

Caracterización de la expresión hepática de FSP27 en diversas condiciones experimentales.

HERRERA MARCOS, Luis Vte.

Tutores: OSADA GARCÍA, Jesús

NAVARRO FERRANDO, M^a Ángeles

Master en Biología Molecular y Celular. Curso 2013-2014

Memoria Trabajo Fin de Máster.

Abreviaturas:

AOV:	Aceite de olive virgen
ATGL:	Lipasa de triacilglicéridos adipocitaria
cDNA:	Ácido desoxirribonucleico complementario
CGI-58:	Comparative gene identification-58
CIDE:	Cell inducing DFF45-like effector
CIDEC:	Cell inducing DFF45-like effector C
CIDE-3:	CIDEC
CM:	Camada
CREB:	Elementos de unión en respuesta a cAMP
C/EBP β :	Proteína de unión a la zona potenciadora CAAT
DEPC:	Dietil pirocarbonato
DNA:	Ácido desoxirribonucleico
EDTA:	Ácido etilendiaminotetraacético
FFA:	Ácidos grasos libres
FSP27:	Fat specific protein 27 kDa, CIDEC.
HFD:	Dieta alta en grasas
HPRT:	Hipoxantina guanina fosforribosil transferansa
HSL:	Lipasa sensible a hormonas
LD:	Gota lipídica
LDCS:	Sitios de contacto entre gotas lipídicas
LDL:	Lipoproteína de baja densidad
LFD:	Dieta baja en grasas
MN:	Mann-Whitney
MUFA:	Ácido graso monoinsaturado
mRNA:	Ácido ribonucleico mensajero
PLIN:	Perilipina 1
PPIA:	Ciclofilina A
PUFA:	Ácido graso poliinsaturado
PT:	Propionato de testosterona
TBE:	Tris Borato EDTA
TE:	Tris-EDTA
TG:	Triglicérido

TRIS:	Tris(hidroximetil)aminometano
RNA:	Ácido Ribonucleico
KO:	Knot-out
qPCR:	PCR cuantitativa
WT:	wild-type, fenotipo salvaje

INDICE:

	Página:
I. Resumen	6
II. Introducción	7
III. Antecedentes	8
IV. Objetivos	15
V. Materiales y métodos	16
V. 1 Material Biológico	16
V. 1.1 Cerdos	16
V. 1.1 a) Experimento 1 o cerdos con dieta esteatósica	16
V. 1.1 b) Experimento 2 o cerdos suplementados con fitosteroles	17
V. 1.1 c) Experimento 3 o influencia del tipo de grasa en cerdos ibéricos	18
V. 1.1 d) Experimento 4 o influencia del aceite de oliva en cerdos minipig	18
V. 1.1 e) Experimento 5 o inflamación local en cerdos	19
V. 1.2 Ratas	19
V. 1.2 a) Experimento 6 o efecto de la dieta, tamaño de la camada y testosterona en ratas esteatósicas	19
V. 1.2 b) Experimento 7 o efecto del resveratrol en ratas genéticamente obesas	19
V. 1.2 c) Experimento 8 o efecto del resveratrol en ratas obesas a través de la dieta	20
V. 2 Material Instrumental y reactivos	21
V. 2. 1 Extracción del RNA	21
V. 2. 2 Purificación del RNA	23
V. 2. 3 Retrotranscripción	23
V. 2. 4 PCR cuantitativa (qPCR)	24

V.	3 Métodos	25
	V. 3. 1. Extracción del RNA	25
	V. 3. 2. Purificación del RNA	25
	V. 3. 3. Retrotranscripción	26
	V. 3. 4. PCR cuantitativa	26
	V. 3. 4. a) Diseño de primers	28
	V. 3. 4. b) Housekeeping (gen de referencia)	29
	V. 3. 4. b) Procedimiento experimental	30
	V. 3. 5. Procedimiento matemático	30
	V. 3. 6. Análisis estadístico	31
VI.	Resultados	32
VII.	Discusión de los resultados	39
VIII.	Conclusión	42
IX.	Agradecimientos	43
X.	Bibliografía	44

I. Resumen:

El hígado graso no alcohólico está alcanzando prevalencias del 30% en ciertas poblaciones occidentales. Esta alta incidencia acarrea muchas consecuencias, ya que supone una interrupción del metabolismo hepático conllevando al desarrollo de un amplio abanico de enfermedades metabólicas.

La familia de proteínas CIDE está íntimamente relacionada con el desarrollo de estas enfermedades ya que desempeñan un papel crítico en apoptosis y metabolismo lipídico. La familia de proteínas CIDE ha sido sugerida como una nueva diana terapéutica por estar asociadas a muchas enfermedades humanas como cáncer, envejecimiento, diabetes, y obesidad. Por ejemplo FSP27/CIDEC aumenta en varias formas de hígado esteatósico. Por todo lo anterior se postula que estas proteínas pueden constituir un nexo de unión entre el metabolismo energético y la apoptosis.

Este trabajo incluye el empleo de varios modelos animales, la rata (*Rattus norvegicus*) por ser un modelo clásico de experimentación animal y el cerdo (*Sus scrofa*), por tener unas características anatómicas y funcionales muy semejantes a las humanas. Esto permite establecer mecanismos universales involucrados en la patogenia de la esteatosis y del transporte al hígado de nutrientes. Consecuentemente resulta pertinente validar los hallazgos descritos en roedores en la especie porcina para poder asumir que también confluyen en la especie humana.

A través de este trabajo se puede vislumbrar la relación manifiesta entre esteatosis hepática y el aumento de la expresión hepática de *FSP27/CIDEC* en cerdos, la diferente influencia de las distintas grasas (monoinsaturadas, poliinsaturadas o saturadas) en la expresión hepática de *CIDEC* o como la presencia de colesterol parece ser determinante en la expresión hepática de *CIDEC*. Además este estudio también recoge la influencia de otros factores como testosterona, inflamación local o resveratrol entre otros en la expresión hepática de *CIDEC*.

II. Introducción:

El hígado graso no alcohólico está alcanzando prevalencias del 30% en ciertas poblaciones occidentales [1]. Esta alta incidencia acarrea muchas consecuencias, ya que supone una alteración del metabolismo hepático conllevando al desarrollo de un amplio abanico de enfermedades metabólicas (diabetes, obesidad, esteatosis hepática y enfermedades cardiovasculares).

La familia de proteínas CIDE está íntimamente relacionada con el desarrollo de éstas y han sido sugeridas como una nueva diana terapéutica para desórdenes metabólicos [2]. Dado que las proteínas de la familia CIDE (incluyendo CIDE/CIDEC/FSP27) tienen un papel crítico en apoptosis y metabolismo lipídico, están asociadas a muchas enfermedades humanas como cáncer, envejecimiento, diabetes y obesidad [3]. Por ejemplo CIDEC/FSP27 y CIDEA aumentan su expresión en varias formas de hígado esteatósico [4]. Las funciones de las proteínas CIDE pueden proponernos un nexo entre el metabolismo energético y la apoptosis.

El empleo de varios modelos animales para caracterizar molecularmente la esteatosis hepática resulta muy interesante por permitir también su abordaje terapéutico. Sin embargo, ningún modelo animal reproduce exactamente el proceso humano. La utilización de varios modelos animales, con diferentes peculiaridades del metabolismo lipoproteico cuya respuesta esperada será diferente, permitirá desentrañar los mecanismos involucrados en la patogenia de la esteatosis y del transporte al hígado de nutrientes, así como en la patogenia y protección de la aterosclerosis.

Por ello, en este trabajo se estudiaron dos especies distintas, la rata (*Rattus norvegicus*) por ser un modelo clásico de experimentación animal y el cerdo (*Sus scrofa*). La elección de esta segunda especie es debido a que sus características anatómicas y funcionales son muy semejantes a las humanas. Consecuentemente resulta pertinente validar los hallazgos descritos en roedores en la especie porcina y así establecer mecanismos universales de esteatosis hepática que confluyan también en la especie humana.

III. Antecedentes:

La familia CIDEs (cell inducing DFF45-like effectors) es una familia de proteínas proapoptóticas que apareció tras el descubrimiento de los factores 40 y 45 de fragmentación del DNA (DFF40/45), un complejo heterodímero, ejecutor y regulador de la fragmentación del DNA, paso clave para la apoptosis celular [3, 5]. Se observó que estas dos proteínas contenían un dominio común llamado CIDE, que daba lugar a una interacción proteica de un residuo de unos 90 aa. A raíz de ello se identificaron proteínas que contenían CIDE en base a su secuencia homologa. Hasta la fecha 5 proteínas que contienen CIDE han sido identificadas en mamíferos (DFF40, DFF45, CIDEA, CIDEB Y CIDEC/FSP27) también se han descrito variantes tras el *splicing* para Cidec, (Cide-3 α) y para DFF45 (DFF35) [3].

Los primeros estudios bioquímicos defendían que todas las proteínas que contuviesen CIDE estarían involucradas en la apoptosis. Sin embargo, varios estudios posteriores demostraron que Cidea, Cideb y Cidec/Fsp27 están involucradas en el metabolismo lipídico [3, 4, 6].

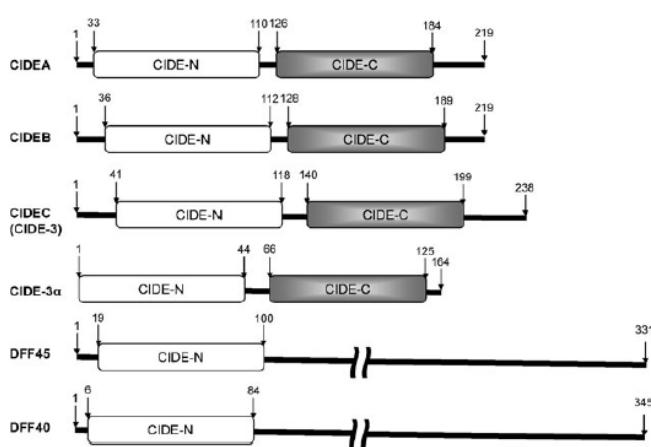


Fig. 1 Estructura esquemática de la familia CIDE en humana [5, 7].

CIDEA y FSp27/CIDEC posee una homología de 39, 29, y 38% respectivamente con DFF45. El dominio CIDE-C de CIDEA y de CIDEB posee una homología con FSP27/CIDEC del 54 y 53% respectivamente [8]. Esta alta homología no impide a CIDEC tener interacciones proteicas específicas ausentes en otros miembros de su familia.

Las tres proteínas CIDE poseen un dominio CIDE-N en el extremo N terminal evolutivamente conservado (este dominio también está presente en la nucleasa proapoptótica DFF40 y en su compañera inhibidora la proteína DFF45) y un dominio CIDE-C que es único de la familia CIDE (Fig. 1) [3,7]. El dominio CIDE-N de CIDEA,

FSP27 (Fat specific protein 27), al que a partir de ahora me referiré como CIDEc, es un miembro importante de la familia CIDE, más que por su función como proteína proapoptótica, por su implicación en el metabolismo lipídico y en la regulación del peso corporal. Por ello, está considerado como un gen candidato para el estudio de la obesidad humana y en la diabetes tipo 2 [9].

El gen *CIDEc* humano contiene una región codificante de 717 pares de bases que codifican 238 aminoácidos. Éste muestra alta similitud con los modelos de rata y de cerdo. *CIDEc*, en cerdo, se localiza en el cromosoma 13q31, mientras que en rata se localiza en el cromosoma 4q42. Con respecto a su distribución en los tejidos se ha demostrado que se expresa en diversos tejidos, fundamentalmente en tejido graso blanco y marrón. Pero también se encuentra en altas concentraciones en intestino, tejido linfático y cerebro. Además, los niveles de m-RNA en tejido adiposo e hígado son significativamente más altos en cerdos obesos que en sus congéneres [9,10].

