

Luis Vicente Herrera Marcos

Mecanismos moleculares de la
esteatosis hepática no alcohólica
en diversos modelos animales e
influencia de terpenos del aceite
de oliva

Director/es

DE LA OSADA GARCÍA, JESÚS

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>

© Universidad de Zaragoza
Servicio de Publicaciones

ISSN 2254-7606

Tesis Doctoral

MECANISMOS MOLECULARES DE LA
ESTEATOSIS HEPÁTICA NO ALCOHÓICA EN
DIVERSOS MODELOS ANIMALES E INFLUENCIA
DE TERPENOS DEL ACEITE DE OLIVA

Autor

Luis Vicente Herrera Marcos

Director/es

DE LA OSADA GARCÍA, JESÚS

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA
Escuela de Doctorado

2019

*Mecanismos moleculares de la
esteatosis hepática no
alcohólica en diversos modelos
animales e influencia de
terpenos del aceite de oliva*

Memoria presentada por
LUIS VICENTE HERRERA MARCOS
para optar al grado de Doctor
por la Universidad de Zaragoza

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular
Universidad de Zaragoza

Octubre 2019



Departamento de Innovación,
Investigación y Universidad



Universidad
Zaragoza



Instituto de Investigación
Sanitaria Aragón

ciberobn



Universidad
Zaragoza

El Doctor Jesús de la Osada García, Catedrático del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular de la Universidad de Zaragoza.

INFORMA: que el Licenciado D. **Luis Vicente Herrera Marcos** ha realizado bajo mi dirección el trabajo que presenta como memoria de doctorado con el título: “Mecanismos moleculares de la esteatosis hepática no alcohólica en diversos modelos animales e influencia de terpenos del aceite de oliva”, y que el mismo se ajusta a la propuesta de tesis aprobada por la comisión.

Este trabajo se ha llevado a cabo durante los años 2015 al 2019 en este departamento.

Zaragoza, 15 de octubre de 2019

Fdo: Jesús de la Osada García

Este trabajo ha sido financiado por la ayuda para la contratación del personal predoctoral del Gobierno de Aragón, la red CIBER de Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición, como iniciativa FEDER-ISCIIII, la Agencia Estatal de Investigación (SAF 2013-41651-R y SAF2016-75441-R) y el Gobierno de Aragón, grupo de Referencia B16_17R.

Agradecimientos:

La ciencia es un área que requiere del trabajo en equipo y esta tesis no ha sido una excepción al respecto.

En primer lugar, tengo que agradecer el entusiasmo, la constancia y la dedicación de mi Director Jesús Osada que siempre ha tenido respuesta y tiempo para responder todas mis preguntas y de cuyo despacho nunca he salido sin nuevas ideas para ensayar. Puedo atisbar la ingente cantidad de trabajo que supone mantener un grupo de investigación y sin embargo siempre sacas tiempo para doctorandos. Por todo ello muchísimas gracias Jesús. Sin ti, nada de esto tendría lugar.

Además de Jesús, hay muchas personas a las que agradecer la existencia de este trabajo: A la Dra. M^a Jesús Rodríguez (MJ para los del barrio), gracias por el acceso al cuarto de cultivo celular donde tantísimas horas he pasado, gracias por ser una fuente de inspiración y demostrarme que ser cabezota vale para algo en esta vida! También tengo que agradecer a la Dra. Arnal (Mamen) todo el tiempo que ha invertido al microscopio y ayudándome con el mismo. Ha sido todo un placer trabajar bajo vuestro ejemplo.

Otros grandes científicos que siempre han supuesto una ayuda a lo largo de este camino que es esta tesis son Angie y Roberto, a los que jamás podré demostrar cuan agradecido estoy por su inestimable ayuda. Tampoco puedo olvidar a aquellos miembros del equipo que aún estando más lejos también han aportado su granito de arena: Manu, Joaquín o a aquellos con los que coincidí en el pasado y su camino les ha llevado a continuar por otros lares: Sara, Clara y Sonia. Mil gracias por todo lo que me habéis enseñado.

Por supuesto agradecer a quienes me han sufrido más de cerca: Cris, Javi, Tania y Roubi. Sé que trabajar conmigo no siempre es fácil, con mis mil manías y horarios imposibles y sin embargo hemos logrado trabajar codo con codo y sobrevivir a la experiencia. Muchas gracias por todos los momentos que me habéis regalado.

También tengo que agradecer este trabajo al resto de mis compañeros de laboratorio, tanto a Puri, Santi y Sofía, como a los pertenecientes a grupos de investigación (...en realidad gastronómicos) que entre ingesta e ingesta sacan tiempo para investigar trabajos de altísima calidad sin que ello merme el buen ambiente que ha reinado todos estos años en el departamento, muchas gracias por toda la ayuda prestada a lo largo de esta tesis. Gracias a vosotros trabajar en el departamento ha sido un placer, ojalá mi próximo destino sea la mitad de acogedor de lo que ha sido este.

A lo largo de estos años no solo me he visto apoyado en el laboratorio, en el resto de facetas de mi vida también me he visto muy bien acompañado. Gracias a mi Madre, a mi sobrina, y al resto de mi familia del que tanto tiempo me ha privado este trabajo. Gracias también a mis amigos del parque con los que las frustraciones del laboratorio se desvanecen convirtiéndose en divertidas anécdotas que compartir, con especial énfasis a Ana, a Isa y a su familia que siempre me han ayudado con Enya cada vez que lo he necesitado. También tengo que agradecer a mis compañeras de tesis extradepartamentales por compartir vivencias a lo largo de estos años; a la doctora Shophy (estoy seguro que pronto tendrás el cachorrete de golden que siempre has querido meándote por la casa y destrozándote los muebles), a la Yohannina y a su jeque (a ver si se estira y me incluye en alguno de tus viajes exóticos), a la pepito grillo del mal llamada "Mati" y por supuesto a las doctoras fisiólogas & filosóficas Marta, Raquel y Elena con las que tengo esa cena vegeta pendiente. Además, también tengo que agradecer este trabajo a todas esas amistades que han perdurado a lo largo de los años a pesar de no haberles podido dedicar todo el tiempo que me hubiese gustado. Esta lista podría ser tan larga como el resto de la tesis ya que he sido muy afortunado al coincidir con gente maravillosa a lo largo de esta vida. A todos ellos, ¡gracias!

"If I have seen further it is by standing on the shoulders of Giants."

Sir Isaac Newton, 1676

Abreviaturas:

AA	Ácido araquidónico
ABC	Casette de unión al ATP
ACAT	Acil CoA: colesterol O-aciltransferasa
ACC	Acetil CoA carboxilasa
ACOX1	Acil CoA oxidasa peroxisomal
ACSL3	Ligasa 3 de acilos CoA de cadena larga
ADDE	Agua destilada y desionizada
ALA	Ácido α -linolénico
ALP	Fosfatasa alcalina
ALT	Alanina aminotransferasa
AML12	Línea celular americana de hepatocitos de ratón
AMP	Adenosín monofosfato
AMPK	Proteína quinasa activada por AMP
APC5	Subunidad 5 del complejo promotor de la anafase
Apoe	Apolipoproteína E
APS	Persulfato amónico
ASMase	Esfingomielinasa ácida
AST	Aspartato aminotransferasa
ATF6	Factor de transcripción 6
ATG	Activador transcripcional de genes relacionados con la autofagia
ATGL	Lipasa de triglicéridos adipocitaria
AUP1	Proteína ubicua antigua 1
BLAST	Herramienta de alineamiento de secuencias de nucleótidos del NCBI
CAR	Receptor constitutivo de androstano
CBS	Cistationina β sintasa
CE	Éster de colesterol
Cer	Ceramida
CHO	Carbohidratos
CHOP	Proteína homóloga a C/EBP
cHDL	Colesterol HDL
ChREBP	Proteína de unión al elemento de respuesta a los carbohidratos

CIDE	Efactor parecido al factor de fragmentación del DNA que induce la muerte celular.
CK-18	Citoqueratina-18
CL	Cardiolipinas
CLA	Conjugado del ácido linoleico
cLDL	Colesterol LDL
CMA	Autofagia mediada por chaperonas
CPT1A	Carnitina palmitoil transferasa 1 tipo A
CREBH	Proteína H de unión a los elementos de respuesta al AMP cíclico
CRN	Red de investigación clínica (UK)
CYP51	Citocromo P450 de la familia 51
C/EBP	Proteínas de unión al enhancer CCAAT
DAG	Diacilglicerol
DGAT	Diacilglicerol aciltransferasa
DHA	Ácido docosahexaenoico
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNL	Lipogénesis de novo
DEPC	Dietilpirocarbonato
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
ELISA	Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas
EPA	Ácido eicosapentaenoico
ERAD	Proteína de degradación asociada al RE
ERK	Quinasa de regulación extracelular
FA	Ácido graso
FABP	Proteína de unión a los ácidos grasos
FADH₂	Flavín adenín dinucleótido reducido
FAO	Oxidación de ácidos grasos
FAT/CD36	Translocasa de ácidos grasos
FATP	Proteína transportadora de ácidos grasos
FAS	Ácido graso sintasa
FC	Colesterol no esterificado
FDPS	Farnesil difosfato sintasa

FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos
FIT	Proteína transmembrana inductora del almacenamiento de grasa
FLIP	Inhibición de la progresión del hígado graso
FOXO1	Proteína de horquilla box O 1
FPLC	Cromatografía líquida de filtración por gel
FSP27	Proteína específica de grasa 27
FXR	Receptor de farnesilos X
GEO	Base de datos de expresión génica Omnibus
GGT	Gamma glutamil transferasa
GLUT	Transportador de glucosa
GPAT4	Glicerol 3 fosfato aciltransferasa 4
GS	Glucógeno sintasa
GSK3	Glucógeno sintasa kinasa 3
GWAS	Estudios de asociación al genoma completo
G1P	Glucosa 1 fosfato
G6P	Glucosa 6 fosfato
G6Pase	Glucosa-6-fosfatasa
HDL	Lipoproteína de alta densidad
HIG2	Gen 2 inducible por hipoxia
HMGB1	Proteína de alta movilidad del grupo box 1
HMGCoA	Hidroximetil glutaril Co A
HNF4	Factor hepático nuclear 4
HPR	Peroxidasa de rábano picante
HSC	Células hepáticas estrelladas
HSC70	Proteína de choque térmico 70
HSL	Lipasa sensible a hormonas
IFN	Interferón
IL-6	Interleuquina 6
IR	Insulinorresistencia
IRE-1	Inositol-requiring enzyme-1
IRS-1	Receptor del sustrato insulina -1
ISG15	Modificador 15 parecido a la ubiquitina

JNK	Quinasa c-Jun N-terminal
KB	Cuerpos cetónicos
LC	Cromatografía líquida
L-CGK	Glucocinasa hepática
LD	Gota lipídica
LDL	Lipoproteína de baja densidad
LDLR	Receptor de LDL
LGALS3	Galectina 3
LPC	Lisofosfatidilcolina
LPS	Lipopolisacáridos/Endotoxinas
LT	Leucotrienos
LXR	Receptor hepático X
mRNA	RNA mensajero
MRI-PDFF	Resonancia magnética de la fracción de grasa de densidad de protones en el hígado
MS	Espectrometría de masas
mtGPAT	Glicerol-3-fosfato aciltransferasa mitocondrial
mTOR	Proteína diana de los mamíferos de la rapamicina
MTTP	Proteína de transferencia de triglicéridos microsomal
MUFA	Ácido graso monoinsaturado
NADH	Nicotin adenín dinucleótido reducido
NADPH	Nicotin adenín dinucleótido fosfato reducido
NAFLD	Enfermedad del hígado graso no alcohólico
NASH	Esteatohepatitis no alcohólica
NCBI	Centro nacional de información biotecnológica (USA)
NEFA	Ácido graso no esterificado
NF-κB	Factor nuclear κ B
NLRP3	Familia de receptores 3 que contiene un dominio de piridina parecido al dominio de oligomerización de nucleótidos
NMR	Espectrometría de resonancia magnética nuclear
PAQR7	Miembro 7 de la familia de receptores de progestina y adipoQ
PBS	Tampón fosfato salino
PC	Fosfatidilcolina

PCA	Análisis de componentes principales
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PGC1a	Coactivador 1a de PPAR
PEDF	Factor derivado del pigmento epitelial
PEPCK	Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa
PERK	Proteína quinasa del ER tipo R
PEX	Factor de biogénesis peroxisomal
PKA	Proteína quinasa A
PKC	Proteína quinasa C
PLA₂	Fosfolipasa A ₂
PLIN2	Perilipina 2
PPAR	Receptor activado de proliferación peroxisomal
PP2A	Proteína fosfatasa 2
PREDIMED	Prevención a través de la dieta mediterránea
PRM	Análisis de proteómica dirigida
PUFA	Ácido graso polisaturado
PXR	Receptor del pregnano X
PYGL	Glucógeno fosforilasa
qPCR	PCR cuantitativa a tiempo real
RE	Retículo endoplásmico
RIP-1	Proteína interactuante con el receptor 1
RNA	Ácido ribonucleico
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SAF	Esteatosis, actividad y fibrosis
SCD-1	Estearoil CoA desaturasa 1
SD	Desviación estándar
SDS	Sodio dodecil sulfato
SFA	Ácido graso saturado
SFB	Suero fetal bovino
SH3BP5	Proteína de unión al dominio SH3
SMase	Esfingomielinasa
SMPDL3A	Proteína 3 tipo esfingomielina fosfodiestearasa ácida

SOCS	Supresores de la señalización de citoquinas
SPEA	Actividad enzimática prolidasa del suero
SPMs	Mediadores especializados proresolución
SphK	Esfingosina quinasa
SPP1	Fosfoproteína secretable 1
sRAGE	Receptor soluble del producto final de glicación avanzada
SREBP1c	Proteína de unión al elemento regulador de esteroides 1c
SRGN	Seringlicina
STAT	Activadores de la transcripción y transductores de señal
S1P	Esfingosina 1-fosfato
TEMED	Tetrametiletilendiamina
TC	Tomografía computarizada
TG	Triglicéridos
TGF	Factor de crecimiento tumoral
TNFα	Factor de necrosis tumoral alfa
TRAIL	Ligando inductor de apoptosis asociado a TNF
TRAIL-R	Receptor de TRAIL
TRB3	Homólogo 3 de Tribbles 3
TX	Tromboxanos
TLR4	Receptor tipo toll 4
UPR	Respuesta a proteínas mal plegadas
VLDL	Lipoproteína de muy baja densidad
XBP1	Proteína de unión X-box 1

Índice

Índice	2
I. Resumen	6
I. Abstract	8
II. Introducción	10
III. Revisión bibliográfica	12
III.1 El hígado como órgano central del metabolismo	14
III.1.1 Anatomía e histología del hígado	14
III.1.2 Fisiología y bioquímica del hígado (metabolismo energético)	15
III.2 Esteatosis hepática no alcohólica	18
III.2.1 Clasificación	18
III.2.2 Prevalencia.....	19
III.2.3 Diagnóstico	20
III.2.3.1 Ecografía	20
III.2.3.2 Tomografía computarizada	20
III.2.3.3 Imágenes de la densidad de protones de la fracción grasa por resonancia magnética (MRI-PDF) (Magnetic resonance imaging proton density fat fraction)	20
III.2.3.4 Elastografía transitoria (Fibroscan)	21
III.2.3.5 Métodos serológicos	21
III.2.3.6 Métodos invasivos: Biopsia hepática	21
III.2.4 Patogénesis.....	22
III.2.4.1 Metabolismo lipídico.....	22
III.2.4.2 Glúcidos e insulina en la esteatosis hepática	42
III.2.4.3 Estrés del retículo endoplásmico (RE)	46
III.2.4.4 Macroautofagia	48
III.2.4.5 Sistema inmune	49
III.2.4.6 Muerte celular	50
III.2.4.7 Receptores nucleares	50
III.2.5 Metabolismo de la gota lipídica en el hígado	59
III.2.5.1 Biogénesis de la gota lipídica.....	59
III.2.5.2 Gemación de gotas lipídicas.....	60
III.2.5.3 Crecimiento y maduración de la gota lipídica	61
III.2.5.4 Proteínas de las gotas lipídicas.....	62
III.2.5.5 Contacto de las gotas lipídicas con las membranas celulares.....	63
III.3 Aceite de Oliva	68
III.4 Escualeno.....	69
III.5 Ómicas.....	71
III.5.1 Genómica	71
III.5.2 Epigenómica.....	72
III.5.3 Transcriptómica	72
III.5.4 Proteómica.....	74
III.5.5 Metabolómica.....	75
III.5.6 Multiómicas	77

