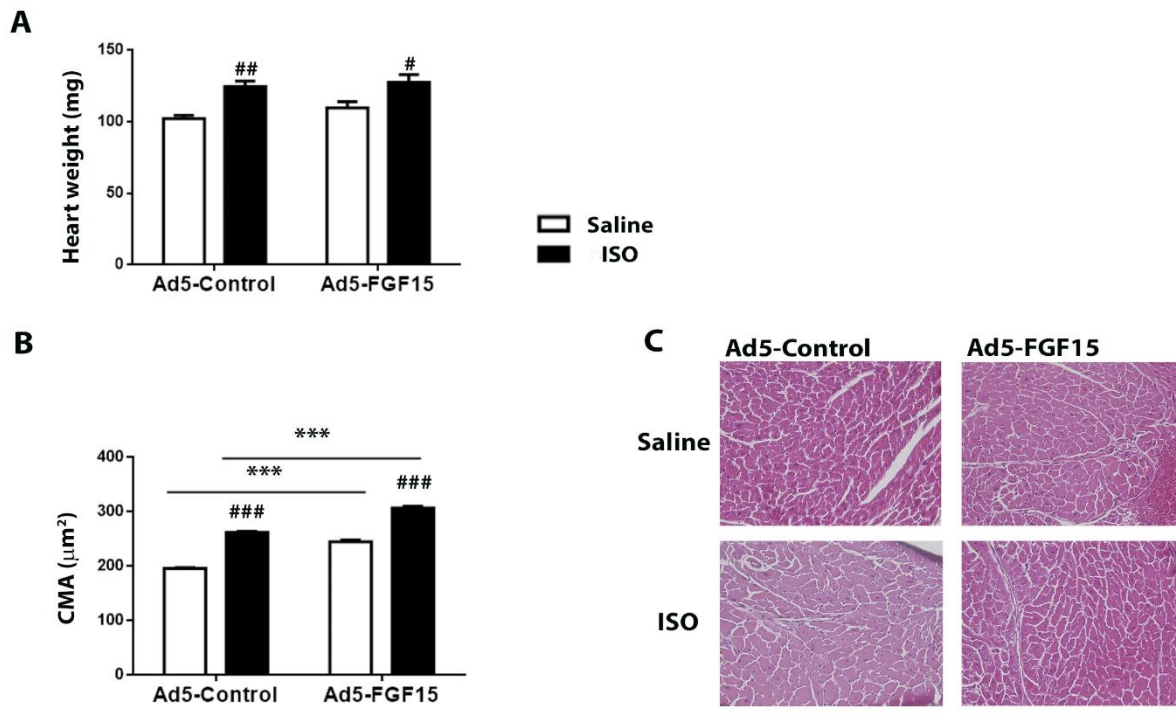
A continuación para seguir explorando el papel de FGF15 en la hipertrofia cardíaca patológica y fisiológica se infectaron ratones WT C57BL/6J con los adenovirus portadores del gen de FGF15 (Ad5-FGF15) o controles (Ad5-Control), consiguiendo una sobreexpresión de FGF15 durante una semana. Al mismo tiempo, se colocó subcutáneamente una bomba osmótica para una administración continua de estos animales con salino o con ISO, a fin de provocar hipertrofia cardíaca (Tabla 30).

**Tabla 30. Caracterización de animales Ad5-Control y Ad5-FGF15 tratados durante 7 días con salino o ISO.** En la tabla se muestran los datos concernientes a los pesos de los animales y parámetros metabólicos. Todas las medidas se expresan como media  $\pm$  SEM (n = 5). Análisis estadísticos realizados con t-student. # muestra diferencias entre tratamiento y \* diferencias entre adenovirus (\* p<0,05; \*\* p <0,01; # p<0,05; ## p <0,01).

	Ad5-Control		Ad5-Fgf15	
	Salino	ISO	Salino	ISO
<b>Peso corporal (g)</b>	22,3 $\pm$ 0,1	23,9 $\pm$ 1,0	22,1 $\pm$ 0,7	21,0 $\pm$ 0,2 *
<b>TAM interescapular (mg)</b>	50,8 $\pm$ 3,7	63,8 $\pm$ 1,7#	54,6 $\pm$ 3,5	58,9 $\pm$ 3,2
<b>TABi (mg)</b>	102,9 $\pm$ 6,7	110,6 $\pm$ 11,2	113,4 $\pm$ 13,5	61,0 $\pm$ 8,9**#
<b>TABe (mg)</b>	116,0 $\pm$ 5,0	81,1 $\pm$ 12,0 #	116,0 $\pm$ 16,3	49,3 $\pm$ 7,8 ## (*p=0,06)
<b>Hígado (mg)</b>	2173,2 $\pm$ 61,3	2089,1 $\pm$ 190,5	1707,0 $\pm$ 143,7 *	1444,9 $\pm$ 62,8 *
<b>Glucosa (mg/dL)</b>	106,6 $\pm$ 12,0	89,3 $\pm$ 12,8	103,3 $\pm$ 5,0	109,0 $\pm$ 17,0
<b>Triglicéridos (mg/dL)</b>	92,5 $\pm$ 5,4	83,2 $\pm$ 7,9	85,9 $\pm$ 4,7	69,7 $\pm$ 3,5#
<b>FGF21 (pg/mL)</b>	2883,2 $\pm$ 426,2	2147,9 $\pm$ 367,6	1653,3 $\pm$ 206,2*	670,3 $\pm$ 153,0**##

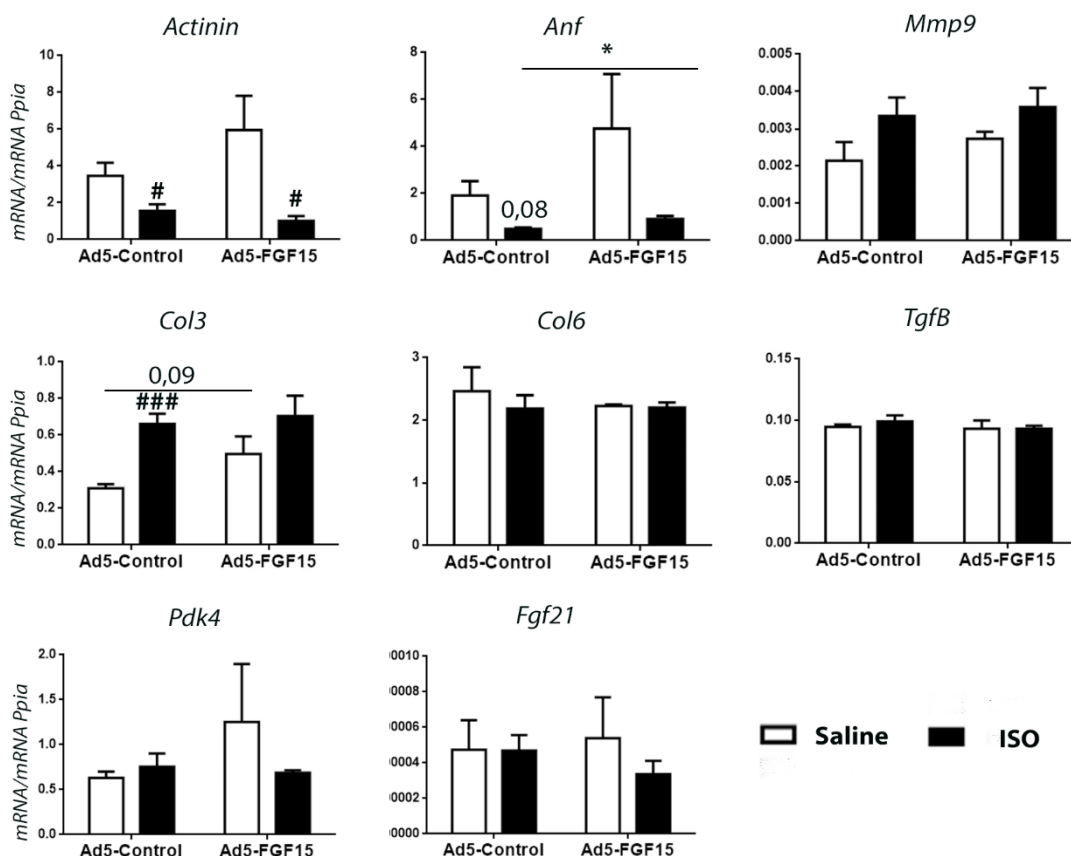
El tratamiento con ISO aumentó tanto el peso del corazón como el área de sus cardiomiocitos. El peso del corazón no se vio modificado por efecto de la sobreexpresión de Ad5-FGF15. Por otra parte, se pudo comprobar cómo la sobreexpresión de *Fgf15* en

estos ratones sí provocaba un aumento del área de los cardiomiocitos, tanto en el tratamiento con salino como con ISO (Figura 58).



**Figura 58. La sobreexpresión de FGF15 no provoca cambios significativos en el peso de los corazones pero sí en el área de los cardiomiocitos en condiciones basales y de inducción de hipertrofia por ISO.** Ratones Ad5-Control y Ad5-FGF15 fueron tratados durante 7 días con salino e ISO y alimentados con una dieta estándar. **A.** Pesos de los corazones de ratones en el momento del sacrificio. **B.** Área de los cardiomiocitos (CMA) expresada en  $\mu\text{m}^2$ . **C.** Secciones histológicas de corazones representativas teñidas con hematoxilina y eosina (H&E). 20x aumentos, escala 50  $\mu\text{m}$ ). Los resultados se expresan como media  $\pm$  SEM ( $n = 5$ ). Análisis estadísticos realizados con t-student. # muestra diferencias entre tratamiento y \* diferencias entre adenovirus. En el caso del peso del corazón, se ha realizado un análisis two way ANOVA.

Ahora bien, los resultados obtenidos en cuanto a la expresión de genes relacionados con la hipertrofia, la fibrosis o el metabolismo cardíaco no mostraban diferencias a causa de la sobreexpresión de FGF15 (Figura 59) y solo se apreció una tendencia no significativa a una mayor expresión de *Actinin*, *Anfy* y *Pdk4* en respuesta a Ad5-FGF15 en ausencia de ISO.



**Figura 59. La sobreexpresión de FGF15 no influye en la expresión de genes relacionados con la hipertrofia cardíaca.** En la figura se muestran niveles de expresión de RNAm de diferentes genes relacionados con la hipertrofia (*Actinin* y *Anf*), con la fibrosis (*Mmp9*, *Col3*, *Col6* y *TgfB*) y con el metabolismo (*Pdk4* y *Fgf21*). Los resultados se expresan como media  $\pm$  SEM (n = 5). Análisis estadísticos realizados con t-student. # muestra diferencias entre tratamientos y \* diferencias entre adenovirus (\* p<0,05; # p<0,05; ### p <0,01; ### p <0,001). También se analizó diferencias entre factores mediante el test two-way ANOVA.

Al analizar otros genes del metabolismo cardíaco no se observaron grandes diferencias entre animales inyectados con Ad5-Control y Ad5-FGF15. Los animales con sobreexpresión de FGF15 mostraban unos niveles de expresión más elevados de *Acadm* (con una p=0,06 para el factor “Ad5-FGF15” mediante con two-way ANOVA) y de *Cpt1b*. Por otro lado, los animales tratados con Ad5-FGF15 e ISO mostraban una mayor expresión de *Glut1*, sugiriendo un aumento de la entrada de glucosa al cardiomiocito, con una p<0,0001 debido a la sobreexpresión de FGF15 según two-way ANOVA (tabla 31).



**Tabla 31. Niveles de expresión de mRNA de genes relacionados con el metabolismo cardíaco.** Todos los resultados se expresan como media  $\pm$  SEM (n=5 por grupo). Análisis estadístico realizado por t-student. # muestra diferencias entre tratamiento y \* diferencias entre adenovirus (\* p<0,05; # p<0,05; ## p <0,01)

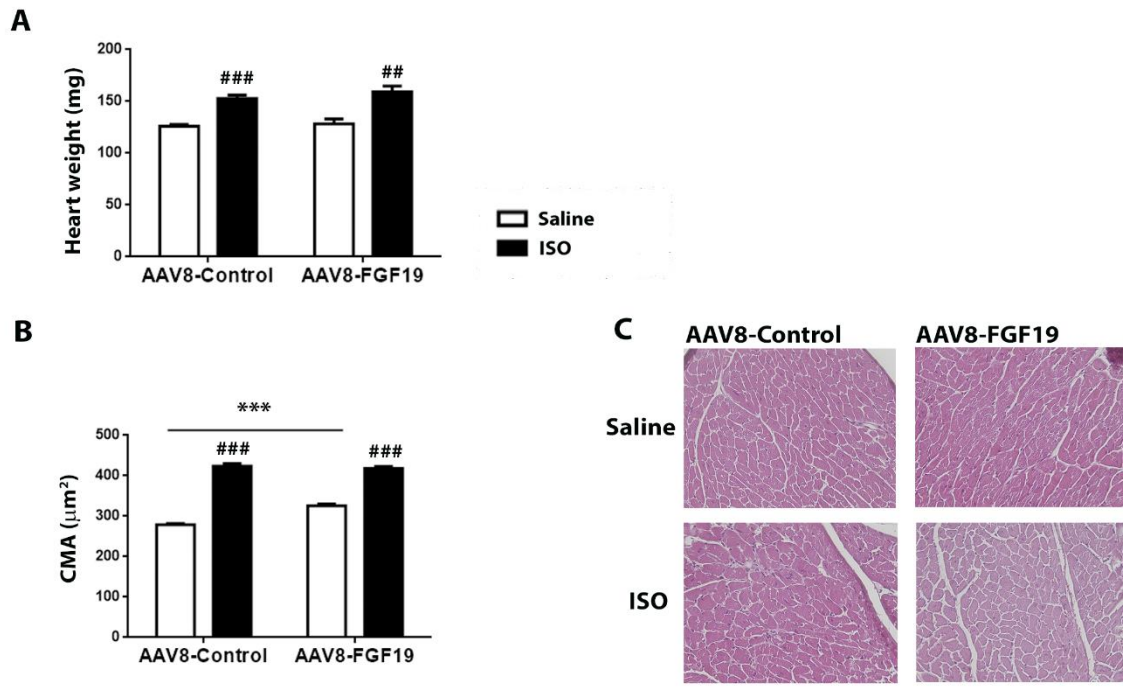
	Ad5-Control		Ad5-FGF15	
	Salino	ISO	Salino	ISO
<b>Acadm</b>	4,03 $\pm$ 0,35	2,78 $\pm$ 0,27 #	4,64 $\pm$ 0,46	3,64 $\pm$ 0,34 (*p=0,08)
<b>Cpt1b</b>	2,98 $\pm$ 0,14	2,05 $\pm$ 0,19 ##	3,04 $\pm$ 0,37	2,75 $\pm$ 0,31 (*p=0,09)
<b>Slc2a1 (Glut1)</b>	0,171 $\pm$ 0,009	0,179 $\pm$ 0,015	0,184 $\pm$ 0,010	0,326 $\pm$ 0,032
<b>Ppargc1a</b>	0,86 $\pm$ 0,08	0,76 $\pm$ 0,20	0,95 $\pm$ 0,11	0,98 $\pm$ 0,15

Teniendo en cuenta otra vez las diferencias funcionales entre FGF15 y su ortólogo en humanos FGF19, se llevó a cabo la misma aproximación pero, esta vez, mediante la infección de ratones con el virus adeno-asociado con la construcción de *FGF19*. Se inyectaron ratones WT C57BL/6J con la construcción AAV8-Control o AAV8-FGF19, provocando una sobreexpresión de FGF19 durante 3 semanas. En el transcurso de la última semana, se implantaron las bombas osmóticas para realizar el tratamiento con salino o con ISO y así provocar hipertrofia cardíaca (Tabla 32).

**Tabla 32. Caracterización de animales AAV8-Control y AAV8-FGF19 tratados durante 7 días con salino o ISO.** En la tabla se muestran los datos concernientes a los pesos de los animales y parámetros metabólicos. Todas las medidas se expresan como media  $\pm$  SEM (n = 6). Análisis estadísticos realizados con t-student. # muestra diferencias entre tratamiento y \* diferencias entre virus adeno-asociado (\* p<0,05; \*\* p <0,01; \*\*\* p <0,001; # p<0,05; ## p <0,01; ### p <0,001).

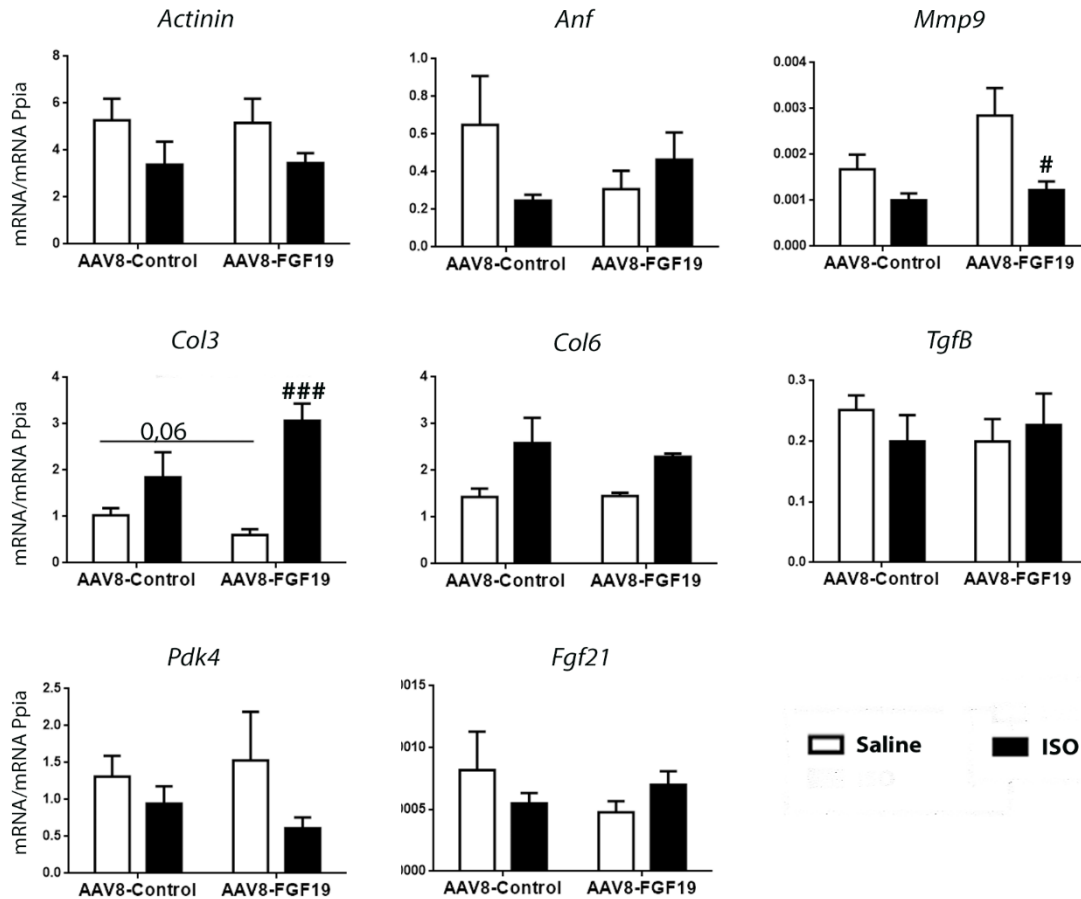
	AAV8-Control		AAV8-FGF19	
	Saline	ISO	Saline	ISO
<b>Peso corporal (g)</b>	27,9 $\pm$ 0,8	27,9 $\pm$ 0,5	26,8 $\pm$ 0,5	26,7 $\pm$ 0,5
<b>TAM interescapular (mg)</b>	93,3 $\pm$ 10,3	74,4 $\pm$ 1,5	66,7 $\pm$ 4,1*	79,7 $\pm$ 6,1
<b>TABi (mg)</b>	290,1 $\pm$ 16,6	168,32 $\pm$ 10,8###	229,5 $\pm$ 5,9**	211,4 $\pm$ 8,8*
<b>TABe (mg)</b>	300,5 $\pm$ 24,8	130,2 $\pm$ 13,6####	180,8 $\pm$ 9,3***	148,9 $\pm$ 8,1#
<b>Hígado (mg)</b>	1354,4 $\pm$ 80,5	1490,6 $\pm$ 39,2	1288,8 $\pm$ 53,5	1342,4 $\pm$ 37,9 *
<b>Glucosa (mg/dL)</b>	168,6 $\pm$ 7,7	153,1 $\pm$ 11,5	159,6 $\pm$ 8,6	147,2 $\pm$ 10,2
<b>Triglicéridos (mg/dL)</b>	127,7 $\pm$ 20,7	73,6 $\pm$ 2,1 #	113,0 $\pm$ 11,4	93,7 $\pm$ 7,4 *
<b>FGF21 (pg/mL)</b>	46,6 $\pm$ 35,3	82,9 $\pm$ 54,3	65,6 $\pm$ 30,0	25,4 $\pm$ 10,7

El tratamiento con ISO provocó un aumento del peso del corazón y del área de los cardiomiocitos tanto en los ratones AAV8-Control como en los AAV8-FGF19, confirmando el progreso de la hipertrofia cardíaca en los ratones tratados con ISO. En cuanto a la sobreexpresión de FGF19, tal como sucedió anteriormente con los ratones con sobreexpresión de *Fgf15*, los ratones inyectados con el AAV8-FGF19 tenían una mayor área de sus cardiomiocitos, aunque en este caso solamente sucede en los ratones tratados con salino. La sobreexpresión de FGF19 no parece potenciar la hipertrofia provocada por ISO (Figura 60).



**Figura 60. La sobreexpresión de FGF19 no provoca cambios en el peso de los corazones pero sí en el área de los cardiomiocitos en hipertrofia (por ISO).** Ratones AAV8-Control y AAV8-FGF19 fueron tratados durante 7 días con salino e ISO y alimentados con una dieta estándar. **A.** Pesos de los corazones de ratones en el momento del sacrificio. **B.** Área de los cardiomiocitos (CMA) expresada en  $\mu\text{m}^2$ . **C.** Secciones histológicas de corazones representativas teñidas con hematoxilina y eosina (H&E). 20x aumentos, escala 50  $\mu\text{m}$ ). Los resultados se expresan como media  $\pm$  SEM ( $n = 5$ ). Análisis estadísticos realizados con t-student. # muestra diferencias entre tratamiento y \* diferencias entre virus adeno-asociado. En el caso del peso del corazón, se ha realizado un análisis two way ANOVA (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; #  $p < 0,05$ ; ##  $p < 0,01$ ; ###  $p < 0,001$ ).