CIDEc (cell-inducing DFFA-like effector C)) también conocido como FSP27 o CIDE-3, está presente en gran cantidad en la superficie de las gotas lipídicas (LD) y está demostrado que la sobreexpresión de Cidec induce la acumulación de gotas lipídicas y su fusión. Además, promueve la acumulación de triglicéridos no sólo en adipocitos sino también en algunas células no lipídicas (musculo, hígado, fagocitos,...) [3, 8, 10-13]. En el estudio de las funciones de CIDEc, varios grupos han descrito tanto en cultivos celulares como en los adipocitos blancos de ratones deficientes en CIDEc que se presentaban gotas lipídicas más pequeñas, mayor metabolismo oxidativo mitocondrial, y lipólisis aumentada [2, 10, 11, 13], además en los ratones KO se observaron niveles de glucosa y leptina más bajos, resultando en un aumento de la sensibilidad a la insulina y mayor resistencia a una dieta que induce obesidad [4, 11, 14, 15].

Mientras que algunos autores comentan que la expresión ectópica de CIDEA o CIDEc puede significativamente aumentar el tamaño de la gota lipídica en adipocitos [2, 4]. Otros estudios demuestran que la expresión ectópica de CIDEA, CIDEb y CIDEc induce potencialmente apoptosis en células de mamífero [5, 7]. En este último caso se relacionaba la sobreexpresión con su localización mitocondrial. Sin embargo, no se ha descrito su presencia en mitocondria, solamente en gotas lipídicas o en retículo endoplasmático [2, 8].

CIDEC, se encuentra enriquecido en los sitios de contacto de las gotas (LDCS), promueve la fusión y crecimiento de LDs mediante la generación de un potencial poro de transferencia de lípidos neutros de la LD pequeña a la grande [4, 12]. Varios factores, incluyendo el tamaño del poro, la diferencia de presión interna, la tensión de superficie de las LDs, la homodimerización del dominio CIDE-N de CIDEC, la formación del heterodímero CIDEC-PLIN1 o la interacción con CIDEA pueden influir y promover la formación/expansión del poro y/o aumentar la tasa de transferencia de lípidos [2]. Además esta última asociación puede reclutar otras proteínas que deformen la monomembrana fosfolipídica en estos puntos de unión [16]. La manera en que se regula la transferencia de lípidos y el crecimiento de las gotas lipídicas sigue siendo un misterioso proceso distinto de otras fusiones de membrana.

Conociendo esto, se podría pensar que los adipocitos marrones no expresan CIDEC. No obstante, los adipocitos marrones también lo expresan, pero acumulan LDs pequeños multiloculares. Esto puede ser explicado mediante la alta expresión de proteínas relacionadas con la termogénesis, por un alto número de mitocondrias y una oxidación activa de ácidos grasos. Se puede concluir que esta proteína es esencial pero no suficiente para la formación de LDs uniloculares [2, 12].

Otras funciones que se le atribuyen a CIDEC es la inhibición de la oxidación de ácidos grasos cuando se sobreexpresa. No obstante, se conoce poco sobre su papel fisiológico en el hígado. Durante el ayuno, el hígado adapta su metabolismo para mantener la normoglucemia, así que en el hígado se produce la gluconeogénesis. Ésta, necesita poder reductor (NADH) que se obtendrá mediante la oxidación mitocondrial de ácidos grasos. De este proceso saldrán cuerpos cetónicos, productos solubles de la oxidación incompleta de los ácidos grasos. Hay información que indica que hay dos mecanismos de regulación distintos entre el ayuno a corto plazo y el ayuno a largo plazo. Esta teoría considera que los ácidos grasos liberados durante el ayuno a corto plazo son acumulados o exportados por CIDEC, y que en períodos largos son degradados por la mitocondria a través del sistema carnitina palmitoiltransferasa. Consecuentemente CIDEC se expresa más durante el ayuno a corto plazo que durante el ayuno prolongado [17].

Por otro lado, se ha descubierto que los niveles de CIDEB y de CIDEC están aumentados en macrófagos en presencia de LDLs oxidadas, sugiriendo un papel

potencial de estas dos proteínas en la formación de células espumosas y el desarrollo de la aterosclerosis [18].

Algunos autores han centrado sus esfuerzos en conocer qué dominios de la proteína ejercen las distintas funciones. La conclusión fue que el dominio CIDE-C es necesario y suficiente para inducir el crecimiento de LDs. Sin embargo esta función se ve altamente perjudicada sin homodimerización [3].

Esta segunda función, la homodimerización, es realizada por el dominio CIDE-N de CIDEC. Éste tiene un plegamiento típico α/β formado por dos hélices α y 5 o 4 láminas β , de manera similar a otras CIDE [2]. Sin embargo la estructura de alta definición de CIDEC indica que el dominio CIDE-N de Cidec tiene el potencial de formar un dímero asimétrico esencial para el crecimiento de las LDs mediado por Cidec. [2, 3]. En consecuencia, el dominio CIDE-N de CIDEC monomérico puede actuar como un dominio autoinhibitorio para bloquear la función del dominio CIDE-C. Se postula que esta autoinhibición es mayoritariamente debida a un efecto conformacional [3].

En un estudio realizado por Vishwajeet y cols sobre la interacción entre la perilipina (PLIN1) y CIDEC mediante inmunoprecipitación descubrieron que sólo el extremo C-terminal (aa 120–220) coimmunoprecipitaba con PLIN1 sugiriendo que este extremo es el responsable de esta interacción [19]. Sin embargo otro estudio publicado por Peng Li propone que es el extremo N terminal (a.a. 1–122, a.a. 1–135 y a.a. 38–239) el encargado de esta interacción [2]. A pesar de esta discrepancia, ambos están de acuerdo que esta interacción logra aumentar significativamente la transferencia de lípidos y el crecimiento de las LDs dependiente de CIDEC. Además también coinciden en que se trata de una interacción específica entre PLIN1 y CIDEC. PLIN1 no interactúa ni con CIDEA ni con CIDEB a pesar de compartir un alto nivel de homología.

Peng Li propone que esta interacción surge a través de una estructura de seis residuos de lisina en forma de anillo en el dominio CIDE-N de CIDEC que no se conserva en el dominio CIDE-N de CIDEA ni en CIDEB y una pequeña sección de residuos aminoacídicos ácidos en el dominio central de PLIN1. De este manera, PLIN1 funciona como una clave reguladora de la lipólisis en adipocitos [2, 12], resultando la ausencia de PLIN1 en adipocitos en una reducción marcada de la actividad de

intercambio lipídico [2]. Es más, este mismo autor ha demostrado que PLIN1 es capaz de restaurar la actividad defectiva en mutantes de CIDEC que no pueden dimerizar. El mecanismo molecular exacto por el cual PLIN1 estimula la actividad de CIDEC permanece desconocido.

En este modelo propuesto por Peng Li, la homodimerización del dominio CIDE-N de CIDEC y la heterodimerización de CIDE-N y PLIN1 están mediadas por regiones diferentes del dominio CIDE-N.

Estos datos muestran que el dominio CIDE-N de CIDEC controla la actividad de la proteína homodimerizando y reclutando cofactores como PLIN1. Además revelan un nuevo mecanismo para la formulación de LDs uniloculares en adipocitos a través de la acción cooperativa de CIDEC y PLIN1.

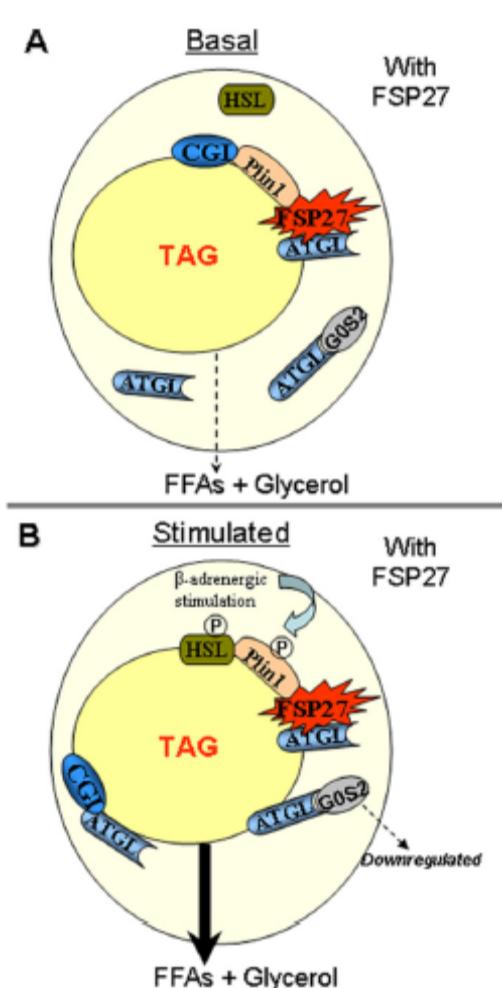


Fig 2. Modelo de funcionamiento para las LDs [11].

membra fosfolipídica CIDEC se une a ATGL y limita el acceso de ATGL a CGI-58.

Otra de las proteínas con las que interactúa directamente Cidec es ATGL (triglicérido lipasa adipocitaria). Esto añade un nivel adicional de regulación de la lipólisis, además de la mediada por la regulación de la morfología de las LDs. CIDEC a través del dominio a.a. 120-220, regula la acción lipolítica de ATGL (enzima limitante de la lipólisis en adipocitos) de una manera directa e independiente de proteínas o los factores específicos de adipocito. De esta manera, reduce la lipólisis y favorece la acumulación de los ácidos grasos libres (FFAs) y TG (Triglicéridos) circulantes dentro de los adipocitos, protegiendo frente a la resistencia insulínica mediada por FFA [11].

Vishwajeet y cols proponen un modelo de funcionamiento de las LDs en el que PLIN1 ancla a CIDEC a la LDs. En la

(Figura 2). Después de una estimulación lipolítica, HSL (hormona sensible a lipasa) y PLIN1 se fosforilan. CGI-58 se libera de la PLIN1 fosforilada, y se une directamente a ATGL activándolo. De manera que cuando ATGL no está unido a CIDECA puede ganar acceso a CGI-58 tanto bajo condiciones basales como estimulantes [11].

El mecanismo exacto de la acumulación de TG mediada por CIDECA aún está por conocer. Vishwajeet y cols proponen que CIDECA reduce la lipólisis de los TGs almacenados y por ello, aumenta el contenido de TG. Además, proponen que la regulación de la lipólisis mediada por CIDECA y la acumulación de TG son específicamente dependientes de ATGL. En cualquier caso, es posible que CIDECA pueda regular la lipólisis mediante otros mecanismos además de la actividad catalítica de ATGL. Por ejemplo, la interacción de FSP27 con ATGL en la superficie de LD puede facilitar interacciones con otros factores intrínsecos que pueden, en cambio, maximizar la regulación de FSP27 sobre la lipólisis y aumentar la acumulación de TG [11].

Además de la interacción directa entre ATGL y CIDECA, y de que la fusión de LDs mediada por CIDECA limite el acceso a las lipasas intracelulares al disminuir el área de superficie de las LDs, Vishwajeet y cols han descubierto una tercera vía por la que CIDECA tiene acción antilipolítica, CIDECA inhibe la expresión de ATGL mediante la estimulación del efecto de su represor transcripcional EGR1. La supresión de ATGL mediante EGR1 y CIDECA está estimulada por una dieta alta en grasas [19]. En esta misma línea, Wang y cols han descubierto que FSP27 interacciona con y coactúa con la proteína β de unión al dominio regulador CCAAT (C/EBPβ). Por ello CIDECA puede ser un nuevo regulador de la transcripción en adipocitos [20].

Finalmente, cabe añadir como dato interesante el hallazgo de una mujer que padecía acantolisis nigricans y lipodistrofia parcial, esto fue achacado a un cambio de base G por T en el exón 6 de CIDECA, E188X, que cambia el aminoácido ácido glutámico por un codón sinsentido. Esto coincide con el fenotipo observado en ratones deficientes en CIDECA (menos grasa corporal, formación de adipocitos blancos con gotas lipídicas multiloculares y aumento de mitocondrias en el tejido adiposo blanco) [11, 21, 22].