III.6 Modelo celular: AML12	77
III.7 Modelo Animal	78
III.7.1 Ratón.....	78
III.7.2 Cerdo	79
IV. Objetivos.....	82
V. Material y métodos	86
V.1 Material biológico	88
V.1.1 Estudios animales	88
V.1.1.1 Influencia del colesterol	89
V.1.1.2 Influencia de una dieta occidental	90
V.1.1.3 Influencia del ácido oleanólico.....	91
V.1.1.4 Influencia del escualeno.....	91
V.1.1.5 Influencia del sexo.....	92
V.1.1.6 Influencia de la castración.....	92
V.1.2 Sacrificio de los animales.....	92
V.1.3 Cultivo celular	93
V.1.3.1 Manejo y condiciones de cultivo.....	93
V.1.3.2 Mantenimiento de la línea celular AML12	93
V.1.3.3 Tripsinización de los cultivos.....	94
V.1.3.4 Siembra de los cultivos.....	94
V.1.3.5 Congelación/descongelación de las células	95
V.1.3.6 Adición de ácidos grasos al medio	95
V.1.3.7 Incubación con 17 β - estradiol.....	96
V.2 Estudio de la expresión génica.....	96
V.2.1 Extracción del RNA	96
V.2.2 Eliminación del DNA contaminante.....	98
V.2.3 RNA Quality Integration (RQI)	98
V.2.4 Secuenciación masiva del RNA (RNAseq)	99
V.2.5 Retrotranscripción.....	99
V.2.6 PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR)	100
V.2.7 Elección del gen de referencia.....	101
V.2.8 Diseño de cebadores y optimización	101
V.3 Estudio histológico y determinaciones analíticas del hígado	102
V.3.1 Hematoxilina-eosina.....	102
V.3.2 Tricrómico de Masson	103
V.3.3 Inmunohistoquímica.....	103
V.3.4 Lípidos hepáticos	104
V.3.4.1 Determinación del colesterol hepático	105
V.3.4.2 Determinación de los triglicéridos hepáticos.....	106
V.3.5 Lipidómica	106
V.4 Determinaciones analíticas del plasma	109
V.4.1 Glucosa	109
V.4.2 Triglicéridos y colesterol.....	109
V.4.3 Ácidos grasos no esterificados (NEFA).....	109
V.4.4 Cuerpos cetónicos	110
V.4.5 Enzimas hepáticas	111
V.4.6 Separación de lipoproteínas por cromatografía líquida de filtración por gel (FPLC).....	111
V.4.6 Colesterol total y libre en las fracciones separadas por FPLC.....	112

V.4.7 Lipidómica	113
V.5 Detección de proteínas	114
V.5.1 Extracción y cuantificación de proteínas	114
V.5.2 Análisis de proteómica dirigida (PRM)	114
V.5.2.1 Diseño del análisis por PRM	115
V.5.2.2 Análisis por PRM	115
V.5.3 Detección inmunoespecífica	116
V.5.3.1 Western-Blot	116
V.5.3.2 ELISA Sandwich	120
V.5.3.3 Multiplex	121
V.6 Análisis estadístico	122
VI. Resultados	124
VI. 1 Pgc1a is responsible for the sex differences in hepatic Cidec/Fsp27 mRNA expression in hepatic steatosis of mice fed a Western diet	126
VI. 2 Transcriptomic and proteomic analyses identify potential biomarkers of hepatic steatosis in a cross-bred porcine model	162
VI. 3 Short-term squalene supplementation decreases triglyceride accumulation in a new swine steatosis model	200
VII. Discusión de resultados	236
VIII. Conclusiones	252
VIII. Conclusions	256
IX. Bibliografía	260



I. Resumen

Las sociedades occidentales están haciendo frente a nuevas enfermedades fruto de la descoordinación entre los cambios en nuestros hábitos alimenticios y nuestra capacidad de adaptación a los mismos. Una de estas enfermedades es la esteatosis hepática, caracterizada por el depósito de gotas lipídicas en el hígado. Esta puede comprometer la calidad de vida de las personas hasta progresar a hepatocarcinoma. Para poder combatir esta enfermedad es necesario el desarrollo de métodos diagnósticos precoces y tratamientos para evitar o ralentizar el progreso de esta enfermedad. Para alcanzar ambos objetivos la caracterización de las bases moleculares de la esteatosis es fundamental.

Entre los muchos genes que intervienen en el desarrollo de la esteatosis hepática, *Cidec* ocupa un puesto especial ya que participa en la fusión de las gotas lipídicas y el conocimiento sobre factores que regulan su expresión resulta clave. En el presente trabajo se explora la influencia de distintos componentes dietéticos, observando que el colesterol estimula su expresión. Asimismo, también se observa un dimorfismo sexual en el desarrollo de la esteatosis en el que parece que la expresión de *Cidec* regulada por las hormonas femeninas a través del cofactor de la transcripción Pgc1a juega un papel clave.

Para ahondar en el conocimiento de los mecanismos moleculares de la esteatosis hemos desarrollado y caracterizado un modelo esteatótico de rápido desarrollo con cerdos procedentes del cruce de razas comerciales. Gracias a este modelo, y mediante el uso de las transcriptómica y proteómica dirigida hemos logrado identificar nuevos genes que responden tanto al desarrollo como a la regresión de esta patología. Además, también nos ha ofrecido nuevos candidatos a marcadores plasmáticos de la esteatosis hepática: LGALS3 e ISG15.

A la hora de buscar tratamientos, el uso de nutrifarmacos o alimentos funcionales resultan un enfoque muy práctico y atractivo para la sociedad. En este aspecto la incorporación de escualeno en la dieta ha mostrado ser eficaz para reducir el porcentaje de gotas lipídicas hepáticas tanto en ratones como en

conejos. Por ello en este trabajo hemos explorado el efecto a corto plazo de la suplementación de escualeno al 0,5% en cerdos previamente esteatóticos. A través de dicho experimento hemos observado que el escualeno reproduce sus efectos en este modelo modificando tanto el lipidoma hepático como el plasmático.

La complejidad que entraña la esteatosis hepática tanto en su desarrollo como en su regresión va más allá de la mera acumulación de grasa e implica cambios en todo tipo de biomoléculas a través de la regulación de distintas rutas metabólicas en función de los componentes de la dieta. En este marco el escualeno es capaz de paliar la esteatosis hepática en distintos modelos. Por ello su futuro uso como alimento funcional puede ser una clave en el tratamiento de la esteatosis hepática.

I. Abstract

Western societies are facing new diseases as a result of the lack of coordination between changes in our eating habits and our ability to adapt to them. One of these diseases is hepatic steatosis, characterized by the deposition of lipid droplets in the liver. This situation can compromise the quality of life of people even progressing to hepatocarcinoma. In order to combat this disease, it is necessary to develop early diagnostic methods and treatments to avoid or to slow down the progress of this disease. To achieve both objectives, the characterization of the molecular basis of steatosis is essential.

Among the many genes involved in the development of liver steatosis, *Cidec* occupies a special position since it participates in the fusion of lipid droplets and knowledge about which factors regulate its expression is crucial. This work explores the influence of different dietary components, observing that cholesterol stimulates its expression. Likewise, there is also a sexual dimorphism in the development of steatosis in which it seems that the expression of *Cidec* regulated by female hormones through the transcription cofactor *Pgc1a* plays a key role.

To deepen our knowledge of the molecular mechanisms of steatosis we have developed and characterized a short-time developing steatotic model based in commercial crossbreed pigs. Thanks to this model, and through the use of transcriptomics and directed proteomics we have managed to identify new genes that respond to both the development and regression of this pathology. In addition, it has also offered us new candidates for plasma markers of hepatic steatosis: LGALS3 and ISG15.

When looking for treatments, the use of nutraceuticals or functional foods results a very handful and attractive approach for society. In this aspect the incorporation of squalene in the diet has been shown to be effective in reducing the percentage of hepatic lipid droplets in both mice and rabbits. Therefore, in this work we have explored the effect of a 0.5% squalene one-month supplementation in previously steatotic pigs. Through this experiment we have observed that squalene reproduces its effects in this model by modifying both hepatic and plasma lipidome.

The complexity involved in hepatic steatosis both in its development and in its regression goes beyond the mere accumulation of fat and implies changes in all types of biomolecules through the regulation of different metabolic pathways depending on the components of the diet. In this context, squalene is able to alleviate hepatic steatosis in different models. Therefore, its future use as a functional food can be a key in the treatment of liver steatosis.

II. Introducción

El hígado graso no alcohólico (NAFLD) es una patología caracterizada por tener una acumulación de gotas lipídicas superior al 5% en los hepatocitos que puede evolucionar a esteatohepatitis, cirrosis y hepatocarcinoma (1). Esta enfermedad supone actualmente un desafío para la sociedad ya que su prevalencia es superior al 25% en algunos países occidentales (2). Esta cifra es una aproximación ya que otro de sus problemas es que no existen marcadores no invasivos precoces para su diagnóstico (3). En esta situación resulta clave descifrar los mecanismos moleculares que subyacen durante la NAFLD tanto para buscar biomarcadores sensibles y específicos para su diagnóstico como posibles tratamientos a dicha patología que reviertan o al menos demoren su evolución.

Para descifrar los mecanismos moleculares que concurren durante la esteatosis hepática y el efecto del escualeno sobre los mismos, el uso de varios modelos experimentales resulta clave. Actualmente existen multitud de modelos de esteatosis hepática basados en modificaciones dietéticas, genéticas o intervenciones farmacológicas desarrollados en roedores (4). Sin embargo, los modelos desarrollados en cerdo, el animal más parecido al hombre a excepción de los primates, son caros y poco accesibles necesitando crear y caracterizar un modelo porcino económico y accesible (5).

A pesar de que queda mucho por conocer y caracterizar de la esteatosis hepática tanto en humano como en sus diversos modelos animales y celulares se sabe que la dieta es uno de los factores claves para su desarrollo por lo que es lógico deducir que a través de esta se pueden proporcionar posibles tratamientos. En esta línea surge el uso de escualeno como alimento funcional. El escualeno, principal componente de la fracción no saponificable del aceite de oliva, ya se ha mostrado capaz de reducir el porcentaje de gotas lipídicas en modelos basados en animales pequeños (6, 7), quedando por conocer que ocurre en un modelo más similar al hombre, como es el cerdo.

III. Revisión bibliográfica

III.1 El hígado como órgano central del metabolismo

En las civilizaciones mesopotámicas, el hígado era considerado el centro de la vitalidad, el órgano donde residía el alma y era utilizado en rituales para predecir el futuro, esta importancia desapareció con las culturas clásicas (8) y hasta hace algunas décadas, el hígado no había vuelto a recobrar su importancia en el organismo. Esta vez desde una perspectiva menos religiosa.

III.1.1 Anatomía e histología del hígado

El hígado es el órgano más grande del cuerpo representando el 2% del peso total. Y se divide en un número de lóbulos variable en función de la especie. En el caso del humano, se diferencia lóbulo derecho e izquierdo, teniendo este último a su vez otros dos lóbulos (lóbulo cuadrado y lóbulo caudado) (9). En el caso del cerdo y del ratón también se observan 4 lóbulos.

La unidad funcional del hígado recibe el nombre de lobulillo hepático, esta estructura se organiza alrededor de una vena central (o centrolobulillar) que llevará la sangre a las venas hepáticas y posteriormente a la vena cava. Los hepatocitos son las células protagonistas de esta estructura y se disponen, como radios de una rueda, en forma de placas celulares de un grosor de 2 células. En el seno de estas placas se encuentran los canalículos biliares que recogerán la bilis producida por los hepatocitos y la llevarán al conducto biliar, y en la otra cara de estos hepatocitos, alrededor de las placas celulares se encuentra el espacio de Disse, que supone un estrecho espacio entre los hepatocitos y las células endoteliales en el que transcurren nutrientes metabolitos e incluso un gran porcentaje de proteínas plasmáticas, este espacio está drenado por el sistema linfático (10). En este espacio aparecen las células de Ito, también llamadas células hepáticas estrelladas, cuya función es almacenar vitamina A, y en caso de lesión hepática se transdiferencian a miofibroblastos fibrogénicos y proliferativos y producen matriz extracelular (11). Finalmente, en los lobulillos hepáticos aparecen los sinusoides hepáticos, formados por células endoteliales discontinuas que pueden intercalarse con células de Kupffer, macrófagos encargados de depurar de bacilos la sangre proveniente del colon (12). En la

luz de los sinusoides hepáticos se recoge la sangre procedente de las arteriolas hepáticas y de la vena porta, y tras exponerse al intercambio de nutrientes y metabolitos con los hepatocitos, será drenada por la vena central. Esto constituye una irrigación única en el organismo, en la que dos vasos aportan sangre a un órgano (vena porta y arteria hepática, mientras que solo uno la drena (vena hepática) (13).

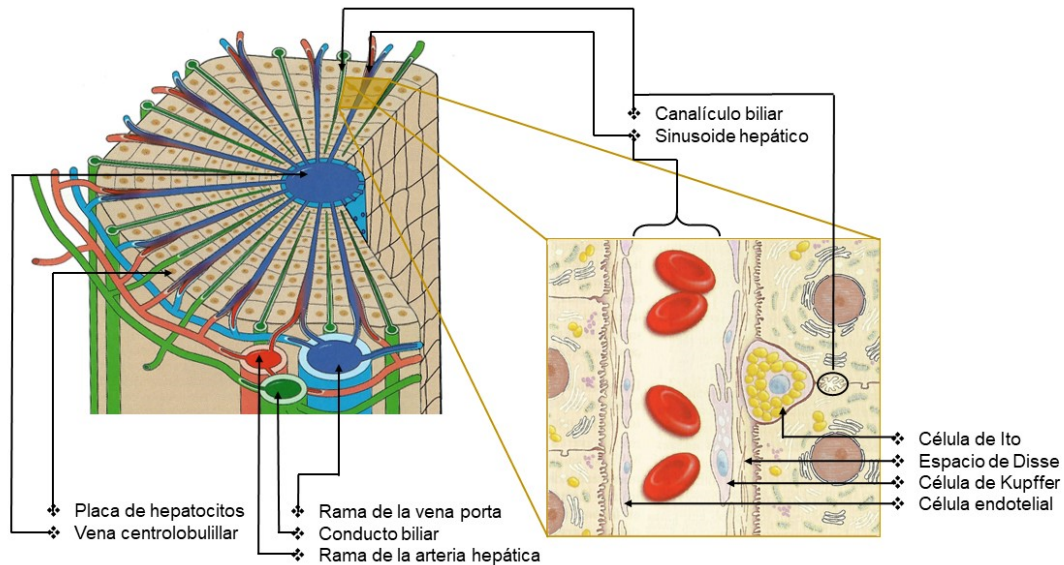


Figura 1. Histología hepática. Adaptado de (10) y (13).

III.1.2 Fisiología y bioquímica del hígado (metabolismo energético)

Con esta organización microscópica tan precisa el hígado es capaz de realizar en el seno de los hepatocitos una ingente cantidad de reacciones bioquímicas, interviniendo en multitud de rutas metabólicas.

Dentro del metabolismo lipídico el hígado sintetiza casi todos los lípidos del organismo y normalmente, éste los secreta al resto del cuerpo para su consumo o almacenamiento. Las células los aprovecharán para la síntesis de membranas, estructuras intracelulares y sustancias químicas (como para la síntesis de hormonas esteroideas por parte de las gónadas y la glándula adrenal). Así pues, el hígado tiene algunas funciones específicas en el metabolismo lipídico, como la oxidación y la síntesis de ácidos grasos, la síntesis de fosfolípidos y de casi todas las lipoproteínas y la síntesis de grandes

cantidades de colesterol, la mayor parte del cual será excretado con la bilis, pero cerca de un 20% se transportará al resto de los tejidos junto con los fosfolípidos en las lipoproteínas (12).

Respecto al metabolismo proteico, el hígado supone una contribución clave tanto en la degradación de las proteínas a través de la desaminación de los aminoácidos y de la formación de urea para la eliminación del amoniacó del cuerpo como en la formación de proteínas plasmáticas (a excepción de las gammaglobulinas) y en la síntesis e interconversión de los distintos aminoácidos y síntesis de compuestos derivados de los aminoácidos (14).