En cuanto a la expresión de genes marcadores de hipertrofia (*Actc1*, *Anf*), la fibrosis (*Mmp9*, *Col3*, *Col6*, *TgfB*) y el metabolismo cardíaco (*Pdk4*), tal como sucedía en el modelo de sobreexpresión de *Fgf15*, no se observan diferencias en la expresión de estos genes entre ratones AAV8-Control y AAV8-FGF19 (Figura 61).



**Figura 61. Efectos de la sobreexpresión de FGF19 sobre la expresión de genes relacionados con la hipertrofia cardíaca.** En la figura se muestran niveles de expresión de RNAm de diferentes genes relacionados con la hipertrofia (*Actinin* y *Anf*), con la fibrosis (*Mmp9*, *Col3*, *Col6* y *TgfB*) y con el metabolismo (*Pdk4* y *Fgf21*). Los resultados se expresan como media  $\pm$  SEM (n = 5). Análisis estadísticos realizados con t-student. # muestra diferencias entre tratamientos y \* diferencias entre virus adeno-asociado (# p<0,05; ## p <0,01; ### p <0,001). También se analizó diferencias entre factores mediante el test two-way ANOVA.

Al analizar otros genes del metabolismo cardíaco no se observaron grandes diferencias entre animales inyectados con AAV8-Control y AAV8-FGF19 (Tabla 33). En esta ocasión solamente se observaron diferencias de expresión en el caso de *Glut1*, ya que los animales tratados con ISO y con sobreexpresión de FGF19 mostraban un aumento de la expresión de este transportador, indicando posiblemente un aumento de la entrada de glucosa dentro del cardiomiocito, tal como pasaba en el caso los animales con sobreexpresión de FGF15 (p=0,0095 por la sobreexpresión de FGF19 con two-way ANOVA).

**Tabla 33. Niveles de expresión de mRNA de genes relacionados con el metabolismo cardíaco.** Todos los resultados se expresan como media  $\pm$  SEM (n=6 por grupo). Análisis estadístico realizado por t-student. # muestra diferencias entre tratamiento y \* diferencias entre adenovirus (\* p<0,05; # p<0,05; ## p <0,01)

	AAV8-Control		AAV8-FGF19	
	Salino	ISO	Salino	ISO
<b>Acadm</b>	8,91 $\pm$ 1,81	3,95 $\pm$ 0,22 #	9,35 $\pm$ 0,79	4,90 $\pm$ 0,55
<b>Cpt1b</b>	4,02 $\pm$ 0,28	2,31 $\pm$ 0,21 ##	5,08 $\pm$ 0,59	2,55 $\pm$ 0,23 ##
<b>Slc2a1 (Glut1)</b>	0,19 $\pm$ 0,01	0,17 $\pm$ 0,02	0,21 $\pm$ 0,02	0,28 $\pm$ 0,02 #*
<b>Ppargc1a</b>	1,39 $\pm$ 0,17	1,07 $\pm$ 0,18	1,74 $\pm$ 0,18	1,23 $\pm$ 0,18 (#p=0,07)

Los modelos *in vivo* que hemos llevado a cabo nos han indicado que la sobreexpresión de FGF15 o FGF19, o el efecto directo de estos sobre el corazón, no provoca grandes cambios en la hipertrofia cardíaca, con escasas modificaciones en el perfil de expresión génica. Se vieron afectaciones claras a nivel del área de los cardiomiocitos y se observaron algunos cambios en genes clave del metabolismo de los cardiomiocitos. Sin embargo, la ausencia de Fgf15 sí que provoca grandes cambios en la hipertrofia (sobre todo en la hipertrofia cardíaca fisiológica), sugiriendo que la presencia sistémica de FGF15/19 es necesaria para el desarrollo de hipertrofia cardíaca, pero no es inductora por sí misma.

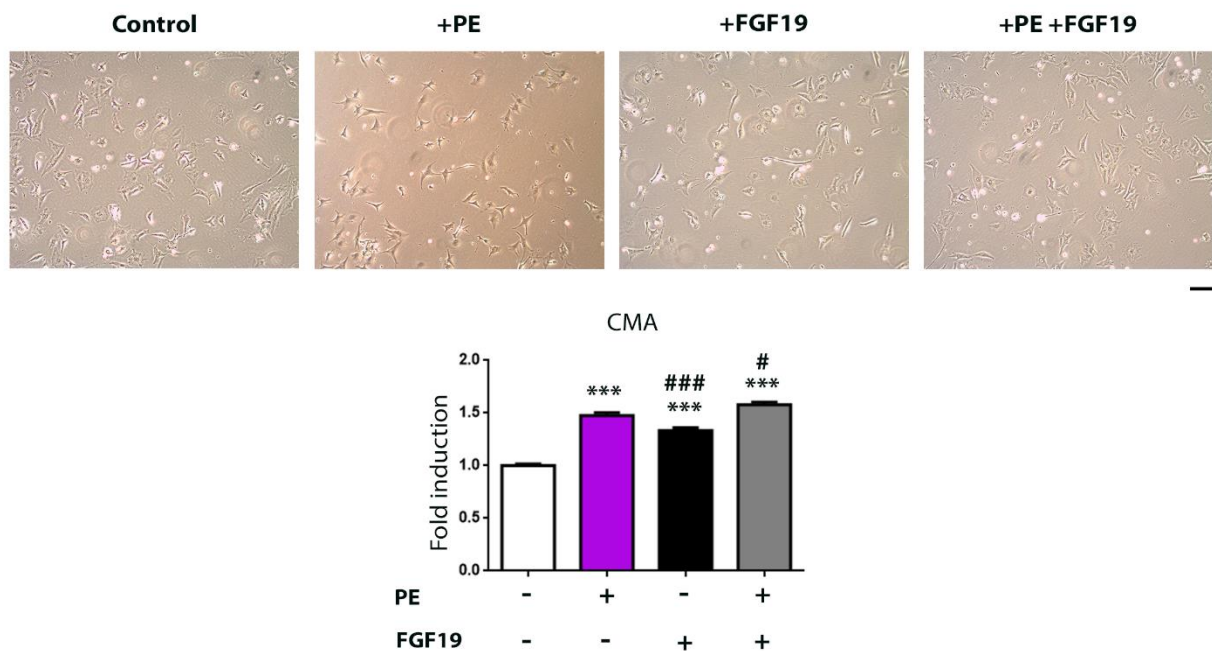
## 6. Efectos del tratamiento con FGF19 en cultivos primarios de cardiomiocitos.

La evaluación de un posible efecto directo de FGF15 sobre los cardiomiocitos, tal como sucedía en la primera parte de los resultados con el estudio de sus efectos sobre adipocitos, se encuentra obstaculizada por la falta de proteína FGF15 recombinante. En este caso, se utilizó un sistema heterólogo para determinar si FGF19, como ortólogo de FGF15, podía tener un efecto sobre células cardíacas.

Se realizaron cultivos primarios de cardiomiocitos neonatales (NCMs) de rata, modelo óptimo para estudios *in vitro* de hipertrofia de cardiomiocitos. Una vez diferenciadas, las NCMs se pretrataron con FGF19 durante 24 horas. Al finalizar el pretratamiento, las

células fueron tratadas con fenilefrina (PE) durante 24 horas a fin de inducen su hipertrofia (n=3).

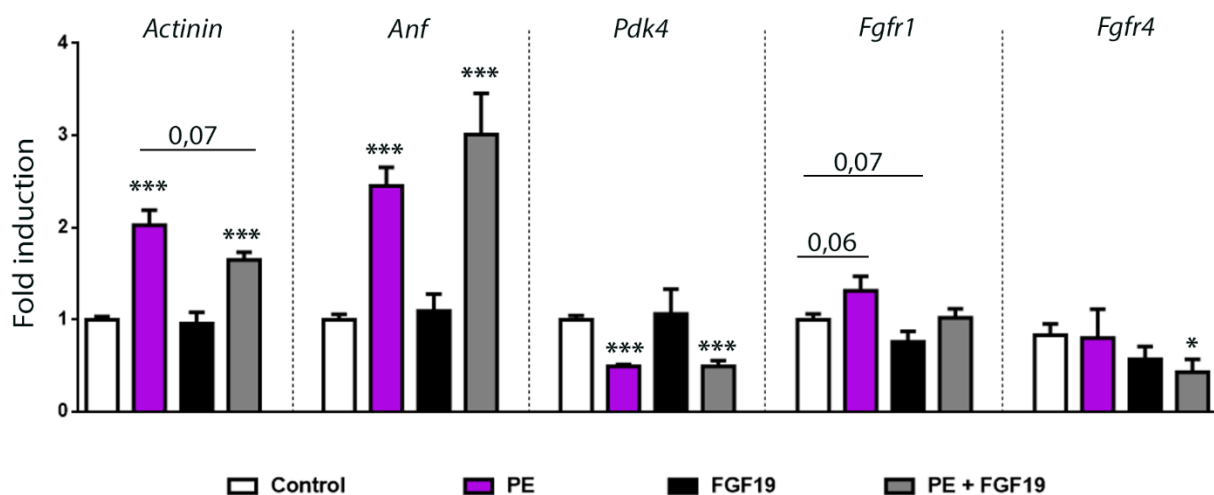
Se realizaron fotografías con microscopio y se cuantificaron las áreas de los cardiomiocitos. En ellas se pudo observar como el tratamiento con PE provocó un aumento del área de los cardiomiocitos, demostrando así la efectividad del modelo de inducción de hipertrofia cardíaca. Ahora bien, el tratamiento con FGF19 también produjo un aumento del área de los cardiomiocitos, aunque en menor grado que la PE. En los cardiomiocitos con ambos tratamientos, el tamaño de los cardiomiocitos fue incluso mayor, sugiriendo un efecto sinérgico (Figura 62).



**Figura 62. Los NCMs sufren un aumento de tamaño al ser tratadas con FGF19.** Las células fueron tratadas con FGF19 (50 ng/ml) durante 24 horas. Posteriormente, fueron tratadas con PE (10  $\mu$ M) durante 24 horas. En la figura se muestran imágenes representativas (100  $\mu$ m escala) de NCMs a diferente condición y la cuantificación de su área (CMA). Resultados expresados como grados de inducción, media  $\pm$ SEM (n=3). Análisis estadístico realizado con t-student. \* para comparaciones con el control y # para comparaciones con PE (\* p<0,05; \*\* p <0,01; \*\*\* p<0,001; # p<0,05; ## p <0,01; ### p<0,001).

La expresión de genes marcadores de hipertrofia cardíaca, como *Actinin* y *Anf*, mostraron que la PE había funcionado como era esperable y los NCMs habían sufrido un proceso de hipertrofia. En el caso de *Actinin*, el pretratamiento con FGF19 produjo un ligero

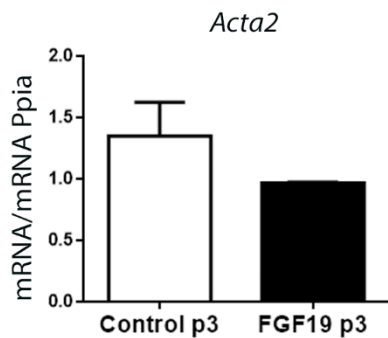
descenso de su expresión, aunque no de forma significativa ( $p = 0,07$ ). En cuanto a *Anf*, no hubo cambios: se produjo un incremento de su expresión en células tratadas con PE, independientemente del tratamiento con FGF19. *Pdk4*, *Fgfr1* y *Fgfr4* no mostraron cambios en su expresión tras el tratamiento con FGF19 (Figura 63). Así pues, la observación de un efecto hipertrófico de FGF19 sobre los cardiomiocitos observado en base a su tamaño no tuvo concordancia en cuanto a marcadores de expresión génica.



**Figura 63. El tratamiento con FGF19 no provoca cambios en la expresión de genes relacionados con la hipertrofia en NCMs.** Análisis de la expresión génica de *Actinin*, *Anf*, *Pdk4*, *Fgfr1* y *Fgfr4*. Resultados expresados como grados de inducción, media  $\pm$ SEM ( $n=3$ ). Análisis estadístico realizado con t-student. \* para comparaciones con el control y # para comparaciones con PE (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).

Otro tipo celular existente en los corazones son los fibroblastos cardíacos, que juegan un papel importante en la fibrosis y en procesos de remodelación del tejido. A fin de evaluar si FGF19 pudiera tener una acción directa en este tipo celular, se obtuvieron fibroblastos procedentes de corazón de neonato de rata y se estudiaron a fase 3 del cultivo, situación en que son considerados como miofibroblastos (fibroblastos que se encuentran en el corazón en una situación de fibrosis). Estos fueron tratados durante 24 horas con FGF19 y, a fin de evaluar su respuesta, se analizaron los niveles de  $\alpha$ -Smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA o Acta2), gen que sobreexpresan estos miofibroblastos una vez activados. Los

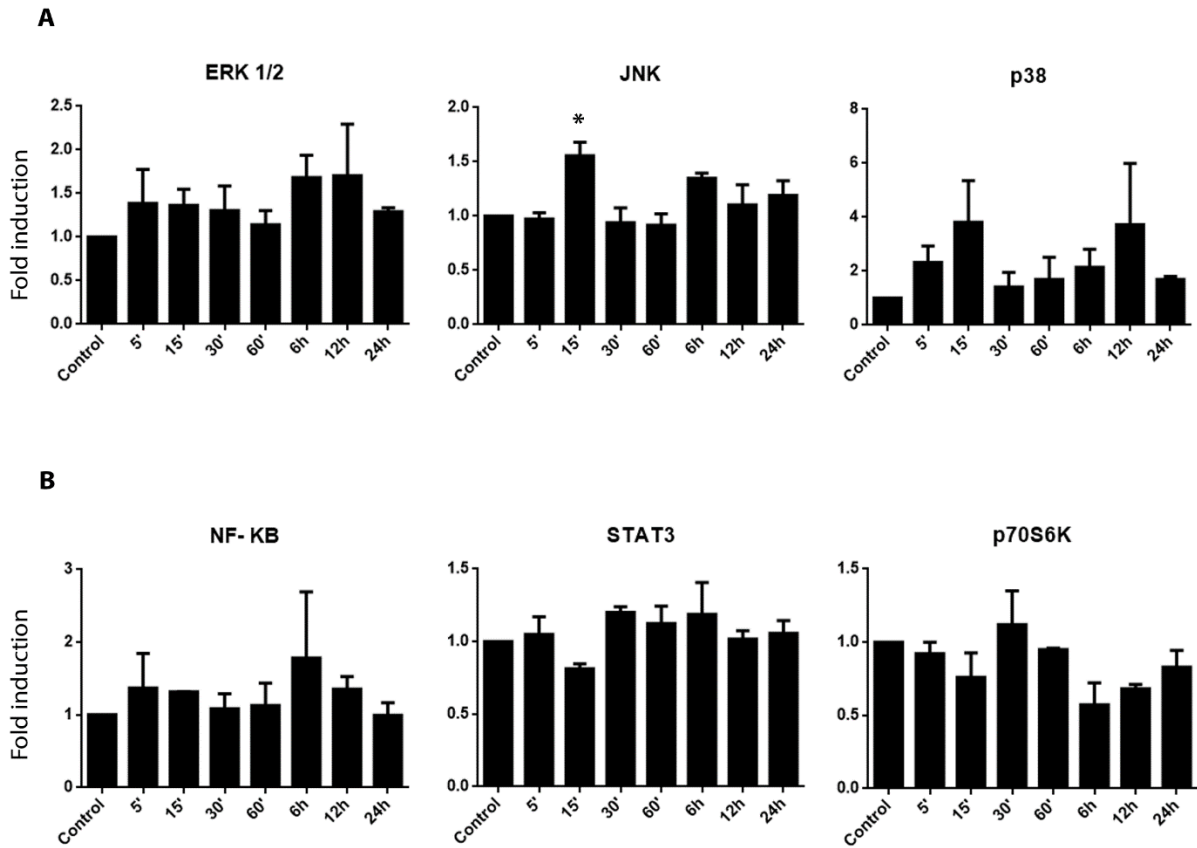
resultados obtenidos muestran cómo el tratamiento con FGF19 no provoca cambios significativos en la expresión de *Acta2* en los miofibroblastos (figura 64).



**Figura 64. El tratamiento con FGF19 no provoca cambios significativos en la expresión de *Acta2* en miofibroblastos (fibroblastos de pase 3).** Análisis de la expresión génica de *Acta2*. Resultados expresados como grados de inducción, media  $\pm$ SEM. Análisis estadístico realizado con t-student. \* para comparaciones con el

A fin de determinar a través de qué vía de señalización FGF19 podía actuar sobre las NCMs (y llegar a provocar cambios tales como el aumento en su tamaño), se incubaron NCMs con FGF19 a diferentes tiempos (5', 15', 30', 60', 6 h, 12 h, y 24 h) y, utilizando un sistema Multiplex, se analizaron diferentes proteínas (quinasas y sustratos) cuyo estado de fosforilación es indicativo de distintas vías intracelulares de regulación: AKT, ERK, JNK, NF- $\kappa$ B, p38, CREB, p70S6K, STAT3 y STAT5. El sistema Multiplex permite obtener un ratio de señal entre la forma fosforilada y la total, proporcionando información sobre el grado de activación de cada vía. Las cinasas ERK1/2, JNK y p38 mostraron un incremento en su fosforilación tras el tratamiento con FGF19 (Figura 65A). En el caso de las otras proteínas, como es el caso de NF- $\kappa$ B, STAT3 o p70S6K, no se observaron cambios en el grado de fosforilación (Figura 65B).





**Figura 65. La exposición de los NCMs con FGF19 provoca cambios en la fosforilación de diferentes cinasas. A. Cinasas con un aumento en su fosforilación. B. Cinasas que no muestran cambios al tratamiento con FGF19. Resultados expresados como grados de inducción, media  $\pm$ SEM. Análisis estadístico realizado con t-student. Comparaciones realizadas con el grupo control (\*  $p < 0,05$ ).**

**Discusión:**  
**FGF15/19 y la plasticidad en  
tejido adiposo**



Estudios realizados en nuestro laboratorio habían indicado que la concentración de FGF19 en sangre correlaciona negativamente con distintos parámetros biométricos como la obesidad o el BMI, haciendo de FGF19 un potencial marcador para estudios de obesidad (Gallego-Escuredo et al., 2015). En las muestras analizadas en esta tesis doctoral, se replicaron estos resultados en una segunda cohorte independiente. Además, también se dispuso de muestras de tejido adiposo subcutáneo de esta misma cohorte de pacientes. El análisis de la expresión génica (mRNA) de distintos genes indicó que los niveles de FGF19 correlacionaban positivamente con los niveles de expresión de los marcadores termogénicos (de *browning*) *UCP1* y *DIO2*. Así, observamos que a mayor concentración de FGF19 sistémico, mayor era la expresión de *UCP1* en tejido adiposo subcutáneo y, por tanto, mayor era el *browning* de este tejido.

Al ver estos resultados prometedores en humanos, se decidió estudiar en mayor profundidad la relación entre FGF19 y la activación termogénica de los tejidos adiposos y el papel positivo que FGF19, y su ortólogo en ratón FGF15, pueden ejercer sobre esta. Así, gracias a la disponibilidad del modelo de ratón deficiente en este gen, *Fgf15*-null, se decidió estudiar las consecuencias de la invalidación de *Fgf15* en la biología de los tejidos adiposos, primeramente en condiciones estándar de temperatura (21 °C).

Los ratones *Fgf15*-null mostraron un aumento de la enzima limitante de la síntesis de ácidos biliares, la colesterol-7- $\alpha$ -hidroxilasa (*Cyp7a1*), confirmando así el modelo: el *feedback* negativo que controla la síntesis de ácidos biliares por FGF15 se encuentra impedido en los ratones *Fgf15*-null (Wu et al., 2018). Los ratones *Fgf15*-null cuentan con sistemas alternativos de control de síntesis y absorción/secreción de ácidos biliares que garantizan la viabilidad del modelo, como el mecanismo de autorregulación de los propios ácidos biliares sobre su síntesis en hígado o los mediados por TGR5 (Wright et al., 2004). El hecho de que en nuestra caracterización el modelo *Fgf15*-null no se observen diferencias en los ácidos biliares totales, no excluye que pudiese haber diferencias entre las distintas especies de estos.

El tejido adiposo marrón (TAMi) de ratones *Fgf15*-null no mostró cambios significativos, ni a nivel de morfología de los adipocitos, ni a expresión génica de marcadores de termogénesis. La temperatura de la región interescapular, correspondiente con la temperatura del TAMi (Crane et al., 2014) tampoco mostraba diferencias, por lo que

asumimos que el déficit de *Fgf15* no alteraba la actividad termogénica del tejido adiposo marrón “clásico”.

Ahora bien, el tejido adiposo blanco subcutáneo (TABi) sí mostró cambios debidos a la deficiencia de *Fgf15*. Los ratones *Fgf15*-null tenían una menor adiposidad en los tejidos adiposos blancos, aunque el tamaño de los adipocitos era mayor, indicando una posible hipertrofia de los adipocitos blancos. Por otro lado, los niveles de expresión de *Ucp1*, *Dio2* y *Ppargc1a* (PGC1- $\alpha$ ) eran menores, indicando un descenso del *browning* de este tejido. Sin embargo, este cambio en el *browning* no modifica la temperatura de la zona inguinal. Cabe matizar que la temperatura de superficie medida por termografía infrarroja en la región interescapular es un método común en la bibliografía, validado como medida de la actividad termogénica local del TAMi (Crane et al., 2014). En cambio, el mismo método, midiendo la zona inguinal, relacionando la temperatura indicada con la actividad termogénica del TABi, está menos consolidada y la falta de cambios observada en nuestro modelo debe tomarse con cierta reserva.