Incluso después de una década de estudio, los roles fisiológicos de las proteínas CIDECA aún no han sido completamente dilucidados. Con este trabajo se pretende arrojar

algo de luz sobre las funciones de CIDE y sus papeles fisiológicos. La mayoría de estudios hasta el momento han estado realizados en humanos o en ratones, ninguna investigación en animales domésticos ha ido tan lejos. Sin embargo el cerdo no solo es un importante a nivel económico como animal de producción, sino también es un valioso modelo biomédico, ya que está considerado como el animal más apropiado para estudios sobre la obesidad humana [23].

IV. Objetivos:

Este trabajo transversal persigue diferentes objetivos valiéndose para ello de muestras obtenidas a lo largo de los años de actividad del grupo de Jesús de la Osada, y de muestras facilitadas por grupos colaboradores:

- 1- Caracterizar diversos factores dietéticos que puedan influir en la expresión hepática de *CIDEC* en cerdos:
 - Dieta esteatósica.
 - Adición de fitosteroles en la dieta.
 - Presencia de distintas grasas (MUFA, PUFA o saturadas) en la dieta.
 - Presencia de colesterol en la dieta.
- 2- Conocer el efecto de una inflamación local capaz de iniciar la síntesis de mediadores inflamatorios hepáticos sobre la expresión hepática de *CIDEC* en cerdos.
- 3- Validar resultados obtenidos en otras especies para el cerdo.
- 4- Definir el efecto del resveratrol en distintos modelos de obesidad en ratas en la expresión hepática de *Cidec*.
- 5- Determinar la influencia de la testosterona en la expresión hepática de *Cidec* en rata.
- 6- Describir el efecto de la proporción de grasas en la dieta en la expresión hepática de *Cidec* en rata.
- 7- Identificar la influencia de factores ambientales, como el tamaño de camada en la expresión hepática de *Cidec* en rata.

V. Material y Métodos:

V.1 Material Biológico:

Los animales pertenecientes a los experimentos 1, 3, 4 y 5 se albergaron en las instalaciones del Servicio General de Apoyo a la Investigación en la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza con la aprobación del Comité ético de Experimentación Animal de la Universidad de Zaragoza y acorde a la legislación vigente.

V.1.1 Cerdos (*Sus scrofa*):

V.1.1.a) Experimento 1 o cerdos con dieta esteatósica:

En este estudio se utilizaron 29 cerdos machos cruce de Landrace x Large White de 3 meses de edad. Estos cerdos se subdividieron en 5 grupos.

El primer grupo de 3 animales recibió la dieta control del cerdo durante tres meses.

El segundo grupo de 3 animales recibió una dieta capaz de inducir hígado graso durante tres meses. Esta dieta esteatósica especial es deficiente en metionina y colina y suplementada en colesterol, colato, grasa saturada, grasa parcialmente hidrogenada y fructosa [24].

El tercer grupo estuvo constituido por cinco animales y el estudio duró 3 meses. Se alimentó a todos ellos con la dieta esteatósica y el último mes se les administró 10 mg de melatonina /kg/ día.

El cuarto grupo, formado por otros seis animales, consumieron la dieta esteatósica durante 4,5 meses. Durante el último mes se les administró melatonina a la misma dosis que el grupo anterior.

El quinto grupo estuvo constituido por 12 animales (tres de ellos fallecieron a lo largo del estudio). El estudio se prolongó durante 2 meses. Todos ellos recibieron la

misma dieta esteatósica y durante el último mes a 4 de ellos se les administró melatonina con dosis 10 mg/kg/día.

La toma de muestras se realizó al sacrificio con edad variable entre 4 y 7 meses de edad en función del grupo al que pertenezca. A los cerdos se les indujo anestesia general y fueron mantenidos con propofol. El abdomen fue abierto a través de la línea alba mediante laparotomía. Las muestras hepáticas fueron obtenidas al final del procedimiento a partir del lóbulo cuadrado de los cerdos [24]. Tras su obtención, se introdujeron en nitrógeno líquido para su conservación y se almacenaron a -80 °C.

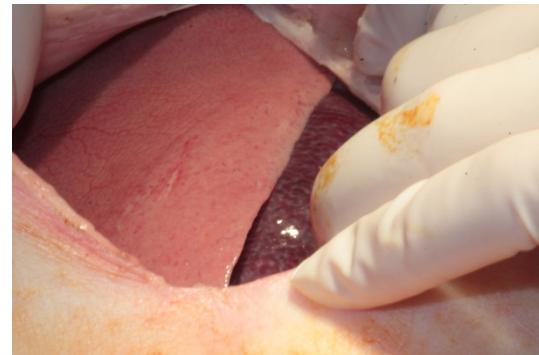


Fig 3. Imagen tomada durante la biopsia, Obsérvese diferencia de color hígado estatósico (izquierda) frente bazo (derecha).

V.1.1.b) Experimento 2 o cerdos suplementados con fitosteroles:

Este estudio, compuesto por 32 cerdos de 10 semanas de edad a inicio del estudio se llevó a cabo en la granja experimental “Mas de Bover” (Constantí, Tarragona) que pertenece a la unidad de nutrición animal IRTA. Los animales se estabularon en grupos de 6, el espacio disponible cumplía los estándares para esta categoría de animal con temperatura y humedad controladas. Los animales disponían de agua y alimento *ad libitum*. El alimento fue formulado para asegurar que todos los grupos experimentales recibieran una cantidad de alimento similar teniendo en cuenta la distinta cantidad de MAYMO® (fórmula compuesta por fitosteroles: fundamentalmente β-sitosterol) que recibían cada grupo experimental. Se establecieron cuatro grupos experimentales:

T-1: Dieta basal

T-2: Dieta basal + 120 ppm de MAYMO®

T-3: Dieta basal + 240 ppm de MAYMO®

T-4: Dieta basal + 2400 ppm de MAYMO®

Los animales se sacrificaron tras 56 días de estudio y se tomó muestra de músculo longuísimo dorsal, hígado, riñón, linfonodos mesentéricos. Las muestras se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C.

V.1.1.c) Experimento 3 o influencia del tipo de grasa en cerdos ibéricos

Este estudio fue realizado con 18 cerdos de raza ibérica con peso a inicio de estudio de 30 kg y se les tuvo en un periodo de adaptación hasta alcanzar los 55 kg.

Después de obtener un peso de 55 kg se reasignaron en grupos de 6 individuos y recibieron una de las tres dietas isoenergéticas, isonitrógenas y libres de colesterol. Las dietas contenían 21 g lípidos/kg y estaban suplementadas al 3% con grasas saturadas, grasas monoinsaturadas (MUFA) en la dieta enriquecida con aceite de aceite de oliva o grasas polinsaturadas (PUFA) en las dietas enriquecidas en aceite de girasol. El alimento fue proporcionado *ad libitum*. Para formular la dieta se siguió las mismas pautas ya publicadas [25].

El experimento duró 42 días, hasta que los animales alcanzaron un peso vivo de 95 kg. Sin apenas diferencias en las ganancias medias diarias entre los grupos.

Después de una noche de ayuno, la toma de muestras se llevó a cabo en el matadero. Se tomaron muestras de sangre, hígado y duodeno. Las muestras de hígado fueron congeladas en nitrógeno líquido y almacenadas a -80 °C [25].

V.1.1.d) Experimento 4 o influencia del aceite de oliva virgen en cerdos minipigs

Este estudio se realizó con 10 cerdos enanos, también llamados minipigs. Se dividieron en 2 grupos, uno que recibió una dieta control y el otro grupo que recibió la misma dieta suplementada con AOV (aceite de oliva virgen) al 25% y con colesterol al 0,3%.

Tras la obtención de la muestra se introdujeron en nitrógeno líquido para su conservación y se almacenaron a -80 °C.

V.1.1.e) Experimento 5 o inflamación local en cerdos:

Este estudio consistía en provocar una inflamación local con una inyección de turpentina (0,5 ml/kg) y observar el efecto que tenían los mediadores de la inflamación (IL-6 y TNF α) sobre el hígado. El estudio se compone de 12 cerdos machos Landrace x Large White de entre 28 y 39 kilos de peso. A 10 animales se les indujo la inflamación subcutánea con turpentina. Despues de 8 horas y 48 horas se obtuvo la muestra de 3 y 7 animales respectivamente. Como control 2 animales fueron inyectados con el mismo volumen de solución salina. Las muestras se obtuvieron mediante sacrificio de los animales y se obtuvo muestra de hígado y de plasma [26]. Las muestras fueron congeladas inmediatamente con nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C.

V.1.2 Rata (*Rattus norvegicus*):V.1.2.a) Experimento 6 o efecto de la dieta grasa, tamaño de camada y testosterona en ratas:

Para realizar este experimento se trabajó con muestras de RNA facilitadas por el grupo del doctor Manuel Tena Sempere de la Universidad de Córdoba.

Este estudio está compuesto por 80 ratas hembras. Estas se dividen en diversos grupos de 10 animales en función de:

LFD 12 cm	HFD 12 cm	LFD 4 cm	HFD 4 cm	LFD 12 cm PT	HFD 12 cm PT	LFD 4 cm PT	HFD 4 cm PT
----------------------	----------------------	---------------------	---------------------	-----------------------------	-----------------------------	----------------------------	----------------------------

Si han recibido propionato de testosterona (PT) o no.

Si han ingerido dieta alta (HFD) o baja en grasas (LFD)

Si pertenecen a partos de 4 o 12 crías por madre.

Teniendo todos los factores en cuenta hay 8 grupos distintos [27].

V.1.2. b) Experimento 7 o efecto del resveratrol en ratas genéticamente obesas

Para realizar este experimento se trabajó con muestras de RNA facilitadas por el grupo de la doctora M^a del Carmen Puy Portillo de la Universidad del País Vasco.

El primer estudio se realizó con ratas genéticamente obesas [28]. Se trabajó con 30 machos Zucker (fa/fa) con 6 semanas de edad y peso aproximado de 213 gramos, obtenidos de Harlan Ibérica (Barcelona, SPAIN) y estabulados de acorde a las guías de la Unión Europea de cuidado y uso de animales de laboratorio. Las ratas fueron alojadas individualmente en cajas metabólicas de policarbonato (Tecniplast Gazzada, Buguggiate, Italy) en una habitación con temperatura constante entre 22 y 28 °C con ciclos de luz y oscuridad de 12 horas. Después de 6 días de periodo de adaptación, las ratas fueron distribuidas al azar en 2 grupos experimentales, un grupo control alimentado con una dieta estándar de laboratorio (Panlab, Barcelona, Spain) y un grupo resveratrol, administrado oralmente (15 mg/kg de peso vivo por día) a través de un catéter orogástrico durante 6 semanas. El resveratrol estaba diluido en 1 ml de solución de etanol al 20%. Las ratas del grupo control recibieron el vehículo.

Todos los animales tenían libre acceso al alimento y al agua. La ingesta y el peso fueron medidos diariamente. Al final del periodo experimental y después de un periodo de ayuno de 6-8 horas, los animales fueron sacrificados mediante desangrado cardiaco bajo condiciones anestésicas, utilizando una inyección intraperitoneal de una sobredosis (45 mg/kg) de pentobarbital sódico. Se recogió muestra de tejido hepático. Las muestras fueron congeladas inmediatamente con nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C.

V.1.2. b) Experimento 8 o efecto del resveratrol en ratas obesas a través de la dieta:

Para realizar esta experimento se trabajó con muestras de RNA facilitadas igualmente por el grupo de la doctora M^a del Carmen Puy Portillo.