Dentro del metabolismo de los carbohidratos los hepatocitos son capaces de la conversión de galactosa y fructosa en glucosa, de llevar a cabo la gluconeogénesis, de almacenar grandes cantidades de glucosa en forma de glucógeno y de aprovechar los hidrocarburos para modificar proteínas o lípidos. Debido a estas funciones, el hígado supone un órgano clave para el mantenimiento de la glucemia, dado que cuando se produce el aumento postprandial de la glucemia, es capaz de almacenar este exceso de glucosa en forma de glucógeno que puede llegar a suponer entre un 5-10% del volumen del hígado. Gracias a esta acción puede posteriormente, en un momento de hipoglucemia, liberar la glucosa del glucógeno e incluso producirla (en caso de necesidad) a partir de triglicéridos o proteínas y cedérsela al resto del cuerpo, este fenómeno se conoce como la función amortiguadora de la glucosa del hígado (14).

Esta función está regulada por las hormonas insulina y glucagón. La insulina paraliza la gluconeogenesis en el hígado e inactiva la fosforilasa hepática, impidiendo el catabolismo del glucógeno, por otro lado, estimula la actividad de la glucógeno sintetasa. Además, aumenta la captación de glucosa sanguínea por el hepatocito, aumentando la actividad de la enzima glucokinasa que convierte la glucosa a glucosa-6-P e impide que pueda salir libremente del hepatocito. La insulina no solo interviene en el metabolismo glúcido del hígado sino también en el lipídico dado que en el momento que ya no se puede almacenar esta glucosa en forma de glucógeno pasa a estimular su transformación a ácidos grasos que inicialmente se distribuirán con las

lipoproteínas al resto de tejidos y que, en caso de saturación del organismo, puede también almacenarse en el hígado (12).

Mientras la insulina ejerce su efecto en una situación postprandial, el glucagón actúa en la situación opuesta, en el que la glucemia empieza a disminuir, como en un ayuno prolongado, produciendo un efecto antagónico al de la insulina. El glucagón estimula la glucogenólisis a través de la elevación del AMPc en el hepatocito que conlleva a un aumento de la glucosa libre en el hepatocito que será secretada al torrente circulatorio. El glucagón también es capaz de estimular la gluconeogénesis si con la glucogenólisis no se hubiese restablecido la glucemia (12).

Otra de las grandes aportaciones del hígado al organismo es la síntesis y excreción de bilis, cuya función será la digestión y absorción de grasas ya que por un lado actúan como detergentes y emulsionan las grandes partículas de grasa de los alimentos en partículas más pequeñas y más fácilmente atacables por las lipasas y por otro lado favorecen activamente la absorción de las grasas. Además, la bilis constituye un medio de excreción de productos de desecho procedentes de la sangre como la bilirrubina o el exceso de colesterol. Las sales biliares se producen a partir del colesterol, que se convierte primero en ácido cólico o quenodesoxicólico y posteriormente al combinarse con la glicina o la taurina en ácidos biliares glico- y tauroconjugados, estos y sus sales sódicas son los excretados a través de la bilis. En ausencia de sales biliares, se excretarían en las heces cerca del 40% de los lípidos ingeridos, con el subsiguiente déficit energético por la pérdida de nutrientes (14).

Finalmente, otras de las funciones a destacar que realiza el hígado son la síntesis de las moléculas para la coagulación (fibrinógeno, protrombina, factor VII, etc...), el almacenamiento de vitaminas (vitamina A, D y B₁₂) y de hierro (en forma de ferritina) y la eliminación y destoxificación de tóxicos, drogas, hormonas y otras sustancias (12).

Todas estas implicaciones en las distintas rutas metabólicas nos dan una idea de la complejidad metabólica del hígado, además también nos permite observar que los hepatocitos se comportan como verdaderos *filántropos* energéticos, liberando energía al resto del cuerpo cuando este lo necesita y

almacenándola cuando el resto del cuerpo no lo necesita, con el subsiguiente peligro de perjudicar la ejecución del resto de reacciones metabólicas que alberga el citoplasma del hepatocito (12, 14).

III.2 Esteatosis hepática no alcohólica

Antes de introducirse en la esteatosis hepática es interesante conocer que la palabra “hígado” no deriva directamente de su equivalente en latín *-iecur-* ni del griego *-hepatos-*, sino de una palabra compuesta que utilizaban los romanos para referirse a un manjar producido al alimentar a las ocas con higos (ficus) produciéndoles un acúmulo de grasa en el hígado: lecur ficatum, (hígado alimentado de higos). Esta palabra en la edad media derivó en fégado y posteriormente a hígado. Así pues, resulta altamente interesante la relación tan estrecha que tiene el hígado con esta enfermedad, que incluso le dio el nombre al órgano (15, 16).

Este acúmulo de grasa en el hígado que observaban los romanos en sus ocas se produce en forma de gotas lipídicas en el interior de los hepatocitos y, en humanos, cuando alcanza un porcentaje mayor al 5% se considera patológico definiéndose como esteatosis hepática. Esta enfermedad es actualmente la enfermedad hepática más común en los países occidentales y está postulada como la principal causa de trasplantes hepáticos en dichos países en los próximos 10 años (1).

III.2.1 Clasificación

La esteatosis hepática no alcohólica (NAFLD “*non alcoholic fatty liver disease*”) abarca un espectro de 4 estadios. El primero de ellos, esteatosis simple, consiste en una acumulación de grasa superior al 5% del volumen del hígado sin que haya componente inflamatorio. En el momento en el que evoluciona y aparece el componente inflamatorio, pasa a llamarse esteatohepatitis (NASH, “*Non-alcoholic steatohepatitis*”). El tercer estadio de la esteatosis hepática no alcohólica se caracteriza por presentar depósitos de tejido cicatricial en el hígado y se conoce como fibrosis hepática. Éste, es un estadio irreversible, al que al aplicar un tratamiento no provocaría una reversión del mismo, sino simplemente impediría su evolución al siguiente estadio: La cirrosis

hepática, caracterizada por presentar, además de la fibrosis y la inflamación, focos de necrosis y de proliferación celular coexistiendo en el hígado. Finalmente, de la evolución de este último estadio sería el hepatocarcinoma (HCC), que se produciría en el momento en el que esos focos proliferantes se desdiferencian convirtiéndose en células cancerígenas (3).

III.2.2 Prevalencia

Actualmente se considera que la NAFLD afecta a un 20-34% de la población. Sin embargo, se trata de un porcentaje muy variable a lo largo del globo. Por ejemplo, en un trabajo de Younossi y cols en el que recogieron los resultados obtenidos en 729 estudios procedentes de más de 20 países e incluyendo un total de más de 8 millones de personas observaron que la prevalencia más baja se da en África donde era del 13,5 %, mientras que la más alta se da en Sudamérica 30,5% y el Medio Este 31,8%. En Europa, la prevalencia se sitúa en un 23,7%, con Italia a la cabeza 49,6% (2). En España, gracias a un trabajo de Caballeria y cols, conocemos que la prevalencia se sitúa en un 25,8% (17).

Otros factores que influyen enormemente en su prevalencia es la existencia de otras enfermedades metabólicas, como la hiperlipidemia (69,2% 95%, la obesidad (51,3%), la hipertensión (39,3%), la diabetes tipo dos (22,5%) o el síndrome metabólico (42%) (2).

	Prevalencia (%)	IC 95% (%)
Según Regiones		
África	13,5	5,7 - 28,7
Europa	23,7	16,1 – 33,5
Medio Este	31,8	13,5 – 58,2
Sudamérica	30,5	22,8 - 39,4
Italia	49,5	40,8 – 58,4
España	25,8	22,8 – 29,1
Según Enfermedad diagnosticada previamente		
Hiperlipidemia	69,2	49,9 – 83,5
Obesidad	51,3	41,4 – 61,2
Síndrome metabólico	42	30,1 – 56,1
Hipertensión	39,3	33,2 – 54,9
Diabetes tipo II	22,5	17,9 – 27,9

Tabla 1. Prevalencia de la esteatosis hepática. Adaptado de (2).

III.2.3 Diagnóstico

Los porcentajes de prevalencia arrojan una idea aproximada de la situación a lo largo y ancho del globo. Sin embargo, suelen ser imprecisos ya que el diagnóstico de NAFLD es complicado y los distintos estudios han utilizado diferentes métodos de diagnóstico. Estos se clasifican como no invasivos e invasivos (biopsia hepática). Dentro de los primeros encontramos:

III.2.3.1 Ecografía

Se trata del método más extendido en la clínica con pacientes asintomáticos, por ser muy económico, rápido e inocuo (18). Sin embargo, muestra muy baja especificidad y sensibilidad cuando el porcentaje de esteatosis está por debajo del 30% y requiere de personal formado para interpretar las lecturas del equipo (3).

III.2.3.2 Tomografía computarizada

Esta técnica se basa en la exposición a rayos X, y la comparación entre las densidades del hígado y el bazo que, en caso de esteatosis, la densidad del hígado es menor que la del bazo. Sin embargo, este método supone la exposición a radiación, además se puede ver distorsionado por factores ajenos como edemas o acúmulo de cobre en el hígado. La TC no sería mejor que la ecografía en su diagnóstico, pero sí que ofrecería un método cuantitativo (3).

III.2.3.3 Imágenes de la densidad de protones de la fracción grasa por resonancia magnética (MRI-PDFF) (Magnetic resonance imaging proton density fat fraction)

Esta técnica se basa en la observación de los hidrógenos, que muestran patrones diferentes si forman parte del agua o de la grasa. Gracias a esto se puede medir la densidad grasa del hígado. Esta técnica puede mostrar una precisión muy alta en el diagnóstico de la esteatosis. Sin embargo, los equipos capaces de llevar a cabo este análisis son muy caros y escasos e incapaces de diferenciar entre la esteatosis simple y la esteatohepatitis (3).

III.2.3.4 Elastografía transitoria (Fibroscan)

Se trata de un método no invasivo basado en ultrasonografía para medir el grado de fibrosis del hígado (18). La combinación del fibroscan con alguno de los paneles séricos puede convertirse en el mejor método no invasivo para la medición de NAFLD (19).

III.2.3.5 Métodos serológicos

Hasta el momento muchas proteínas se han estudiado como posibles biomarcadores de NAFLD: TNF α , Il-6, pentraxina, ferritina, SPEA (“*Serum prolidase enzyme activity*”), sRAGE (“*soluble receptor for advanced glycation end product*”) y CK-18 (Citoqueratina-18). De entre todas ellas la que mejor resultados ha ofrecido es CK-18 pero sin embargo sigue sin cumplir con las características de especificidad y sensibilidad necesarias para poder utilizarse en clínica (3, 20).

III.2.3.6 Métodos invasivos: Biopsia hepática

Actualmente, la biopsia hepática seguida de su estudio histopatológico es el método de diagnóstico más exacto para NAFLD. Pero aún con todo tiene sus limitaciones. Además de ser un método invasivo que pueda provocar una hepatitis (3), al realizar un biopsia hepática solo se utiliza una pequeña sección del hígado (aproximadamente la 1/50,000 parte), quedando la mayoría de él sin estudiar (21). Esto, según los resultados obtenidos por Bonekamp y cols en el 2014, supone un problema ya que observaron que el depósito de grasa no es homogéneo a lo largo del hígado, siendo mayor en el lóbulo derecho que en el izquierdo y que la superficie del órgano presenta una fibrosis mayor (22). Tres estándares se están utilizando para el diagnóstico histológico de NASH: el sistema de Brunt, el NASH CRN (“*Clinical Research network*”) y los algoritmos SAF (“*steatosis, activity and fibrosis*”) y FLIP (“*fatty liver inhibition progression*”), pero no hay consenso sobre cuál de ellos sería el más apropiado (3).

A pesar de esta dificultad en su diagnóstico, es indudable de que actualmente presenta una elevada prevalencia en la población y esto es un

problema porque hasta hace unas décadas no se había diagnosticado en humanos. Ello justifica la necesidad de conocer más sobre su fisiopatología.

III.2.4 Patogénesis

El hígado juega un papel fundamental en la síntesis, almacenamiento, degradación, empaquetamiento y distribución de glúcidos, proteínas y ácidos grasos estando orquestado por una compleja red de rutas metabólicas de señalización, hormonas, receptores nucleares y factores de transcripción (4). Una desregulación en cualquiera de estas rutas que lleve a una adquisición de lípidos, incorporación de ácidos grasos circulatorios o lipogénesis de novo (DNL), que exceda la capacidad compensatoria de eliminarlos del hígado (oxidación, secreción de VLDLs y producción y excreción de ácidos biliares) provocará la esteatosis hepática. Esta situación puede provocar estrés oxidativo, estrés del retículo endoplásmico (RE), compromiso de la función mitocondrial y aumento la oxidación en peroxisomas y citocromos llevando a daño celular y al avance de la enfermedad (23).

III.2.4.1 Metabolismo lipídico

III.2.4.1.1 Incorporación de ácidos grasos no esterificados (NEFA, “non-esterified fatty acids”) plasmáticos

Los niveles séricos de NEFA han mostrado correlación con la apoptosis en hepatocitos y parecen ser capaces de activarla (24, 25). Los NEFA pueden derivar de los triglicéridos de la dieta (20%) o de la lipólisis en los adipocitos (80%) (26). Este último caso ocurre normalmente en un estado de ayuno estimulado por las catecolaminas, péptidos natriuréticos y el glucagón e inhibido por la insulina. De acuerdo a esto último, se ha observado que en un estado de resistencia a la insulina, la lipólisis adipocitaria se dispara, aumentando los NEFA en el plasma independientemente del estado nutricional (27).

Los mecanismos por los que estos NEFA se incorporan al hígado no están completamente dilucidados, parece ser que la difusión pasiva de ácidos grasos (FA, “fatty acid”) circulantes hacia el hígado es anecdótica y que la captación de ácidos grasos depende principalmente de transportadores de ácidos grasos

(FATP “*fatty acid transporter protein*”) (28). FATP2 y FATP5 son las que presentan expresión hepática en mamíferos y se ha demostrado que el silenciamiento génico de cualquiera de ellos puede mejorar la esteatosis hepática (29, 30).

Una vez el FA alcanza la membrana citoplasmática del hepatocito, se forma un complejo transmembrana tetramérico que comprende la proteína de unión a ácidos grasos (FABP “*fatty acid binding protein*”), la caveolina-1, una ácido graso translocasa (FAT/CD36) y una fosfolipasa de membrana independiente de calcio (iPLA_{2β}) (31). Este proceso parece regulado por el receptor activado de proliferación peroxisomal alfa (PPAR α) en combinación con la leptina y la insulina (32, 33). Cada una de estas proteínas del complejo tetramérico han despertado gran interés por su posible implicación con el desarrollo de NAFLD. De hecho, muchos estudios han encontrado una elevación de los estos transportadores de ácidos grasos en pacientes con NAFLD (25, 27, 34, 35).

Dentro de las FABP, FABP1 es la isoforma predominante en el hígado (28). La FABP1 facilita el transporte, el almacenaje en forma de TG y el uso de los ácidos grasos y sus derivados acil CoA. Además, puede ejercer un efecto protector contra la lipotoxicidad mediante unión a los NEFA, los cuales de otra manera serían citotóxicos (36). La FABP1 es capaz de mediar el transporte de ligandos de PPAR al núcleo de los hepatocitos, estando los niveles intracelulares de FABP1 correlacionados con la actividad de PPAR α y PPAR γ (37). Se ha descrito un aumento de FABP1 en los primeros estados del NAFLD, el cual promovería el flujo lipídico como mecanismo compensatorio para reducir la lipotoxicidad. A medida que la enfermedad progresa, disminuyen los niveles de FABP1 aumentando los niveles de lípidos y las repercusiones de daño en los orgánulos y células del hígado debido a su lipotoxicidad (23).

La translocasa de ácidos grasos, CD36, facilita el transporte de ácidos grasos de cadena larga, y está regulada por el PPAR γ , PXR (“*Pregnane X receptor*”) y LXR (“*Liver X receptor*”) (38). Se ha demostrado que tanto la esteatosis provoca un aumento de la expresión de CD36, como un aumento de CD36 hepático lleva a una esteatosis (39, 40). Por otro lado, también se ha

observado que la expresión de CD36 está confinada al citoplasma en el hígado sano, y su translocación a la membrana plasmática podría provocar la progresión del NAFLD (41) siendo tanto su abundancia como su localización celular importantes en el desarrollo de la NAFLD.