El modelo de mantenimiento de los animales a temperatura ambiente de 21 °C permitió observar que el TAMi no se encuentra significativamente afectado debido a la falta de FGF15 mientras que el TABi, tejido sensible en el que se produce el fenómeno de *browning*, sí muestra una expresión disminuida de los marcadores termogénicos, mostrando un posible impedimento del *browning*. Esto nos indicaría que FGF15 participa de la adaptación termogénica del TABi de ratones mantenidos a 21 °C (temperatura ambiente), en la que el ratón se halla en un estado de necesidad moderada de actividad termogénica. En este sentido, se ha descrito que BAR502, un agonista dual de FXR y GPBAR1 que entre otros efectos induce la síntesis de FGF15, promueve el *browning* del tejido adiposo blanco (Cariño et al., 2017). Otro agonista específico del FXR intestinal, el fexaramide, también estimula el *browning* y reduce la obesidad y la resistencia a la insulina (Fang et al., 2015).

A la luz de las moderadas alteraciones presentes en ratones mantenidos a 21 °C, se decidió estudiar la capacidad de respuesta de estos ratones a un desafío termogénico severo: temperatura ambiental de 4 °C durante una semana, procedimiento considerado como un estímulo crónico de frío (Cereijo et al., 2018). Aunque los ratones se adaptaron bien a la temperatura y no mostraron signos evidentes de hipotermia, tras la exposición

al frío, los ratones *Fgf15*-null mantuvieron una mayor masa de tejido adiposo y una mayor concentración de insulina en comparación a los niveles de los WT a 4 °C y de los mismos *Fgf15*-null a temperatura ambiente, evidenciado como el efecto sensibilizador de la insulina por frío en estos ratones se encontraba impedido (ref). Se ha visto cómo la administración de FGF19 mejora la sensibilidad a insulina, mejorando a su vez la homeostasis de la glucosa (Antonellis et al., 2019). De manera que, la falta en este caso de FGF15 en estos ratones, impide el efecto sensibilizador de la insulina por frío, explicando posiblemente las diferencias en la concentración de insulina observadas en nuestros resultados. Cabe recordar que la actividad del TA es cuantitativamente muy relevante al comparar tejidos en cuanto a la captación de glucosa global en respuesta a la insulina en los roedores.

Por otro lado también analizamos el proceso de adaptación de ratones *Fgf15*-null de 21 °C a 30 °C, que corresponde con la temperatura de termoneutralidad en ratones, temperatura a la que la termogénesis se encuentra totalmente inactivada (Altshire-Keylin et al., 2016; Cairó et al., 2019). A pesar de que los ratones no mostraban cambios en el peso corporal, la adiposidad sí se encontraba aumentada, acompañada de un descenso en la concentración de triglicéridos y de NEFA. Una de las funciones en hígado de FGF15 es la inhibición de la lipogénesis. Sin FGF15, puede que se esté favoreciendo este proceso y ello comporte un aumento del tamaño del tejido adiposo. La administración de FGF19 en ratones reduce la adiposidad y el tamaño de los depósitos de tejido adiposo, independientemente de la energía consumida (Antonellis et al., 2019; Ling Fu et al., 2004; Tomlinson et al., 2002). Así, la falta de FGF15 en este contexto puede provocar el aumento de la adiposidad, evidenciado por el tamaño de los depósitos de tejido adiposo, observada en los animales *Fgf15*-null mantenidos a 30 °C en comparación con los WT a la misma temperatura.

La expresión de genes marcadores de termogénesis en el TAM aumentaba a 4 °C en ratones WT y *Fgf15*-null, aunque la expresión de alguno de ellos, como *Dio2*, se encuentra levemente impedida en ratones *Fgf15*-null. Sin embargo, al estar los niveles de UCP1, principal marcador termogénico (Nicholls et al., 1984), tanto a nivel proteico como de expresión génica sin alterar en ratones *Fgf15*-null no podemos afirmar que la termogénesis en el TAM se encuentre impedida.

El TAM no solamente es un órgano productor de calor, sino también un órgano endocrino secretor de las llamadas batocinas (Villarroya et al., 2016; Villarroya et al., 2019). A pesar de no detectar cambios en *Fgf21* (Cuevas-Ramos et al., 2019), al analizar la expresión de otras batocinas estudiadas previamente en nuestro laboratorio, *Cxcl14* (Cereijo et al., 2018) y *Gdf15* (Campderrós et al., 2019), observamos cómo su expresión se reducía significativamente en ratones *Fgf15*-null expuestos a 4 °C, sobre todo en el caso de *Cxcl14*. Este hecho indica que, a pesar de que la función termogénica del tejido no se encuentra impedida, la función del TAM como órgano secretor de batocinas sí se encontraría afectada.

El análisis del TABi de los ratones mantenidos a 4°C, sí mostró alteraciones en su activación termogénica debido a la falta de FGF15. Así como los ratones WT mostraban un *browning* masivo al ser mantenidos a 4 °C, esta activación se encuentra fuertemente impedida en ratones *Fgf15*-null. Por otro lado, aunque la temperatura en la región del TAM de estos ratones no mostró diferencias, en el TABi sí presentaba una cierta tendencia a ser menor. Además, en el caso del TABi, las regiones con temperatura alta máxima son menores, tal como se puede observar en la Figura 33.

En el TABe, aunque es un depósito no tan propenso al *browning* como el TABi (Seale et al., 2011), también muestra un impedimento, de manera que la alteración en el *browning* presente en animales *Fgf15*-null se produce tanto en TAB subcutáneo como visceral.

Con el modelo de frío pudimos observar cómo la adaptación termogénica en ratones *Fgf15*-null se encuentra alterada, ya que existe un impedimento en la capacidad de inducción del *browning* en TAB (tanto a nivel morfológico como a nivel de marcadores de termogénesis) de estos ratones sometidos a un desafío termogénico. Al analizar las batocinas secretadas por el TAM vimos cómo su expresión se encuentra impedida, sobre todo en el caso de *Cxcl14*. Esta batocina es expresada por adipocitos marrones y, cuando el tejido se activa, es capaz de atraer macrófagos y polarizar a los macrófagos infiltrados en el tejido a M2, fenotipo que favorece y mantiene la actividad termogénica en el TAM. Por otro lado, CXCL14 también polariza los macrófagos a M2 y favorece el *browning* en el TABi, promoviendo la aparición de adipocitos beige. Además de este efecto endocrino, tanto los adipocitos marrones clásicos del TAM como los beige del TABi liberarán CXCL14 con función paracrina, manteniendo la respuesta y la termogénesis (Cereijo et

al., 2018). De manera que, la disminución de CXCL14 en ratones *Fgf15*-null puede estar contribuyendo al impedimento del *browning* que muestran en el TAB. La otra batocina analizada, *Gdf15*, es liberada por los adipocitos marrones y actúa de forma paracrina sobre los macrófagos residentes en el TAM, favoreciendo la disminución de marcadores inflamatorios (disminuyendo el fenotipo M1 de los macrófagos) y así ayuda a mantener la actividad termogénica. Al haber una disminución de *Gdf15* en ratones *Fgf15*-null, no se favorece la disminución de macrófagos de fenotipo M1 y, por tanto, no se favorece la respuesta termogénica (Villarroya et al., 2018; Campderrós et al., 2019). Así, la falta de *Fgf15* provoca una disminución de diversas batocinas favorecedoras de la respuesta termogénica, afectando así al *browning* del TAB. Esta actividad reguladora de FGF15 sobre la síntesis de adipocinas no sería la única, pues existen algunas evidencias que FGF15 puede regular la producción de adiponectina en adipocitos blancos, hormona con múltiples efectos beneficiosos, como la disminución de los lípidos intrahepáticos o efectos antiinflamatorios (Park et al., 2015; You et al., 2009). Esta es una posible razón del impedimento de la respuesta termogénica en los ratones *Fgf15*-null. Sin embargo, en el desarrollo de esta tesis doctoral no se ha identificado el mecanismo por el cual FGF15 puede estar regulando la síntesis de estas batocinas, ignorando si los efectos de FGF15 sobre el tejido adiposo pueden ser de forma directa sobre los propios adipocitos, o de forma indirecta, mediados por el SNS (Owen et al., 2014) o por batocinas.

Una vez realizados los experimentos anteriores basados en explorar los efectos de la “pérdida-de-función” experimental (*Fgf15*-null), abordamos la estrategia recíproca, basada en experimentos de “ganancia-de-función”. Para evaluar la función de FGF15 en el control de la termogénesis adaptativa, especialmente en la plasticidad del TAB para realizar *browning* y promover la aparición de adipocitos beige, se realizaron experimentos de sobreexpresión de FGF15 mediante la inyección de un vector adenoviral que contiene el cDNA completo de FGF15, logrando un sistema de producción heterólogo de FGF15. Este método es una alternativa a la falta de proteína recombinante utilizado comúnmente (Wei et al., 2008; Rao et al., 2014), como en nuestro caso. A causa de las limitaciones del modelo en cuanto a la falta de sistemas de detección de FGF15 en plasma, solamente se pudieron analizar los niveles expresión del mRNA de FGF15 en hígado, teniendo un aumento de más de 100 veces respecto a los controles. También



debemos tener en cuenta que estos niveles de FGF15 se suman a la propia expresión endógena de FGF15 en íleon y que la concentración en sangre de este se sabe que es de aproximadamente 6 ng/ml, detección realizada mediante espectrometría de masas tal como se indica en Kataguchi et al., 2015. Los ratones con sobreexpresión de FGF15 tuvieron niveles disminuidos de expresión hepática de *Cyp7a1*, evidenciando así que la acción biológica de FGF15 se inducía. Los ratones Ad5-FGF15 no mostraron cambios en el TAM. Sin embargo, en el TABi resultó que el aumento sistémico de FGF15 provocaba un aumento del *browning* en dicho depósito, siendo evidenciado tanto a nivel morfológico, de expresión de genes termogénicos y de niveles proteicos de UCP1.

Esta misma aproximación experimental de ganancia-de-función se abordó mediante la sobreexpresión de FGF19, con el fin de discernir las posibles diferencias funcionales existentes entre ambos ortólogos (Nishimura et al., 1999). En este caso la sobreexpresión fue mediada por un virus adeno-asociado de serotipo 8 (inclusión en hígado) portador de FGF19. Este método provocó una sobreexpresión de FGF19 a una concentración sistémica dentro del rango de los niveles fisiológicos descritos en humanos (Gallego-Escuredo et al., 2015). La sobreexpresión de FGF19 también llevó a una disminución de la expresión en hígado de *Cyp7a1*, confirmando el mantenimiento de la función biológica. No se evidenciaron cambios en el TAM. Sin embargo, en el TABi sí, tal como habíamos visto en el caso de FGF15: un aumento en la aparición de adipocitos multiloculares, un aumento en la expresión de marcadores génicos y un aumento a nivel proteico de UCP1, evidenciando un aumento del *browning* en el TABi.

Estos resultados concuerdan con lo visto anteriormente: el déficit de FGF15 provoca un impedimento en el *browning* (leve a temperatura ambiente y marcado en el caso de exposición al frío) y el aumento de FGF15/19 provoca un aumento en el *browning* del TAB, confirmando así el papel positivo de FGF15/19 sobre la respuesta termogénica.

Ahora bien, esta respuesta del tejido adiposo puede ser consecuencia de un efecto directo de FGF15 y FGF19 sobre el mismo tejido, o mediante una regulación de su actividad por vía indirecta, posiblemente por parte del sistema nervioso central, tal como ya se ha descrito en el caso de FGF21 (Owen et al., 2004). A fin de esclarecer esta cuestión, se utilizaron dos modelos experimentales, uno con un tratamiento crónico mediante inyecciones de CL316,243 (agonista específico  $\beta$ 3-adrenérgico) y otro con isoproterenol

(agonista no específico de los  $\beta$ -receptores) (Koryakina et al., 2014; Puzzo et al., 2016). El uso de estos dos agonistas adrenérgicos permitiría observar si una activación farmacológica directa de la función termogénica del TAM y TAB que, a diferencia del frío, es independiente de la acción del sistema nervioso central, requiere de la presencia de FGF15. En ratones *Fgf15*-null tratados con CL o con ISO no se observaron diferencias en la expresión de genes termogénicos debido a la falta de FGF15 ni en TAM ni en TAB, indicando que posiblemente los efectos positivos ejercidos por FGF15/19 no son directos, sino indirectos, sugiriendo que podrían implicar los mecanismos de activación del sistema nervioso simpático presentes a nivel central y que responden a la temperatura ambiental.

Al combinar los modelos de ganancia-de-función mediante la sobreexpresión de FGF15 con el uso del agonista adrenérgico ISO, se vio como en TABi, la combinación de ambos factores provocaba un aumento drástico de los niveles de expresión de genes termogénicos, mostrando un posible efecto sinérgico de ambas condiciones.

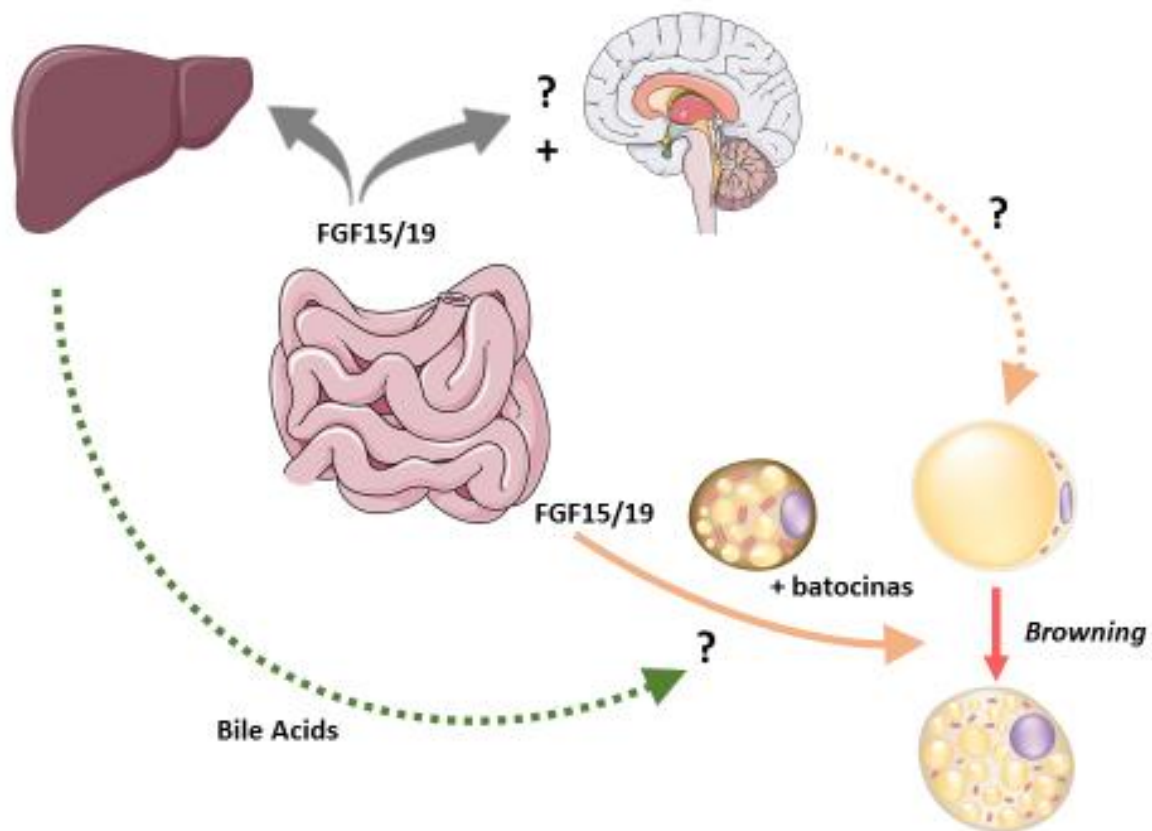
Otra posibilidad, viendo los efectos sobre los niveles de las batocinas CXCL14 y GDF15, es que el mecanismo mediante el cual FGF15/19 puede regular el *browning* en respuesta al frío no sean únicamente a través del SNS, sino con la participación de este tipo de batocinas (Campderrós et al., 2019; Cereijo et al., 2018; Villarroya & Vidal-Puig, 2013).

Tampoco se puede descartar que la falta de FGF15/19 provoque cambios en los niveles de las distintas especies de ácidos biliares a pesar de que no cambie los ácidos biliares totales. Se ha descrito que una exposición a frío provoca un aumento de la síntesis y secreción de ácidos biliares, los cuales mediante su acción a través de TGR5, provocan un aumento de la termogénesis en adipocitos marrones (Watannabe, 2006; Wothman, 2017). De esta manera, tampoco puede descartarse que parte de los efectos de FGF15/19 en la regulación de la termogénesis sean mediados por los ácidos biliares (Fong et al., 2015).

La administración de FGF19 puede provocar un cambio en las especies de ácidos biliares dentro de la composición total de estos (Martoni et al., 2015). Así, FGF19 puede reducir la adiposidad mediante la modulación de la absorción de lípidos, explicando los resultados obtenidos tanto en concentración de triglicéridos como en adiposidad. Por

otro lado, la activación mediante agonistas de FXR (receptor nuclear responsable de la expresión de *Fgf15*), provoca cambios en la composición de los ácidos biliares totales que, a su vez, se traduce como cambios en las especies de ácidos biliares (Sayin et al., 2013). Estos ácidos biliares provocan la activación de la expresión de *Dio2* mediante TGR5, mejorando la sensibilidad a insulina (Watanabe et al., 2006). Los cambios en los ácidos biliares implican cambios en la expresión de genes termogénicos, aumentando así la termogénesis del TAM y el *browning* del TAB (Carino et al., 2016; Fang et al., 2015). Los cambios en la expresión de FGF15/19, han provocado la disminución (en el caso de *Fgf15*-null) o el aumento (experimentos de sobreexpresión) de los genes termogénicos. De manera que, a pesar de que la vía principal de acción de FGF15/19 parece ser central, no es descartable una posible contribución mediante cambios en las especies de ácidos biliares como consecuencia de los efectos hepáticos de FGF15/19.

Una información que podía contribuir a clarificar los posibles efectos directos o indirectos de FGF15/19 era explorar si FGF15/19 tenían acción sobre adipocitos en cultivo, de forma totalmente *ex vivo*. La falta de disponibilidad en la comunidad científica de FGF15 recombinante excluía, para mantener un sistema homólogo a nivel de especie, el uso de cultivos murinos. Por este motivo, empleamos adipocitos beige humanos SGBS, modelo caracterizado previamente como útil para el estudio *in vitro* del *browning* (Wabiysch et al., 2001), y FGF19 recombinante. Las células SGBS mostraron sensibilidad a FGF19, tal como indica la inducción en la expresión de *Egr1*, que se considera un marcador de respuesta inmediata a FGFs (Adams et al., 2012). A pesar de ello, el tratamiento con FGF19 no modificó la expresión de genes relacionados con la maquinaria de FGF19 (receptores o correceptores). Sin embargo, la expresión de genes termogénicos no solo no aumentó sino que, de hecho, disminuyó tras el tratamiento con FGF19, lo cual sería contradictorio con los resultados obtenidos en los modelos animales que evidenciaban un papel positivo de FGF15/19 frente a la actividad termogénica. Estas observaciones refuerzan la idea de que la acción de FGF15/19 sobre las adaptaciones termogénicas no sería principalmente directa sobre el adipocito y que sus efectos beneficiosos se encuentran mediados, ya sea por el SNC o por otras proteínas como las batocinas.



**Figura 66. Esquema de las posibles vías de actuación de FGF15/19 en el tejido adiposo.**

Por otro lado, hemos observado en la presente tesis doctoral cómo la ausencia de FGF15 provoca un aumento de FGF21 a nivel de concentración sistémica. Se ha postulado que ambos FGFs endocrinos se regulan entre ellos y que pueden competir por los mismos receptores (Zhang, 2017). Además, en pacientes con obesidad, T2DM o infección con VIH, se comportan de una forma recíproca: cuando FGF21 aumenta, FGF19 disminuye (Gallego-Escuredo et al., 2015; Gallego-Escuredo et al., 2012). Sin embargo, ambos parecen tener una acción coordinada. De manera que, la falta de FGF15 en ratones puede provocar una sobreexpresión y un aumento de FGF21 a fin de mantener sus funciones.

Se ha postulado que los efectos de FGF19 y FGF21 sobre el metabolismo pueden deberse a su señalización a nivel central. La infusión de ambos FGFs en SNC provoca los mismos efectos que su administración sistémica, haciendo del hipotálamo su diana más probable. Además, el SNC cuenta con la maquinaria necesaria para su respuesta a FGF19 y FGF21: expresión tanto de los cuatro receptores de FGFs endocrinos como de  $\beta$ -Klotho, cofactor

necesario para la unión de los FGFs mencionados a su receptor (Antonellis et al., 2019). Además, FGF19 y FGF21 son capaces de traspasar la barrera hematoencefálica, siendo el SNC una de las dianas de acción más probable (Owen et al., 2015). Nuestros resultados refuerzan esta idea. Sin embargo, tal como ya se ha mencionado, no se pueden descartar otras vías indirectas de actuación de FGF15/19, mediante batocinas, ácidos biliares, o directas, ya que  $\beta$ -Klotho y FGFR4 se expresan en múltiples tejidos, como el adiposo. La falta de un anticuerpo funcional y de proteína recombinante FGF15, no ha permitido profundizar más en la identificación de los mecanismos de acción. Sin embargo, la posibilidad de crear medios condicionados con una alta concentración de FGF15 gracias al Ad5-FGF15 nos permitirá en un futuro seguir explorando los posibles efectos directos de esta proteína en modelos celulares de ratón.

**Discusión:**  
**FGF15/19 y la plasticidad en**  
**corazón**



En el contexto del estudio del papel de FGF15/19 en el desarrollo de la adiposidad, estudiamos los efectos de FGF15 en la adaptación metabólica a una dieta obesogénica. De manera interesante, otro de los efectos destacables aparte de la participación de FGF15 en el proceso de *browning* del tejido adiposo blanco, fue sobre el tamaño del corazón: los corazones de los ratones *Fgf15*-null alimentados con HFD eran significativamente de menor tamaño que los corazones de los WT bajo las mismas condiciones de dieta.