Este estudio se realizó con ratas obesas a través de la dieta [29]. El experimento se llevó a cabo con 16 machos Sprague-Dawley obtenidos de Harlan Ibérica (Barcelona, SPAIN) y estabulados de acorde a las guías de la unión europea de cuidado y uso de animales de laboratorio. Las ratas fueron alojadas individualmente en cajas metabólicas de policarbonato (Tecniplast Gazzada, Buguggiate, Italy) en una habitación con temperatura constante (22 ± 2 °C) con ciclos de luz y oscuridad de 12 horas. Después de 6 días de periodo de adaptación, las ratas fueron distribuidas al azar en 2 grupos experimentales: grupo control (n=8) o grupo tratado con resveratrol (n= 8) y alimentadas con una dieta obesogénica (4.6 kcal/g) proporcionada por Harlan Ibérica

(TD.06415) durante 6 semanas. El Resveratrol se añadió a la dieta en cantidad suficiente para asegurar una dosis de 30 mg/kg de peso vivo al día.

Todos los animales tenían libre acceso al alimento y al agua. La ingesta y el peso fueron medidos diariamente. Al final del periodo experimental y después de un periodo de ayuno de 12 horas, los animales fueron sacrificados mediante desangrado cardiaco bajo condiciones anestésicas (clorhidrato). El hígado fue disecado, pesado e inmediatamente congelado.

V.2 Material instrumental y reactivos:

V.2.1. Extracción del RNA

Reactivos

- Agua destilada y desionizada: Agua milli-Q cuya resistividad sea superior a 18 MΩ en un recipiente limpio de RNAsas.
- Agua tratada con dietilpirocarbonato (agua DEPC). Por cada litro de agua destilada y desionizada se le añadió 0,5 ml de DEPC. Se agitó vigorosamente hasta solubilizar bien el DEPC. Y se dejó que actuara durante una noche para posteriormente destruirlo mediante autoclavado durante 1 hora a 1 atm. Cada vez que se ha usado, se ha autoclavado durante 20 min a 1 atm.
- Solución descontaminante de DEPC al 0,05%.
- SDS al 10%. Se humectaron 100 g de sodio dodecil sulfato en 700 ml de agua tratada a 60 °C durante una noche, el día posterior se completó el volumen a 1000 ml.
- EDTA 0,5 M pH 8,0. Se pesaron 186,1 g EDTA Na₂.2H₂O y se disolvieron en 800 ml de agua tratada. Se agitó en un agitador magnético limpio de RNAsas. Se añadió 20 g de NaOH. Una vez disuelto, se verificó que el pH en una alícuota. Posteriormente se completó a 1 l con agua tratada. Se autoclavó cada vez que se usó durante 20 min. a 1 atm.
- TRIS/HCl 1 M pH 8,0. 121,1 g de Tris base se disolvieron en 800 ml de agua tratada. Se añadió 54 ml de HCl concentrado. Se verificó el pH en una alícuota.

Posteriormente se completó a 1 l con agua tratada. Se autoclavó cada vez que se usó durante 20 min a 1 atm.

- TE: 10 mM Tris-HCl, pH 8,0; 1 mM EDTA. Se tomó 10 ml de Tris/HCl 1 M pH 8,0 para RNA y 2 ml del EDTA 0,5 M, Posteriormente se completó a 1 l con agua tratada.. Se autoclavó cada vez que se usó durante 20 min a 1 atm.
- Cloroformo. (Sigma®).
- Isopropanol. (Sigma®).
- Etanol al 75%:
- Reactivo de extracción: Tri-reagent®. (AMBION®). Almacenar a 4 °C.
- Nieve carbónica o nitrógeno líquido.
- Hielo picado.
- TBE. Se pesó 10,8 g de TRIS base y disolvió en 800 ml de agua tratada. Una vez disueltos, se añadió 40 ml de 0,5 M EDTA pH 8,0. Posteriormente se disolvió 5,5 g de ácido bórico y se completó el volumen a 1 l con agua tratada. Posteriormente se autoclavó.
- Bromuro de etidio. (SIGMA®) Almacenar a 4 °C
- Gel de agarosa de RNA al 1% en TBE. 0,5 g de agarosa en 50 ml de tampón TBE. Se fundió en microondas, evitando la evaporación del tampón, hasta que la solución no tenía ninguna partícula de agarosa flotando. Se dejó enfriar un poco y se añadió bromuro de etidio al 0,5 µg /ml. Después se dejó gelificar en la cubeta con los peines puestos.
- Tampón de carga de RNA.: Azul de bromofenol al 0,25%; xileno cianol al 0,25%, EDTA 1 mM y glicerol al 50% en agua tratada

Material: El material de RNA es específico para este uso

- Vidrio y metal. Se descontaminó de RNAsas por esterilización a 180 °C durante 8 h.
- Plástico y barras de agitación. Se trajeron durante al menos media hora en la solución descontaminante de DEPC y después se autoclavaron durante una hora para inactivar el DEPC.
- Nanodrop™ 1000

V.2.2. Purificación del RNA:

Reactivos almacenados a –20 °C:

El kit (AMBION® de Life technologies™) está compuesto por los siguientes reactivos:

- TURBO Dnase (2 unidades/ μ l) (120 μ l).
- 10x TURBO DNase Buffer (600 μ l).
- DNase Inactivation Reagent (600 μ l).
- Nuclease-Free Water, o agua DEPC (1,75 ml).



Fig 4. Nanodrop™ 1000.

<http://openwetware.org/images/e/ee/NanoDrop1000.jpg>

Material:

- Termociclador (S1000™ Thermal Cycler, BIO-RAD®).
- Nanodrop™ 1000.

V.2.3. Retrotranscripción:

Reactivos almacenados a –20 °C:

El kit (First Strand cDNA Synthesis kit, Thermo Scientific) está compuesto por los siguientes reactivos:

- Oligo (dT) 12-18 (500 μ g/ml).
- 1 μ l dNTP Mix (10 mM cada uno).
- M-MuLV Reverse Transcriptase (20 U/ μ l).*
- RiboLock RNase Inhibitor (20 U/ μ l).
- Agua destilada estéril.

Fig 5. Termociclador (S1000™ Thermal Cycler, BIO-RAD®) http://www.bio-rad.com/webroot/web/images/lsr/products/amplification_pcr/product_detail/global/lsr_S1000.jpg

Material:

- Termociclador (S1000™ Thermal Cycler, BIO-RAD®)

V.2.4. PCR cuantitativa (qPCR):

Reactivos:

- Agua filtrada de PCR.
- Kit de SYBR® Green (SYBR® Green, Applied Biosystems™).
- Cebadores o *Primers* específicos para los genes a estudiar.

Material:

- Puntas autoclavadas sin ningún posible contaminante
- Placas de tubos de 200 µl aptos para uso RT-PCR.
- Tapas de tubos optical caps.
- Real Time PCR system, Step One plus™.



Fig 6. Step One plus™ Real time PCR system https://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/prodImages/high/StepOne_big.jpg

V.3 Métodos:

V.3.1. Extracción del RNA:

El RNA ha sido aislado usando Trigent® reagent (AMBION®).

Se homogeneizó unos 100 mg de cada una de las muestras de tejido hepático de con el Ultraturrax en 1 ml de Trigent® reagent. Tras un lavado con Cloroformo (0,2 ml) se recogió la fase acuosa superior en un Eppendorf® y se precipitó el RNA con isopropanol y centrifugado. Tras decantar el sobrenadante, se lavó el precipitado con etanol al 75% y volvió a centrifugar. Se decantó el etanol al 75% y se resuspendió el RNA en agua DEPC (dietilpirocarbonatada). Finalmente se midió su concentración con el nanodrop™. (Fijándose en el ratio de absorbancia 260/280 que nos da una referencia sobre la calidad de nuestro RNA). Posteriormente, a fin de verificar la integridad de la muestra se hizo una electroforesis de la muestra en un gel de agarosa al 1%.



Fig. 7. RNA solubilizado en la fase superior, tras lavado con clorformo. Fase inferior, roja.

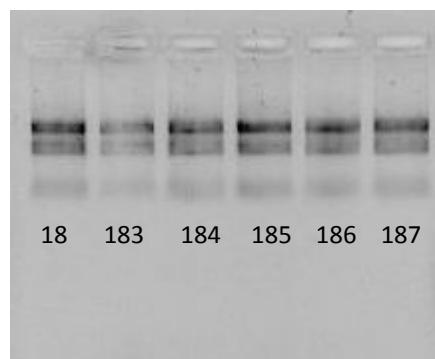


Fig. 8: Gel de agarosa del 2º grupo de cerdos esteatósicos tras extraccion del RNA total

V.3.2. Purificación del RNA

Tras la extracción del RNA han podido quedar restos de DNA genómico en la muestras que pueden interferir en la qPCR. Para evitarlo, se realizó el tratamiento del RNA con una DNAsa que en una etapa posterior se elimina de la muestra.

El procedimiento se realizó en el termociclador, se incubaron durante 30 minutos a 37 °C 5 µg de RNA junto con un Buffer y la DNAsa. Después se inactivó la enzima, se centrifugó la muestra y se recogió el sobrenadante en un nuevo Eppendorf® de 200 µl con mucho cuidado de no coger nada del precipitado. Tras ellos, se midió la concentración del RNA limpio en el nanodrop™.

Después, se vuelve a correr la muestra en un gel agarosa al 1% para verificar el estado del RNA.



Fig. 9. RNA limpio del estudio de inflamación local en cerdos

V.3.3. Retrotranscripción

La transcripción inversa (retrotranscripción) es la reacción por la cual se sintetiza DNA complementario de doble hebra (cDNA) a partir de una hebra molde de RNA monocatenaria. La reacción es mediada por la enzima denominada transcriptasa inversa o retrotranscriptasa, una enzima tipo DNA polimerasa existente en los retrovirus.

Para la retrotranscripción se utilizó un kit de la casa Thermo Scientific™. Se depositaron 500 ng de RNA limpio junto con 1 µl de oligoDTs en agua DEPC hasta un volumen de 11 µl, se incubó durante 5 minutos a 65 °C, se posó en hielo, se le dió un spin, y se volvió a poner en hielo. Se le añadió el resto de productos del kit hasta un volumen de 20 µl (4 µl 5X Reaction Buffer, 1 µl RiboLock inhibidor de RNasa , 2 µl de mix de dNTP y 1 µl de M.MuLV Transcriptasa inversa). Para finalizar se incubó a 25 °C durante 5 minutos seguido de 1 hora a 37 °C y otros cinco minutos a 70 °C. Así se generó el cDNA.

V.3.4. PCR cuantitativa (qPCR)

El fundamento de la Reacción en Cadena de la Polimerasa es hacer copias de DNA de unas secuencias determinadas, a partir de unos *primers* específicos. Para amplificarlos se realizan una serie de ciclos de temperaturas que nos permiten repetir el proceso un número determinado de veces (normalmente 40 veces).

En la qPCR la cantidad de DNA se mide después de cada ciclo mediante el uso de marcadores fluorescentes que se incorporan al producto de PCR. Para este trabajo se utilizó SYBRgreen, que es un agente intercalante que se introduce en la estructura secundaria de la doble hélice del DNA y se acopla energéticamente a los ácidos nucleicos que lo forman, de manera que se incrementa notablemente su tasa de emisión fluorescente. El incremento de la señal fluorescente es directamente proporcional al número de moléculas de producto de PCR (amplicones) generados en la fase exponencial de la reacción.