Las caveolinas comprenden una familia de tres proteínas de membrana que contribuyen al tráfico lipídico y a la formación de gotas lipídicas (42). Diferentes observaciones sugieren que el rol de caveolina 1 en la acumulación de lípido hepático puede variar en función del origen de la esteatosis, a consecuencia de una dieta alta en grasas o un ayuno prolongado (23).

La incorporación de NEFA al hígado ha captado el foco de atención de los investigadores por su lipotoxicidad (43), debida en parte a su capacidad de activar receptores Toll like e iniciar la cascada extrínseca de apoptosis (44, 45), forma predominante de daño hepatocelular en el NASH (24, 46). De hecho la actividad apoptótica del hígado enfermo correlaciona con la severidad de la enfermedad, y consecuentemente, con la presencia de fragmentos de CK-18 en el plasma de los individuos con NAFLD (47). Los FA también interfieren con la señalización de los receptores nucleares, lo que podría adicionalmente influenciar la extensión del daño hepático promoviendo la resistencia a la insulina y el estrés del RE (48, 49).

Otro de los efectos de los FA es la estimulación de la producción de TNF α y de su receptor hepático, el cual correlaciona con la severidad de la enfermedad en NAFLD (50). La activación del receptor del TNF α aumenta la expresión de SREBP1c ("*sterol regulatory element binding protein 1 c*"), el cual induce lipogénesis hepática y acumulación de lípidos (51). Como los efectos mediados por TNF α son antagonizados por la adiponectina, los receptores de adiponectina están disminuidos durante la esteatohepatitis (52). Al activar el receptor TNF α los ácidos grasos promocionan la insulino resistencia hepática que ocasiona un círculo vicioso de acumulación de lípidos en la patogénesis del NASH (27).

Finalmente, otro de los grandes contribuyentes a la lipotoxicidad de los FA es su oxidación, que lleva a la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS, "*reactive oxygen species*") como más adelante comentaremos en el apartado de oxidación de ácidos grasos (FAO "*fatty acid oxidation*").

Una manera eficaz de evitar todos esos efectos deletéreos es la conversión de los FA a triglicéridos (TG) considerados inertes, la acumulación de TG en forma de gotas lipídicas parece ser hepatoprotectora aunque sea característica de la esteatosis hepática y de esteatohepatitis (53). Esta conversión de FA a TG se produce debido a la acción de las enzimas glicerol-3-fosfato aciltransferasa mitocondrial (mtGPAT) y de la diacilglicerol aciltransferasa (DGAT) mitocondrial y del RE (54). De ésta última existe dos isoformas codificados por genes distintos. En el hígado la que más se expresa es la DGAT-2 que sintetiza TG a partir de NEFA, procedentes del torrente circulatorio o de DNL, y diglicéridos recién formados (55). Estos procesos están controlados por la SREBP-1c, LXR, FXR ("*Farnesoid X Receptor*") y ChREBP ("*Carbohydrate responsive element-binding protein*"), el cual relaciona el metabolismo de la glucosa y el lipídico (56). Un buen reflejo de esta función hepatoprotectora de los TG se observó en un experimento realizado en ratones alimentados con una dieta deficiente de colina y en metionina, donde la delección de DGAT2, enzima encargada del último paso de la síntesis de TG, aumentó la necroinflamación, la peroxidación y estrés oxidativo en el hígado de los ratones, a pesar de la reducción intracelular de TG (57). Otros efectos que se observaron tras su silenciamiento fueron de la lipopenia y problemas cutáneos (58). Otra opción para estos TG es el empaquetamiento en forma de VLDLs para su consumo por el resto de tejidos periféricos o su almacenamiento en los adipocitos (4, 54).

Además de la cantidad, el tipo de NEFA que aparece en el hígado esteatótico también esta alterado, con una acumulación sustancial de ácidos grasos saturados (SFA "*saturated fatty acid*"), como el palmítico (C16:0) y esteárico (C18:0) en relación con los ácidos grasos monoinsaturados y poliinsaturados (MUFA "*monounsaturated fatty acid*" y los PUFA "*polyunsaturated fatty acid*") (59).

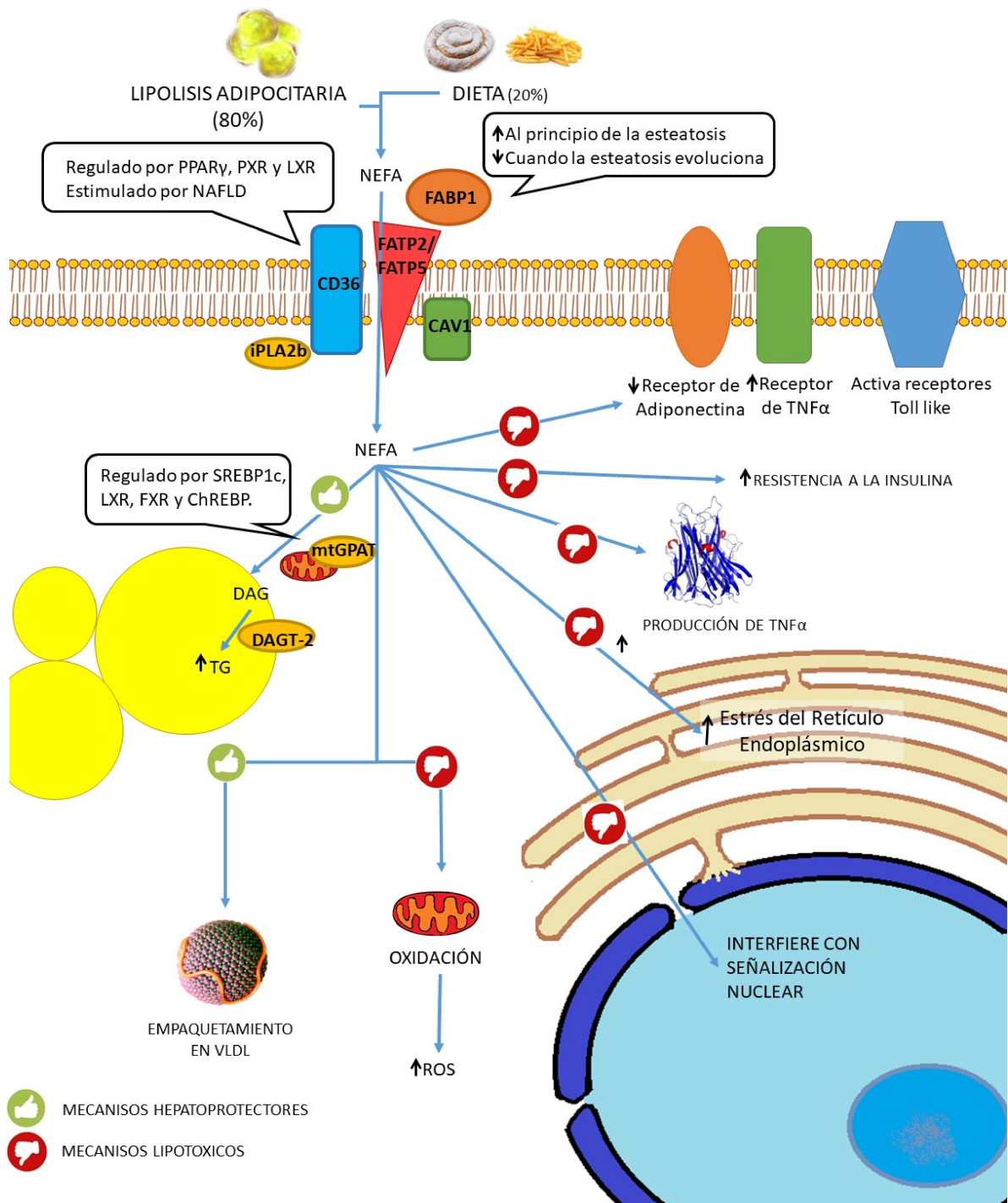


Figura 2. Metabolismo de los ácidos grasos no esterificados en el hepatocito

III.2.4.1.2 SFA en la esteatosis hepática

Varios autores coinciden en que la acumulación de SFA en el hígado estático es paralelo a la severidad de la enfermedad (60-62), lo cual es consistente con su lipotoxicidad a través de varios mecanismos. Por un lado, antes de entrar en el hepatocito, los SFAs son capaces de unirse y activar

receptores de membrana del hepatocito, incluyendo los receptores de la muerte TRAIL, TRAIL-2 y el receptor Toll like 4 (63, 64). En este contexto, TRAIL2 activaría la ruta proteolítica de la caspasa 8 y el receptor Toll like 4 a través del receptor nuclear NF- κ B activando quinasas del estrés como la JNK (c-Jun NH2-termina kinase) (63). Una vez dentro del hepatocito, los SFA continúan con sus acciones lipotóxicas activando el estrés del RE y a JNK directamente. Otra ruta más de los SFAs para activar JNK sería a través de su conversión a ceramidas como se explicará más adelante.

JNK representa un importante mediador de la lipotoxicidad hepática de los SFA, pertenece a la familia de proteínas quinasas activadas por mitógeno y tras su activación, JNK inactiva a IRS-1 (Insulin receptor substrate-1), produciendo insulino resistencia (IR) e interaccionando con la proteína de membrana mitocondrial SH3BP5 llevando a una respiración mitocondrial disminuida y aumentando la producción de ROS (65). Además, JNK suprime el efecto del PPAR α , la β oxidación en mitocondria y peroxisomas y activa el estrés del RE.

Los SFAs no se limitan a alterar la maquinaria metabólica de los hepatocitos. También son capaces de activar los receptores TLR4 (*"toll like receptor"*) en las células de Ito llevándolas a secretar citoquinas atrayentes de monocitos, y a activar JNK en las células de Kupffer induciendo su conversión a una forma más activa y proinflamatoria, en la que secretan TGF- β e inhibidores de metaloproteinasa-1 (65, 66).

III.2.4.1.3 MUFA en la esteatosis hepática

Los MUFA más abundantes y estudiados en NAFLD son el ácido palmitoleico (C16:1) y el ácido oleico (C18:1), los cuales son generados mediante la enzima esteroil CoA desaturasa-1 (SCD-1, stearoyl-CoA desaturase-1) a partir de ácido palmítico y del esteárico respectivamente (67). La conversión de SFA a MUFA por SCD1 podría ser un mecanismo de protección (68).

A pesar de que contribuyen a la esteatosis, los MUFA se han mostrado menos lipotóxicos que los SFA. Los MUFA inducen apoptosis, pero este efecto es mínimo comparado con los SFA, especialmente con el palmitato (69). Parece ser que los MUFA tienen una menor capacidad para desencadenar el estrés del RE y tienen una incorporación más eficiente a la formación de TG, siendo esto

un sistema de defensa contra los efectos proapoptóticos de las grandes cantidades de NEFA en las células como hemos comentado previamente (53, 69, 70). Este efecto está corroborado tanto mediante la suplementación de FA, como la estimulación de SCD-1 (70-72).

III.2.4.1.4 PUFA en la esteatosis hepática

Los PUFA se clasifican en dos clases: $\omega 6$ y $\omega 3$, nombrados por la presencia de la primera insaturación contando desde el extremo metilo del FA, conocido como el carbono ω . Destacados ejemplos de PUFA $\omega 6$ incluyen el ácido dihomo- γ -linoleico (20:3n-6) y el ácido araquidónico (AA; 20:4n-6) y de los PUFA $\omega 3$, el ácido eicosapentaenoico (EPA; 20:5n-3) y el docosahexaenoico (DHA; 22:6n-3) (59).

En animales, la conversión de los ácidos grasos de 18 C a PUFA de 20 C o más es menor de un 5-10% (73), por ello han de ser incorporados en la dieta, con el consumo de pescado o de sus aceites, los cuales contienen niveles altos de EPA y de DHA siendo las principales fuentes de PUFA $\omega 3$. Algunos PUFA de 18C, linoleico y α -linolénico (ALA), también tienen que ser añadidos a la dieta, ya que los mamíferos carecen de las desaturasas necesarias para sintetizarlos a partir del oleico (59).

La suplementación dietética con PUFA, tanto $\omega 3$ (EPA, ALA) como $\omega 6$ (linoleato) ha mostrado una mejora en cuanto marcadores de la actividad de la enfermedad (esteatosis, necro inflamación, *balloning* y fibrosis) (74, 75). Esto puede ser debido a que los PUFA modulan la fluidez y la permeabilidad de la membrana celular, y a modo de ejemplo, se ha observado que al aumentar los $\omega 3$ en la membrana se permite un mayor número de receptores de insulina y una mejoría en la sensibilidad a la misma (76).

Sin embargo, parece ser que no son igualmente beneficiosos los $\omega 3$ que los $\omega 6$. Análisis lipídomicos acoplados a actividad enzimática y a la expresión génica estudiaron el ratio $\omega 6/\omega 3$, observaron un ratio aumentado de $\omega 6/\omega 3$ en el hígado debido a la saturación de la enzima FADS1, siendo esto un factor patogénico clave en NASH (61, 62, 77, 78). En este mismo trabajo, los autores realizaron estudios inhibiendo la FADS1 hepática y observaron una alteración en

la composición y cantidad de los fosfolípidos de membrana, acompañada de una acumulación de SFA y sobreproducción de eicosanoides proinflamatorios derivados de $\omega 6$: PG (prostaglandinas), TX (tromboxanos) y LT (leucotrienos).

Parece ser que las dietas actuales también se caracterizan por tener un ratio $\omega 6/\omega 3$ descompensado que lleva a la formación de derivados proinflamatorios del $\omega 6$. Basados en estos hallazgos la estrategia a seguir es la suplementación con $\omega 3$, la cual ya ha mostrado beneficios tanto en experimentos con pacientes (79) y con ratones esteatóticos (80-83). La aplicación de este tratamiento redujo el estrés del RE, la disfunción mitocondrial y la DNL desregulada, consecuentemente mejoró la esteatosis y el perfil cardiometabólico, sin embargo no mejoró la necroinflamación histológica ni la fibrosis (84, 85).

Los efectos beneficiosos de los $\omega 3$ -PUFA en la esteatosis hepática no están exentos de controversia (86). Esto puede deberse a la diferencia en el tipo y dosis de $\omega 3$ PUFA utilizado o con la baja estabilidad que tiene los PUFA debido a ser más fácilmente oxidables. Trabajos publicados este año proponen la nanoencapsulación como un sistema de protección que mejora tanto la absorción de DHA como sus propiedades beneficiosas (87).

Aunque la mayor parte de los FA de la dieta se metabolizan mediante β -oxidación (20-30%), almacenamiento en forma de TG en el mismo hepatocito o envío en forma de VLDL a los adipocitos (15-80%), algunos PUFAs logran una interacción directa con los factores de transcripción consiguiendo los efectos antiesteatogénicos y metabólicos. Sin embargo, los efectos anti-inflamatorios pueden estar predominantemente mediados por la formación de SPMs ("*specialized pro-resolving mediators*") derivados de PUFA (80). Estos SPMs, que más adelante detallaremos, ejercen su acción en el rango de picomolar a nanomolar, al contrario que los $\omega 3$ PUFA, que ejercen sus efectos en un rango de μM a mM en la sangre (88).

En conclusión mientras que la acumulación de TG protege frente a la lipotoxicidad y es característica de esteatosis benigna, la acumulación de FA, (especialmente SFA) y sus metabolitos son los que median la apoptosis, la IR y la progresión de la esteatosis simple a esteatohepatitis (62, 89).