Al observar que la falta de FGF15 afectaba a la adaptación del corazón a una dieta rica en grasa, nos planteamos la posibilidad de que FGF15/19 pudiera tener un efecto relevante a nivel cardíaco. Con este propósito, analizamos los niveles sistémicos de FGF19 en muestras de pacientes con insuficiencia cardíaca o que habían sufrido un infarto de miocardio, observando cómo los niveles de FGF19 eran significativamente menores que en los controles sanos. Por otra parte, tal como sucedía en el caso de pacientes con obesidad, T2DM y VIH, los niveles de FGF21 se comportan de manera opuesta a los de FGF19 (Gallego-Escuredo et al., 2015; Gallego-Escuredo et al., 2012). Nuestros datos indican que FGF19 disminuye su concentración sistémica, postulándose así como potencial nuevo biomarcador de patología cardíaca.

Aprovechando los experimentos realizados con los métodos a nuestra disposición, procedimos a determinar el posible papel de FGF15/19 en corazón. Siguiendo con el modelo experimental de obesidad inducida por dieta, se pudo comprobar cómo no solamente el corazón de los ratones *Fgf15*-null era más pequeño que el de los ratones WT, sino que también lo era el área de sus cardiomiocitos (CMA). La disminución de la expresión de la actinina, gen marcador de hipertrofia cardíaca, en el corazón de los ratones *Fgf15*-null ( $p=0,05$  por two way ANOVA), confirmó los resultados vistos tanto por peso como por CMA. Sin embargo, otros genes marcadores de fibrosis y remodelación cardíaca no mostraron variaciones. El mayor efecto obtenido en corazón de *Fgf15*-null bajo HFD a nivel de expresión génica fue con respecto a *Pdk4*, gen que codifica por la enzima que inactiva la piruvato deshidrogenasa, inhibiendo la oxidación de la glucosa y, por tanto, fomentando la utilización de ácidos grasos. De manera que, a mayor expresión de *Pdk4*, mayor es la utilización de ácidos grasos y a menor expresión



de *Pdk4*, menor es la utilización de ácidos grasos y mayor la de glucosa como sustrato energético.

En nuestro caso, los animales WT bajo una dieta HFD tienen un aumento de la expresión de *Pdk4*, indicando una mayor utilización de ácidos grasos por parte de los cardiomiocitos, tal como está descrito en la bibliografía (Hsieh et al., 2008). Los ratones *Fgf15*-null, en cambio, no muestran dicho aumento por HFD, mostrando cierto impedimento delante del cambio de sustrato. Este perfil de respuesta es similar al que presenta *Fgf21*. Otros genes relacionados con el metabolismo cardíaco también se vieron afectados. En nuestro modelo experimental, los ratones WT aumentaban la expresión de *Acadm* (acil-CoA deshidrogenasa de cadena media, involucrada en la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos), *Cpt1b* (carnitina palmitoiltransferasa 1b, enzima que limita la incorporación de ácidos grasos en las mitocondrias) y *Ppargc1a* (controla la expresión de *Pdk4* y *Cpt1b*) bajo HFD (aunque de manera no significativa), reforzando la idea de que en este caso el sustrato energético preferente son los ácidos grasos. En cambio, esta adaptación no sucede en ratones *Fgf15*-null bajo las mismas condiciones de dieta: existe un impedimento del cambio de sustrato o de la propia utilización de los ácidos grasos en corazones de ratones *Fgf15*-null.

El mantenimiento de la capacidad contráctil y de la función del corazón en condiciones de hipertrofia depende en gran parte de su capacidad de adaptación a fin de que pueda cubrir la elevada demanda energética a la que se enfrenta. Dicha adaptación dependerá de cada situación y de cada estímulo, diferenciando así la hipertrofia patológica de la fisiológica (Strom et al., 2005). Normalmente, el sustrato preferente de un corazón en situación de hipertrofia patológica sería la glucosa pero en el caso de la hipertrofia inducida por obesidad es un tanto distinto. En este tipo de hipertrofia, en lugar de haber un descenso de la utilización de ácidos grasos existe una menor flexibilidad metabólica y el corazón se vuelve más dependiente de los ácidos grasos como sustrato de obtención de ATP. Esto se podrá ver en genes relacionados con la utilización de ácidos grasos, cuya expresión aumentará (tal como hemos visto en el caso de *Pdk4*, *Acadm* o *Cpt1b*). Este hecho dificultará la respuesta del corazón en esta situación patológica, ya que su capacidad para utilizar glucosa se encuentra visiblemente disminuida (Fukushima & Lopaschuk, 2016; Mazumder et al., 2004).

Este aumento en la utilización y captación de ácidos grasos es debido a un aumento de los ácidos grasos en sangre (a causa de la dieta) y de la aparición de resistencia a la insulina y reducción de la eficiencia metabólica del corazón. Además, el aumento de la acumulación de derivados de lípidos potencialmente tóxicos (como los diacilgliceroles, triacilgliceroles y ceramidas) aumenta la lipotoxicidad y puede inducir a la apoptosis de los cardiomiocitos, a un desarrollo de la fibrosis y, finalmente, a disfunción cardíaca (Koves et al. 2005; Zhou et al., 2000).

En el caso de los ratones Fgf15-null, esta alteración en el metabolismo cardíaco hace que no estén adaptándose al sustrato preferente en esta situación (mayor disponibilidad de ácidos grasos que de glucosa) y no tengan el comportamiento habitual en la hipertrofia asociada a obesidad. De manera que los ratones Fgf15-null no tienen plasticidad metabólica, provocando un posible déficit energético que impide el crecimiento de los cardiomiocitos y del corazón.

Una vez visto el posible papel de FGF15/19 en el contexto de la dieta alta en grasas y viendo cómo FGF15 está involucrado en la adaptación del tejido adiposo al frío adiposo en ratones, procedimos a analizar si FGF15 también participa de la adaptación cardíaca al frío.

Estudios realizados en diferentes modelos animales han demostrado cómo la exposición al frío provoca un aumento del flujo, la presión cardíaca y un aumento de la hipertrofia cardíaca (Deaton et al., 1969; May et al., 1971; Le Moine et al., 2010; Sun et al., 2010; Matsubara et al., 2016), aunque los distintos mecanismos que lo inducen no están plenamente clarificados.

Después de mantener a los ratones una semana en frío (a 4°C) y comparándolos con ratones de los mismos genotipos mantenidos el mismo tiempo a 30 °C pudimos ver cómo el peso del corazón en WT a 4 °C era significativamente mayor que el de WT a 30 °C, indicando el desarrollo de hipertrofia fisiológica. Los ratones Fgf15-null, en cambio, no mostraron cambios: tanto el peso de sus corazones como el área de los cardiomiocitos, aunque un poco mayor que el de los ratones WT a 30 °C, no variaban. Al parecer, la capacidad del corazón para agrandarse y así afrontar la demanda energética que supone la exposición de los ratones al frío se encontraba impedida en estos ratones.

En este modelo experimental, el análisis de los genes relacionados con la fibrosis y la remodelación cardíaca que implica este tipo de hipertrofia fisiológica reveló una intensa inducción en ratones WT expuestos a 4°C mientras que en el caso de los ratones *Fgf15*-null, esta inducción era de menor grado. Por lo tanto, la remodelación cardíaca asociada a la hipertrofia fisiológica a la exposición al frío se encuentra bloqueada debido a la ausencia de FGF15.

Una vez más, el mayor efecto se pudo ver en la expresión de genes clave del metabolismo cardíaco. En animales WT a 4°C la expresión de *Pdk4* desciende, indicando que aumenta el consumo de glucosa como sustrato energético. Por otro lado, la expresión de *Fgf21* aumenta en ratones WT con el frío. El corazón también es un órgano que puede secretar FGF21, que tiene función cardioprotectora (Planavila et al., 2013), a diferencia de FGF15/19, cuya expresión es nula en el corazón. En el caso de los ratones *Fgf15*-null, la expresión de *Fgf21* es menor que en los WT y no hay inducción por frío, indicando que el posible efecto cardioprotector de FGF21 no se produce.

En el caso de los otros genes del metabolismo cardíaco analizados, *Acadm*, *Cpt1b* y *Ppargc1a*, su expresión disminuye en ratones WT a 4 °C, corroborando que la glucosa es el sustrato energético principal de esta situación. En *Fgf15*-null la expresión de estos genes tiende a ser menor. Por otro lado, la expresión de *Glut1* (transportador de glucosa) también tiene una tendencia a ser menor en el caso de los animales *Fgf15*-null (no significativa), hecho que puede significar que la disponibilidad de sustrato en estos animales sea menor que en los WT.

Los estudios principales acerca de las alteraciones metabólicas en hipertrofia cardíaca se han realizado en base a la hipertrofia asociada a procesos patológicos. La idea general es que, durante la hipertrofia cardíaca la principal forma de obtención de ATP pasa a ser la glucólisis a partir de glucosa (Neubauer et al., 2007), evidenciada por la disminución de la expresión de genes relacionados con procesos metabólicos mitocondriales (Aubert et al., 2013). Por otro lado, la expresión de enzimas relacionadas con la oxidación y transporte de ácidos grasos disminuye. Aunque se produzca un aumento de la glucólisis a fin de compensar la reducción de la actividad de las vías oxidativas, el ATP obtenido no es suficiente y se produce una disminución del rendimiento del corazón, acompañado de un aumento del estrés oxidativo, un aumento de la muerte de los cardiomiocitos y un

aumento de la fibrosis (Nakamura & Sadoshima, 2016). Todo este proceso puede llevar al corazón a la remodelación patológica y a la insuficiencia cardíaca. Además, la acumulación de productos intermedios puede provocar problemas de cardiopatía, llevando a una descompensación metabólica (Zhou et al., 2000). No obstante, estos procesos pueden tener diferencias en función de los insultos condicentes a la hipertrofia cardíaca y, sobre todo en la hipertrofia cardíaca fisiológica y adaptativa, no patológica.

Tanto en el modelo experimental de HFD como en el de frío hemos podido observar cómo una importante alteración en los ratones *Fgf15*-null es la falta de flexibilidad en el metabolismo cardíaco. Estos ratones no desarrollan hipertrofia en el mismo grado que los ratones WT y no lograban adaptar su metabolismo a las demandas energéticas que requiere la adaptación del corazón a dichos estímulos. En situaciones de alta demanda energética el tejido cardíaco debe adaptarse, aumentando su tamaño y así garantizar la homeostasis del sistema circulatorio. Cuando el corazón recibe un aumento de la carga de trabajo y a fin de contrarrestar el incremento crónico de estrés sufrido en sus paredes, el corazón aumenta su masa gracias a la hipertrofia de los cardiomiocitos. De manera que la hipertrofia, por ejemplo en el caso del frío, cuando hay un incremento generalizado en la demanda de nutrientes y oxígeno como consecuencia del aumento de la tasa metabólica, esta hipertrofia es necesaria (Shimizu & Minamino, 2016). Los ratones deficientes en FGF15 no son capaces de llevar a cabo esta adaptación delante de la carga de trabajo.

Dado el posible papel beneficioso de FGF15/19 en el desarrollo de la hipertrofia adaptativa, realizamos otra aproximación experimental para evaluar la adaptación del corazón a un estímulo prohipertrofico farmacológico, no fisiológico. Así, animales WT y *Fgf15*-null fueron tratados con salino o con Isoproterenol durante 7 días mediante una infusión continua con bombas osmóticas. En este diseño experimental pudimos realizar una aproximación a la función cardíaca *in vivo* mediante ecocardiografía, la cual reveló que las mayores diferencias surgen entre ratones WT y *Fgf15*-null sin inducción experimental de hipertrofia por ISO. Los ratones *fgf15*-null tienen un mayor volumen del septo y un mayor grosor de la pared posterior del ventrículo izquierdo (tanto en sístole como en diástole), indicando un posible malfuncionamiento del corazón en estos ratones en condiciones basales y pudiendo así explicar su mala capacidad de adaptación a

estímulos hipertróficos. Sin embargo, el tratamiento con ISO no exacerbó estas diferencias.

Al mirar el tamaño del corazón, no hubo diferencias entre ambos genotipos pero, en cuanto a CMA, los Fgf15-null mostraron un CMA menor que los WT. En esta ocasión, a fin de evaluar la fibrosis cardíaca en este modelo, realizamos preparaciones para poder calcular el porcentaje de áreas fibróticas en comparación con el área total. De este modo pudimos ver cómo los ratones Fgf15-null (tanto en salino como con ISO), tienen una tendencia a contener menos áreas fibróticas, con una  $p=0,07$  con two way ANOVA.

En cuanto a los marcadores génicos relacionados con la hipertrofia y la fibrosis, no vimos diferencias claras. En lo relacionado al metabolismo, la expresión de *Pdk4* disminuye en el WT con ISO, mostrando el cambio de sustrato de ácidos grasos a glucosa debido a la adaptación del corazón y al proceso de hipertrofia. En los ratones Fgf15-null no se produce esta variación. Una vez más, los ratones Fgf15-null no reaccionan ante el estímulo prohipertrófico y no varían su comportamiento metabólico. Esta falta de respuesta también queda reflejada en la expresión de los otros genes analizados, como *Acadm*, *Cpt1b*, *Glut1* y *Ppargc1a*. De manera que, es posible que los ratones Fgf15-null no utilicen ácidos grasos de forma eficiente y utilicen, por defecto, glucosa.

Dado las herramientas disponibles y los modelos utilizados, analizamos los corazones de los experimentos de sobreexpresión de FGF15 y de FGF19, y de tratamiento con ISO realizados en la primera parte de esta tesis doctoral. En este caso, los efectos de FGF15/19 sobre el corazón solamente se pudieron observar a nivel de CMA en ambos modelos, donde la sobreexpresión de FGF15 o FGF19 llevaba a un incremento en el área de sus cardiomiocitos. Ahora bien, a nivel de expresión génica no encontramos diferencias en cuanto a genes relacionados con la hipertrofia o la fibrosis. En el caso de los genes relacionados con el metabolismo lipídico (*Pdk4*, *Acadm*, *Cpt1b* y *Ppargc1a*), mostraban una tendencia a una mayor expresión, sin ser significativa. Esto puede indicar que la sobreexpresión de FGF15/19 aumenta la utilización de los ácidos grasos como sustrato energético.

De manera que, con todos los datos obtenidos con nuestros modelos *in vivo*, hemos observado que FGF15/19 tendría un papel permisivo para el desarrollo de la hipertrofia

cardíaca, ya que su deficiencia provoca un impedimento en la adaptación cardíaca, provocando en algunas ocasiones el bloqueo total de la hipertrofia cardíaca.

Benoit et al., descubrieron recientemente un efecto directo de FGF19 sobre la regulación de la masa muscular. Estos investigadores vieron cómo el tratamiento con FGF19 en fibras musculares desencadenaba la fosforilación tanto de ERK1/2 como de rpS6, activando sus vías de señalización y desencadenando hipertrofia muscular. Esta hipertrofia no se encontraba relacionada con un aumento en el número de fibras, sino de un aumento del tamaño de estas. En mioblastos humanos, FGF19 no afecta a la proliferación celular, sino a su tamaño celular (Benoit et al., 2017). Por otro lado, el tratamiento con FGF19 sobre ratones obesos o de avanzada edad, aminoraba la atrofia muscular asociada a estos procesos. De esta manera, FGF19 se podría postular como herramienta terapéutica a fin de revertir la pérdida de masa muscular en determinados procesos. De hecho, estudios previos de nuestro grupo han asociado un aumento en los niveles sistémicos de FGF19 con una mayor síntesis proteica en hígado, y posiblemente en músculo esquelético, de cerdos (Ipharraguerre et al., 2018).

Vistos los efectos de FGF19 sobre el músculo esquelético, al analizar los efectos de FGF15 sobre el corazón vimos cómo la falta de este provoca problemas en la adaptación del corazón a diferentes situaciones. Estos efectos son similares a los vistos en músculo esquelético. Ratones sin FGF15 no son capaces de afrontar grandes cargas de trabajo ni de adaptar su corazón a situaciones que lo requieran (no son capaces de afrontar la alta demanda energética asociada) (Doenst et al., 2013).

Además, nuestros análisis con muestras humanas han indicado como pacientes con diferentes patologías cardíacas contaban con una concentración sistémica de FGF19 menor que los controles sanos, lo que sería coherente con un papel positivo de FGF19 en relación con la función cardíaca.

Asimismo, la aproximación *in vitro* con cardiomiocitos neonatales en cultivo mostró cómo el tratamiento con FGF19 aumentaba el área de los cardiomiocitos. No obstante, el análisis del perfil de expresión génica de marcadores de hipertrofia cardíaca no consolidó estas observaciones.

Por otro lado, al ver que FGF19 sí afectaba el tamaño de los cardiomiocitos, aunque no hubiera variaciones de la expresión génica, se analizó mediante un sistema Milliplex el grado de fosforilación de diferentes cinasas y sustratos, para ver si existían vías de señalización que eran modificadas tras el tratamiento con FGF19. Con este sistema vimos que la exposición de los cardiomiocitos a FGF19 provocaba algunos cambios en la fosforilación de ERK1/2, JNK y p38, lo cual sugería que los cardiomiocitos son, *per se*, sensibles a FGF19.

Los cardiomiocitos cuentan con la maquinaria necesaria para la señalización de FGF21, ya que tienen en su membrana tanto  $\beta$ -Klotho como FGFR1 en cantidad suficiente (Font Tacer et al., 2010; Planavila et al., 2013). Aunque no contenga casi FGFR4, receptor clásico de FGF15/19, existen estudios que señalan que FGF15/19 es capaz de señalizar a través del receptor propio de FGF21, FGFR1, con menor sensibilidad o eficiencia (Owen et al., 2015). De esta forma, existe una potencial sensibilidad de estos cardiomiocitos por FGF15/19 ya que, si bien no señalizarían a través de FGFR4, serían capaces de hacerlo a través de FGFR1, con su correceptor  $\beta$ -Klotho.

La falta de resultados concluyentes sobre la posible acción de FGF15/19 en la promoción de la hipertrofia cardíaca en NCMs puede ser consecuencia del modelo experimental utilizado. Este modelo heterólogo, basado en el uso de proteína recombinante FGF19 humana es debido a la falta de disponibilidad de proteína recombinante de FGF15 en la comunidad científica. Por esta razón, no se puede excluir que FGF15 pueda ejercer un efecto sobre los cardiomiocitos de rata, que no son mimetizados por FGF19. La obtención del vector adenoviral de sobreexpresión Ad5-FGF15 abre la puerta a nuevas posibilidades, como sería la sobreexpresión de FGF15 en un modelo celular y la posterior utilización de los medios de cultivo enriquecidos en FGF15 sobre los cardiomiocitos. Estos modelos pueden provocar nuevos problemas, ya que estos medios de cultivo condicionados contendrán multitud de biomoléculas que podrían señalizar también nuestros cardiomiocitos. Sin embargo, esta y otras posibles estrategias deberán ser exploradas para clarificar el posible efecto directo de FGF15 sobre los cardiomiocitos. La estrategia recíproca de utilizar un modelo de cultivo de cardiomiocitos humanos y tratarlos con FGF19 sería, asimismo, una estrategia a desarrollar en un futuro.

# Conclusiones





## Parte 1, FGF15/19 y la plasticidad en tejido adiposo:

- Nuestros estudios confirman el papel de FGF19 como potencial biomarcador circulante en la obesidad.
- Los niveles de FGF19 correlacionan de forma positiva con la expresión de marcadores termogénicos en tejido adiposo subcutáneo de humanos.
- El déficit de FGF15 provoca un impedimento del *browning* del tejido adiposo blanco subcutáneo en ratones expuestos a temperaturas de 21 °C y 4 °C, mientras que la activación termogénica del tejido adiposo marrón no parece afectada.
- El déficit de FGF15 provoca una reducción en la expresión de diferentes batocinas, como CXCL14 y GDF15, indicando que la función del tejido adiposo marrón como órgano secretor de batocinas sí se encuentra alterada.
- El déficit de FGF15 en ratones expuestos a 4°C impide el proceso de sensibilización a la insulina provocada por frío.
- La sobreexpresión de FGF15 y FGF19 en ratones provoca un aumento de la expresión de genes termogénicos en tejido adiposo blanco subcutáneo, evidenciando un aumento del *browning* de dicho tejido.
- La falta de FGF15 no impide el *browning* inducido por agonistas adrenérgicos, sugiriendo que la acción de FGF15 ocurre a través del sistema nervioso central y/o otros mecanismos indirectos.
- Los datos obtenidos sobre los efectos de FGF19 en adipocitos humanos *in vitro* concuerdan con efectos mayormente indirectos del sistema FGF15/19 en la adiposidad.

- En conclusión: el sistema FGF15/19 está implicado de forma importante en el proceso de adaptación termogénica del tejido adiposo blanco (*browning*), posiblemente por mecanismos indirectos.

#### Parte 2, FGF15/19 y la plasticidad en corazón:

- Los niveles de FGF19 en pacientes con diferentes condiciones de alteración cardíaca son menores que en individuos sanos, indicando el papel de FGF19 como posible biomarcador de patología cardíaca.
- El déficit de FGF15 en ratones impide la correcta adaptación del corazón (principalmente hipertrofia adaptativa) a estímulos como la dieta alta en grasas o el frío ambiental, y causa signos menores de alteración de la respuesta hipertrófica inducida por isoproterenol.
- La expresión del gen *Pdk4*, que codifica por la piruvato deshidrogenasa y es clave en el control de la utilización de ácidos grasos/glucosa por parte del corazón, se encuentra alterada en ratones *Fgf15*-null. Este hecho muestra la necesidad de *Fgf15* para una correcta plasticidad metabólica adaptativa del corazón.
- Los estudios en cultivos celulares no permiten establecer de forma concluyente efectos directos de FGF15/19 sobre células del corazón.
- En conclusión: una adecuada función del sistema FGF15/19 es necesaria para la plasticidad cardíaca adaptativa a situaciones fisiológicas.

Conclusión global: podemos concluir que FGF15/19 es un factor endocrino de origen intestinal de origen intestinal (enterocina) con capacidad de afectar la funcionalidad de los tejidos adiposos y del corazón, especialmente en sus capacidades de adaptación a estímulos ambientales.