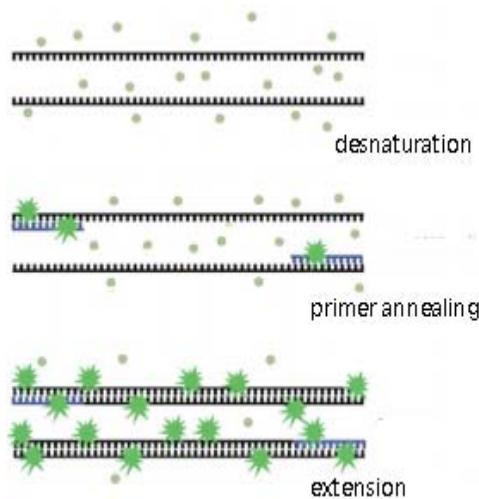


Fig. 10. Esquema de unión de las moléculas de SYBRGreen a la cadena de DNA (<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9780470089941.et1003s00/pdf>)

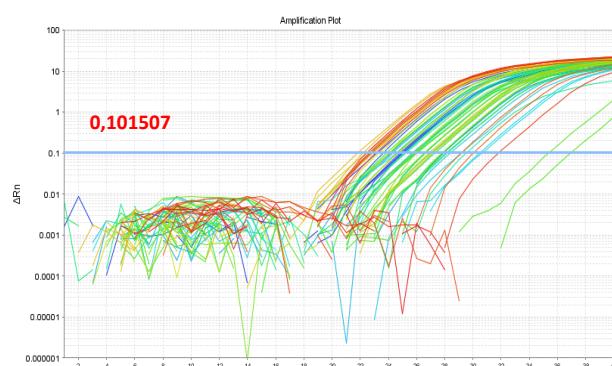


Fig 11. RT-qPCR, detalle del umbral.

alcanza el Ct (Cycle Threshold, ciclo umbral). Este valor se obtiene mediante una línea horizontal, que la determina el programa por encima del background de los 8 primeros ciclos para todas las muestras. El valor de Ct de cada muestra sirve para cuantificar ya que mide en la fase exponencial de la reacción cuando los reactivos no están limitados, doblando el número de moléculas presente con cada ciclo de amplificación.

Con los valores de Ct para cada una de las muestras se calcula la media y desviación estándar, observándose que las desviaciones estándar sean inferiores a un ciclo, En caso de tener valores superiores, se revisan los datos de los duplicados. Se trata de una técnica muy sensible.

En los primeros ciclos de la qPCR la fluorescencia permanece en niveles no detectables, similares al ruido de fondo o *background* hasta un momento determinado en el que se alcanza un acumulo detectable de producto amplificado. La PCR cuantitativa, nos permite identificar los ciclos necesarios en los que se

V.3.3.a) Diseño de primers

A la hora de hacer una PCR resulta fundamental contar con unos buenos *primers*. Para ello se dispone de varios programas para diseñarlos. En este estudio se optó por **Primer BLAST**, programa que se encuentra en la página del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Antes de diseñarlos, debemos de saber qué condiciones han de tener para considerarlos unos buenos primers:

- Cada uno debe contar con una longitud de 18-24 bases.
- Se debe mantener un contenido de G:C entre 40 y 60%.
- Su temperatura de fusión “Tm” ha de ser similar, dentro de los 5 °C, mejor si es superior a 58 °C
- Es mejor si la secuencia de los primers individuales debe iniciarse y terminarse con 1 o 2 bases púricas.
- Evitar regiones con potencialidad para formar horquillas internas, o que puedan dar lugar a dímeros de primers
- Los primers deben ser complementarios a las regiones deseadas, aunque admiten degeneraciones

Una vez conocidas las características ideales de los pares de primers, queda encontrar la secuencia de *CIDEC* del RNA, preferentemente de dos exones distintos para minimizar la amplificación del DNA genómico. Esto lo podemos hacer en la base de datos **nucleotide** del NCBI buscando el gen motivo del trabajo: *CIDEC* pig (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM_001112689.1). De idéntica forma, se procedió para los cebadores de la rata.

Llegados a este punto solo queda copiar la secuencia y escoger una pareja de primers.

Primer pair 1

	Sequence (5'>3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	GAAGGGCGACTCTCTACGGTG	Plus	20	529	548	59.90	60.00	4.00	1.00
Reverse primer	TAACAGGAGGTGCCAAGCAG	Minus	20	669	650	59.96	55.00	3.00	1.00
Product length	141								
Total intron size	1943 (between pos. 446946 and 445002 on NW_003611693.1)								
Products on intended target									
> NM_001112689.1 Sus scrofa cell death-inducing DFFA-like effector c (CIDEC), mRNA									
product length = 141									
Forward primer	1	GAAGGGCGACTCTCTACGGTG	20						
Template	529	548						
Reverse primer	1	TAACAGGAGGTGCCAAGCAG	20						
Template	669	650						

Fig 12. Imagen de la base de datos de primer BLAST.

Para confirmar la especificidad de nuestros primers recurrimos a una tercera página del NCBI para realizar el BLAST, que nos indica donde se nos unen nuestros primers a lo largo del genoma de la especie en estudio.

V.3.4.b) Housekeeping (Gen de referencia)

Un housekeeping es un gen que se utiliza para corregir errores debidos a la posible diferencia de carga de las muestras. Este gen se caracteriza por no variar su expresión en las condiciones de estudio. A lo largo del estudio se han utilizado diferentes genes como housekeeping, como *18S*, *HPRT* o *PPIA*. Ya que, a pesar de que todas las muestras son de hígado, variaba la estabilidad de los distintos genes de

referencia utilizados, llegando a aparecer diferencias significativas entre las distintas condiciones experimentales. Para determinar la estabilidad se utilizó un programa llamado Bestkeeper.

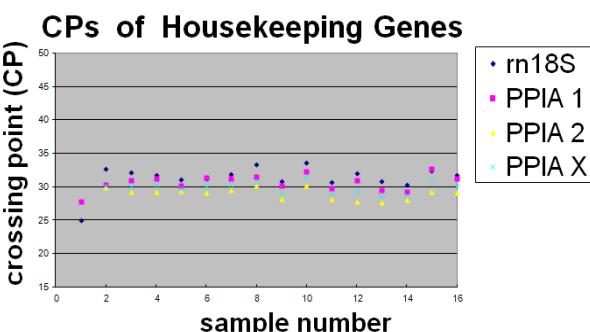


Fig. 13 Gráfica Bestkeeper estudio 6 o efecto de la dieta grasa, tamaño de camada y testosterona en ratas.

V.3.4.c) Procedimiento experimental:

La reacción de PCR se llevó a cabo utilizando el kit de SYBR Green® (Applied Biosystems™)

En cada pocillo de la placa pondremos 1 µl de cDNA a la dilución elegida, y luego añadiremos el mix (11,5 µl) con el resto de los reactivos, (SYBRgreen®, agua y los primers), el mix se prepara porque algunos de los volúmenes de los reactivos son muy pequeños, y el error de pipeteo puede ser importante. Al preparar el mix proteger el SYBR green de la luz cubriendolo con papel de aluminio.

Una vez cargada la placa, se centrifuga, y se pone en el equipo para PCR cuantitativa.

V.3.5. Procedimiento matemático:

Este proceso tiene dos partes. La primera es evaluar los primers, tanto del gen que vamos a estudiar como del housekeeping (cuya expresión tiene que ser invariable en las condiciones del estudio). Para ver la capacidad de amplificación de nuestras muestras, haremos un pool de cada grupo con los cDNAs y sus respectivas diluciones decimales, desde cDNA sin diluir hasta la dilución 1/1000. Tanto del gen a estudiar como del gen control, representaremos dos rectas de calibrado en las que representaremos la media del valor Ct de cada dilución frente al logaritmo de la concentración de cDNA. Una vez representada la gráfica. Hay que observar la pendiente de la recta, cuyo valor óptimo es -3,32, por lo que si obtenemos pendientes con un error $\pm 10\%$, tendremos que volver a probarlo en otras condiciones. Además la pendiente de los dos genes tiene que ser parecida, ya que si es muy diferente no son comparables.

Lo siguiente que hay que ver es la dilución a utilizar para analizar las muestras. Esta técnica pierde precisión a partir de 32 ciclos, por lo que tenemos que emplear la dilución correspondiente a un valor Ct inferior a 32 ciclos para los dos genes. Utilizando como máximo una dilución 1/100.

La segunda parte del proceso es evaluar las muestras y hacer los cálculos matemáticos para compararlas. Como las muestras se hacen por duplicado, se tiene que hacer la media y la desviación estándar y comprobar que no ha habido problemas en

ninguna muestra ni duplicado. Luego hay que comprobar que el gen control no cambia en las condiciones de estudio mediante un análisis estadístico entre grupos.

A continuación, con la media de cada gen y animal, se calcula el valor ΔCt (Ct gen de estudio - Ct gen housekeeping).

El siguiente paso es normalizar los valores de ΔCt , para lo que calcularemos la media de este valor para el grupo control, y se restará a todas las muestras los valores ΔCt del grupo control, con lo que obtendremos $\Delta\Delta Ct$.

Para representar los datos de forma que comparable, existen dos posibilidades, hacerlo utilizando la potencia ($R = 2^{-\Delta\Delta Ct}$) o el logaritmo ($R = \text{Log}(\Delta\Delta Ct)$), Dependiendo de los resultados o de las preferencias personales, podremos utilizar uno u otro.

V.3.6. Análisis estadístico:

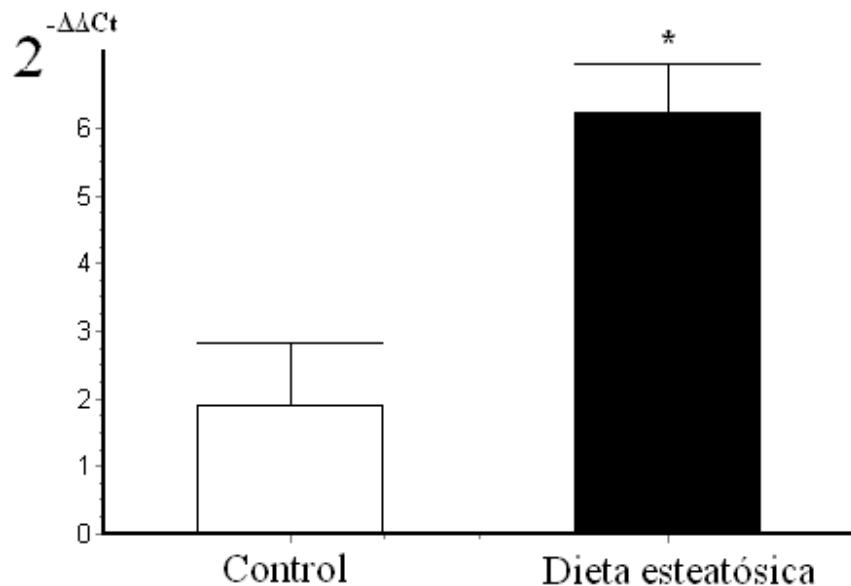
Los resultados se representan como valores medios y desviaciones estándares de la media. El test Shapiro-Wilk se aplicó para analizar el tipo de distribución. Cuando el test de Shapiro-Wilk rechazó la hipótesis de distribución normal de la muestra o cuando el test de Barlett de homogeneidad de varianza fue significativamente diferente, las diferencias entre los grupos se calcularon por el test de Mann-Whitney para muestras no apareadas y el test de Wilcoxon para muestras apareadas.

En el caso contrario, las diferencias se evaluaron por el test ANOVA de Tukey para muestras no apareadas [30]. Estos análisis estadísticos se llevaron a cabo mediante el programa GraphPad.