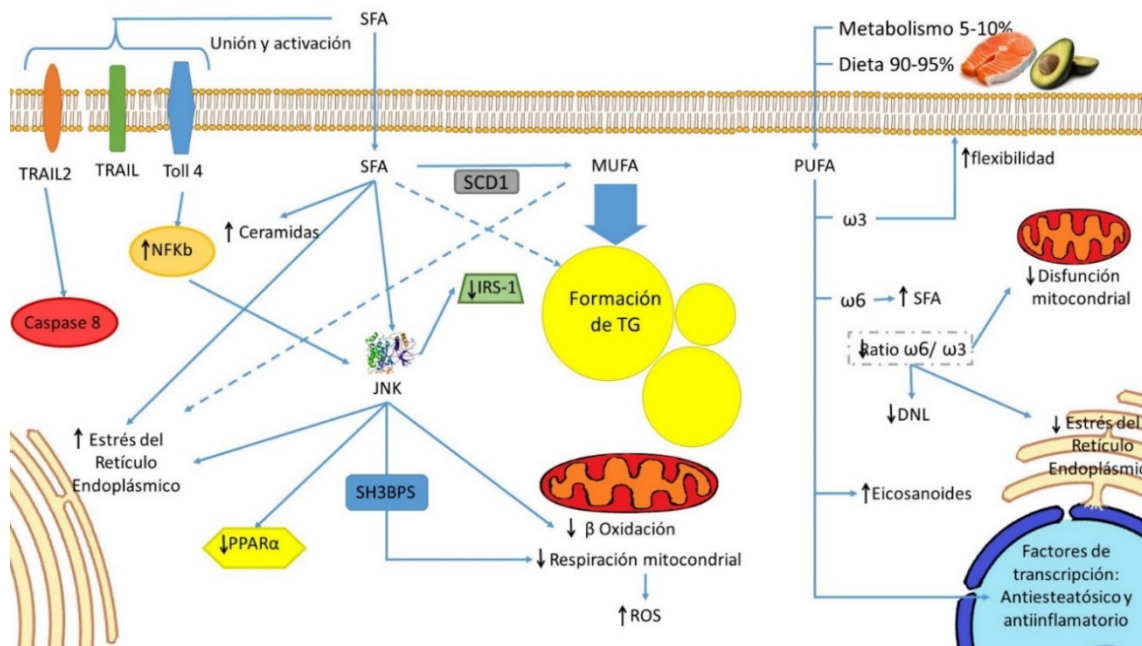


Figura 3. Efectos de los ácidos grasos en el hepatocito en función de sus insaturaciones

III.2.4.1.5 Lipogénesis *de novo* (DNL) hepática

El segundo componente más importante en el desarrollo de la esteatosis hepática es la lipogénesis hepática (DNL) mientras que la contribución de la inhibición de la β -oxidación, la disminución de la secreción de VLDLs, o la producción y excreción de ácidos biliares ocupan una importancia relativa menor (26).

Tanto en pacientes como en animales se ha observado un aumento de la DNL durante la esteatosis hepática en estado de ayuno (42, 90-92)(93, 94). Este aumento es independiente de los niveles intrahepáticos de TG pudiendo reflejar que su inadecuada supresión durante el ayuno es clave en los pacientes con NAFLD (95, 96). El aumento de la DNL contribuye a la esteatosis hepática, hipertrigliceridemia e incluso esteatohepatitis (70).

Aunque el fallo de regulación de la DNL es un hecho central en la acumulación de lípidos hepático en los pacientes con NAFLD, los mecanismos responsables no están perfectamente esclarecidos. En la DNL intervienen dos protagonistas, la acetil CoA carboxilasa (ACC) y la ácido graso sintasa (FAS), juntas se encargan de convertir el acetil CoA y el malonil CoA a ácidos grasos. La función de la ACC es la adición de un carbono al acetil CoA para formar malonil CoA. Hay dos isoenzimas de ACC codificadas por genes distintos: ACC1

citosólica; y ACC2, mitocondrial. El malonil CoA citosólico formado por ACC1 se utiliza principalmente para la DNL, mientras que el mitocondrial se utiliza principalmente como un inhibidor alostérico de la carnitina palmitoil transferasa 1a (CPT1A), evitando la entrada de ácidos grasos a la mitocondria. La inhibición de la ACC conlleva una disminución de la DNL y aumenta la β -oxidación de FA, dos pasos claves en la formación de la esteatosis hepática (67). Respecto a FAS, se ha estudiado que su ausencia en hígado promueve la esteatosis hepática con una señalización defectuosa de PPAR α en ratones con una dieta sin grasa (97). Este fenotipo es reversible mediante adición de grasa a la dieta o mediante un agonista PPAR α (97).

La regulación de estas dos enzimas está complejamente orquestada por varios receptores nucleares (PPAR α , PPAR γ , LXR y el FXR) (98). Esta complejidad se hace más redundante al ser capaz el PPAR α de autoactivarse mediante un fosfolípido sintetizado por FAS (27). Respecto a los factores de transcripción que regulan la DNL, hay dos que cobran vital importancia: SREBP1c (activado por insulina) y ChREBP (activado por carbohidratos) (99-101).

La expresión de SREBP1c está aumentada en pacientes con NAFLD, y de acuerdo a su rol lipogénico, los niveles de triglicéridos hepáticos están aumentados en ratones que sobreexpresan SREBP1c (90, 91) mientras que su ausencia provoca la disminución de enzimas lipogénicas y la estimulación compensatoria de SREBP2, que a su vez, lleva a un aumento paradójico de la síntesis de colesterol y a su acumulación, relacionando la DNL con el metabolismo del colesterol (102). A este mismo nivel, otro efecto contradictorio se observa en el caso de la IR. A pesar de que lo lógico sería que la resistencia a la insulina en los pacientes con NAFLD contrarrestase la activación de SREBP1c por la insulina, la IR presenta una inhibición selectiva de manera que, asegura la habilidad de la insulina para promover DNL a través de SREBP1c lo cual la hace incapaz de suprimir la gluconeogénesis (99).

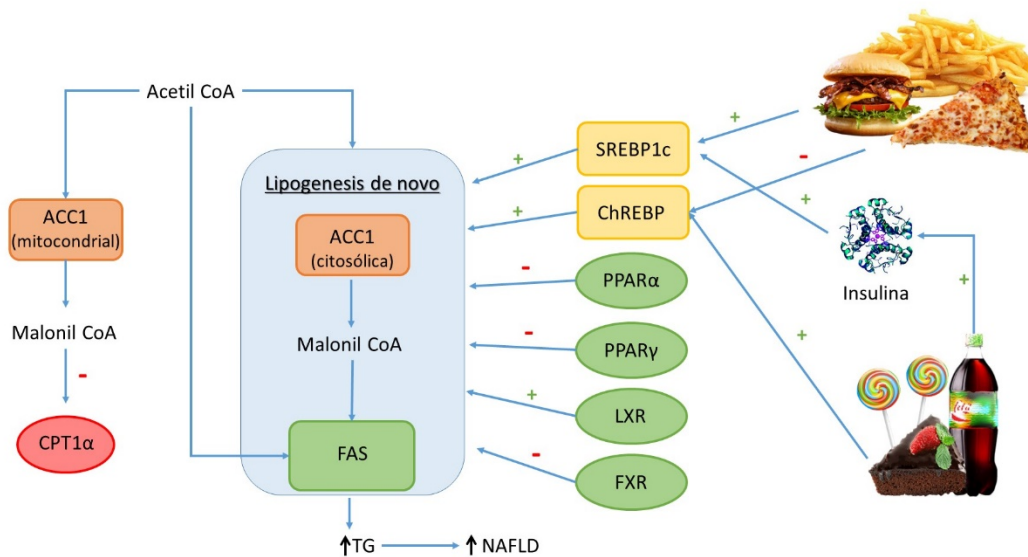


Figura 4. Lipogénesis de novo hepática

Por su parte, ChREBP media la inducción de la DNL estimulado por los carbohidratos (CHO) pero no por las grasas, es más, las dietas altas en grasa inhiben su actividad (100, 103). De acuerdo a esto, los ratones ChREBP KO redujeron la DNL un 65% debido a la incapacidad de los CHO de estimular la DNL. Sin embargo, no por ello mostraron un fenotipo más saludable, sino que también manifestaron IR e intolerancia a los azúcares. Y además mostraron un aumento en la síntesis de colesterol, con su consecuente citotoxicidad (104, 105). En biopsias de pacientes con NASH se ha observado segregación en los patrones de expresión de ChREBP, los pacientes con esteatosis hepática muestran una expresión alta de ChREBP, pero sin embargo, es baja en pacientes con IR (68). Al poder ser la DNL activada por la insulina y la glucosa a través de SREBP1c y ChREBP supone un nexo entre el metabolismo de los glúcidos y de los lípidos (106, 107).

Como se va entendiendo no subyacen los mismos mecanismos moleculares en todos los pacientes con hígado graso. Los mecanismos protectores frente a la lipotoxicidad varían entre individuos, (p. ej. desaturasas e inhibidores de la inflamación) (23).

III.2.4.1.6 Oxidación de ácidos grasos

La oxidación de los ácidos grasos (FAO) representa la manera más eficiente energéticamente para la homeostasis al compararla con otros subtipos de macronutrientes (4).

El primer paso de la oxidación de ácidos grasos ocurre en el citoplasma, donde la acil CoA sintetasa une los ácidos grasos a la coenzima A formando el acil CoA. A partir de aquí, la oxidación de ácidos grasos puede ocurrir en la mitocondria, en peroxisomas o a través de la acción de los citocromos en el RE (108, 109). Siendo la oxidación en la mitocondria la forma principal.

Para acceder a la mitocondria, la difusión pasiva a través de las membranas es minoritario y sucede principalmente a través de la CPT1A situada en la membrana externa mitocondria. Sin embargo, solo puede introducir aquellos acil CoA que provengan de un ácido graso de 16 C o menor. Esto implica el paso por el peroxisoma para reducir su tamaño hasta 16 C si es de 18 C o mayor (110, 111). La oxidación de los acil-CoA mayores de 18 C en el peroxisoma se produce a través de ACOX1 (Acil CoA oxidasa peroxisomal). Su ausencia resulta en acumulación lipídica hepática, fibrosis, estrés oxidativo e inflamación, enfatizando en el rol de la FAO peroxisomal en NAFLD (112). El mecanismo por el cual esos acil CoA acortados en el peroxisoma se dirigen a la mitocondria aún está por dilucidar.

De vuelta a la mitocondria, CPT1A presenta una regulación alostérica por el malonil CoA, un precursor de la síntesis de lípidos que se acumula tras la activación del receptor de insulina (113). De esta manera, en un estado postprandial, la oxidación de ácidos grasos se reprime, mientras que la síntesis de FA se estimula, permitiendo el almacenaje y distribución de los lípidos (114). Normalmente durante la β -oxidación se producen electrones (recogidos en forma de NADH y FADH₂) y acetil CoA, los electrones son llevados a la cadena de transporte de electrones para sintetizar ATP y el acetil CoA al ciclo de krebs o en caso de sobrecarga lipídica sin fuente de glucosa, será convertido en cuerpos cetónicos (115).

En caso de sobrecarga lipídica, como en el NAFLD, los mecanismos mitocondriales de protección frente a la oxidación se ven sobrepasados produciéndose el daño oxidativo al DNA mitocondrial y minando las funciones mitocondriales. Esto, establece un ciclo vicioso que exacerba la disfunción mitocondrial y el estrés oxidativo (110). La disminución de las funciones mitocondriales conlleva a la necesidad de utilizar una ruta de FAO alternativa: la ω oxidación en el RE (108).

La ω oxidación microsomal está protagonizada por los citocromos CYP4A, CYP4A11, CYP2E1 y CYP2A1 (91, 116-120) y a pesar de reducir el nivel de lípidos hepáticos genera peroxidación lipídica, cantidades considerables de ROS, estrés oxidativo y ácidos dicarboxílicos tóxicos, que pueden potenciar la inflamación y la progresión de la enfermedad (91, 108, 110, 121-124). La activación de la ω oxidación puede ser secundaria también a la inhibición de la β -oxidación debido a la acumulación de malonil CoA y la inhibición de la CPT1A (26, 125, 126).

La oxidación de ácidos grasos está controlada por la insulina y por el PPAR α , el cual disminuye durante la esteatohepatitis, (42, 108, 110, 111, 121, 122). Curiosamente estos mediadores de señalización también estimulan la formación de cuerpos cetónicos a través de la regulación transcripcional de la hidroximetil glutaril CoA sintasa mitocondrial (HMGCoA). (127). PPAR α también estimula por un lado las proteínas transportadoras de ácidos grasos y las enzimas relacionadas al metabolismo de la apolipoproteína B (128) y por otro la capacidad de JNK1 y NF- κ B de unirse al DNA llevando al aumento de la inflamación hepática (129). Consecuentemente, la expresión de PPAR α puede estar relacionada tanto con la homeostasis lipídica como con la inflamación.

A pesar de que la consecuencia esperada de la acumulación de lípidos hepáticos sería un aumento en la FAO a modo de respuesta adaptativa para reducir la sobrecarga lipídica y la lipotoxicidad, los distintos estudios de FAO son conflictivos, algunos refieren su aumento (130-133), otros disminución (134) y otros que no existen cambios (135).

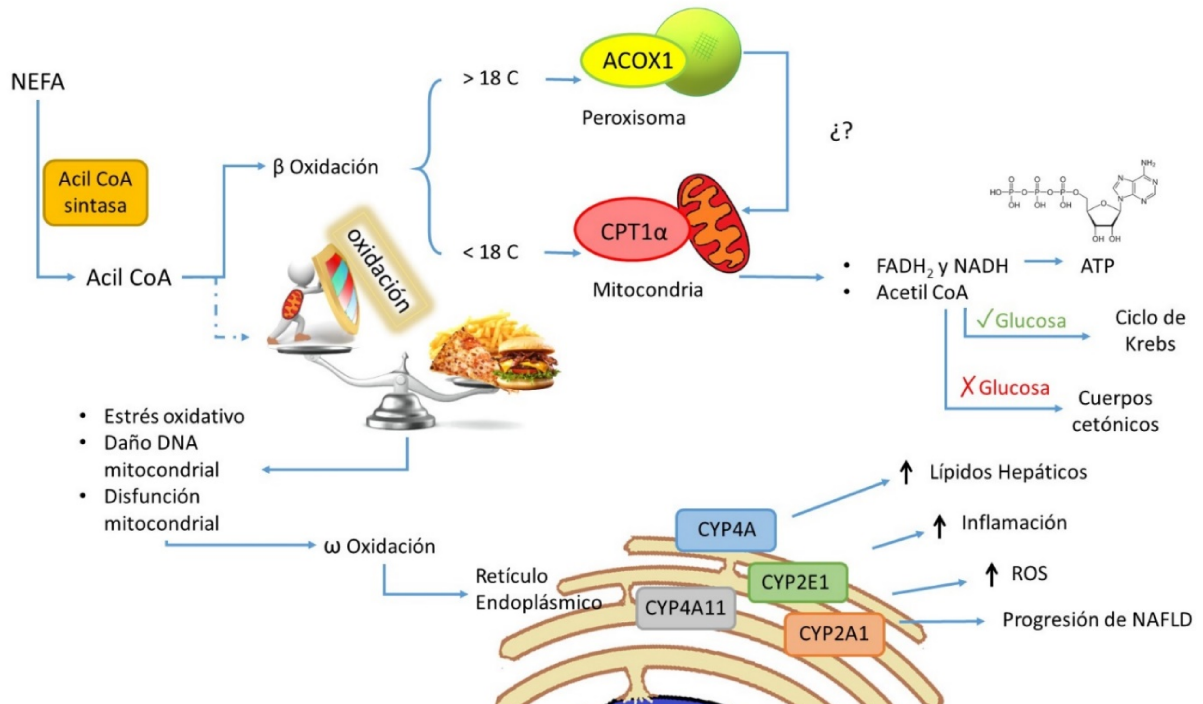


Figura 5. Oxidación de ácidos grasos en el hepatocito

III.2.4.1.7 Secreción plasmática de lípidos hepáticos

La secreción de TG es otra opción que tiene el hígado para reducir el contenido lipídico (136). Debido a su naturaleza hidrofóbica, los ácidos grasos solo pueden secretarse tras haber sido incorporados como TG a las partículas hidrosolubles VLDL junto con colesterol, fosfolípidos y apolipoproteínas (137). Las partículas VLDL se forman en el RE, donde la APOB100 se carga con lípidos en un proceso catalizado por la enzima MTTP (microsomal triglyceride transfer protein). Las VLDL nacientes se transfieren posteriormente al aparato de Golgi, y durante este proceso se cargarán con más lípidos hasta que se forma la partícula de VLDL madura (138). De manera que una VLDL contiene una única molécula de APOB100 y un contenido variable de TG (138, 139). Como queda implícito, APOB100 y MTTP son componentes claves en la secreción de VLDL y en el mantenimiento de la homeostasis hepática lipídica. De ello deriva que pacientes con defectos en los genes de *MTTP* o en *APOB* muestren esteatosis hepática secundaria a problemas para secretar triglicéridos (140, 141).