# Bibliografía



- Abel, E. D., Kaulbach, H. C., Tian, R., Hopkins, J. C., Duffy, J., Doetschman, T., Minnemann, T., Boers, M. E., Hadro, E., Oberste-Berghaus, C., Quist, W., Lowell, B. B., Ingwall, J. S., & Kahn, B. B. (1999). Cardiac hypertrophy with preserved contractile function after selective deletion of GLUT4 from the heart. *The Journal of clinical investigation*, 104(12), 1703–1714.
- Adams, A.C., Cheng, C.C., Coskun, T., Kharitononkov, A. (2012) FGF21 Requires  $\beta$ klotho to Act In Vivo. *PLoS ONE* 7(11): e49977
- Allard, M. F., Schonekess, B. O., Henning, S. L., English, D. R., & Lopaschuk, G. D. (1994). Contribution of oxidative metabolism and glycolysis to ATP production in hypertrophied hearts. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 267(2 36-2).
- Altshuler-Keylin, S., Shinoda, K., Hasegawa, Y., Ikeda, K., Hong, H., Kang, Q., Yang, Y., Perera, R. M., Debnath, J., & Kajimura, S. (2016). Beige Adipocyte Maintenance Is Regulated by Autophagy-Induced Mitochondrial Clearance. *Cell metabolism*, 24(3), 402–419.
- Alvarez-Sola, G., Uriarte, I., Ujue Latasa, M., Urtasun, R., Bárcena-Varela, M., Elizalde, M., ... Avila, M. A. (2017). Fibroblast Growth Factor 15/19 in Hepatocarcinogenesis. *Digestive Diseases*, 35(3), 158–165.
- Alvarez-Sola, G., Uriarte, I., Latasa, M. U., Fernandez-Barrena, M. G., Urtasun, R., Elizalde, M., Barcena-Varela, M., Jiménez, M., Chang, H. C., Barbero, R., Catalán, V., Rodríguez, A., Frühbeck, G., Gallego-Escuredo, J. M., Gavaldà-Navarro, A., Villarroya, F., Rodriguez-Ortigosa, C. M., Corrales, F. J., Prieto, J., Berraondo, P., ... Avila, M. A. (2017). Fibroblast growth factor 15/19 (FGF15/19) protects from diet-induced hepatic steatosis: development of an FGF19-based chimeric molecule to promote fatty liver regeneration. *Gut*, 66(10), 1818–1828.
- An, S. Y., Lee, M. S., Yi, S. A., Ha, E. S., Han, S. J., Kim, H. J., ... Lee, K. W. (2012). Serum fibroblast growth factor 21 was elevated in subjects with type 2 diabetes mellitus and was associated with the presence of carotid artery plaques. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 96(2), 196–203.
- Andrade, J. M. O., Frade, A. C. M., Guimarães, J. B., Freitas, K. M., Lopes, M. T. P., Guimarães, A. L. S., ... Santos, S. H. S. (2014). Resveratrol increases brown adipose tissue thermogenesis markers by increasing SIRT1 and energy expenditure and decreasing fat accumulation in adipose tissue of mice fed a standard diet. *European Journal of Nutrition*, 53(7), 1503–1510.
- Angelin, B., Larsson, T. E., & Rudling, M. (2012). Circulating fibroblast growth factors as metabolic regulators - A critical appraisal. *Cell Metabolism*, 16(6), 693–705.
- Armand, A. S., Laziz, I., & Chanoine, C. (2006). FGF6 in myogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta* -

*Molecular Cell Research*, 1763(8), 773–778.

Arner, P. (1997). Regional adiposity in man. *J Endocrinol* 155, 191-192.

Arner, P., Pettersson, A., Mitchell, P. J., Dunbar, J. D., Kharitononkov, A., & Rydén, M. (2008). FGF21 attenuates lipolysis in human adipocytes - A possible link to improved insulin sensitivity. *FEBS Letters*, 582(12), 1725–1730.

Badman, M. K., Pissios, P., Kennedy, A. R., Koukos, G., Flier, J. S., & Maratos-Flier, E. (2007). Hepatic Fibroblast Growth Factor 21 Is Regulated by PPAR $\alpha$  and Is a Key Mediator of Hepatic Lipid Metabolism in Ketotic States. *Cell Metabolism*, 5(6), 426–437.

Banerjee, R. R., Rangwala, S. M., Shapiro, J. S., Rich, A. S., Rhoades, B., Qi, Y., ... Lazar, M. A. (2004). Regulation of Fasted Blood Glucose by Resistin. *Science*, 303(5661), 1195–1198.

Bartelt, A., Heeren, J. (2014). Adipose tissue browning and metabolic health. *Nature reviews. Endocrinology* 10, 24-36.

Bartness TJ, Vaughan CH, Song CK. (2010). Sympathetic and sensory innervation of brown adipose tissue. *International Journal of Obesity*. Oct;34 Suppl 1:S36-42.

Barutcuoglu, B., Basol, G., Cakir, Y., Cetinkalp, S., Parildar, Z., Kabaroglu, C., ... Bayindir, O. (2011). Fibroblast growth factor-19 levels in type 2 diabetic patients with metabolic syndrome. *Annals of Clinical and Laboratory Science*, 41(4), 390–396.

Bays, H. E. (2011). Adiposopathy: Is “sick fat” a cardiovascular disease? *Journal of the American College of Cardiology*, 57(25), 2461–2473.

Bello Roufai, M., Li, H., & Sun, Z. (2007). Heart-specific inhibition of protooncogene c-myc attenuates cold-induced cardiac hypertrophy. *Gene Therapy*, 14(19), 1406–1416.

Benoit, B., Meugnier, E., Castelli, M., Chanon, S., Vieille-Marchiset, A., Durand, C., ... Ruzzin, J. (2017). Fibroblast growth factor 19 regulates skeletal muscle mass and ameliorates muscle wasting in mice. *Nature Medicine*, 23(8), 990–996.

Berenji, K., Drazner, M. H., Rothermel, B. A., & Hill, J. A. (2005). Does load-induced ventricular hypertrophy progress to systolic heart failure? *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 289(1 58-1), 8–16.

Bergmann, O., Bhardwaj, R. D., Bernard, S., Zdunek, S., Walsh, S., Zupicich, J., ... Frisnt, J. (2017). Linked references are available on JSTOR for this article : Renewal in Humans Evidence for Cardiomyocyte. *National Institutes of Health*, 324(5923), 98–102.

Bergmann, O., Zdunek, S., Felker, A., Salehpour, M., Alkass, K., Bernard, S., ... Frisén, J. (2015).

- Dynamics of Cell Generation and Turnover in the Human Heart. *Cell*, 161(7), 1566–1575.
- Bernardo, B. C., Weeks, K. L., Pretorius, L., & McMullen, J. R. (2010). Molecular distinction between physiological and pathological cardiac hypertrophy: Experimental findings and therapeutic strategies. *Pharmacology and Therapeutics*, 128(1), 191–227.
- Bhatnagar, S., Dammron, H. A., & Hillgartner, F. B. (2009). Fibroblast growth factor-19, a novel factor that inhibits hepatic fatty acid synthesis. *Journal of Biological Chemistry*, 284(15), 10023–10033.
- Biemann, R., Penner, M., Borucki, K., Westphal, S., Luley, C., Rönicke, R., ... Isermann, B. (2016). Serum bile acids and GLP-1 decrease following telemetric induced weight loss: Results of a randomized controlled trial. *Scientific Reports*, 6(June), 1–10.
- Bleumink, G. S., Knetsch, A. M., Sturkenboom, M. C. J. M., Straus, S. M. J. M., Hofman, A., Deckers, J. W., ... Stricker, B. H. C. (2004). Quantifying the heart failure epidemic: Prevalence, incidence rate, lifetime risk and prognosis of heart failure - The Rotterdam Study. *European Heart Journal*, 25(18), 1614–1619.
- BonDurant, L. D., & Potthoff, M. J. (2018). Fibroblast Growth Factor 21: A Versatile Regulator of Metabolic Homeostasis. *Annual Review of Nutrition*, 38(1), 173–196.
- Bookout, A. L., Groot, M. H. M. De, Owen, B. M., Lee, S., Lawrence, H. L., Ding, X., ... Kliewer, S. A. (2014). *on the Nervous System*. 19(9), 1147–1152.
- Boström, P., Wu, J., Jedrychowski, M. P., Korde, A., Ye, L., Lo, J. C., ... Spiegelman, B. M. (2012). A PGC1a dependent myokine that derives browning of white fat and thermogenesis. *Nature*, 481(7382), 463–466
- Bouřová, L., Peřanová, Z., Novotný, J., Bengtsson, T., & Svoboda, P. (2000). Differentiation of cultured brown adipocytes is associated with a selective increase in the short variant of G(s)α protein. Evidence for higher functional activity of G(s)αS. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 167(1–2), 23–31.
- Branney PA, Faas L, Steane SE, Pownall ME & Isaacs HV. Characterisation of the fibroblast growth factor dependent transcriptome in early development. *PLoS One*. 2009;4(3):e4951. doi:10.1371/journal.pone.0004951
- Brasaemle, D. L. (2007). The perilipin family of structural lipid droplet proteins: Stabilization of lipid droplets and control of lipolysis. *Journal of Lipid Research*, 48(12), 2547–2559.
- Bunker, A., Wildenhain, J., Vandenberg, A., Henschke, N., Rocklöv, J., Hajat, S., & Sauerborn, R.



- (2016). Effects of Air Temperature on Climate-Sensitive Mortality and Morbidity Outcomes in the Elderly; a Systematic Review and Meta-analysis of Epidemiological Evidence. *EBioMedicine*, 6, 258–268.
- Burýšek, L., & Houštěk, J. (1997).  $\beta$ -Adrenergic stimulation of interleukin-1 $\alpha$  and interleukin-6 expression in mouse brown adipocytes. *FEBS Letters*, 411(1), 83–86.
- Cairó, M., Campderrós, L., Gavaldà-Navarro, A., Cereijo, R., Delgado-Anglés, A., Quesada-López, T., Giralt, M., Villarroya, J., & Villarroya, F. (2019). Parkin controls brown adipose tissue plasticity in response to adaptive thermogenesis. *EMBO reports*, 20(5), e46832.
- Camilleri, M., Klee, E. W., Shin, A., Carlson, P., Li, Y., Grover, M., & Zinsmeister, A. R. (2014). Irritable bowel syndrome-diarrhea: characterization of genotype by exome sequencing, and phenotypes of bile acid synthesis and colonic transit. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, 306(1), G13–G26.
- Campbell, J. E., & Drucker, D. J. (2013). Pharmacology, physiology, and mechanisms of incretin hormone action. *Cell Metabolism*, 17(6), 819–837.
- Campderrós, L. (2019). GDF15, un nou factor secretable regulador del metabolisme. Paper com a "batoquina" en models experimentals, i estudis en humans.  
<http://hdl.handle.net/2445/141534>
- Campderrós, L., Moure, R., Cairó, M., Gavaldà-Navarro, A., Quesada-López, T., Cereijo, R., ... Villarroya, F. (2019). Brown Adipocytes Secrete GDF15 in Response to Thermogenic Activation. *Obesity*, 27(10), 1606–1616.
- Cannon, B., & Nedergaard, J. (2004). Brown Adipose Tissue: Function and Physiological Significance. *Physiological Reviews*, 84(1), 277–359.
- Cannon, B., & Nedergaard, J. (2011). Nonshivering thermogenesis and its adequate measurement in metabolic studies. *Journal of Experimental Biology*, 214(2), 242–253.
- Cao, W., Daniel, K. W., Robidoux, J., Puigserver, P., Medvedev, A. V., Bai, X., ... Collins, S. (2004). p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Is the Central Regulator of Cyclic AMP-Dependent Transcription of the Brown Fat Uncoupling Protein 1 Gene. *Molecular and Cellular Biology*, 24(7), 3057–3067.
- Cao, Wenhong, Medvedev, A. V., Daniel, K. W., & Collins, S. (2001).  $\beta$ -adrenergic activation of p38 MAP kinase in adipocytes: cAMP induction of the uncoupling protein 1 (UCP1) gene requires p38 map kinase. *Journal of Biological Chemistry*, 276(29), 27077–27082.

- Carino A, Cipriani S, Marchianò S, et al. (2017). BAR502, a dual FXR and GPBAR1 agonist, promotes browning of white adipose tissue and reverses liver steatosis and fibrosis. *Sci Rep*. 2017;7:42801.
- Carmen Carmona, M., Iglesias, R., Obregón, M. J., Darlington, G. J., & Villarroya, F. (2002). Mitochondrial biogenesis and thyroid status maturation in brown fat require CCAAT/enhancer-binding protein  $\alpha$ . *Journal of Biological Chemistry*, 277(24), 21489–21498.
- Cereiyo, R, Villarroya, J., & Villarroya, F. (2015). Non-sympathetic control of brown adipose tissue. *International Journal of Obesity Supplements*, 5(S1), S40–S44.
- Cereiyo, Rubén, Gavaldà-Navarro, A., Cairó, M., Quesada-López, T., Villarroya, J., Morón-Ros, S., ... Villarroya, F. (2018). CXCL14, a Brown Adipokine that Mediates Brown-Fat-to-Macrophage Communication in Thermogenic Adaptation. *Cell Metabolism*, 28(5), 750-763.e6.
- Chakrabarti, P., Kim, J. Y., Singh, M., Shin, Y.-K., Kim, J., Kumbrink, J., ... Kandror, K. V. (2013). Insulin Inhibits Lipolysis in Adipocytes via the Evolutionarily Conserved mTORC1-Egr1-ATGL-Mediated Pathway. *Molecular and Cellular Biology*, 33(18), 3659–3666.
- Chartoumpekis, D. V., Habeos, I. G., Ziros, P. G., Psyrogiannis, A. I., Kyriazopoulou, V. E., & Papavassiliou, A. G. (2011). Brown adipose tissue responds to cold and adrenergic stimulation by induction of FGF21. *Molecular Medicine*, 17(7–8), 736–740.
- Chavez, A. O., Molina-Carrion, M., Abdul-Ghani, M. A., Folli, F., DeFronzo, R. A., & Tripathy, D. (2009). Circulating fibroblast growth factor-21 is elevated in impaired glucose tolerance and type 2 diabetes and correlates with muscle and hepatic insulin resistance. *Diabetes Care*, 32(8), 1542–1546.
- Chen, W. W., Li, L., Yang, G. Y., Li, K., Qi, X. Y., Zhu, W., ... Boden, G. (2008). Circulating FGF-21 levels in normal subjects and in newly diagnose patients with type 2 diabetes mellitus. *Experimental and Clinical Endocrinology and Diabetes*, 116(1), 65–68.
- Choi, M., Moschetta, A., Bookout, A. L., Peng, L., Umetani, M., Holmstrom, S. R., ... Kliewer, S. A. (2006). Identification of a hormonal basis for gallbladder filling. *Nature Medicine*, 12(11), 1253–1255.
- Christe, M. E., & Rodgers, R. L. (1994). Altered Glucose and Fatty Acid Oxidation in Hearts of the Spontaneously Hypertensive Rat. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, Vol. 26, pp. 1371–1375.
- Cinti, S. (2000). Anatomy of the adipose organ. *Eating and Weight Disorders*, 5(3), 132–142.

- Cinti, S. (2009). Transdifferentiation properties of adipocytes in the adipose organ. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 297(5).
- Cooper G., 4th (1987). Cardiocyte adaptation to chronically altered load. *Annual review of physiology*, 49, 501–518.
- Coskun, T., Bina, H. A., Schneider, M. A., Dunbar, J. D., Hu, C. C., Chen, Y., ... Kharitonov, A. (2008). Fibroblast growth factor 21 corrects obesity in mice. *Endocrinology*, 149(12), 6018–6027.
- Cowie, M. R., Wood, D. A., Coats, A. J. S., Thompson, S. G., Suresh, V., Poole-Wilson, P. A., & Sutton, G. C. (2000). Survival of patients with a new diagnosis of heart failure: A population based study. *Heart*, 83(5), 505–510.
- Crane JD, Mottillo EP, Farncombe TH, Morrison KM, Steinberg GR. (2014). A standardized infrared imaging technique that specifically detects UCP1-mediated thermogenesis in vivo. *Mol Metab.* 3(4):490-494.
- Cristancho, A. G., & Lazar, M. A. (2011). Forming functional fat: A growing understanding of adipocyte differentiation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 12(11), 722–734.
- Cuevas-Ramos, D., Almeda-Valdes, P., Gómez-Pérez, F. J., Elena Meza-Arana, C., Cruz-Bautista, I., Arellano-Campos, O., ... Aguilar-Salinas, C. A. (2010). Daily physical activity, fasting glucose, uric acid, and body mass index are independent factors associated with serum fibroblast growth factor 21 levels. *European Journal of Endocrinology*, 163(3), 469–477.
- Dani C, Billon N. (2012). Adipocyte Precursors: Developmental Origins, Self-Renewal, and Plasticity. *Adipose Tissue Biology*. Springer. 1-13
- Dávila-Román, V. G., Vedala, G., Herrero, P., De Las Fuentes, L., Rogers, J. G., Kelly, D. P., & Gropler, R. J. (2002). Altered myocardial fatty acid and glucose metabolism in idiopathic dilated cardiomyopathy. *Journal of the American College of Cardiology*, 40(2), 271–277.
- Deaton, J. W., Reece, F. N., McNally, E. H., & Tarver, W. J. (1969). Liver, heart and adrenal weights of broilers reared under constant temperatures. *Poultry Science*, 48(1), 283–288.
- Degirolamo, C., Sabbà, C., & Moschetta, A. (2016). Therapeutic potential of the endocrine fibroblast growth factors FGF19, FGF21 and FGF23. *Nature Reviews Drug Discovery*, 15(1), 51–69.
- Desnoyers, L. R., Pai, R., Ferrando, R. E., Hötzel, K., Le, T., Ross, J., ... French, D. M. (2008). Targeting FGF19 inhibits tumor growth in colon cancer xenograft and FGF19 transgenic hepatocellular carcinoma models. *Oncogene*, 27(1), 85–97.
- Desvergne, B., and Wahli, W. (1999). Peroxisome proliferator-activated receptors: Nuclear control

of metabolism. *Endocr. Rev.* 20, 649-688

- Díaz-Delfín, J., Hondares, E., Iglesias, R., Giralt, M., Caelles, C., & Villarroya, F. (2012). TNF- $\alpha$  represses  $\beta$ -klotho expression and impairs FGF21 action in adipose cells: Involvement of JNK1 in the FGF21 pathway. *Endocrinology*, 153(9), 4238–4245.
- Doenst, T., Nguyen, T. D., & Abel, E. D. (2013). Cardiac Metabolism in Heart Failure. *Circulation Research*, 113(6), 709–724.
- Donate-Correa, J., Martín-Núñez, E., Delgado, N. P., de Fuentes, M. M., Arduan, A. O., Mora-Fernández, C., & Navarro González, J. F. (2016). Implications of Fibroblast growth factor/Klotho system in glucose metabolism and diabetes. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 28, 71–77.
- Dutchak, P. A., Katafuchi, T., Bookout, A. L., Choi, J. H., Yu, R. T., Mangelsdorf, D. J., & Kliewer, S. A. (2012). Fibroblast growth factor-21 regulates PPAR $\gamma$  activity and the antidiabetic actions of thiazolidinediones. *Cell*, 148(3), 556–567.
- Fagard, R. H. (1997). Impact of different sports and training on cardiac structure and function. *Cardiology Clinics*, 15(3), 397–412.
- Fang, S., Suh, J. M., Reilly, S. M., Yu, E., Osborn, O., Lackey, D., Yoshihara, E., Perino, A., Jacinto, S., Lukasheva, Y., Atkins, A. R., Khvat, A., Schnabl, B., Yu, R. T., Brenner, D. A., Coulter, S., Liddle, C., Schoonjans, K., Olefsky, J. M., Saltiel, A. R., ... Evans, R. M. (2015). Intestinal FXR agonism promotes adipose tissue browning and reduces obesity and insulin resistance. *Nature medicine*, 21(2), 159–165.
- Fares, A. (2013). Winter cardiovascular diseases phenomenon. *North American Journal of Medical Sciences*, 5(4), 266–279.
- Feldmann, H. M., Golozoubova, V., Cannon, B., & Nedergaard, J. (2009). UCP1 Ablation Induces Obesity and Abolishes Diet-Induced Thermogenesis in Mice Exempt from Thermal Stress by Living at Thermoneutrality. *Cell Metabolism*, 9(2), 203–209.
- Ferrer-Curriu, G., Redondo-Angulo, I., Guitart-Mampel, M., Ruperez, C., Mas-Stachurska, A., Sitges, M., ... Planavila, A. (2019). Fibroblast growth factor-21 protects against fibrosis in hypertensive heart disease. *Journal of Pathology*, 248(1), 30–40.
- Fisher, F. F., Kleiner, S., Douris, N., Fox, E. C., Mepani, R. J., Verdeguer, F., ... Spiegelman, B. M. (2012). FGF21 regulates PGC-1 $\alpha$  and browning of white adipose tissues in adaptive thermogenesis. *Genes and Development*, 26(3), 271–281.
- Fisher, F. M., Chui, P. C., Antonellis, P. J., Bina, H. A., Kharitonov, A., Flier, J. S., & Maratos-Flier, E.