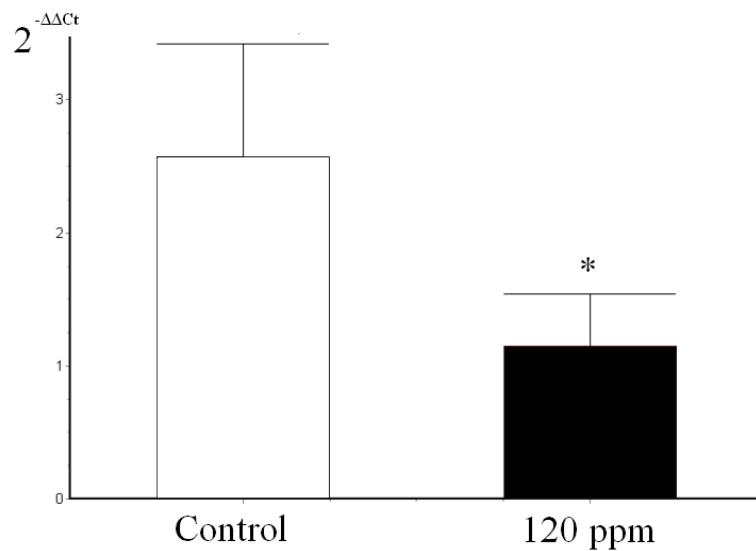
VI. Resultados:

Experimento 1 o cerdos con dieta esteatósica:

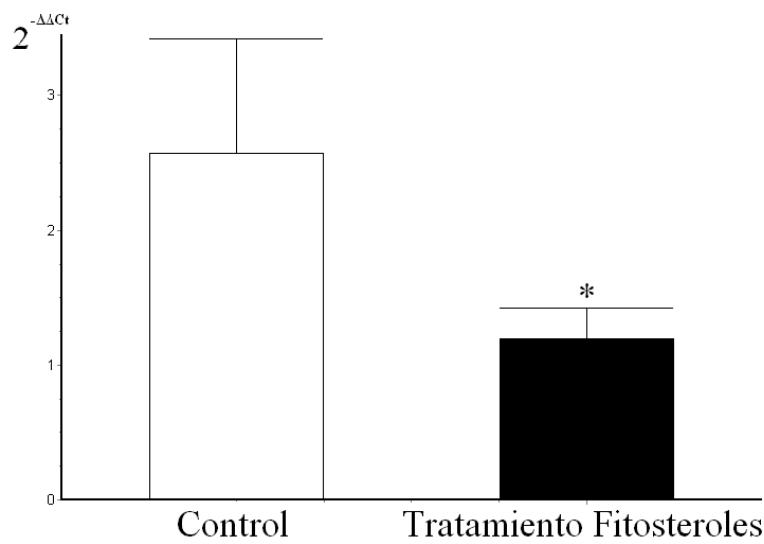
En este estudio se puede observar la fuerte influencia de la esteatosis en la expresión del gen que codifica la proteína CIDEc.



Gráfica 1. Efecto de la esteatosis inducida por la dieta en cerdos en la expresión hepática a nivel de mRNA de *CIDEC* normalizando con *18S* y medido mediante qPCR. Resultados expresados como media ± desviación estándar. Análisis estadístico fue llevado a cabo por el test de MN de una cola. (*: P < 0.02 vs control)

Experimento 2 o cerdos suplementados con fitosteroles

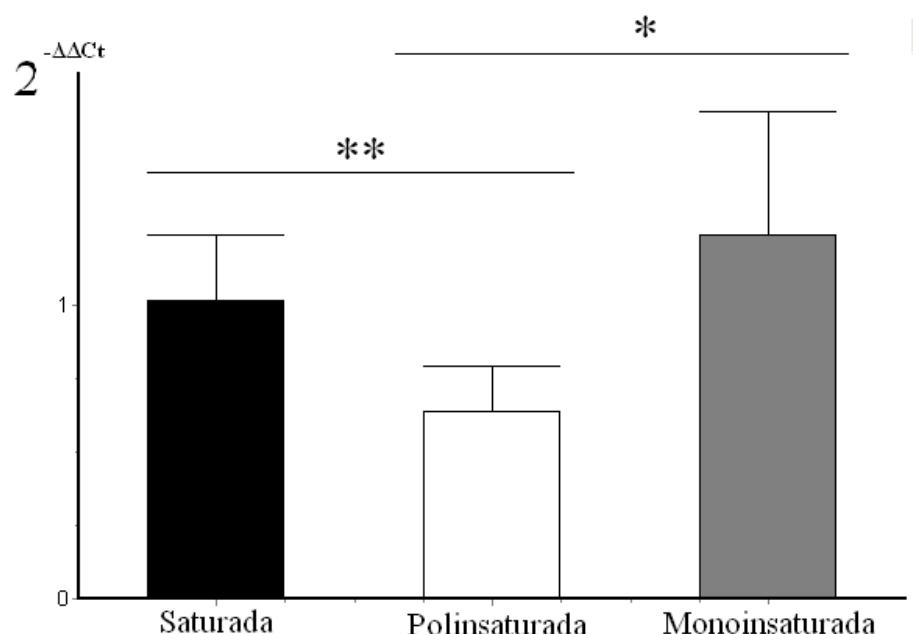
Gráfica 2 Efecto de la administración de fitosteroles en cerdos en la expresión a nivel de mRNA de *CIDEC* normalizando con *HPRT* y medido mediante qPCR. Resultados expresados como media ± desviación estándar. Análisis estadístico fue llevado a cabo por el test de MN de una cola. (*: $P < 0.05$ vs control).



Gráfica 3 Efecto de la administración de fitosteroles independientemente de la dosis en cerdos en la expresión hepática a nivel de mRNA de *CIDEC* normalizando con *HPRT* y medido mediante qPCR. Resultados expresados como media ± desviación estándar. Análisis estadístico fue llevado a cabo por el test de MN de una cola. (*: $P < 0.02$ vs control)

En el experimento 2 se observa como una alimentación suplementada con fitosteroles reduce significativamente la expresión de *CIDEC*. Algo que ya sucede con la dosis más baja de 120 ppm. Dosis más altas no producen más efecto, aunque el mismo se mantiene.

Experimento 3 o influencia del tipo de grasa en cerdos ibéricos

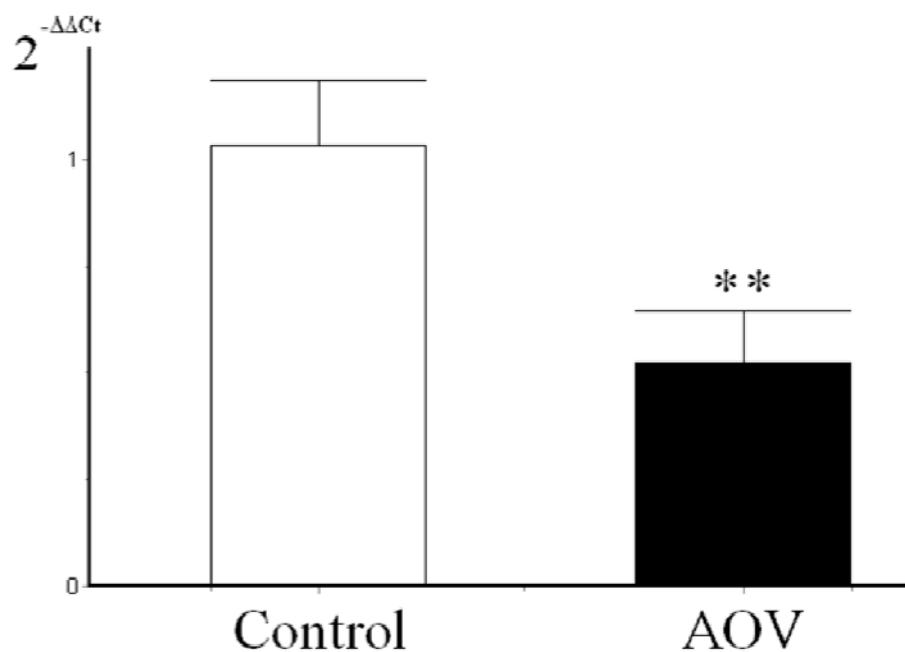


Gráfica 4. Efecto del tipo de grasa en cerdos ibéricos en la expresión hepática a nivel de mRNA de *CIDEC* normalizando con *PPIA* y medido mediante qPCR. Resultados expresados como media ± desviación estándar. Análisis estadístico fue llevado a cabo por el test de MN de una cola. (*: P < 0.04, **: P < 0.02)

La expresión hepática de *CIDEC* mostró diferencias significativas por efecto de la saturación de los ácidos grasos proporcionados en la dieta. Se obtuvieron cambios significativos al comparar la dieta suplementada con PUFA frente a la dieta con grasa saturada (**: P < 0.02 vs saturada), y al comparar la dieta suplementada con PUFA frente a la suplementada con MUFA (*: P < 0.04 vs MUFA).

Experimento 4 o influencia del aceite de oliva virgen en cerdos minipigs

Cuando se comparó la administración de una dieta enriquecida en AOV con la dieta estándar del cerdo, se observó que la expresión de *CIDEC* disminuyó significativamente en este modelo animal.



Gráfica 5. Efecto de la administración de AOV en cerdos minipigs en la expresión hepática a nivel de mRNA de *CIDEC* normalizando con *PPIA* y medido mediante qPCR. Resultados expresados como media ± desviación estándar. Análisis estadístico fue llevado a cabo por el test de MN de una cola (**P < 0.01 vs control).

Experimento 5 o inflamación local en cerdos:

En este estudio no se obtuvieron diferencias significativas con respecto a los controles mediante inyección subcutánea de turpentina.

	Control	8h	48h
<i>Fsp27</i>	1.0 ± 0.2	0.9 ± 0.7	1.1 ± 0.8

Tabla 1. Efecto de una inflamación local frente al control en la expresión hepática de CIDEc a nivel de mRNA, normalizado con PPIA, y mediante qPCR. Resultados expresados como media ± desviación estándar. Análisis estadístico fue llevado a cabo por el test de MN de una cola

Experimento 6 o efecto de la dieta, tamaño de la camada y testosterona en ratas

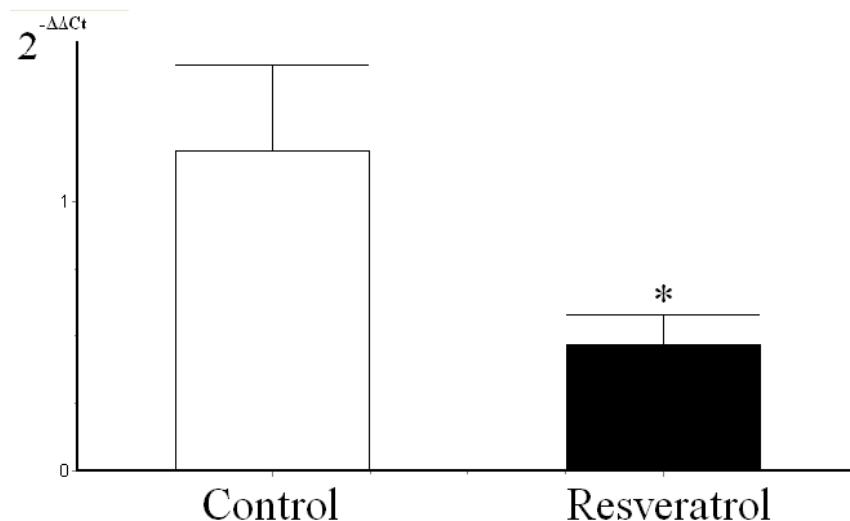
Este estudio deja patente una fuerte influencia de la testosterona en la expresión de *Cidec*. Donde los grupos que han recibido propionato de testosterona tienen una expresión más elevada que los que no han recibido testosterona. Sin embargo no obtuvieron efecto alguno el efecto del porcentaje de grasa en la dieta ni el tamaño de la camada.

	LFD 12 cm	HFD 12 cm	LFD 4 cm	HFD 4 cm	LFD 12 cm PT	HFD 12 cm PT	LFD 4 cm PT	HFD 4 cm PT
<i>Fsp27</i>	1.2 ± 0.9	1.1 ± 0.5	1.6 ± 0.8	1.7 ± 1.0	18 ± 17^a	21.7 ± 12^b	15.0 ± 14^c	9.1 ± 7.1^d

Tabla 2. . Efecto de la administración de propionato de testosterona en la expresión hepática de *Cidec* a nivel de mRNA, normalizado con *Ppia*, y mediante qPCR. Resultados expresados como media ± desviación estándar. Análisis estadístico fue llevado a cabo por el test de MN de una cola (^a LFD 12 cm vs. LFD 12 cm PT: P<0.01, ^b HFD 12 cm vs. HFD 12 cm PT: P<0.01, ^c LFD 4 cm vs LFD 4 cm PT: P < 0.0001, ^d HFD 4 cm vs HFD 4 cm PT: P < 0.0009).