Se ha observado que la secreción de TG a través de las VLDLs aumenta con el contenido intrahepático de lípidos, sin embargo alcanza un máximo cuando el contenido graso del hígado supera el 10%, viéndose comprometida la

capacidad compensatoria de este sistema para prevenir el aumento de la acumulación de lípidos en el hígado (137). A pesar de la mayor secreción de VLDL-TG en pacientes con esteatosis hepática que en individuos sanos, la secreción de APOB100 se mantiene estable, sugiriendo que los pacientes con NAFLD no secretan más lipoproteínas, sino las mismas, pero más grandes y más ricas en TG (137). El límite de este sistema aparece cuando las partículas VLDL son tan grandes que no pueden ser secretadas porque su diámetro supera el del poro del sinusoide endotelial, llevando a la retención de lípidos y a NAFLD (142). Otros autores han observado que una exposición moderada a ácidos grasos sí que logra aumentar la secreción de APOB100, pero sin embargo la exposición prolongada lleva a estrés del RE, degradación posttraduccional de la APOB100 y, consecuentemente, reducción de la secreción de APOB100 tanto *in vivo* como *in vitro*, relacionando el estrés del RE con la progresión del NAFLD debida a la inhibición de APOB100 (143, 144).

La transcripción del gen MTTP está estimulada por PPAR α e implica a su vez un aumento en la secreción de la APOB100 y una paradójica disminución de la trigliceridemia en ratones (145). Esto podría ser debido a una inhibición de la APOC3 mediada por el PPAR α , en esta situación se promueve la eliminación de las lipoproteínas asociadas a APOB100 del torrente circulatorio (145). A la vista de estos resultados, el PPAR α no solo ejerce su efecto catabólico a través de la FAO, sino también a través del metabolismo de las lipoproteínas. Por otro lado, tanto la APOB100 como la MTTP están negativamente reguladas por la insulina de una forma contradictoria ya que reduce la exportación de lípidos hepáticos, induciendo la degradación de APOB100 y suprimiendo la síntesis de MTTP (138). Por otro lado, también se ha observado regulación por SREBP1c, quien inhibe la secreción de VLDLs mediante inhibición de la expresión de MTTP (146).

A pesar de la variación entre estudios, queda patente que la secreción plasmática de lípidos en NAFLD puede ser bifásica, aumentando inicialmente hasta alcanzar una meseta o incluso una disminución. Esta situación contribuye a la esteatosis hepática, lipotoxicidad y daño hepático, promocionando la progresión de la enfermedad y la fibrosis (23).

III.2.4.1.8 Los ácidos biliares en la esteatosis

Los ácidos biliares, además de suponer un ruta de excreción lipídica parcial, pueden actuar como ligando de receptores nucleares hormonales, siendo el FXR la principal diana (147, 148). En el hígado, FXR es un regulador negativo de la síntesis de ácidos biliares (BA), interfiriendo con la conversión del colesterol a ácidos biliares iniciada por la CYP7A1 mediante la estimulación de una proteína llamada SHP (small heterodimer partner), también facilita la absorción de BA en el ileo distal. FXR disminuye la glicolisis a través de la inhibición de ChREBP (149) y la lipogénesis a través del eje SHP-SREBP-1c (150). La activación de FXR hepático lleva a la reducción de FA y TG, aumenta la β -oxidación mediante la inducción de PPAR α (151), y disminuye la expresión de la apolipoproteína C3, involucrada en el ensamblaje de las VLDL (152).

III.2.4.1.9 Colesterol no esterificado

En las esteatosis hepática, el colesterol no esterificado (FC) se acumula en los hepatocitos y en sus orgánulos como resultado del aumento de la síntesis del colesterol y de la hidrólisis de ésteres del colesterol y de la disminución en la exportación de colesterol y de la síntesis de ácidos biliares (153). Respecto al aumento de la síntesis de colesterol, la hidroximetilglutaril CoA reductasa (HMGCoA reductasa) es la enzima clave para la síntesis de colesterol y está regulada por la sterol regulatory-element binding protein (SREBP)-2. Se ha observado que tanto los niveles de SREBP-2 como los del FC y los de la proteína transportadora de colesterol mitocondrial aumentan en la esteatohepatitis (154). Además, se ha observado que la sobrealimentación con colesterol libre lleva a la acumulación de oxisteroles tóxicos que contribuyen a la generación de ROS, al estrés mitocondrial y del RE y al daño hepático (155, 156). Otros autores también han observado que la acumulación de FC lleva a la apoptosis a través de la ruta JNK1 regulada por TLR4 que activa los mediadores inflamatorios de la proteína HMGB1 (*High mobility group box 1*) (157). Sus efectos deletéreos no se limitan al hepatocito ya que el abundante colesterol libre estimula a las células de Kupffer y a las células de Ito las cuales median la inflamación y la fibrosis (158).

La función clave del colesterol en la esteatohepatitis ha llevado al uso de fármacos que reducen el colesterol para tratar la esteatohepatitis, y con esto se ha observado que las estatinas son capaces de proteger frente al daño hepático (159) y la fluvastatina atenúa la activación de las células de Ito y protege frente a la fibrosis hepática, la inflamación y el estrés oxidativo (160).

III.2.4.1.10 Ceramidas y sus derivados en la esteatosis hepática

Las ceramidas son un grupo de lípidos que contienen una base esfingoide, típicamente la esfingosina, unida a un acil CoA procedente de un graso saturado o mono insaturado y constituye el núcleo hidrofóbico de todos los esfingolípidos, incluyendo la esfingomielina, los cerebrósidos y los gangliósidos (161). Las ceramidas se pueden sintetizar *de novo* a partir de la serina y el palmitato mediante la acción secuencial de tres enzimas del RE: Serina palmitoil transferasa (SPT), ceramida sintetasa (CS), y dihidro-ceramida desaturasa (DES), o ser generadas desde la hidrólisis de la esfingomielina de la membrana plasmática a ceramida y fosfocolina mediante la enzima esfingomielinasa (SMAse).

Las ceramidas, aumentadas tanto en el hígado como en el plasma de pacientes con esteatohepatitis (62, 77, 162), se han relacionado recientemente con la resistencia a la insulina, el estrés oxidativo y la inflamación (163) (164-167). En el hígado, las ceramidas interactúan con el TNF α y promueven el daño mitocondrial impidiendo la β -oxidación y la activación de los complejos II y IV y promoviendo la producción de ROS y la acumulación de TG (168, 169). También llevan a la disrupción de la homeostasis del calcio en el RE, lo que induce apoptosis mediada por el estrés del RE, la activación del inflamósoma y el bloqueo de la autofagia (170, 171). Varios autores han observado que la inhibición de la síntesis de ceramidas reduce el daño hepático, la esteatosis y mejora la sensibilidad a la insulina en ratones alimentados con una dieta alta en grasas (158, 172, 173).

Se ha observado que los SFA son el sustrato limitante para la síntesis de las ceramidas en el hígado, y al haber grandes cantidades de los mismos en la esteatosis hepática se estimula la síntesis *de novo* de ceramidas. La sobrecarga en ceramida hepática puede inducir la hidrólisis de la esfingomielina por la

SMasa ácida (ASMA_s), una isoforma de SMA_s que está estimulada en NASH por estímulos proinflamatorios, incluyendo ROS y ligandos de TNF α (174). La activación de la ASMA_s por sí misma también promueve el daño hepático mediante la disrupción del metabolismo de la metionina y la fosfatidil colina (PC), consecuentemente promoviendo la permeabilización de la membrana lisosomal (165) y activando directamente las células de Ito (175).

Uno de los productos derivados de la acción de las SMA_s sobre las esfingomielinas es la esfingosina que tras ser fosforilada mediante la esfingosina quinasa (SphKs) formará esfingosina-1-fosfato (S1P). S1P tiene una función compleja dependiendo del compartimento celular donde se sintetice, la diana molecular celular y del tipo celular. En humanos, existen dos isoformas para SphK con diferente localización subcelular: SphK1, en la membrana celular, cuyo producto será preferiblemente secretado extracelularmente y SphK2 en núcleo, RE y mitocondria, donde el S1P generado *de novo* actúa directamente en dianas intracelulares de un modo independiente de receptor. De este modo, en el núcleo, S1P impide la síntesis de DNA inhibiendo las desacetilasas de histonas 1 y 2; en el RE, S1P contribuye a la activación del factor 2 asociado al receptor de TNF α , el cual se necesita para la activación de NF- κ B (176), y en la mitocondria, S1P interacciona con la prohibitina 2 para regular la respiración y desencadenar la apoptosis celular dependiente de Bax (177). SphK2 es la forma predominante en el hígado (176, 177). Por otro lado, la expresión hepática de SphK1 conlleva a la secreción de citoquinas proinflamatorias TNF α y IL6 e inhibe la secreción de adipocinas antiinflamatorias como adiponectina e IL-10 (178) siendo efectos opuestos a la activación de SphK2 (179).

Existe un delicado balance de las cantidades relativas de ceramida, esfingosina y esfingosina 1-fosfato (S1P), los cuales son metabólicamente interconvertibles entre sí. Este balance se conoce como reóstato esfingolipídico y puede llevar la célula en direcciones opuestas en función sus cantidades relativas: por ejemplo, las ceramidas y la esfingosina inducen apoptosis celular, senescencia e inhibición del crecimiento. Sin embargo, S1P lleva a la proliferación celular (161).

A pesar de que las ceramidas son un conocido mediador de la lipotoxicidad de los NEFAs, y uno de los responsables de la inducción de la

apoptosis de los hepatocitos, el rol de las ceramidas en la esteatosis hepática y la lipotoxicidad no está del todo esclarecido y parece ser específica del tipo celular (180, 181).

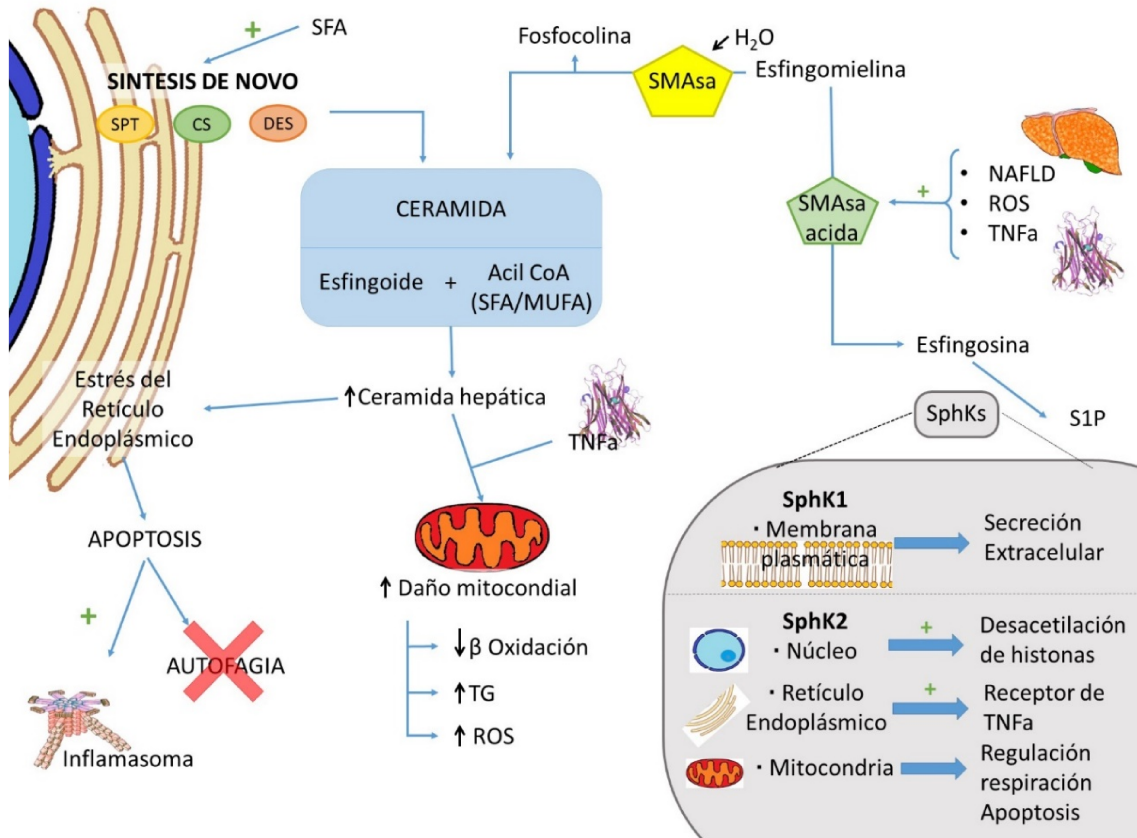


Figura 6. Metabolismo de las ceramidas en el hepatocito durante la esteatosis hepática

III.2.4.1.11 Lisofosfatidil colina

La lisofosfatidil colina (LPC) es un glicerofosfolípido generado a partir de PC por hidrólisis parcial de un ácido graso. Esta reacción puede ser catalizada intracelularmente por la fosfolipasa A₂ (PLA₂) o extracelularmente por la lecitino-colesterol aciltransferasa plasmática (67). La LPC procedente de PLA₂ es un mediador importante de la lipotoxicidad de los SFA, ya que induce apoptosis celular (26, 182).

El contenido de LPC en hígado y plasma aumenta en los ratones y en humanos conforme empeora el NASH (43, 60, 62, 77). Esta parece ser clave en los efectos de la lipotoxicidad sobre el estrés del RE e induciendo apoptosis a través de JNK o de la glucógeno sintasa kinasa 3 (GSK3) y la inducción del factor

de transcripción CCAAT/enhancer-binding homologous protein (CHOP). Además de la lipopoptosis mediada por JNK y la activación del estrés del RE, existen otros mecanismos de lipotoxicidad de la LPC: alteración de la fosforilación oxidativa en las mitocondrias hepáticas (183), formación y liberación de vesículas extracelulares proinflamatorias y profibrogénicas en los hepatocitos (184, 185) y su conversión a ácido lisofosfatídico (LPA), un potente fosfolípido profibrogénico, generado por la acción de la autotaxina (186), cuyos fenómenos de lipotoxicidad son muy difíciles de distinguir de los provocados por la LPC (182).

Un mecanismo adicional importante de lipotoxicidad es la depleción de PC en la membrana por la acción de la PLA₂ (26, 187). La PC es el fosfolípido más abundante en los mamíferos, es esencial para la integridad de la membrana celular, y es un inhibidor por feedback importante de la lipogénesis mediada por SREBP-1c (188). Los hepatocitos tienen alta necesidad de PC para la producción de VLDL y para la secreción de bilis, por lo cual son particularmente sensibles a su carencia. La esteatohepatitis se caracteriza por una depleción de PC y una disrupción de la integridad de la membrana del hepatocito, resultando en la liberación extracelular de lípidos tóxicos, apoptosis de los hepatocitos, inflamación y progresión de la enfermedad hepática (187, 189).

III.2.4.1.12 Eicosanoides

Los eicosanoides son derivados de los PUFA, principalmente del AA pero también del EPA y del ácido dihomo- γ -linolenico (190). Existen múltiples subfamilias de los eicosanoides (prostaglandinas, tromboxanos, leucotrienos, resolvinas, etc...) con actividades heterogéneas e incluso opuestas. Los eicosanoides actúan como agentes de señalización autocrina, paracrina y endocrina a través de la unión a los receptores de superficie acoplados a la proteína G en las células diana. Los eicosanoides son sintetizados a partir de ω 6 y ω 3 PUFA de los fosfolípidos de la membrana tras la activación de la PLA₂.

Dentro de los eicosanoides aparece un subgrupo llamado SPMs (mediadores especializados proresolución) formado por lipoxinas, maresinas, y resolvinas que estimulan la autolimitación y la resolución de la inflamación crónica y la fibrosis del tejido mediante la activación de rutas metabólicas para

restaurar la homeostasis celular normal y la arquitectura de los tejidos en los diferentes órganos incluyendo el hígado (89). Algunos de estos SPMs se han mostrado capaces de disminuir la infiltración grasa en el hígado y la apoptosis inducida por el estrés del RE del hepatocito (191-194) como por ejemplo la maresina 1 (195).

Información derivada de modelos dietéticos de NASH y del cultivo celular muestran que el desequilibrio entre los eicosanoides proinflamatorios y los SPMs en el hígado tiene una función patológica principal en el desarrollo de la esteatosis hepática y que la restauración de ese equilibrio podría ser un tratamiento eficaz (89, 196, 197).