- (2010). Obesity is a fibroblast growth factor 21 (FGF21)-resistant state. *Diabetes*, 59(11), 2781–2789.
- Fon Tacer, K. F., Bookout, A. L., Ding, X., Kurosu, H., John, G. B., Wang, L., ... Kliewer, S. A. (2010). Research resource: Comprehensive expression atlas of the fibroblast growth factor system in adult mouse. *Molecular Endocrinology*, 24(10), 2050–2064.
- French, D. M., Lin, B. C., Wang, M., Adams, C., Shek, T., Hötzel, K., ... Desnoyers, L. R. (2012). Targeting FGFR4 inhibits hepatocellular carcinoma in preclinical mouse models. *PloS One*, 7(5), 1–12.
- Fried, S. K., Ricci, M. R., Russell, C. D. & Laferrere, B. (2000). Regulation of leptin production in humans. *J. Nutr* 130, 3127S-3131S.
- Friedman, J., & Halaas, D. (1998). Leptin and the regulation of body composition. *Nature*, 395, 763–770.
- Frühbeck, G., Méndez-Giménez, L., Fernández-Formoso, J. A., Fernández, S., & Rodríguez, A. (2014). Regulation of adipocyte lipolysis. In *Nutrition Research Reviews* (Vol. 27).
- Fu, L., John, L. M., Adams, S. H., Yu, X. X., Tomlinson, E., Renz, M., ... Stewart, T. A. (2004). Fibroblast growth factor 19 increases metabolic rate and reverses dietary and leptin-deficient diabetes. *Endocrinology*, 145(6), 2594–2603.
- Gaich, G., Chien, J. Y., Fu, H., Glass, L. C., Deeg, M. A., Holland, W. L., ... Moller, D. E. (2013). The effects of LY2405319, an FGF21 Analog, in obese human subjects with type 2 diabetes. *Cell Metabolism*, 18(3), 333–340.
- Gallego-Escuredo, J. M., Gómez-Ambrosi, J., Catalan, V., Domingo, P., Giralt, M., Frühbeck, G., & Villarroya, F. (2015). Opposite alterations in FGF21 and FGF19 levels and disturbed expression of the receptor machinery for endocrine FGFs in obese patients. *International Journal of Obesity*, 39(1), 121–129.
- Gallego-Escuredo, José M., Domingo, P., Del Mar Gutiérrez, M., Mateo, M. G., Cabeza, M. C., Fontanet, A., ... Villarroya, F. (2012). Reduced levels of serum FGF19 and impaired expression of receptors for endocrine FGFs in adipose tissue from HIV-infected patients. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*, 61(5), 527–534.
- Gallego-Escuredo, José M., Lamarca, M. K., Villarroya, J., Domingo, J. C., Mateo, M. G., Gutierrez, M. del M., ... Giralt, M. (2017). High FGF21 levels are associated with altered bone homeostasis in HIV-1-infected patients. *Metabolism: Clinical and Experimental*, 71, 163–170.
- Gälman, C., Arvidsson, I., Angelin, B., & Rudling, M. (2003). Monitoring hepatic cholesterol 7 $\alpha$ -

- hydroxylase activity by assay of the stable bile acid intermediate 7 $\alpha$ -hydroxy-4-cholesten-3-one in peripheral blood. *Journal of Lipid Research*, 44(4), 859–865.
- Gälman, C., Lundåsen, T., Kharitononkov, A., Bina, H. A., Eriksson, M., Hafström, I., ... Rudling, M. (2008). The Circulating Metabolic Regulator FGF21 Is Induced by Prolonged Fasting and PPAR $\alpha$  Activation in Man. *Cell Metabolism*, 8(2), 169–174.
- Gavaldà-Navarro, A., Hondares, E., Giralt, M., Mampel, T., Iglesias, R., & Villarroya, F. (2015). Fibroblast growth factor 21 in breast milk controls neonatal intestine function. *Scientific Reports*, 5, 1–13.
- Ge, X., Chen, C., Hui, X., Wang, Y., Lam, K. S. L., & Xu, A. (2011). Fibroblast growth factor 21 induces glucose transporter-1 expression through activation of the serum response factor/Ets-like protein-1 in adipocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 286(40), 34533–34541.
- Gertz, E. W., Wisneski, J. A., Stanley, W. C., & Neese, R. A. (1988). Myocardial substrate utilization during exercise in humans. Dual carbon-labeled carbohydrate isotope experiments. *Journal of Clinical Investigation*, 82(6), 2017–2025.
- Gesta, S. (2006). Evidence for a role of developmental genes in the origin of obesity and body fat distribution. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103, 6676-6681.
- Gesta, S., Tseng, Y., -H., and Kahn, C.R. (2007). Developmental origin of fat: tracking obesity to its source. *Cell* 131, 242-256.
- Giralt, M., Gavaldà-Navarro, A., & Villarroya, F. (2015). Fibroblast growth factor-21, energy balance and obesity. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 418, 66–73.
- Giralt, M., & Villarroya, F. (2013). White, brown, beige/brite: Different adipose cells for different functions? *Endocrinology*, 154(9), 2992–3000.
- Goetz R, Mohammadi M. (2013). Exploring mechanisms of FGF signalling through the lens of structural biology. *Nat Rev Mol Cell Biol* 14, 166-180.
- Golberg, I. J., Eckel, R. H. & Abumrad, N.A. (2009). Regulation of fatty acid uptake into tissues: lipoprotein lipase and CD36-mediated pathways. *J Lipid Res*, 86-90.
- Golozoubova, V., Hohtola, E., Matthias, A., Jacobsson, A., Cannon, B., & Nedergaard, J. (2001). Only UCP1 can mediate adaptive nonshivering thermogenesis in the cold. *The FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 15(11), 2048–2050.
- Gómez-Ambrosi, J., Gallego-Escuredo, J. M., Catalán, V., Rodríguez, A., Domingo, P., Moncada, R., ...

- Frühbeck, G. (2017). FGF19 and FGF21 serum concentrations in human obesity and type 2 diabetes behave differently after diet- or surgically-induced weight loss. *Clinical Nutrition*, 36(3), 861–868.
- Grossman, W., Jones, D., & McLaurin, L. P. (1975). Wall stress and patterns of hypertrophy in the human left ventricle. *Journal of Clinical Investigation*, 56(1), 56–64.
- Guan, D., Zhao, L., Chen, D., Yu, B., & Yu, J. (2016). Regulation of fibroblast growth factor 15/19 and 21 on metabolism: In the fed or fasted state. *Journal of Translational Medicine*, 14(1), 1–7.
- Guerra, C., Roncero, C., Porrás, A., Fernández, M., & Benito, M. (1996). Triiodothyronine induces the transcription of the uncoupling protein gene and stabilizes its mRNA in fetal rat brown adipocyte primary cultures. *Journal of Biological Chemistry*, 271(4), 2076–2081.
- Hale, C., Chen, M. M., Stanislaus, S., Chinookoswong, N., Hager, T., Wang, M., ... Xu, J. (2012). Lack of overt FGF21 resistance in two mouse models of obesity and insulin resistance. *Endocrinology*, 153(1), 69–80.
- Haman, F. (2006). Shivering in the cold: From mechanisms of fuel selection to survival. *Journal of Applied Physiology*, 100(5), 1702–1708.
- Hany, T. F., Gharehpapagh, E., Kamel, E. M., Buck, A., Himms-Hagen, J., & Von Schulthess, G. K. (2002). Brown adipose tissue: A factor to consider in symmetrical tracer uptake in the neck and upper chest region. *European Journal of Nuclear Medicine*, 29(10), 1393–1398.
- Harms, M., & Seale, P. (2013). Brown and beige fat: Development, function and therapeutic potential. *Nature Medicine*, 19(10), 1252–1263.
- Harms, M.J., Ishibashi, J., Wang, W., Lim, H., -W., Goyama, S., Sato, T., Kurokawa, M., Won, K.-J., and Seale, P. (2014). Prdm16 is required for the maintenance of brown adipocyte identity and function in adult mice. *Cell Metab.* 19, 593-604.
- Harrison, S. A., Rinella, M. E., Abdelmalek, M. F., Trotter, J. F., Paredes, A. H., Arnold, H. L., ... Loomba, R. (2018). NGM282 for treatment of non-alcoholic steatohepatitis: a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 trial. *The Lancet*, 391(10126), 1174–1185.
- Harvey, P. A., & Leinwand, L. A. (2011). Cellular mechanisms of cardiomyopathy. *Journal of Cell Biology*, 194(3), 355–365.
- Harwood, H. J. (2012). The adipocyte as an endocrine organ in the regulation of metabolic homeostasis. *Neuropharmacology*, 63(1), 57–75.
- Henkel, A. S., Anderson, K. A., Dewey, A. M., Kavesh, M. H., & Green, R. M. (2011). A chronic high-

- cholesterol diet paradoxically suppresses hepatic CYP7A1 expression in FVB/NJ mice. *Journal of Lipid Research*, 52(2), 289–298.
- Holland, W. L., Adams, A. C., Brozinick, J. T., Bui, H. H., Kusminski, C. M., Bauer, S. M., ... Gordillo, R. (2014). Expenditure and Insulin Action in Mice. *Elsevier Inc*, 17(5), 790–797.
- Holt, J. A., Luo, G., Billin, A. N., Bisi, J., McNeill, Y. Y., Kozarsky, K. F., ... Jones, S. A. (2003). Definition of a novel growth factor-dependent signal cascade for the suppression of bile acid biosynthesis. *Genes and Development*, 17(13), 1581–1591.
- Hondares, E., Gallego-Escuredo, J.M., Flachs, P., Frontini, A., Cereijo, R., Goday, A., Perugini, J., Kopecky, P., Giralt, M., Cinti, S., et al. (2014). Fibroblast growth factor-21 is expressed in neonatal and pheochromocytoma-induced adult human brown adipose tissue. *Metabolism*. 63, 312-317.
- Hondares, E., Iglesias, R., Giralt, A., Gonzalez, F. J., Giralt, M., Mampel, T., & Villarroya, F. (2011). Thermogenic activation induces FGF21 expression and release in brown adipose tissue. *Journal of Biological Chemistry*, 286(15), 12983–12990.
- Hondares, E., Mora, O., Yubero, P., De La Concepción, M. R., Iglesias, R., Giralt, M., & Villarroya, F. (2006). Thiazolidinediones and rexinoids induce peroxisome proliferator-activated receptor-coactivator (PGC)-1 $\alpha$  gene transcription: An autoregulatory loop controls PGC-1 $\alpha$  expression in adipocytes via peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  coactivation. *Endocrinology*, 147(6), 2829–2838.
- Hondares, E., Rosell, M., Gonzalez, F. J., Giralt, M., Iglesias, R., & Villarroya, F. (2010). Hepatic FGF21 Expression Is Induced at Birth via PPAR $\alpha$  in Response to Milk Intake and Contributes to Thermogenic Activation of Neonatal Brown Fat. *Cell Metabolism*, 11(3), 206–212.
- Hotamisligil, G. S., Shargill, N. S., & Spiegelman, B. M. (1993). Adipose expression of tumor necrosis factor- $\alpha$ : Direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science*, 259(5091), 87–91.
- Hsieh, M.C.F., Das, D., Sambandam, N., Zhang, M.Q., and Nahlé, (2008). Regulation of the PDK4 isozyme by the Rb-E2F1 complex. *J. Biol. Chem.* 283, 27410-27417.
- Hsuchou, H., Pan, W., & Kastin, A. J. (2013). Fibroblast growth factor 19 entry into brain. *Fluids and Barriers of the CNS*, 10(1), 1.
- Hu, E., Liang, P., & Spiegelman, B. M. (1996). AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity. *Journal of Biological Chemistry*, 271(18), 10697–10703.
- Hu, X., Xiong, Q., Xu, Y., Zhang, X., Pan, X., Ma, X., ... Jia, W. (2018). Association of serum fibroblast



- growth factor 19 levels with visceral fat accumulation is independent of glucose tolerance status. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 28(2), 119–125.
- Iemitsu, M., Maeda, S., Miyauchi, T., Matsuda, M., & Tanaka, H. (2005). Gene expression profiling of exercise-induced cardiac hypertrophy in rats. *Acta Physiologica Scandinavica*, 185(4), 259–270.
- Iizuka, K., Takeda, J., & Horikawa, Y. (2009). Glucose induces FGF21 mRNA expression through ChREBP activation in rat hepatocytes. *FEBS Letters*, 583(17), 2882–2886.
- Ikäheimo, T. M., Lehtinen, T., Antikainen, R., Jokelainen, J., Näyhä, S., Hassi, J., ... Jaakkola, J. J. K. (2014). Cold-related cardiorespiratory symptoms among subjects with and without hypertension: The National FINRISK Study 2002. *European Journal of Public Health*, 24(2), 237–243.
- Inagaki, T., Choi, M., Moschetta, A., Peng, L., Cummins, C. L., McDonald, J. G., ... Kliewer, S. A. (2005). Fibroblast growth factor 15 functions as an enterohepatic signal to regulate bile acid homeostasis. *Cell Metabolism*, 2(4), 217–225.
- Ipharraguerre, I. R., Pastor, J. J., Gavaldà-Navarro, A., Villarroya, F., & Mereu, A. (2018). Antimicrobial promotion of pig growth is associated with tissue-specific remodeling of bile acid signature and signaling. *Scientific reports*, 8(1), 13671.
- Ito, S., Fujimori, T., Furuya, A., Satoh, J., Nabeshima, Y., & Nabeshima, Y. I. (2005). Impaired negative feedback suppression of bile acid synthesis in mice lacking  $\beta$ Klotho. *Journal of Clinical Investigation*, 115(8), 2202–2208.
- Itoh, N., & Ornitz, D. M. (2004). Evolution of the Fgf and Fgfr gene families. *Trends in Genetics*, 20(11), 563–569.
- Itoh, N., & Ornitz, D. M. (2011). Fibroblast growth factors: From molecular evolution to roles in development, metabolism and disease. *Journal of Biochemistry*, 149(2), 121–130.
- Izumiya, Y., Bina, H. A., Ouchi, N., Akasaki, Y., Kharitonov, A., & Walsh, K. (2008). FGF21 is an Akt-regulated myokine. *FEBS Letters*, 582(27), 3805–3810.
- Jahn, D., Rau, M., Hermanns, H. M., & Geier, A. (2015). Mechanisms of enterohepatic fibroblast growth factor 15/19 signaling in health and disease. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 26(6), 625–635.
- Johansson, H., Mörk, L. M., Li, M., Sandblom, A. L., Björkhem, I., Höijer, J., ... Ellis, E. (2018). Circulating Fibroblast Growth Factor 19 in Portal and Systemic Blood. *Journal of Clinical and*

*Experimental Hepatology*, 8(2), 162–168.

- Johnson, D. E., Lu, J., Chen, H., Werner, S., & Williams, L. T. (1991). The human fibroblast growth factor receptor genes: a common structural arrangement underlies the mechanisms for generating receptor forms that differ in their third immunoglobulin domain. *Molecular and Cellular Biology*, 11(9), 4627–4634.
- Kaiden Student, A., Hsu, R. Y., & Lane, M. D. (1980). Induction of fatty acid synthetase synthesis in differentiating 3T3-L1 preadipocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 255(10), 4745–4750.
- Kajimura, S., Seale, P., Kubota, K., Lunsford, E., Frangioni, J. V., Gygi, S. P., & Spiegelman, B. M. (2009). Initiation of myoblast/brown fat switch through a PRDM16-C/EBP-b transcriptional complex. *Nature*, 460(7259), 1154–1158.
- Kajimura, S., Seale, P., & Spiegelman, B. M. (2010). Transcriptional control of brown fat development. *Cell Metab* 11, 257-262.
- Kajstura, J., Urbanek, K., Perl, S., Hosoda, T., Zheng, H., Ogórek, B., ... Anversa, P. (2010). Cardiomyogenesis in the adult human heart. *Circulation Research*, 107(2), 305–315.
- Kawada, T. (2018). Food-derived regulatory factors against obesity and metabolic syndrome. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 82(4), 547–553.
- Kazak L, Chouchani ET, Jedrychowski MP, ... Spiegelman B.M. (2015). A creatine-driven substrate cycle enhances energy expenditure and thermogenesis in beige fat. *Cell*. 2015;163(3):643-655.
- Kershaw, E. E., & Flier, J. S. (2004). Adipose tissue as an endocrine organ. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 89(6), 2548–2556.
- Kersten, S. (2001). Mechanisms of nutritional and hormonal regulation of lipogenesis. *EMBO Reports*, 2(4), 282–286.
- Kharitononkov, A., Shiyanova, T. L., Koester, A., Ford, A. M., Micanovic, R., Galbreath, E. J., ... Shanafelt, A. B. (2005). FGF-21 as a novel metabolic regulator. *Journal of Clinical Investigation*, 115(6), 1627–1635.
- Kharitononkov, A., Wroblewski, V. J., Koester, A., Chen, Y. F., Clutinger, C. K., Tigno, X. T., ... Etgen, G. J. (2007). The metabolic state of diabetic monkeys is regulated by fibroblast growth factor-21. *Endocrinology*, 148(2), 774–781.
- Kim, J. B., Sarraf, P., Wright, M., Yao, K. M., Mueller, E., Solanes, G., ... Spiegelman, B. M. (1998). Nutritional and insulin regulation of fatty acid synthetase and leptin gene expression through ADD1/SREBP1. *Journal of Clinical Investigation*, 101(1), 1–9.

- Kir, S., Kliewer, S. A., & Mangelsdorf, D. J. (2011). Roles of FGF19 in liver metabolism. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 76, 139–144.
- Klemm, D. J., Leitner, J. W., Watson, P., Nesterova, A., Reusch, J. E. B., Goalstone, M. L., & Draznin, B. (2001). Insulin-induced adipocyte differentiation: Activation of CREB rescues adipogenesis from the arrest caused by inhibition of prenylation. *Journal of Biological Chemistry*, 276(30), 28430–28435.
- Kong, B., Huang, J., Zhu, Y., Li, G., Williams, J., Shen, S., ... Guo, G. L. (2014). Fibroblast growth factor 15 deficiency impairs liver regeneration in mice. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 306(10), 893–902.
- Koryakina, Y., Jones, S. M., Cornett, L. E., Seely, K., Brents, L., Prather, P. L., Kofman, A., & Kurten, R. C. (2012). Effects of the  $\beta$ -agonist, isoprenaline, on the down-regulation, functional responsiveness and trafficking of  $\beta$ 2-adrenergic receptors with N-terminal polymorphisms. *Cell biology international*, 36(12), 1171–1183.
- Krauss, S., Zhang, C. Y., & Lowell, B. B. (2005). The mitochondrial uncoupling-protein homologues. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 6(3), 248–261.
- Kuo, M. M. C., Kim, S., Tseng, C. Y., Jeon, Y. H., Choe, S., & Lee, D. K. (2014). BMP-9 as a potent brown adipogenic inducer with anti-obesity capacity. *Biomaterials*, 35(10), 3172–3179.
- Kurosu, H., Choi, M., Ogawa, Y., Dickson, A. S., Goetz, R., Eliseenkova, A. V., ... Kuro-O, M. (2007). Tissue-specific expression of  $\beta$ klotho and Fibroblast Growth Factor (FGF) receptor isoforms determines metabolic activity of FGF19 and FGF21. *Journal of Biological Chemistry*, 282(37), 26687–26695.
- Kuwahara, K., Saito, Y., Takano, M., Arai, Y., Yasuno, S., Nakagawa, Y., ... Nakao, K. (2003). NRSF regulates the fetal cardiac gene program and maintains normal cardiac structure and function. *EMBO Journal*, 22(23), 6310–6321.
- Lee, M.-W., Lee, M., & Oh, K.-J. (2019). Adipose Tissue-Derived Signatures for Obesity and Type 2 Diabetes: Adipokines, Batokines and MicroRNAs. In *Journal of Clinical Medicine* (Vol. 8).
- Lee, Y. H., Petkova, A. P., Mottillo, E. P. & Granneman, J.G. (2012). In vivo identification of biopotential adipocyte progenitors recruited by  $\beta$ 3-adrenoreceptor activation and high-fat feeding. *Cell Metabolism* 15, 480-491.
- Lefterova, M. I., & Lazar, M. A. (2009). New developments in adipogenesis. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 20(3), 107–114.

- Lenicek, M., Duricova, D., Komarek, V., Gabrysova, B., Lukas, M., Smerhovsky, Z., & Vitek, L. (2011). Bile acid malabsorption in inflammatory bowel disease: Assessment by serum markers. *Inflammatory Bowel Diseases*, 17(6), 1322–1327.
- Li, S., Shin, H. J., Ding, E. L., & van Dam, R. M. (2009). Adiponectin Levels and Risk of Type 2 Diabetes. *Jama*, 302(2), 179.
- Liang, Q., Zhong, L., Zhang, J., Wang, Y., Bornstein, S. R., Triggle, C. R., ... Xu, A. (2014). FGF21 maintains glucose homeostasis by mediating the cross talk between liver and brain during prolonged fasting. *Diabetes*, 63(12), 4064–4075.
- Lin, B. C., Wang, M., Blackmore, C., & Desnoyers, L. R. (2007). Liver-specific activities of FGF19 require klotho beta. *Journal of Biological Chemistry*, 282(37), 27277–27284.
- Lin, Z., Tian, H., Lam, K. S. L., Lin, S., Hoo, R. C. L., Konishi, M., ... Li, X. (2013). Adiponectin mediates the metabolic effects of FGF21 on glucose homeostasis and insulin sensitivity in mice. *Cell Metabolism*, 17(5), 779–789.
- Liu, S. Q., Roberts, D., Kharitonov, A., Zhang, B., Hanson, S. M., Li, Y. C., ... Wu, Y. H. (2013). Endocrine protection of ischemic myocardium by FGF21 from the liver and adipose tissue. *Scientific Reports*, 3.
- López, M., Varela, L., Vázquez, M.J., Rodríguez-Cuenca, S., ..., Vidal-Puig, A. (2010). Hypothalamic AMPK and fatty acid metabolism mediate thyroid regulation of energy balance. *Nat Med* 16, 1001-1008.
- Ludwig, R. G., Rocha, A. L., & Mori, M. A. (2018). Circulating molecules that control brown/beige adipocyte differentiation and thermogenic capacity. *Cell Biology International*, 42(6), 701–710.
- Lundåsen, T., Gälman, C., Angelin, B., & Rudling, M. (2006). Circulating intestinal fibroblast growth factor 19 has a pronounced diurnal variation and modulates hepatic bile acid synthesis in man. *Journal of Internal Medicine*, 260(6), 530–536.
- Luo, J., Ko, B., Elliott, M., Zhou, M., Lindhout, D. A., Phung, V., ... Ling, L. (2014). Liver Disease: A nontumorigenic variant of FGF19 treats cholestatic liver diseases. *Science Translational Medicine*, 6(247), 1–12.
- Maddaluno, L., Urwyler, C., & Werner, S. (2017). Fibroblast growth factors: Key players in regeneration and tissue repair. *Development (Cambridge)*, 144(22), 4047–4060.
- Madsen, L., Pedersen, L. M., Lillefosse, H. H., Fjære, E., Bronstad, I., Hao, Q., ... Kristiansen, K. (2010). UCP1 induction during recruitment of brown adipocytes in white adipose tissue is dependent

- on cyclooxygenase activity. *PLoS ONE*, 5(6).
- Maillet, M., Berlo, J. H. Van, & Molkentin, J. D. (2015). *Molecular basis of physiological heart growth: fundamental concepts and new players Marjorie*. 14(1), 38–48.
- Marcelin, G., Jo, Y. H., Li, X., Schwartz, G. J., Zhang, Y., Dun, N. J., ... Chua, S. (2014). Central action of FGF19 reduces hypothalamic AGRP/NPY neuron activity and improves glucose metabolism. *Molecular Metabolism*, 3(1), 19–28.
- Martoni CJ, Labbé A, Ganopolsky JG, Prakash S, Jones ML. (2015). ges in bile acids, FGF-19 and sterol absorption in response to bile salt hydrolase active *L. reuteri* NCIMB 30242. *Gut Microbes*. (1):57-65.
- Matsubara, T., Shimamoto, S., Ijiri, D., Ohtsuka, A., Kanai, Y., & Hirabayashi, M. (2016). The effects of acute cold exposure on morphology and gene expression in the heart of neonatal chicks. *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology*, 186(3), 363–372.
- Maurizi, G., Petäistö, T., Maurizi, A., & Della Guardia, L. (2018). Key-genes regulating the liposecretion process of mature adipocytes. *Journal of Cellular Physiology*, 233(5), 3784–3793.
- McWhirter, J. R., Goulding, M., Weiner, J. A., Chun, J., & Murre, C. (1997). A novel fibroblast growth factor gene expressed in the developing nervous system is a downstream target of the chimeric homeodomain oncoprotein E2A-Pbx1. *Development*, 124(17), 3221–3232.
- Monteiro, M. P., & Batterham, R. L. (2017). The Importance of the Gastrointestinal Tract in Controlling Food Intake and Regulating Energy Balance. *Gastroenterology*, 152(7), 1707-1717.e2.
- Morrison, S.F., Madden, C.J., Tupone, D. (2014). Central neural regulation of brown adipose tissue thermogenesis and energy expenditure. *Cell Metab* 19, 741-756.
- Morrioni, M., Giordano, A., Zingaretti, M. C., Boiani, R., De Matteis, R., Kahn, B. B., ... Cinti, S. (2004). Reversible transdifferentiation of secretory epithelial cells into adipocytes in the mammary gland. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(48), 16801–16806.
- Morton, G. J., Matsen, M. E., Bracy, D. P., Meek, T. H., Nguyen, H. T., Stefanovski, D., ... Schwartz, M. W. (2013). FGF19 action in the brain induces insulin-independent glucose lowering. *Journal of Clinical Investigation*, 123(11), 4799–4808.
- Mráz, M., Lacinová, Z., Kaválková, P., Haluzíková, D., Trachta, P., Drápalová, J., ... Haluzík, M. (2011).