Experimento 7 o ratas genéticamente obesas

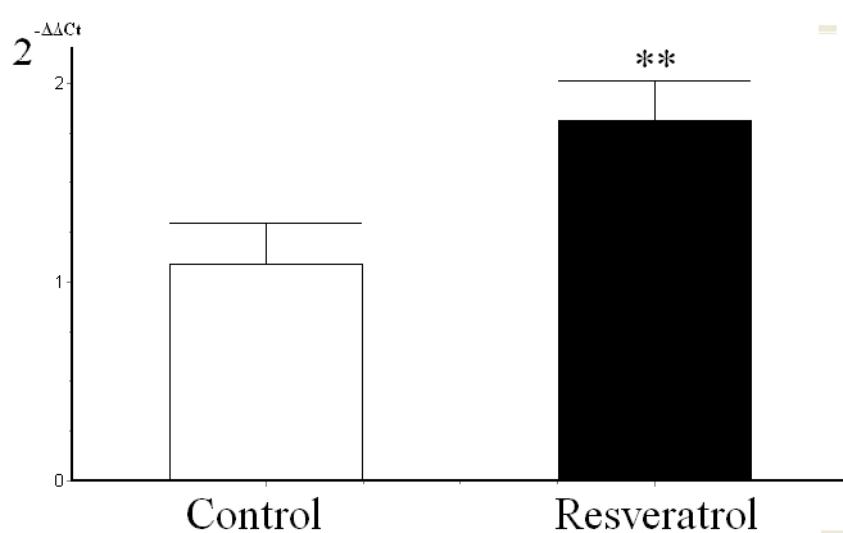
Este experimento muestra de manera significativa el efecto protector del resveratrol frente a la esteatosis hepática en ratas Zucker.



Gráfica 6. Efecto de la administración de resveratrol a través de la dieta en ratas Zucker en la expresión hepática de *Cidec* a nivel de mRNA, normalizado con *18S*, y mediante qPCR. Resultados expresados como media ± desviación estándar. Análisis estadístico fue llevado a cabo por el test de MN de una cola. (*: P < 0.05 vs control).

Experimento 8 o ratas obesas a través de la dieta.

Este experimento muestra de manera muy significativa como el resveratrol induce la expresión del gen *Cidec* en este diseño experimental.



Gráfica 7. Efecto de la administración de resveratrol con una dieta obesogénica en la expresión hepática de *Cidec* a nivel de mRNA, normalizado con *18S*, y mediante qPCR. Resultados expresados como media ± desviación estándar. Análisis estadístico fue llevado a cabo por el test de MN de una cola (**: P < 0.01 vs control)

VII. Discusión de resultados:

A través de los resultados presentados en este trabajo se pueden atisbar algunos aspectos de la influencia de las grasas de la dieta en la expresión hepática de *CIDEC*. Además este estudio también recoge como otras circunstancias (inflamación local o adición de testosterona o resveratrol) influyen en el metabolismo lipídico hepático. Todo esto contribuye a reforzar una rama de la ciencia llamada nutrigenómica, la cual estudia cómo influye la dieta en la expresión de los genes.

La administración de una dieta esteatósica en cerdos aumenta significativamente la esteatosis hepática (datos no mostrados) y la expresión hepática de *CIDEC* frente al grupo control, estos resultados corroboran los obtenidos por otros investigadores que observaron que los niveles de mRNA en tejido adiposo e hígado son significativamente más altos en cerdos obesos que en sus congéneres [4, 9, 10].

Por otro lado una alimentación suplementada con fitosteroles reduce significativamente la expresión de *CIDEC*. Tanto al comparar todos los individuos frente a los controles, o únicamente aquellos que recibieron la dosis más baja (120 ppm). Además estos resultados muestran que un aumento de la dosis de fitosteroles no supone una mayor respuesta a partir de 120 ppm. Está demostrado que los fitosteroles en la dieta reducen la absorción del colesterol [31]. De esta manera reducen la cantidad de lípidos que alcanzan el hígado y en consecuencia el número de lípidos que el hígado almacena. Este principio es el mismo que el utilizado por algunos productos lácteos comerciales a los que se les añade fitosteroles [32].

Al estudiar el efecto del tipo de grasa en ausencia de suplementación de colesterol en la dieta observamos un aumento significativo de la expresión hepática de *CIDEC* en el grupo de grasa monoinsaturada frente al grupo de grasa poliinsaturada. Estos resultados podrían ser consecuentes con los niveles observados de trigliceridemia publicados por algunos autores ya que se observa un nivel de TG mayor con la administración de una grasa monoinsaturada [25]. Por otro lado es lógico observar que la dieta enriquecida en grasas PUFA provoque una expresión hepática de *CIDEC* significativamente menor que la saturada.

Sin embargo, la administración de una dieta suplementada con aceite de oliva virgen al 25% y un 0,3% de colesterol en cerdos reduce la expresión de *CIDEC* frente al control de manera muy significativa. Este resultado se muestra en alta discordancia con resultados obtenidos en el experimento del efecto de tipo de grasa en la expresión hepática de *CIDEC*. Puede que estas diferencias se deban a diferencias raciales de los cerdos y/o a la presencia de colesterol en la dieta. No obstante, debido a que el número de animales de cada grupo en este estudio es mayor, y que aporta resultados mucho más sólidos ($P < 0,01$) es lógico considerar que el AOV reduce la expresión de *CIDEC* a través de su efecto en el metabolismo lipídico. Estos resultados confirman en cerdo los resultados obtenidos en ratón con aceite de oliva virgen al 10% [33] e implican que pudiese ser el responsable un componente minoritario del aceite de oliva virgen. De hecho el escualeno aumenta su expresión hepática en estos ratones (datos no mostrados). Igualmente, en este estudio el aporte de grasa monoinsaturada fue muy superior al del estudio anterior.

Al estudiar el efecto de la inflamación sobre la expresión hepática de *CIDEC* no se observaron cambios significativos a pesar de que *CIDEC* pertenece a una familia relacionada con procesos proapoptóticos. Puede que esto sea debido a que el estudio provoque una forma inflamatoria local en la que la alteración hepática únicamente se vea reflejada en la secreción de mediadores inflamatorios [26], sin que ello perturbe el metabolismo lipídico hepático.

Entrando a discutir los resultados obtenidos en los grupos de ratas no cabe duda alguna de que el efecto de la testosterona se trata de uno de los resultados más llamativos de este trabajo y posiblemente también el más difícil de explicar. La testosterona tiene un efecto tan fuerte en la expresión de *Cidec* que oculta el efecto de cualquier otro factor recogido en el estudio. Sería muy interesante ahondar en este hecho, y estudiar este efecto ya que también se ha estudiado el efecto sexo en el experimento de cerdos fitosteroles sin que se mostrase significativo (datos no mostrados en este trabajo).

Este efecto que muestra la testosterona puede estar debido a que la testosterona como derivado del colesterol, interaccione con ligandos que normalmente interaccionan con el colesterol, y activara de esta manera rutas relacionadas con el metabolismo del colesterol que estimulen la expresión de *Cidec*.

En cuanto al efecto del resveratrol en la expresión hepática de *Cidec* en obesidad genética los resultados obtenidos se muestran bastante lógicos y esperables. Este antioxidante natural que aparece en el vino tinto parece ser beneficioso en este modelo de obesidad genética. Seguramente sea debido a su efecto antioxidante sobre las lipoproteínas [34]. Este efecto ayuda a la movilización de grasas y repercute en el almacenaje hepático de lípidos a largo término porque promueve un tipo de almacenaje más fluido reduciendo la expresión de *Cidec*.

Al estudiar el efecto del resveratrol sobre la expresión hepática de *Cidec* en obesidad inducida por la dieta, paradójicamente la expresión de *Cidec* aumenta, pero no podemos concluir que aumente también la esteatosis hepática ya que como Portillo y cols [29] demuestran el resveratrol disminuye el contenido de triglicéridos, y aumenta la tasa de oxidación mitocondrial y peroxisomal en este mismo estudio. Esto reincide en la idea de que no siempre hay correlación entre la transcripción de un gen y su traducción a proteína y nos lleva a obtener resultados aparentemente contradictorios. Llegados a este punto, habría que profundizar en el estudio de la expresión de CIDEC a nivel proteico.

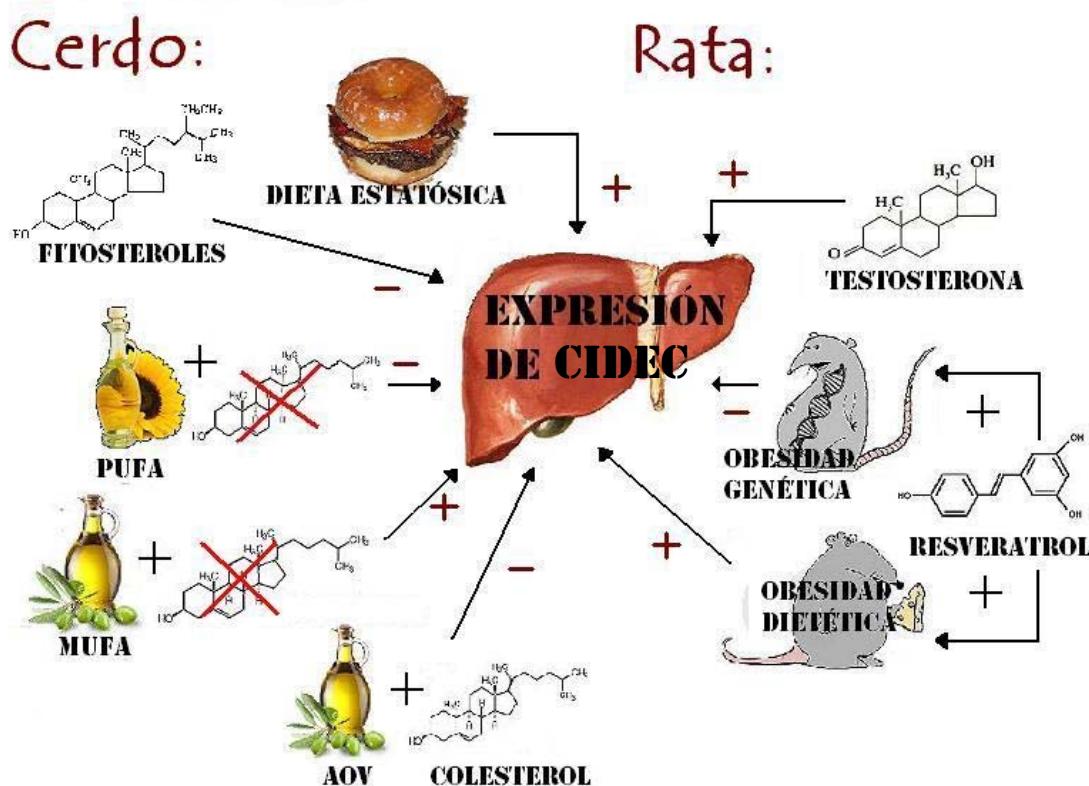


Fig. 24. Cuadro resumen de los resultados obtenidos en este trabajo

VIII. Conclusiones:

Tras analizar los datos obtenidos en este trabajo se pueden obtener varias conclusiones:

1. La expresión hepática de *CIDEC* aumenta con la inducción de esteatosis hepática en cerdos y podría ser un biomarcador de la misma.
2. El enriquecimiento con aceite de oliva virgen junto con colesterol en la dieta disminuye la expresión de *CIDEC* en cerdos. Este efecto puede verse influenciado por la dosis, la presencia de colesterol y/o la raza de cerdos usados.
3. La suplementación en la dieta con fitosteroles reduce la expresión hepática de *CIDEC* y probablemente esto sea debido a su efecto sobre la absorción del colesterol. Además existe una dosis óptima (120 ppm), por encima de la cual no se observan mejores resultados.
4. La expresión hepática de *CIDEC* no se ve alterada con una inyección subcutánea de turpentina capaz de generar una respuesta inflamatoria en el organismo.
5. Los distintos modelos de obesidad en ratas no siempre responden de la misma manera, por ello se reafirma la necesidad de contrastar los resultados en varios modelos experimentales.
6. La expresión de un gen medida a través de su mRNA no siempre correlaciona con el metaboloma del animal, existiendo niveles de regulación post transcripcional que pueden variar tanto la traducción de ese mRNA como impedir la función de la proteína o estimular su degradación.
7. Todos estos resultados permiten entrever una relación de *CIDEC* con el metabolismo del colesterol, donde el colesterol dietético estimularía su síntesis.