III.2.4.2 Glúcidos e insulina en la esteatosis hepática

La esteatosis hepática y el metabolismo glucídico guardan una relación muy estrecha. Por un lado, muchos de los sustratos que se requiere para la DNL provienen del metabolismo de CHO (p. ej. la DNL requiere de poder reductor (NADPH) que deriva de la ruta de las pentosas fosfato) y por otro lado la mayoría los factores nucleares que regulan el metabolismo lipídico también son importantes mediadores en la señalización de la insulina, como los cofactores de la transcripción ChREBP y SREBP1c (4, 27).

Desde hace ya un tiempo se conoce que las dietas altas en carbohidratos inducen resistencia a la insulina, estrés oxidativo, lipogenesis y esteatosis hepática (198). Un exceso de glucosa es normalmente almacenado como glucógeno bajo la influencia de la insulina, pero también puede proporcionar TG: el glicerol a través de triosa fosfato y los ácidos grasos a través del acetyl CoA (vía el ciclo de Krebs). También se conoce que las altas concentraciones de glucosa en cultivo de hepatocitos pueden inducir estrés del RE y apoptosis debido al desequilibrio metabólico (199, 200), conociéndose este fenómeno como glucotoxicidad.

III.2.4.2.1 Glucosa

En un estado postprandial, el hepatocito toma la glucosa de la sangre mediante el transportador de glucosa tipo 2 (GLUT2), el cual presenta una alta capacidad como transportador pero con baja afinidad siendo, además,

independiente de la insulina (201). Una vez la glucosa se ha incorporado en el hepatocito se transforma a G6P mediante la glucoquinasa hepática (L-GCK), favoreciendo su acúmulo intracelular. Esta enzima, en estado de ayuno está inactivada y unida a su proteína reguladora en el núcleo. La abundancia de la glucosa postprandial junto con el efecto de la insulina causa la disociación de esa unión y permite que la L-GCK vaya al citoplasma. A nivel transcripcional la L-GCK está regulada por SREBP-1c, HNF4a, HNF6, FOXO1 (Forkhead box protein O1) y USF1. Mutaciones en el gen de GCK se han asociado con la resistencia a la insulina y con formas hereditarias de la diabetes (202, 203).

La G6P puede ir a la glucólisis o a la síntesis de glucógeno en función del estado metabólico del organismo. La glucólisis llevará a la producción de piruvato con la ganancia neta de dos ATPs y dos NADH + H por molécula de glucosa. La glucólisis se regula al nivel de la L-GCK, la cual puede ser inhibida por la fructosa-1,6-bisfosfato y el AMP, y al nivel de la piruvato kinasa (PK), encargada del paso final de la glucólisis, activada por su sustrato e inhibida por el ATP. La insulina, la epinefrina y el glucagón también regulan la PK mediante la vía del fosfatidil inositol-3-quinasa (PI3K/Akt) y de ChREBP que inducen la transcripción de PK en presencia de glucosa (204). El piruvato se descarboxila más adelante para producir acetil CoA y entrar al ciclo de Krebs o ser utilizado para la DNL. La ruta de las pentosas fosfato es otra posible alternativa para la degradación de la G6P en hepatocitos, la cual proporcionará NADPH, el cual es importante como antioxidante y como cosustrato para la síntesis de ácidos grasos y colesterol. En células de hepatocarcinoma, la actividad glucolítica está estimulada por un aumento de la actividad de la hexokinasa 2 y de la expresión de GLUT1, llevando a un uso patológico de la glucosa (efecto Warburg) (205).

La síntesis de glucógeno está catalizada por la glucógeno sintasa (GS) tras la conversión de la G6P a UDP-glucosa (206). GS tiene una activación alostérica a través de la G6P y está sujeta a regulación por fosforilación. La GSK3 que se encarga de inactivar la GS fosforilándola, está regulada por la Akt/PI3K y consecuentemente por la insulina. GSK3 es una kinasa multifuncional, relacionada en la senescencia celular, con la apoptosis y con el metabolismo lipídico vía la fosforilación de SREBP-1c (207). Otras proteínas quinasas que fosforilan a la GS son la AMPK (proteína quinasa activada por

AMP) y la PKA (proteína quinasa A). La insulina activa la síntesis de glucógeno a través de la represión de la PKA.

En un estado de ayuno, el hígado proporciona energía al organismo a través del catabolismo del glucógeno, y en caso de que sea un ayuno prolongado, a través de la gluconeogénesis (208). La lisis del glucógeno está catalizada por la glucógeno fosforilasa (PYGL), la cual escinde la glucosa del glucógeno en forma de G1P (glucosa 1 fosfato). PYGL se activa alostéricamente por el AMP y mediante fosforilación por la PKA.

La gluconeogénesis hepática empieza en la mitocondria con la inducción de la piruvato carboxilasa por la abundancia de acetyl CoA y además está regulada alostéricamente y transcripcionalmente a la altura de la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK), la fructosa-1,6- bifosfatasa y la glucosa-6-fosfatasa (G6Pase). La insulina reprime la expresión de PEPCK mediante la fosforilación de FOXO1 vía Akt. Esta ruta esta reprimida por la activación de la señalización de PPAR α mediante inducción de la TRB3 (pseudokinase tribbles-homologue 3) (27).

Otros receptores nucleares (PGC1 α y FXR), el glucagón, y los glucocorticoides también median la expresión de PEPCK y de G6Pase (208, 209). FOXO1, un activador transcripcional de PEPCK y de G6Pase, está directa e indirectamente activado por PGC1 α , HNF4 α , CREBP y PPAR α (210).

Se ha observado que la sobreexpresión de PEPCK promueve la IR en ratones (211) y su ausencia provoca una gluconeogénesis disminuida, además de la cataplerosis, lo que causaba acumulación de TG hepática y esteatosis (212). Siendo ambas situaciones patológicas. También en ratones se ha observado que la inhibición de la β -oxidación a través de la CPT1 α restringe la gluconeogénesis hepática (213). Por otro lado, en pacientes se ha observado que la expresión de TRB3 está asociada con IR (214, 215).

III.2.4.2.2 Fructosa

La fructosa es un azúcar de especial importancia en la esteatosis hepática ya que se considera lipogénico (216). La fructosa entra en el hepatocito via GLUT2. Donde se metaboliza para la síntesis de glucógeno, de glucosa, de

lactato, de piruvato o de triglicéridos. Su capacidad de promover la lipogénesis hepática ha centrado el foco de atención de la ciencia y se sabe que es secundaria al aumento de acil coA, DAG (diacilglicerol) y TG. En ratas se ha demostrado que los primeros cambios que realiza la fructosa en el hígado es un aumento de las proteínas lipogénicas FAS, ChREBP, ACC-1 y CD36 (217).

La fructosa no solo ofrece efectos nocivos a corto plazo, se ha observado que la alimentación crónica con fructosa en ratas llevó al aumento de la expresión génica de TNF α mediante el factor de la transcripción NF- κ B (218). TNF α induce la fosforilación de IRS1, a través de la inhibición de las serin fosfatasas (p. ej. PP2A) o la activación de las serin kinasas (p. ej. JNK) lo cual provocó una disrupción en la señalización hepática de la insulina (219). Este mismo planteamiento experimental también logró un aumento de SOCS-3 (220) un miembro de la familia de supresores de la señalización de citoquinas (SOCS), que siendo inicialmente mediador inflamatorio, también es capaz de regular la señalización de la insulina y la DNL en el hígado. SOCS-1 y SOCS-3 pueden inhibir la señalización de la insulina interfiriendo la fosforilación de IRS1 e inducir la DNL en el hígado a través de la inhibición de la JAK (janus tyrosine kinase) y de la STAT 3 (signal transduction and activator of transcription), proteínas que llevan a la activación de SREBP-1c (221).

Datos más recientes incluso asocian la dieta alta en fructosa a la activación del estrés del RE a través de las rutas de IRE1/XBP1 y de PERK/Eif2A (222, 223). Efecto asociado a la activación de SREBP-1c y a la estimulación de las enzimas lipogénicas (224, 225).

III.2.4.2.3 Insulina

Durante la esteatosis hepática se puede producir una señalización alterada de la insulina. En el caso del desarrollo de una IR periférica y una hiperinsulinemia resulta en un aumento del envío de FA al hígado y aumento de la expresión de SREBP1c y de ChREBP hepáticos. La hiperinsulinemia también provoca una disminución en la secreción de adipoquinas por la grasa ectópica. Esta modula el metabolismo lipídico, reduce los niveles de TNF α circulantes (226, 227) y disminuye la inflamación vía AMPK y PPAR α (228). La adiponectina también sensibiliza a la insulina como resultado de la mejora mediada por MAPK

en la oxidación de FA y promueve una disminución de la gluconeogénesis hepática (229). Respecto al desarrollo de resistencia hepática a la insulina, está mediada por citoquinas (TNF e Il-6) y por la JNK e implica estrés del RE.

Datos recientes sugieren que el metabolismo lipídico, de manera independiente al metabolismo glucídico, puede inducir IR. La DAG es un intermediario en la conversión del oleato a TG. La acumulación de DAG en las gotas lipídicas del citosol está asociada con un aumento de la translocación de la isoforma del PKC en el hígado a la membrana plasmática donde se une e inhibe el dominio quinasa intracelular del receptor de insulina (230, 231). También las ceramidas parecen ser capaces de inducir la resistencia a la insulina en NAFLD (54).

III.2.4.3 Estrés del retículo endoplásmico (RE)

El estrés del RE en respuesta al NAFLD ha creado mucho interés ya que se ha observado varios grados de activación del UPR (unfolded protein response) en pacientes con NAFLD (232). De hecho, casi para todos de los componentes de la esteatosis hepática analizados hasta el momento se observa una asociación con el estrés del RE.

El RE es una red de membranas intracelulares donde la mayoría de proteínas tanto secretadas como de membrana adoptan su conformación. Mientras que las mitocondrias son los principales orgánulos de la combustión de energía, el RE es el principal encargado de plegar proteínas y de su tráfico. La aparición de proteínas mal plegadas y su acúmulo pueden deberse a una gran variedad de respuestas celulares. El RE es muy sensible tanto a la inflamación, como a la resistencia a la insulina y al metabolismo de glúcidos y lípidos. De hecho, el exceso de NEFA conlleva al desarrollo del mal plegamiento y conformación inadecuada de las proteínas. Éstas forman agregados y en un mecanismo adaptativo se activa la denominada UPR (233), esta respuesta puede llevar a la autofagia (234).

El UPR es una respuesta orquestada para restablecer la homeostasis normal mediante el arresto del ciclo celular, la atenuación de la síntesis proteica temporal, disminuyendo la inducción de las chaperonas localizadas en el RE, y la degradación de proteínas asociadas al RE. Si esta respuesta no logra restablecer la homeostasis, las proteínas sensoras de estrés, incluyendo el factor de transcripción 6 (ATF6), la IRE-1 (inositol-requiring enzyme-1) y la PERK (protein kinase R-like RE kinase) pueden desencadenar la apoptosis (232, 235). Por un lado, ATF6 activa la apoptosis a través de la sobreexpresión de XBP1 y CHOP (236, 237). El factor de transcripción CHOP muestra bajos niveles en ausencia de estrés y juega un rol crítico en la muerte del hepatocito debida al estrés del RE mediado por NEFA (238, 239). Por otro, IRE-1 tiene actividad endorribonucleasa y libera un fragmento de 26 nt del mRNA de XBP1, de manera que al traducirlo, se convierte en el factor de transcripción activo XBP1s (235). Éste interacciona con varias cascadas de inflamación mediante la activación de JNK y la inhibición de la señalización del NF- κ B y la producción de ROS (240). Finalmente, PERK activa la señalización de NF- κ B y ATF4. NF- κ B regulará la señalización inflamatoria (IL-6 y el TNF α .) y ATF4 el metabolismo de la glucosa (241, 242). PERK además lleva a apoptosis a través de la activación de CHOP.

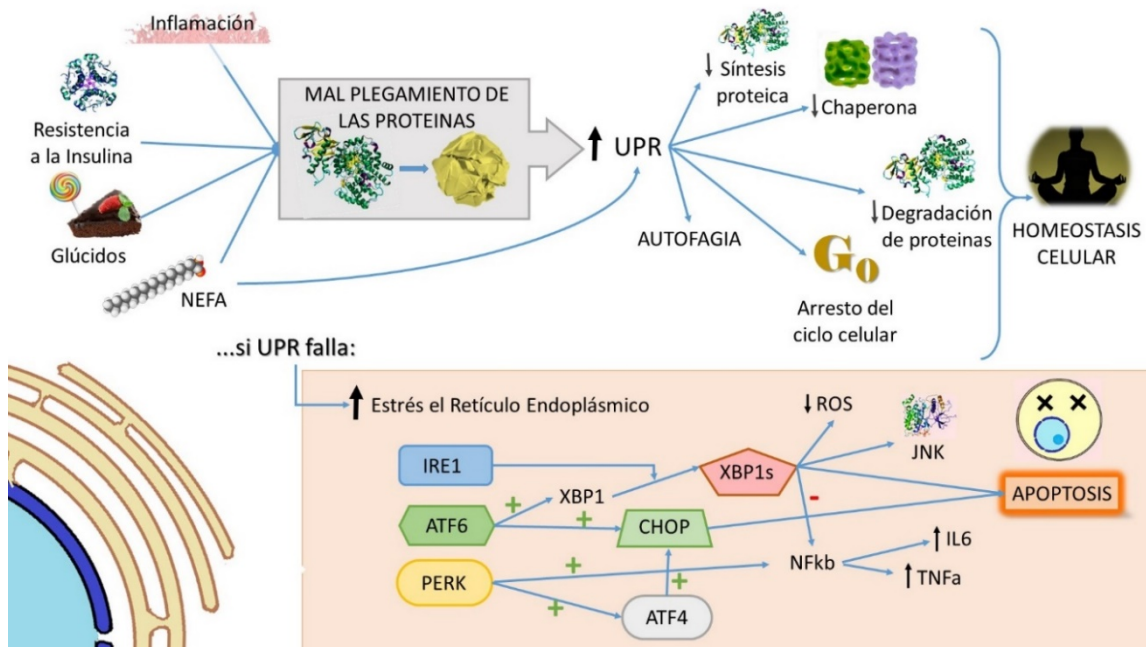


Figura 7. Estrés del retículo endoplásmico durante la NAFLD

El estrés del RE parece ser capaz de regular a otros orgánulos, como las gotas lipídicas y las mitocondrias. Respecto a las gotas lipídicas, el estrés del RE activa la SREBP-1c afectando al metabolismo lipídico y al número, la composición y la calidad de las gotas lipídicas [76, 78]. Respecto a las mitocondrias, la exposición a ácido palmítico y esteárico en hepatocitos en cultivo aumenta de la expresión de los genes de respuesta al estrés del RE: CHOP, GADD34 y GR78 y produce apoptosis dependiente de la mitocondria (180, 243). Mientras que la salida de calcio del RE que se produce tras el estrés del RE inducido por exposición al ácido palmítico se ha visto implicada en la disfunción mitocondrial y el estrés oxidativo (244). El mecanismo que los conecta no está del todo claro. Una posibilidad es que un almacenaje de ácidos grasos aberrante podría activar la UPR al alterar la homeostasis lipídica, causando daños en el plegamiento de las proteínas del RE o en el almacenamiento de calcio en el RE [139, 140]. Alternativamente el secuestro alterado de ácidos grasos podría resultar en una composición lipídica del RE aberrante que directamente activa la UPR, independientemente del plegamiento de las proteínas. De hecho, recientes hallazgos indican que UPR puede ser directamente activado cuando se altera la composición lipídica del RE [141, 143].

Parece ser que una vez que el hígado ha cruzado el umbral de acumulación de esteatosis simple a esteatohepatitis, los genes relacionados con la apoptosis se estimulan, mientras que los del estrés del RE/genes UPR se inhiben, alterando también el metabolismo de otros orgánulos y llevando al estrés oxidativo, la disfunción mitocondrial, la inflamación y la apoptosis (245).

III.2.4.4 Macroautofagia

Otro de los procesos relacionados con la homeostasis lipídica del hígado es la macroautofagia. Esta ruta lisosomal, durante el ayuno lleva a la fusión de lisosomas y gotas lipídicas para formar autofagosomas, los cuales al degradarse liberan los ácidos grasos que serán catabolizados mediante la β -oxidación (27). Este proceso se encuentra inhibido por la diana de los mamíferos de la rapamicina (mTOR), inactiva durante el ayuno. En un estado insulinoresistente, mTOR y la calpaína se encuentran sobreactivadas. Este segundo es un represor de ATGs (Activador transcripcional de genes relacionados con la autofagia)

(246). A este respecto se ha observado en ratones que una macroautofagia defectuosa conlleva a un aumento de gotas lipídicas en el hígado y por otro lado otros autores encontraron en modelos para obesidad genética y nutricional, una disminución de la expresión de los ATGs (234, 247). Además se ha visto en pacientes obesos que la inducción de la ruta del mTOR, activa el SREBP-1c, promueve el estrés del RE e inhibe la autofagia (248, 249).