- Serum concentrations of fibroblast growth factor 19 in patients with obesity and type 2 diabetes mellitus: The influence of acute hyperinsulinemia, very-low calorie diet and PPAR- $\alpha$  agonist treatment. *Physiological Research*, 60(4), 627–636.
- Muguruma, K., Nishiyama, A., Kawakami, H., Hashimoto, K., & Sasai, Y. (2015). Self-organization of polarized cerebellar tissue in 3D culture of human pluripotent stem cells. *Cell Reports*, 10(4), 537–550.
- Muise, E. S., Azzolina, B., Kuo, D. W., El-Sherbeini, M., Tan, Y., Yuan, X., ... Wong, K. K. (2008). Adipose fibroblast growth factor 21 is up-regulated by peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  and altered metabolic states. *Molecular Pharmacology*, 74(2), 403–412.
- Murphy, K. G., Dhillon, W. S., & Bloom, S. R. (2006). Gut peptides in the regulation of food intake and energy homeostasis. *Endocrine Reviews*, 27(7), 719–727.
- Nagarajan, V., Fonarow, G. C., Ju, C., Pencina, M., Laskey, W. K., Maddox, T. M., ... Bhatt, D. L. (2017). Seasonal and circadian variations of acute myocardial infarction: Findings from the Get With The Guidelines–Coronary Artery Disease (GWTG-CAD) program. *American Heart Journal*, 189, 85–93.
- Nedergaard, J., Bengtsson, T., & Cannon, B. (2007). Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 293(2), 444–452.
- Nedergaard, J., Golozoubova, V., Matthias, A., Asadi, A., Jacobsson, A., & Cannon, B. (2001). UCP1: the only protein able to mediate adaptive non-shivering thermogenesis and metabolic inefficiency. *1504 g*, 82–106.
- Nedergaard, J., Petrovic, N., Lindgren, E. M., Jacobsson, A., & Cannon, B. (2005). PPAR $\gamma$  in the control of brown adipocyte differentiation. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1740(2), 293–304.
- Newhardt MF, Batushansky A, Matsuzaki S, et al. Enhancing cardiac glycolysis causes an increase in PDK4 content in response to short-term high-fat diet. *J Biol Chem*. 2019;294(45):16831-16845.
- Nguyen, K. D., Qiu, Y., Cui, X., Goh, Y. P. S., Mwangi, J., Mukundan, L., ... Francisco, S. (2012). *Ajay Chawla-TH*. 480(7375), 104–108.
- Nicholes, K., Guillet, S., Tomlinson, E., Hillan, K., Wright, B., Frantz, G. D., ... French, D. M. (2002). A mouse model of hepatocellular carcinoma: Ectopic expression of fibroblast growth factor 19 in skeletal muscle of transgenic mice. *American Journal of Pathology*, 160(6), 2295–2307.

- Nicholls, D ; Locke, R. (1984). ' Reviews in Brown Fat. *Physiological Reviews*, 64, 3–64.
- Nishimura, T., Nakatake, Y., Konishi, M., & Itoh, N. (2000). Identification of a novel FGF, FGF-21, preferentially expressed in the liver. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Structure and Expression*, 1492(1), 203–206.
- Nishimura, T., Utsunomiya, Y., Hoshikawa, M., Ohuchi, H., & Itoh, N. (1999). Structure and expression of a novel human FGF, FGF-19, expressed in the fetal brain. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Structure and Expression*, 1444(1), 148–151.
- Ornitz, D. M., & Itoh, N. (2001). Protein family review: Fibroblast growth factors. *Genome Biology*, 2(3), reviews3005.1-3005.12.
- Ostadal, B., Ostadalova, I., & Dhalla, N. S. (1999). Development of cardiac sensitivity to oxygen deficiency: Comparative and ontogenetic aspects. *Physiological Reviews*, 79(3), 635–659.
- Owen, B. M. Ding, X., Morgan, D. A., Coate, K.C., Bookout, A. L., Rahmouni, K., Kliewer, S. A. and Mangelsdorf, D. J. (2014). FGF21 acts centrally to induce sympathetic nerve activity, energy expenditure and weight loss. *Cell Met.* 20, 670-677.
- Owen, B. M. and Mangelsdorf, D. J. (2015). Tissue-specific actions of the metabolic hormones FGF15/19 and FGF21. *Trends in endocrinology and metabolism*, 26, 22-29.
- Park PH, Sanz-Garcia C, Nagy LE. (2015). Adiponectin as an anti-fibrotic and anti-inflammatory adipokine in the liver. *Curr Pathobiol Rep.* 3(4):243-252.
- Patel, V., Adya, R., Chen, J., Ramanjaneya, M., Bari, M. F., Bhudia, S. K., ... Randeve, H. S. (2014). Novel insights into the cardio-protective effects of FGF21 in lean and obese rat hearts. *PLoS ONE*, 9(2).
- Pellegrinelli V, Peirce VJ, Howard L, et al. Adipocyte-secreted BMP8b mediates adrenergic-induced remodeling of the neuro-vascular network in adipose tissue. (2018). *Nature Communications*. Nov;9(1):4974
- Pereira, R. O., Wende, A. R., Olsen, C., Soto, J., Rawlings, T., Zhu, Y., ... Abel, E. D. (2013). Inducible overexpression of GLUT1 prevents mitochondrial dysfunction and attenuates structural remodeling in pressure overload but does not prevent left ventricular dysfunction. *Journal of the American Heart Association*, 2(5), 1–17.
- Planavila, A., Redondo, I., Hondares, E., Vinciguerra, M., Munts, C., Iglesias, R., ... Villarroya, F. (2013). Fibroblast growth factor 21 protects against cardiac hypertrophy in mice. *Nature Communications*, 4(May 2013).

- Planavila, Anna, Redondo-Angulo, I., Ribas, F., Garrabou, G., Casademont, J., Giralt, M., & Villarroya, F. (2015a). Fibroblast growth factor 21 protects the heart from oxidative stress. *Cardiovascular Research*, *106*(1), 19–31.
- Planavila, Anna, Redondo-Angulo, I., & Villarroya, F. (2015b). FGF21 and Cardiac Physiopathology. *Frontiers in Endocrinology*, *6*(August), 1–7.
- Pluim, B. M., Zwinderman, A. H., Van Der Laarse, A., & Van Der Wall, E. E. (2000). The athlete's heart: A meta-analysis of cardiac structure and function. *Circulation*, *101*(3), 336–344.
- Pope, M., Budge, H., & Symonds, M. E. (2014). The developmental transition of ovine adipose tissue through early life. *Acta Physiologica*, *210*(1), 20–30.
- Porta, R., Borea, R., Coelho, A., Khan, S., Araújo, A., Reclusa, P., ... Rolfo, C. (2017). FGFR a promising druggable target in cancer: Molecular biology and new drugs. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, *113*, 256–267.
- Potthoff, M. J., Boney-montoya, J., Choi, M., He, T., Sunny, E., Satapati, S., ... Kliewer, S. a. (2011). *the CREB-PGC-1  $\alpha$  Pathway*. *13*(6), 729–738.
- Potthoff, M. J., Kliewer, S. A., & Mangelsdorf, D. J. (2012). Endocrine fibroblast growth factors 15/19 and 21: From feast to famine. *Genes and Development*, *26*(4), 312–324.
- Presta, M., Dell'Era, P., Mitola, S., Moroni, E., Ronca, R., & Rusnati, M. (2005). Fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor system in angiogenesis. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, *16*(2 SPEC. ISS.), 159–178.
- Puigserver, P., and Spiegelman, B.M. (2003). Peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  coactivator 1 $\alpha$  (PGC-1 $\alpha$ ): Transcriptional coactivator and metabolic regulator. *Endocr. Rev.* *24*, 78-90.
- Puzzo, D., Raiteri, R., Castaldo, C. et al. (2016). CL316,243, a  $\beta$ 3-adrenergic receptor agonist, induces muscle hypertrophy and increased strength. *Sci Rep* *6*, 37504.
- Qiao, L., Yoo, H. S., Bosco, C., Lee, B., Feng, G. S., Schaack, J., ... Shao, J. (2014). Adiponectin reduces thermogenesis by inhibiting brown adipose tissue activation in mice. *Diabetologia*, *57*(5), 1027–1036.
- Raher, M. J., Thibault, H. B., Buys, E. S., Kuruppu, D., Shimizu, N., Brownell, A. L., ... Scherrer-Crosbie, M. (2008). A short duration of high-fat diet induces insulin resistance and predisposes to adverse left ventricular remodeling after pressure overload. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, *295*(6), 2495–2503.



- Rajala, M. W., Qi, Y., Patel, H. R., Takahashi, N., Banerjee, R., Pajvani, U. B., ... Ahima, R. S. (2004). Regulation of resistin expression and circulating levels in obesity, diabetes, and fasting. *Diabetes*, *53*(7), 1671–1679.
- Randle, P. J. (1998). Regulatory interactions between lipids and carbohydrates: The glucose fatty acid cycle after 35 years. *Diabetes/Metabolism Reviews*, *14*(4), 263–283.
- Rao, R.R., Long, J.Z., White, J.P., Svensson, K.J., Lou, J., Lokurkar, I., Jedrychowski, M.P., Ruas, J.L., Wrann, C.D., Lo, J.C., et al. (2014). Meteorin-like is a hormone that regulates immune-adipose interactions to increase beige fat thermogenesis. *Cell* *157*, 1279-1291.
- Redondo-Angulo, I., Mas-Stachurska, A., Sitges, M., Tinahones, F. J., Giralt, M., Villarroya, F., & Planavila, A. (2017). Fgf21 is required for cardiac remodeling in pregnancy. *Cardiovascular Research*, *113*(13), 1574–1584.
- Reiche, M., Bachmann, A., Lössner, U., Blüher, M., Stumvoll, M., & Fasshauer, M. (2010). Fibroblast growth factor 19 serum levels: Relation to renal function and metabolic parameters. *Hormone and Metabolic Research*, *42*(3), 178–181.
- Reinehr, T., Woelfle, J., Wunsch, R., & Roth, C. L. (2012). Fibroblast Growth Factor 21 (FGF-21) and its relation to obesity, metabolic syndrome, and nonalcoholic fatty liver in children: A longitudinal analysis. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, *97*(6), 2143–2150.
- Renner, O., Harsch, S., Matysik, S., Lütjohann, D., Schmitz, G., & Stange, E. F. (2014). Upregulation of hepatic bile acid synthesis via fibroblast growth factor 19 is defective in gallstone disease but functional in overweight individuals. *United European Gastroenterology Journal*, *2*(3), 216–225.
- Ribas, F., Villarroya, J., Elayne, H., Giralt, M., & Villarroya, F. (2014). FGF21 expression and release in muscle cells: Involvement of MyoD and regulation by mitochondria-driven signalling. *Biochemical Journal*, *463*(2), 191–199.
- Ritter, O., & Neyses, L. (2003). The molecular basis of myocardial hypertrophy and heart failure. *Trends in Molecular Medicine*, *9*(7), 313–321.
- Roberts, L. D., Boström, P., O’Sullivan, J. F., Schinzel, R. T., Lewis, G. D., Dejam, A., ... Gerszten, R. E. (2014).  $\beta$ -Aminoisobutyric acid induces browning of white fat and hepatic  $\beta$ -oxidation and is inversely correlated with cardiometabolic risk factors. In *Cell Metabolism* (Vol. 19).
- Rosell, M., Hondares, E., Iwamoto, S., Gonzalez, F. J., Wabitsch, M., Staels, B., ... Villarroya, F. (2012). Peroxisome proliferator-activated receptors- $\alpha$  and - $\gamma$  and cAMP-mediated pathways, control retinol-binding protein-4 gene expression in brown adipose tissue. *Endocrinology*, *153*(3),

1162–1173.

- Rosell, M., Kaforou, M., Frontini, A., Okolo, A., Chan, Y. W., Nikolopoulou, E., ... Christian, M. (2014). Brown and white adipose tissues: Intrinsic differences in gene expression and response to cold exposure in mice. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 306(8).
- Rosen, E.D., and Spiegelman, B.M. (2014). What We Talk About When We Talk About Fat. *Cell* 156, 20-44.
- Rosenwald, M., Perdikar, A., Rulicke, T. & Wolfrum, C. (2013). Bi-directional interconversion of brite and white adipocytes. *Nat Cell Biol* 15, 659-667.
- Rosenwald, M. & Wolfrum, C. (2014). The origin and definition of brite versus white and classical brown adipocytes. *Adipocyte* 3, 4-9.
- Rothwell, N. J., & Stock, M. J. (1981). A role for insulin in the diet-induced thermogenesis of cafeteria-fed rats. *Metabolism*, 30(7), 673–678.
- Ruas, J. L., White, J. P., Rao, R. R., Kleiner, S., Brannan, K. T., Harrison, B. C., Greene, N. P., Wu, J., Estall, J. L., Irving, B. A., Lanza, I. R., Rasbach, K. A., Okutsu, M., Nair, K. S., Yan, Z., Leinwand, L. A., & Spiegelman, B. M. (2012). A PGC-1 $\alpha$  isoform induced by resistance training regulates skeletal muscle hypertrophy. *Cell*, 151(6), 1319–1331.
- Rupp, H. (1981). The adaptive changes in the isoenzyme pattern of myosin from hypertrophied rat myocardium as a result of pressure overload and physical training. *Basic Research in Cardiology*, 76(1), 79–88.
- Ryan, K. K., Kohli, R., Gutierrez-Aguilar, R., Gaitonde, S. G., Woods, S. C., & Seeley, R. J. (2013). Fibroblast growth factor-19 action in the brain reduces food intake and body weight and improves glucose tolerance in male rats. *Endocrinology*, 154(1), 9–15.
- Ryti, N. R. I., Guo, Y., & Jaakkola, J. J. K. (2016). Global association of cold spells and adverse health effects: A systematic review and meta-analysis. *Environmental Health Perspectives*, 124(1), 12–22.
- Ryti, N. R. I., Mäkikyrö, E. M. S., Antikainen, H., Hookana, E., Junttila, M. J., Ikäheimo, T. M., ... Jaakkola, J. J. K. (2017). Risk of sudden cardiac death in relation to season-specific cold spells: A case-crossover study in Finland. *BMJ Open*, 7(11), 7–10.
- Sacks, H., & Symonds, M. E. (2013). Anatomical locations of human brown adipose tissue: Functional relevance and implications in obesity and type 2 diabetes. *Diabetes*, 62(6), 1783–1790.

- Saely, C. H., Geiger, K., & Drexel, H. (2011). Brown versus white adipose tissue: A mini-review. *Gerontology*, *58*(1), 15–23.
- Saito, M., Okamatsu-Ogura, Y., Matsushita, M., Watanabe, K., Yoneshiro, T., Nio-Kobayashi, J., ... Tsujisaki, M. (2009). High incidence of metabolically active brown adipose tissue in healthy adult humans: Effects of cold exposure and adiposity. *Diabetes*, *58*(7), 1526–1531.
- Sanchez-Gurmanches, J., and Guertin, D.A. (2014). Adipocytes arise from multiples lineages that are heterogeneously and dynamically distributed. *Nat. Commun.* *5*, 4099.
- Sánchez-Infantes, D., Gallego-Escuredo, J. M., Díaz, M., Aragonés, G., Sebastiani, G., López-Bermejo, A., ... Ibáñez, L. (2015). Circulating FGF19 and FGF21 surge in early infancy from infra-to supra-adult concentrations. *International Journal of Obesity*, *39*(5), 742–746.
- Sarruf, D. A., Thaler, J. P., Morton, G. J., German, J., Fischer, J. D., Ogimoto, K., & Schwartz, M. W. (2010). Fibroblast growth factor 21 action in the brain increases energy expenditure and insulin sensitivity in obese rats. *Diabetes*, *59*(7), 1817–1824.
- Sarzani, P., Dessi-Fulgheri, P., Paci, V.M., Espinosa, E., and Rappelli, A. (1996). Expression of natriuretic peptide receptors in human adipose and other tissues. *J. Endocrinol. Invest.* *19*, 581-585.
- Sayin SI, Wahlström A, Felin J, et al. (2013). Gut microbiota regulates bile acid metabolism by reducing the levels of tauro-beta-muricholic acid, a naturally occurring FXR antagonist. *Cell Metab.* *17*(2):225-235.
- Schaap, F. G., van der Gaag, N. A., Gouma, D. J., & Jansen, P. L. M. (2009). High expression of the bile salt-homeostatic hormone fibroblast growth factor 19 in the liver of patients with extrahepatic cholestasis. *Hepatology*, *49*(4), 1228–1235.
- Schirone, L., Forte, M., Palmerio, S., Yee, D., Nocella, C., Angelini, F., Pagano, F., Schiavon, S., Bordin, A., Carrizzo, A., et al. (2017). A Review of the Molecular Mechanisms Underlying the Development and Progression of Cardiac Remodeling. *Oxid. Med. Cell. Longev.* *2017*
- Schoenberg, K. M., Giesy, S. L., Harvatine, K. J., Waldron, M. R., Cheng, C., Kharitononkov, A., & Boisclair, Y. R. (2011). Plasma FGF21 is elevated by the intense lipid mobilization of lactation. *Endocrinology*, *152*(12), 4652–4661.
- Schreuder, T. C. M. A., Marsman, H. A., Lenicek, M., Van Werven, J. R., Nederveen, A. J., Jansen, P. L. M., & Schaap, F. G. (2010). The hepatic response to FGF19 is impaired in patients with nonalcoholic fatty liver disease and insulin resistance. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, *298*(3), 440–445.