IX. Agradecimientos:

Quisiera agradecer la oportunidad brindada por parte del equipo de Jesús de la Osada para trabajar con ellos, y utilizar todo el material a mi libre disposición.

Asimismo, también quisiera agradecer con especial mención a mis tutores, M^a Ángeles Navarro y Jesús de la Osada por supervisar mi trabajo día a día y la paciencia a la hora de revisar el trabajo escrito. También al resto del equipo (Roberto, Cris, Sara Clara y Joaquín) le debo agradecer todo el tiempo que me han dedicado ya que todos ellos en algún momento u otro me han ayudado a realizar este trabajo.

Finalmente, dar las gracias a los doctores Manuel Tena Sempere y M^a del Carmen Puy Portillo, por la aportación de las muestras de los estudios 6, 7 y 8. Muchas gracias.

X. Bibliografía:

- 1- Browning JD, Szczepaniak LS, Dobbins R, Nuremberg P, Horton JD, Cohen JC, Grundy SM, Hobbs HH.: “*Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the united states: Impact of ethnicity*” Hepatology (2004) Dec;40 (6):1387-95.
- 2- Zhiqi Sun, Jingyi Gong, Han Wu1, Wenyi Xu, Lizhen Wu, Dijin Xu, Jinlan Gao, Jia-wei Wu1, Hongyuan Yang, Maojun Yang1 & Peng Li: “*Perilipin1 promotes unilocular lipid droplet formation through the activation of Fsp27 in adipocytes*”. Nature Communications | 4:1594 | DOI: 10.1038/ncomms2581 |
- 3 Seung Mi Lee, Tae-ho Jang, Hyun Ho Park: “*Molecular basis for homo-dimerization of the CIDE domain revealed by the crystal structure of the CIDE-N domain of FSP27*”. Biochemical and Biophysical Research Communications (2013) 439 564–569
- 4 Hongyuan Yang, Anne Galea, Vladimir Sytnyk and Merlin Crossley: “*Controlling the size of lipid droplets: lipid and protein factors*”. Cell Biology (2012), 24:509–516
- 5 Inohara, N., et al., “*CIDE, a novel family of cell death activators with homology to the 45 kDa subunit of the DNA fragmentation factor.*” EMBO J, (1998). 17(9): p. 2526-33.
- 6 Tang, X., et al., “*Human cell-death-inducing DFF45-like effector C induces apoptosis via caspase-8*” Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), (2011). 43(10): p. 779-86.
- 7 Liang, L., et al., “*Molecular cloning and characterization of CIDE-3, a novel member of the cell-death-inducing DNA-fragmentation-factor (DFF45)-like effector family.*” Biochem J, (2003). 370(Pt 1): p. 195-203.
- 8 Yonezawa, T., et al., “*Which CIDE are you on? Apoptosis and energy metabolism*”. Mol Biosyst, (2011). 7(1): p. 91-100.

- 9 Li, Y.H., et al., “*Molecular cloning, chromosomal location and expression pattern of porcine CIDEa and CIDEc.*” Mol Biol Rep, (2009). 36(3): p. 575-82.
- 10 Vishwajeet Puri: “*Fasting regulates FSP27 expression in the liver*” Journal of Lipid Research (2013) Volume 54,
- 11 Vishwajeet, Puri: “*Fat-specific Protein 27 (FSP27) interacts with Adipose Triglyceride Lipase (ATGL) to regulate lipolysis and insulin sensitivity in Human adipocytes*” J. Biol. Chem. (2014), 289:12029-12039.
- 12 Jolene S.Y. Tan, Colin J.P. Seow, Vera J. Goh, David L. Silver: “*Recent Advances in Understanding Proteins Involved in Lipid Droplet Formation, Growth and Fusion*”. Journal of Genetics and Genomics (2014) 41, 251e259
- 13 Tan Hooi Min Grahn ^a, Yan Zhang ^a, Mi-Jeong Lee ^a, Andreia Gianotti Sommer ^b, Gustavo Mostoslavsky Susan K. Fried ^a, Andrew S. Greenberg ^{c,††}, Vishwajeet Puri: “*FSP27 and PLIN1 interaction promotes the formation of large lipid droplets in human adipocytes*” Biochemical and Biophysical Research Communications (2013) 432, 296–301
- 14 Toh, S.Y., et al., “*Up-regulation of mitochondrial activity and acquirement of brown adipose tissue-like property in the white adipose tissue of fsp27 deficient mice*”. PLoS One, (2008). 3(8): p. e2890.
- 15 Nishino, N., et al., “*FSP27 contributes to efficient energy storage in murine white adipocytes by promoting the formation of unilocular lipid droplets*” J Clin Invest, (2008). 118(8): p. 2808-21.
- 16 Xu, L., L. Zhou, and P. Li, “*CIDE proteins and lipid metabolism*”. Arterioscler Thromb Vasc Biol, (2012). 32(5): p. 1094-8.
- 17 Vila-Brau, A., et al., “*Fsp27/CIDEC is a CREB target gene induced during early fasting in liver and regulated by FA oxidation rate*”. J Lipid Res, (2013). 54(3): p. 592-601.

- 18 Li H, Song Y, Li F, Zhang L, Gu Y, Zhang L, Jiang L, Dong W, Ye J, Li Q.: “*Identification of lipid droplet-associated proteins in the formation of macrophage-derived foam cells using microarrays*”. Int J Mol Med. (2010) Aug; 26(2):231-9.
- 19 Grahn, T.H., et al., “*FSP27 and PLIN1 interaction promotes the formation of large lipid droplets in human adipocytes*”. Biochem Biophys Res Commun, (2013). 432(2): p. 296-301.
- 20 Kandror, R. Taylor Pickering, Vishva Mitra, Sharma, Maneet Singh, Rajween Kaur, Mi-Jeong Lee , Vishwajeet Puri and Konstantin V. “*Fat-specific Protein 27 Inhibits Lipolysis by Facilitating the Inhibitory Effect of Transcription Factor Egr1 on Transcription of Adipose Triglyceride Lipase*”. J. Biol. Chem. (2014), 289:14481-14487.
- 21 Rubio-Cabezas, O., et al., “*Partial lipodystrophy and insulin resistant diabetes in a patient with a homozygous nonsense mutation in CIDEC*”. EMBO Mol Med, (2009). 1(5): p. 280-7.
- 22 Deeney, J.T., et al., “*Microlipid droplets in milk secreting mammary epithelial cells: evidence that they originate from endoplasmic reticulum and are precursors of milk lipid globules*”. Eur J Cell Biol, (1985). 38(1): p. 16-26.
- 23 Bassols, Anna, Costa, Cristina, Eckersall, P David, Osada, Jesus, Sabria, Josefa, Tibau, Joan: “*The pig as an animal model for human pathologies: a proteomics perspective*” Proteomics Clin Appl. (2014) Aug 4. doi: 10.1002/prca.201300099.
- 24 M.A. Gonzalo, R. Martínez-Beamonte, P. Palacios, J. Marín, T. Castiella, J. Surra, F. Burdío, R. Sousa, A. Güemes, J. Osada, A. García-Gil : “*Analysis of Tissue Bioimpedance as a Measurement of Liver Steatosis: Experimental Model in Large Animals*” Transplantation Proceedings (2012), Volume 44, Issue 6, July–August, Pages 1579–1583 DOI: 10.1016/j.transproceed.2012.05.006
- 25 María A. Navarro, Sergio Acín, Ricardo Carnicer, Mario A. Guzmán-García, José M. Arbonés-Mainar, Joaquín C. Surra, José A. Cebrián, Carmen Arnal, Beatriz Isabel, Clemente J. López-Bote and Jesús Osada: “*Response of ApoA-IV*

- in pigs to long-term increased dietary oil intake and to the degree of unsaturation of the fatty acids". Br J Nutr. (2004) Nov; 92 (5):763-9.*
- 26 Navarro, M.A., et al., "Immune-regulation of the apolipoprotein A-I/C-III/A-IV gene cluster in experimental inflammation". Cytokine, (2005). 31(1): p. 52-63.
- 27 Sánchez-Garrido MA, Castellano JM, Ruiz-Pino F, García-Galiano D, Manfredi-Lozano M, Leon S, Romero-Ruiz A, Diéguez C, Pinilla L, Tena-Sempere M.: "Metabolic programming of puberty: sexually dimorphic responses to early nutritional challenges." Endocrinology. (2013) Sep;154 (9):3387-400. doi: 10.1210/en.2012-2157. Epub 2013 Jun 10.
- 28 S. Gómez-Zorita, A. Fernández-Quintel, M. T. Macarulla, L. Aguirre, E. Hijona3, L. Bujanda, F. Milagro, J. A. Martínez and M. P. Portillo: "Resveratrol attenuates steatosis in obese Zucker rats by decreasing fatty acid availability and reducing oxidative stress" British Journal of Nutrition (2012), 107, 202–210 doi:10.1017/S0007114511002753
- 29 Goiuri Alberdi D.S., Víctor M. Rodríguez Ph.D., M. Teresa Macarulla Ph.D., Jonatan Miranda Ph.D., Itziar Churruca Ph.D., María P. Portillo:<<.Hepatic lipid metabolic pathways modified by resveratrol in rats fed an obesogenic diet>>. Nutrition (2013) 29 562–567.
- 30 Rokal, R. R.: "Biometry: The Principles and Practices of Statistics in Biological ResearchHardcover" – September 15, 1994.
- 31 Xiaobo Lin, PhD, Susan B. Racette, PhD, Michael Lefevre, PhD, Catherine Anderson Spearie, MHS, RD, Marlene Most, PhD, Lina Ma, MS, and Richard E. Ostlund, Jr., MD: "The Effects of Phytosterols Present in Natural Food Matrices on Cholesterol Metabolism and LDL-Cholesterol: A Controlled Feeding Trial". Eur J Clin Nutr. (2010) Dec; 64(12): 1481–1487. doi:10.1038/ejcn.2010.180
- 32 Nuria Plana, Catherine Nicolle, Raimon Ferre, Jordi Camps, Rosa Cos and Jesus Villoria: "Plant sterol-enriched fermented milk enhances the attainment of LDL-cholesterol goal in hypercholesterolemic subjects". Eur J Nutr (2008) 47:32–39 DOI 10.1007/s00394-007-0693-4.

- 33 Natalia Guillén, María A. Navarro, Carmen Arnal, Enda Noone, José M. Arbonés-Mainar, Sergio Acín, Joaquín C. Surra, Pedro Muniesa, Helen M. Roche and Jesús Osada “*Microarray analysis of hepatic gene expression identifies new genes involved in steatotic liver*” Physiol Genomics (2009). 37:187-198, First published Mar 3, 2009; doi:10.1152/physiolgenomics.90339.2008
- 34 Baur JA, Sinclair DA. “*Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence.*” Nat Rev Drug Discov. (2006) Jun;5 (6):493-506. Epub 2006 May 26.