- Seale, P., Bjork, B., Yang, W., Kajimura, S., Chin, S., Kuang, S., Scimè, A., Devarakonda, S., Conroe, H.M., Erdjument-Bromage, H. et al. (2008). PRDM16 controls a brown fat/skeletal muscle switch. *Nature* 454, 961-967.
- Seale, P., Conroe, H. M., Estall, J., Kajimura, S., Frontini, A., Ishibashi, J., Cohen, P., Cinti, S., & Spiegelman, B. M. (2011). Prdm16 determines the thermogenic program of subcutaneous white adipose tissue in mice. *The Journal of clinical investigation*, 121(1), 96–105.
- Semba, R. D., Crasto, C., Strait, J., Sun, K., Schaumberg, D. A., & Ferrucci, L. (2013). Elevated serum fibroblast growth factor 21 is associated with hypertension in community-dwelling adults. *Journal of Human Hypertension*, 27(6), 397–399.
- Shabalina IG, Petrovic N, de Jong JM, Kalinovich AV, Cannon B, Nedergaard J. (2013). UCP1 in brite/beige adipose tissue mitochondria is functionally thermogenic. *Cell Rep*. 2013;5(5):1196-1203.
- Shan, Z., Alvarez-Sola, G., Uriarte, I., Arechederra, M., Fernández-Barrena, M. G., Berasain, C., ... Avila, M. A. (2018). Fibroblast growth factors 19 and 21 in acute liver damage. *Annals of Translational Medicine*, 6(12), 257–257.
- Sharp, L. Z., Shinoda, K., Ohno, H., Scheel, D. W., Tomoda, E., Ruiz, L., ... Kajimura, S. (2012). Human BAT Possesses Molecular Signatures That Resemble Beige/Brite Cells. *PLoS ONE*, 7(11).
- Shi, F., & Collins, S. (2017). Second messenger signaling mechanisms of the brown adipocyte thermogenic program: An integrative perspective. *Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation*, 31(2), 1–9.
- Shimizu, I., & Minamino, T. (2016). Physiological and pathological cardiac hypertrophy. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 97, 245–262.
- Shimizu, M., Morimoto, H., Maruyama, R., Inoue, J., & Sato, R. (2015). Selective regulation of FGF19 and FGF21 expression by cellular and nutritional stress. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 61(2), 154–160.
- Shin, D. J., & Osborne, T. F. (2009). FGF15/FGFR4 integrates growth factor signaling with hepatic bile acid metabolism and insulin action. *Journal of Biological Chemistry*, 284(17), 11110–11120.
- Shukla, L., Morrison, W. A., & Shayan, R. (2015). Adipose-Derived Stem Cells in Radiotherapy Injury: A New Frontier. *Frontiers in Surgery*, 2(January), 10–13.
- Sinal, C. J., Tohkin, M., Miyata, M., Ward, J. M., Lambert, G., & Gonzalez, F. J. (2000). Targeted

- disruption of the nuclear receptor FXR/BAR impairs bile acid and lipid homeostasis. *Cell*, 102(6), 731–744.
- Skillington, J., Choy, L., & Derynck, R. (2002). Bone morphogenetic protein and retinoic acid signaling cooperate to induce osteoblast differentiation of preadipocytes. *Journal of Cell Biology*, 159(1), 135–146.
- Song, X., Wang, S., Hu, Y., Yue, M., Zhang, T., Liu, Y., ... Shang, K. (2017). Impact of ambient temperature on morbidity and mortality: An overview of reviews. *Science of the Total Environment*, 586(222), 241–254.
- Sonne, D. P., Van Nierop, F. S., Kulik, W., Soeters, M. R., Vilsbøll, T., & Knop, F. K. (2016). Postprandial plasma concentrations of individual bile acids and FGF-19 in patients with type 2 diabetes. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 101(8), 3002–3009.
- Sottile, V., & Seuwen, K. (2000). Bone morphogenetic protein-2 stimulates adipogenic differentiation of mesenchymal precursor cells in synergy with BRL 49653 (rosiglitazone). *FEBS Letters*, 475(3), 201–204.
- Staiger, H., Keuper, M., Berti, L., de Angelis, M. H., & Häring, H. U. (2017). Fibroblast growth factor 21-metabolic role in mice and men. *Endocrine Reviews*, 38(5), 468–488.
- Stanford, K. I., Middelbeek, R. J. W., Townsend, K. L., An, D., Nygaard, E. B., Hitchcox, K. M., ... Goodyear, L. J. (2013). Brown adipose tissue regulates glucose homeostasis and insulin sensitivity. *Journal of Clinical Investigation*, 123(1), 215–223.
- Stejskal, D., Karpíšek, M., Hanulová, Z., & Stejskal, P. (2008). Fibroblast growth factor-19: Development, analytical characterization and clinical evaluation of a new ELISA test. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, 68(6), 501–507.
- Strable, M., & Ntambi, J. (2010). Genetic control of de novo lipogenesis. *Biochem Mol Biol*, 45(3), 199–214.
- Sun, K., Kusminski, C. M., Luby-Phelps, K., Spurgin, S. B., An, Y. A., Wang, Q. A., ... Scherer, P. E. (2014). Brown adipose tissue derived VEGF-A modulates cold tolerance and energy expenditure. *Molecular Metabolism*, 3(4), 474–483.
- Sun, Z. (2010). Cardiovascular responses to cold exposure. *Frontiers in Bioscience - Elite*, 2 E(2), 495–503
- Symonds, M. E. (2012). Adipose tissue biology. *Adipose Tissue Biology*, 1–413.
- Symonds, M. E., Pope, M., & Budge, H. (2015). The Ontogeny of Brown Adipose Tissue. *Annual*

*Review of Nutrition*, 35(1), 295–320.

- Sztalryd, C., Xu, G., Dorward, H., Tansey, J. T., Contreras, J. A., Kimmel, A. R., & Londos, C. (2003). Perilipin A is essential for the translocation of hormone-sensitive lipase during lipolytic activation. *Journal of Cell Biology*, 161(6), 1093–1103.
- Takada, I., Kouzmenko, A. P., & Kato, S. (2009). Wnt and PPAR $\gamma$  signaling in osteoblastogenesis and adipogenesis. *Nature Reviews Rheumatology*, 5(8), 442–447.
- Tamucci, K. A., Namwanje, M., Fan, L., & Qiang, L. (2018). The dark side of browning. *Protein and Cell*, 9(2), 152–163.
- Tan, B. K., Adya, R & Randeve, H. S. (2010). Omentin: a novel link between inflammation, diabetes, and cardiovascular disease. *Trends Cardiovasc Med* 20, 143-148.
- Tan, B. K., Hallschmid, M., Adya, R., Kern, W., Lehnert, H., & Randeve, H. S. (2011). Fibroblast growth factor 21 (FGF21) in human cerebrospinal fluid: Relationship with plasma FGF21 and body adiposity. *Diabetes*, 60(11), 2758–2762.
- Tanaka, T., Yoshida, N., Kishimoto, T., & Akira, S. (1997). Defective adipocyte differentiation in mice lacking the C/EBP $\beta$  and/or C/EBP $\delta$  gene. *EMBO Journal*, 16(24), 7432–7443.
- Tang, Q. Q., Otto, T. C., & Daniel Lane, M. (2003). Mitotic clonal expansion: A synchronous process required for adipogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(1), 44–49.
- Tang, Q. Q., Zhang, J. W., & Lane, M. D. (2004). Sequential gene promoter interactions of C/EBP $\beta$ , C/EBP $\alpha$ , and PPAR $\gamma$  during adipogenesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 319(1), 235–239.
- Tchkonia, T., Giorgadze, N., Pirtskhalava, T., Thomou, T., DePonte, M., Koo, A., ... Kirkland, J. L. (2006). Fat depot-specific characteristics are retained in strains derived from single human preadipocytes. *Diabetes*, 55(9), 2571–2578.
- Templeman, N. M., Beaudry, J. L., Le Moine, C. M. R., & McClelland, G. B. (2010). Chronic hypoxia- and cold-induced changes in cardiac enzyme and gene expression in CD-1 mice. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1800(12), 1248–1255.
- Tj, B., Ch, V., & Ck, S. (2010). Sympathetic and sensory innervation of brown adipose tissue . *International Journal of Obesity*, 34(Suppl), S36-42.
- Tomiyama, K. I., Maeda, R., Urakawa, I., Yamazaki, Y., Tanaka, T., Ito, S., ... Nabeshima, Y. I. (2010). Relevant use of Klotho in FGF19 subfamily signaling system in vivo. *Proceedings of the*

- National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(4), 1666–1671.
- Tomlinson, E., Fu, L., John, L., Hultgren, B., Huang, X., Renz, M., ... Stewart, T. A. (2002). Decreased Adiposity. *Cardiovascular Research*, 143(5), 1741–1747.
- Tontonoz, P., Kim, J. B., Graves, R. A., & Spiegelman, B. M. (1993). ADD1: a novel helix-loop-helix transcription factor associated with adipocyte determination and differentiation. *Molecular and Cellular Biology*, 13(8), 4753–4759.
- Tontonoz, Peter, & Spiegelman, B. M. (2008). Fat and Beyond: The Diverse Biology of PPAR $\gamma$ . *Annual Review of Biochemistry*, 77(1), 289–312.
- Tynismaa, H., Carroll, C. J., Raimundo, N., Ahola-erkkilä, S., Wenz, T., Ruhanen, H., ... Suomalainen, A. (2010). Mitochondrial myopathy induces a starvation-like response. *Human Molecular Genetics*, 19(20), 3948–3958.
- Uriarte, I., Fernandez-Barrena, M. G., Monte, M. J., Latasa, M. U., Chang, H. C., Carotti, S., Vespasiani-Gentilucci, U., Morini, S., Vicente, E., Concepcion, A. R., Medina, J. F., Marin, J. J., Berasain, C., Prieto, J., & Avila, M. A. (2013). Identification of fibroblast growth factor 15 as a novel mediator of liver regeneration and its application in the prevention of post-resection liver failure in mice. *Gut*, 62(6), 899–910.
- Van Bilsen, M., Van Nieuwenhoven, F. A., & Van Der Vusse, G. J. (2009). Metabolic remodelling of the failing heart: Beneficial or detrimental? *Cardiovascular Research*, 81(3), 420–428.
- Van der Vusse, G. J., Glatz, J. F. C., Stam, H. C. G., & Reneman, R. S. (1992). Fatty acid homeostasis in the normoxic and ischemic heart. *Physiological Reviews*, 72(4), 881–940.
- Van Marken Lichtenbelt, W. D., Vanhommel, J. W., Smulders, N. M., Drossaerts, J. M. A. F. L., Kemerink, G. J., Bouvy, N. D., ... Teule, G. J. J. (2009). Cold-activated brown adipose tissue in healthy men. *New England Journal of Medicine*, 360(15), 1500–1508.
- van Nierop, F. S., Kulik, W., Endert, E., Schaap, F. G., Olde Damink, S. W., Romijn, J. A., & Soeters, M. R. (2017). Effects of acute dietary weight loss on postprandial plasma bile acid responses in obese insulin resistant subjects. *Clinical Nutrition*, 36(6), 1615–1620.
- Vegiopoulos, A., Müller-decker, K., Strzoda, D., Schmitt, I., Chichelnitskiy, E., Ostertag, A., ... Herzig, S. (2010). Recruitment of Brown Adipocytes. *Science*, 328(May), 1158–1161.
- Véniant, M. M., Hale, C., Helmering, J., Chen, M. M., Stanislaus, S., Busby, J., ... Lloyd, D. J. (2012). FGF21 promotes metabolic homeostasis via white adipose and leptin in mice. *PLoS ONE*, 7(7).
- Villarroya, F., Cereijo, R., Villarroya, J., & Giralt, M. (2017). Brown adipose tissue as a secretory

- organ. *Nature Reviews Endocrinology*, 13(1), 26–35.
- Villarroya, F., & Vidal-Puig, A. (2013). Beyond the sympathetic tone: The new brown fat activators. *Cell Metabolism*, 17(5), 638–643.
- Villarroya, F., Cereijo, R., Villarroya, J., Gavaldà-Navarro, A., and Giralt, M. (2018). Toward and Understanding of How Immune Cells Control Brown and Beige Adipobiology. *Cell Metab.* 27, 954-961.
- Villarroya, J., Cereijo, R., Gavaldà-Navarro, A., Peyrou, M., Giralt, M., & Villarroya, F. (2019). New insights into the secretory functions of brown adipose tissue. *Journal of Endocrinology*, 243(2), R19–R27.
- Villarroya, J., Flachs, P., Redondo-Angulo, I., Giralt, M., Medrikova, D., Villarroya, F., ... Planavila, A. (2014). Fibroblast growth factor-21 and the beneficial effects of long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids. *Lipids*, 49(11), 1081–1089.
- Virtanen, K. A., & Al., E. (2009). Functional Brown Adipose Tissue in Healthy Adults. *The New England Journal of Medicine*. 360, 1518-1525.
- von Essen, G., Lindsund, E., Cannon, B., & Nedergaard, J. (2017). Adaptive facultative diet-induced thermogenesis in wild-type but not in UCP1-ablated mice. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 313(5), E515–E527.
- Wabitsch, M., Brenner, R. E., Melzner, I., Braun, M., Möller, P., Heinze, E., Debatin, K. M., & Hauner, H. (2001). Characterization of a human preadipocyte cell strain with high capacity for adipose differentiation. *International journal of obesity and related metabolic disorders : journal of the International Association for the Study of Obesity*, 25(1), 8–15.
- Waldén, T. B., Hansen, I. R., Timmons, J. A., Cannon, B., & Nedergaard, J. (2012). Recruited vs. nonrecruited molecular signatures of brown, “brite,” and white adipose tissues. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 302(1), 19–31.
- Walters, J. R. F., Tasleem, A. M., Omer, O. S., Brydon, W. G., Dew, T., & le Roux, C. W. (2009). A New Mechanism for Bile Acid Diarrhea: Defective Feedback Inhibition of Bile Acid Biosynthesis. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 7(11), 1189–1194.
- Wang, D., Zhu, W., Li, J., An, C., & Wang, Z. (2013). Serum concentrations of fibroblast growth factors 19 and 21 in women with gestational diabetes mellitus: Association with insulin resistance, adiponectin, and polycystic ovary syndrome history. *PLoS ONE*, 8(11), 1–8.
- Wang, F., Kan, M., Yan, G., Xu, J., & McKeethan, W. L. (1995). Alternately spliced NH 2 -terminal



- immunoglobulin-like loop I in the ectodomain of the fibroblast growth factor (FGF) receptor 1 lowers affinity for both heparin and FGF-1. *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 270, pp. 10231–10235.
- Wang, H., Iakova, P., Wilde, M., Welm, A., Goode, T., ..., Scherer, P. E. (2013). Tracking adipogenesis during white adipose tissue development, expansion and regeneration. *Nature Medicine* 19, 1338-1344.
- Wang, Q., Tao, C., Gupta, R. K., & Scherer, P. E. (2013). Tracking adipogenesis during white adipose development, expansion and regeneration. *Nat Med* 19, 1338-1344.
- Wang, W., and Seale, P. (2016). Control of brown and beige fat development. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 17, 691-702.
- Watanabe, M., Houten, S. M., Matak, C., Christoffolete, M. A., Kim, B. W., Sato, H., ... Auwerx, J. (2006). Bile acids induce energy expenditure by promoting intracellular thyroid hormone activation. *Nature*, 439(7075), 484–489.
- Weeks, K. L., & McMullen, J. R. (2011). The athlete's heart vs. the failing heart: Can signaling explain the two distinct outcomes? *Physiology*, 26(2), 97–105.
- Wente, W., Efanov, A. M., Brenner, M., Kharitonov, A., Köster, A., Sandusky, G. E., ... Gromada, J. (2006). Fibroblast growth factor-21 improves pancreatic  $\beta$ -cell function and survival by activation of extracellular signal-regulated kinase 1/2 and Akt signaling pathways. *Diabetes*, 55(9), 2470–2478.
- Whittle, A. J., Carobbio, S., Martins, L., Slawik, M., Hondares, E., Vázquez, M. J., ... Vidal-Puig, A. (2012). BMP8B increases brown adipose tissue thermogenesis through both central and peripheral actions. *Cell*, 149(4), 871–885.
- Whittle, A. J., López, M., & Vidal-Puig, A. (2011). Using brown adipose tissue to treat obesity - the central issue. *Trends in Molecular Medicine*, 17(8), 405–411.
- Woo, Y. C., Xu, A., Wang, Y., & Lam, K. S. L. (2013). Fibroblast Growth Factor 21 as an emerging metabolic regulator: Clinical perspectives. *Clinical Endocrinology*, 78(4), 489–496.
- Worthmann, A., John, C., Rühlemann, M. C., Baguhl, M., Heinsen, F. A., Schaltenberg, N., ... Heeren, J. (2017). Cold-induced conversion of cholesterol to bile acids in mice shapes the gut microbiome and promotes adaptive thermogenesis. *Nature Medicine*, 23(7), 839–849.
- Wright TJ, Ladher R, McWhirter J, Murre C, Schoenwolf GC, Mansour SL. (2004). Mouse FGF15 is the ortholog of human and chick FGF19, but is not uniquely required for otic induction. *Dev Biol*

269: 264–275,

- Wu, A. L., Coulter, S., Liddle, C., Wong, A., Eastham-Anderson, J., French, D. M., ... Sonoda, J. (2011). FGF19 regulates cell proliferation, glucose and bile acid metabolism via FGFR4-dependent and independent pathways. *PLoS ONE*, 6(3).
- Wu, X., Ge, H., Lemon, B., Weiszmann, J., Gupte, J., Hawkins, N., ... Li, Y. (2009). Selective activation of FGFR4 by an FGF19 variant does not improve glucose metabolism in ob/ob mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(34), 14379–14384.
- Wu, Z., Rosen, E. D., Brun, R., Hauser, S., Adelmant, G., Troy, A. E., ... Spiegelman, B. M. (1999). Cross-regulation of C/EBP $\alpha$  and PPAR $\gamma$  controls the transcriptional pathway of adipogenesis and insulin sensitivity. *Molecular Cell*, 3(2), 151–158.
- Xu, J., Stanislaus, S., Chinookoswong, N., Lau, Y. Y., Hager, T., Patel, J., ... Véniant, M. M. (2009). Acute glucose-lowering and insulin-sensitizing action of FGF21 in insulin-resistant mouse models - Association with liver and adipose tissue effects. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 297(5), 1105–1114.
- Yamauchi, T., Kamon, J., Minokoshi, Y., Ito, Y., Waki, H., Uchida, S., ... Kadowaki, T. (2002). Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nature Medicine*, 8(11), 1288–1295.
- Yang, C., Jin, C., Li, X., Wang, F., McKeehan, W. L., & Luo, Y. (2012). Differential specificity of endocrine FGF19 and FGF21 to FGFR1 and FGFR4 in complex with KLB. *PLoS ONE*, 7(3).
- Yang, S. J., Hong, H. C., Choi, H. Y., Yoo, H. J., Cho, G. J., Hwang, T. G., ... Choi, K. M. (2011). Effects of a three-month combined exercise programme on fibroblast growth factor 21 and fetuin-A levels and arterial stiffness in obese women. *Clinical Endocrinology*, 75(4), 464–469.
- Yeo, C. R., Agrawal, M., Hoon, S., Shabbir, A., Shrivastava, M. K., Huang, S., Khoo, C. M., Chhay, V., Yassin, M. S., Tai, E. S., Vidal-Puig, A., & Toh, S. A. (2017). SGBS cells as a model of human adipocyte browning: A comprehensive comparative study with primary human white subcutaneous adipocytes. *Scientific reports*, 7(1), 4031.
- Yoneshiro, T., Iwanaga, T., Saito, M., Yoneshiro, T., Aita, S., Matsushita, M., & Kayahara, T. (2013). *Recruited brown adipose tissue as an antiobesity agent in humans* Find the latest version : Brief report *Recruited brown adipose tissue as an antiobesity agent in humans*. 123(8), 3404–3408.
- You M, Rogers CQ. (2009). Adiponectin: a key adipokine in alcoholic fatty liver. *Exp Biol Med* 234(8):850-859

- Yu, C., Wang, F., Kan, M., Jin, C., Jones, R. B., Weinstein, M., ... McKeehan, W. L. (2000). Elevated cholesterol metabolism and bile acid synthesis in mice lacking membrane tyrosine kinase receptor FGFR4. *Journal of Biological Chemistry*, 275(20), 15482–15489.
- Zafir, B. (2013). Brown adipose tissue: Research milestones of a potential player in human energy balance and obesity. *Hormone and Metabolic Research*, 45(11), 774–785.
- Zamani, N., & Brown, C. W. (2011). Emerging roles for the transforming growth factor- $\beta$  superfamily in regulating adiposity and energy expenditure. *Endocrine Reviews*, 32(3), 387–403.
- Zannad, F., Briancon, S., Juilliere, Y., Mertes, P. M., Villemot, J. P., Alla, F., & Virion, J. M. (1999). Incidence, clinical and etiologic features, and outcomes of advanced chronic heart failure: The EPICAL study. *Journal of the American College of Cardiology*, 33(3), 734–742.
- Zechner, R., Zimmermann, R., Eichmann, T. O., Kohlwein, S. D., Haemmerle, G., Lass, A., & Madeo, F. (2012). FAT SIGNALS - Lipases and lipolysis in lipid metabolism and signaling. *Cell Metabolism*, 15(3), 279–291.
- Zhang, F., Yu, L., Lin, X., Cheng, P., He, L., Li, X., ... Zhang, C. (2015). Minireview: Roles of fibroblast growth factors 19 and 21 in metabolic regulation and chronic diseases. *Molecular Endocrinology*, 29(10), 1400–1413.
- Zhang, J., Gupte, J., Gong, Y., Weiszmann, J., Zhang, Y., Lee, K. J., ... Li, Y. (2017). Chronic Over-expression of Fibroblast Growth Factor 21 Increases Bile Acid Biosynthesis by Opposing FGF15/19 Action. *EBioMedicine*, 15, 173–183.
- Zhang, J. W., Klemm, D. J., Vinson, C., & Lane, M. D. (2004). Role of CREB in Transcriptional Regulation of CCAAT/Enhancer-binding Protein  $\beta$  Gene during Adipogenesis. *Journal of Biological Chemistry*, 279(6), 4471–4478.
- Zhang, L., Keung, W., Samokhvalov, V., Wang, W., & Lopaschuk, G. D. (2010). Role of fatty acid uptake and fatty acid  $\beta$ -oxidation in mediating insulin resistance in heart and skeletal muscle. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1801(1), 1–22.
- Zhang, X., Yeung, D. C. Y., Karpisek, M., Stejskal, D., Zhou, Z. G., Liu, F., ... Xu, A. (2019). Erratum: Serum FGF21 levels are increased in obesity and are independently associated with the metabolic syndrome in humans (Diabetes (2008) 57 (1246–1253) DOI: 10.2337/db07-1476). *Diabetes*, 68(1), 235.
- Zhou, M., Learned, R. M., Rossi, S. J., Depaoli, A. M., Tian, H., & Ling, L. (2016). Engineered fibroblast growth factor 19 reduces liver injury and resolves sclerosing cholangitis in Mdr2-deficient

mice. *Hepatology*, 63(3), 914–929.

Zhou, M., Wang, X., Phung, V., Lindhout, D. A., Mondal, K., Hsu, J. Y., ... Ling, L. (2014). Separating tumorigenicity from bile acid regulatory activity for endocrine hormone FGF19. *Cancer Research*, 74(12), 3306–3316.

Zhou, M., Yang, H., Learned, R. M., Tian, H., & Ling, L. (2017). Non-cell-autonomous activation of IL-6/STAT3 signaling mediates FGF19-driven hepatocarcinogenesis. *Nature Communications*, 8(May), 1–16.

Zingaretti, M. C., Crosta, F., Vitali, A., Guerrieri, M., Frontini, A., Cannon, B., ... Cinti, S. (2009). The presence of UCP1 demonstrates that metabolically active adipose tissue in the neck of adult humans truly represents brown adipose tissue. *FASEB Journal*, 23(9),

Zwick, R. K., Guerrero-juarez, C. F., Horsley, V., Maksim, V., Haven, N., Biology, C., ... Haven, N. (2019). *tissue*. 27(1), 68–83.