III.2.4.5 Sistema inmune

Uno de los distintivos de los desórdenes relacionados con la sobrealimentación es un estado de inflamación hepática crónica de bajo grado que lleva a un proceso de remisión, el cual incluye fibrogénesis y producción persistente de matriz extracelular para reemplazar el tejido dañado, resultando en la cicatrización del tejido, fibrosis y finalmente cirrosis.

En este microambiente metabólico de la esteatosis hepática, además de los efectos tóxicos de glúcidos y lípidos existe otro protagonista más, las endotoxinas (LPS). Las LPS son uno de los componentes clave de la pared externa de las bacterias gram negativas y son capaces de estimular el sistema inmune innato durante la esteatosis hepática. Se ha observado que tanto su inyección subcutánea como su administración a bajas dosis en ratones provoca esteatohepatitis. Además también se ha descrito en ratones genéticamente obesos, que la esterilización de su microbiota intestinal gram negativa previene del desarrollo de NASH e IR (250).

El mecanismo por el que las LPS contribuyen a la patogénesis de NASH es dependiente de TLR4 y puede incluir la intervención de las proteínas chaperonas, factores de transcripción y ROS (251). Además del TLR4, el TLR9 y el TLR2 también están bajo estudio por su posible implicación en la evolución de la esteatosis hepática. De momento se cree que el TLR9 a través de la activación de MyD88 puede mediar la producción de IL-1 β en las células de Kupffer llevando a la progresión del NASH mediante la estimulación de HSCs y hepatocitos (4, 252).

III.2.4.6 Muerte celular

Diversos mecanismos de muerte celular en los hepatocitos durante la esteatosis hepática se han observado: Apoptosis, necroptosis y piroptosis.

El principal mecanismo descrito es la apoptosis. La cual puede ocurrir vía intrínseca, activada por un estrés intracelular, tal como el estrés oxidativo o la disfunción de orgánulos (estrés del RE, permeabilización lisosomal y disfunción mitocondrial) (72, 253) o puede ocurrir vía extrínseca, iniciada por la unión de los ligandos de muerte, como Fas o TRAIL a sus respectivos receptores. Tanto la intrínseca como la extrínseca convergen en un efector de caspasas para mediar la apoptosis (153).

La necroptosis comparte receptores de inducción con la apoptosis pero resulta en un hinchazón celular y de orgánulos independiente de las caspasas; pudiendo llevar a la muerte celular cuando la apoptosis está inhibida. Un estudio reciente muestra que los hígados con NASH expresan altos niveles de RIP-3 (receptor –interacting protein), el cual conjuntamente a RIP-1 forma un complejo conocido como necrosoma relacionado con la señalización de la necroptosis (254).

Finalmente, también parece que la piroptosis contribuye en el desarrollo de NASH en modelos murinos. La piroptosis implica la activación de la caspasa 1 del hepatocito y de las células Kupffer siendo mediada por el inflamosoma NLRP3 (nucleotide oligomerization domain (NOD)-like receptor family, pyrin domain-containing 3). Ratones carentes de este inflamosoma desarrollan menor severidad en la lesión hepática tras un NASH inducido por la dieta (255) mientras que ratones con un inflamosoma NLRP3 activado constitutivamente mostraron muerte celular por piroptosis en sus hepatocitos (256).

III.2.4.7 Receptores nucleares

Los receptores nucleares son factores de transcripción capaces de detectar cambios en el medio o señales hormonales y regulan la transcripción de genes para adaptarse a dichos cambios, orquestando de esta manera las funciones vitales de las células y del organismo. En humanos hay 48 receptores nucleares categorizados en 7 subfamilias NR0-NR6 (257). En general los

receptores nucleares dependen del ligando que regula la maquinaria celular a través de la transcripción. Ciertos miembros específicos de la subfamilia NR1 (LXR, PPAR, FXR, CAR y PXR) se han mostrado especialmente importantes en el desarrollo de la esteatosis hepática (257-260).

III.2.4.7.1 LXRs

LXR regula el metabolismo de triglicéridos y de colesterol tanto en ratones como en humanos, y el metabolismo de ácidos biliares en ratones. Esto se debe a que el promotor de *Cyp7a1* en ratón tiene un elemento de respuesta a LXR carente en humanos (261).

Existen dos isoformas de LXR, LXR α (NR1H3) y LXR β (NR1H2), siendo ambas muy similares, se diferencian en su distribución tisular. En el hígado se expresa principalmente la LXR α (59).

Tanto el colesterol dietético como la biosíntesis del mismo contribuyen al nivel total de colesterol en el suero. La activación de LXR surge como un efecto a largo plazo de la alimentación. La señalización hepática de LXR conlleva a la activación de la síntesis de TG y su transporte a tejidos periféricos, mientras que simultáneamente activa el transporte reverso de colesterol para proteger a los tejidos extra hepáticos frente a la toxicidad del exceso de colesterol dietético (262).

En humanos se ha demostrado que la expresión de LXR aumenta con la severidad de NAFLD (263). LXR tiene un efecto dual en la NAFLD. Mientras que su activación promueve el desarrollo de la obesidad y de la esteatosis, también suprime la inflamación y mejora la hipercolesterolemia (264).

A pesar de que LXR aumenta su expresión con la esteatosis, la expresión de algunos de sus genes diana solo aumenta discretamente, denotando la importancia de la presencia de sus ligandos naturales en cantidades suficientes para activar el receptor. Los ligandos endógenos para LXR son los oxisteroles, que suelen generarse enzimáticamente (265). LXR regula los genes de las siguientes proteínas a través de SREBP1c: la ATP-citrato liasa, la acetil CoA sintasa, la FAS, la ACC y la SCD-1 (266).

El efecto sobre el metabolismo reverso del colesterol la ejecuta a través del estímulo de los transportadores ABC (ATP binding cassette), ABCA1 (267) y ABCG1 (268), lo cual causa movilización del colesterol desde la membrana plasmática de las células que no sean hepatocitos, e induce la formación de APOA, APOE y HDL. Esta reducción en colesterol en la membrana reduce la formación de células espumosas en los macrófagos. Por ello, el desarrollo de agonistas de LXR dirigidos a macrófagos podrían suponer una potencial terapia frente a la aterosclerosis.

Recientemente se ha descubierto que LXR también es capaz de regular el metabolismo glucídico. Tras la ingesta de alimentos, LXR conduce a una disminución de la gluconeogénesis hepática (inhibiendo PEPCK), aumenta la secreción pancreática de insulina estimulada por la glucosa y aumenta los transportadores de glucosa del adipocito (269).

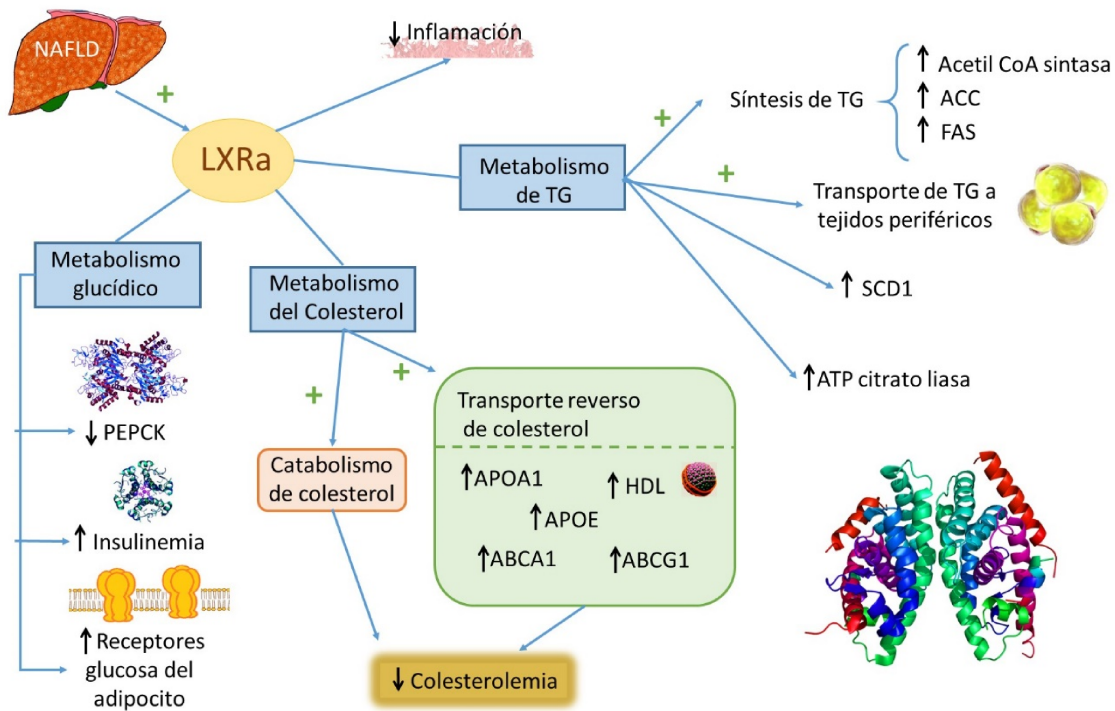


Figura 8. Receptor nuclear LXR durante la esteatosis hepática

III.2.4.7.2 PPARs

Los PPARs son una superfamilia de receptores nucleares que se clasifican en tres isotipos PPAR α , PPAR β/δ y PPAR γ . Los PPAR regulan la transcripción de genes relacionados con el metabolismo, la inflamación y la fibrogénesis (63). En general, la activación PPAR se considera benéfica para la esteatosis hepática, ya que promueve la β oxidación en el hígado y la eliminación de colesterol durante la movilización de lípidos. Esta activación está estrechamente relacionada con el eje intestino:hígado:tejido adiposo (257).

Durante una alimentación alta en grasas, se observa una disminución en PPAR α que lleva a esteatosis tan como se ha visto tanto en el hombre como en modelos murinos de esteatosis. Esta disminución viene acompañada por un aumento de PPAR δ y puede corregirse mediante dieta y ejercicio (270-272).

PPAR α estimula varios genes relacionados con el metabolismo oxidativo de lípidos, como CPT1A, PDK4, CYP4, y ACOX1. Esas acciones permiten a PPAR α funcionar como un regulador hepático principal de la toma de ácidos grasos, la β oxidación mitocondrial y peroxisomal, la cetogénesis, el reciclado de TG y síntesis de ácidos biliares. PPAR α coordina estos procesos con los tejidos periféricos vía FGF21 (273). Estudios de esteatosis dietética con modelos animales han mostrado que la activación de PPAR α mediante agentes terapéuticos mejora la esteatosis (274, 275).

PPAR β/δ se expresan, entre otros tejidos en hígado, y parecen disminuir la apoptosis al tiempo que disminuye la adiposidad. Tanto en primates como en ratones obesos se ha observado que la administración de un agonista de PPAR β/δ lleva a la normalización de los niveles de insulina y triglicéridos en sangre, aumento del cHDL y disminución del cLDL(276, 277). De esta manera, PPAR α y PPAR β/δ comparten efectos metabólicos, ambos estimulan todos los tipos de FAO y la cetogénesis a fin de disminuir la esteatosis hepática (278, 279).

PPAR γ , en el hígado, se expresa predominantemente en las células de Kupffer y en las de Ito. La activación del PPAR γ conlleva la disminución del aporte al hígado de SFAs lipotóxicos, gracias a esto logra polarizar las células de Kupffer de una forma proinflamatoria M1 a un fenotipo M2 menos activo (270), además revierte la transdiferenciación de las células de Ito a miofibroblastos

(280). Varios estudios en ratón apoyan la posibilidad que tanto PPAR β/δ y PPAR γ atenúen la severidad de la esteatosis en ratones (281-284).

PPAR γ tiene tres isoformas, y para todas ellas su función está regulada secundariamente mediante cofactores de transcripción específicos de tejido y de célula, como el PGC1 α (peroxisoma proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha), las STATs (signal transducers and activators of transcription) y el C/EBP (CCAAT-enhancer binding proteins) (285).

Finalmente, los PPAR suprimen la inflamación crónica debida a la obesidad a través de la actuación sobre NF- $\kappa\beta$ y el activador de proteínas 1(AP1) y coordinan el metabolismo vía transcripción de la adiponectina (mediante PPAR γ) y la hepatoquina FGF21 (mediante PPAR α y FXR) (286).

Hasta la fecha el uso de agonistas PPAR en humanos se han mostrado poco eficaces contra NAFLD (270, 287).

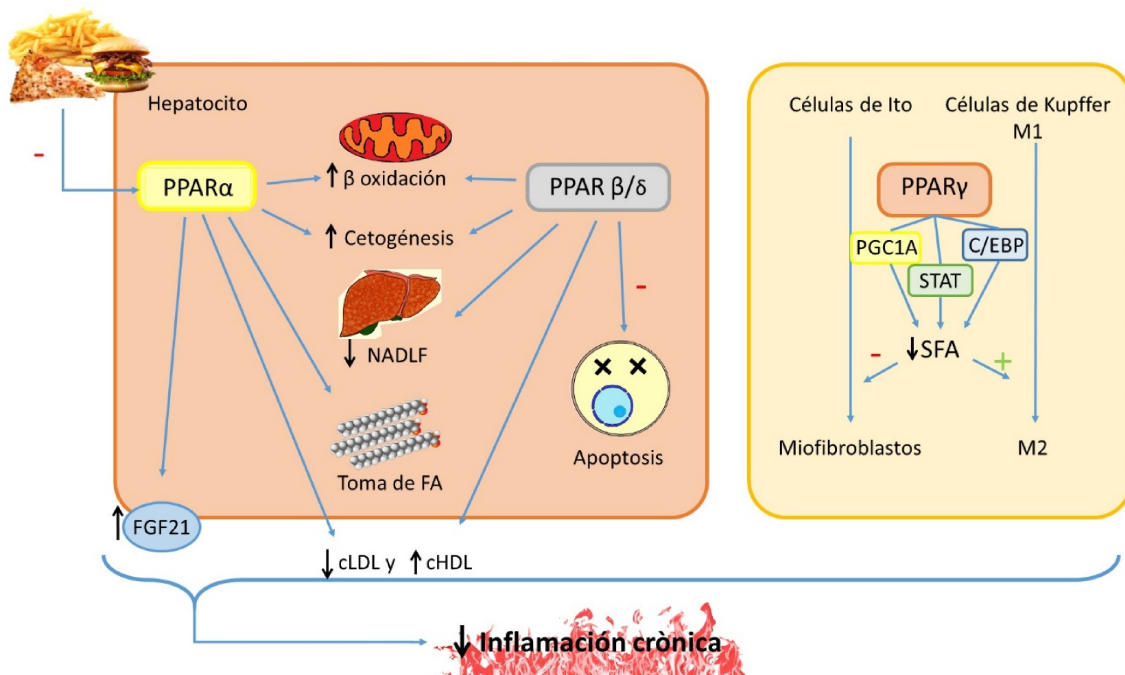


Figura 9. Receptores nucleares PPAR durante la esteatosis hepática

III.2.4.7.3 Pregnano X receptor (PXR/SXR)

La expresión de PXR se ha observado tanto en hepatocitos como en las células Kupffer y en las de Ito (288, 289). Varios de los polimorfismos de su gen se han visto asociados a la esteatosis hepática (290).

PXR ejerce su acción en un estado postprandial afecta a la expresión de transportadores de lípidos y xenobióticos para mantener las barreras selectivas y simultáneamente coordinar tanto el metabolismo de moléculas tóxicas como nutritivas (291-294). PXR regula (a parte de sus genes clásicos) SCD1, CD36 (295, 296) y SLC13A5 (mono- and di- carboxylate transporter solute carrier family 13 member 5), el cual, a su vez, el flujo de citrato (importante precursor de FA), isoprenoides y colesterol (297). PXR también regula SREBP1c y PPAR α , proporcionando una influencia directa e indirecta sobre las dianas PPAR (295).

Modelos *in vitro* (HepG2) han mostrado que tanto la sobreactivación de PXR como su silenciamiento pueden llevar a la esteatosis hepática (298). Los resultados en animales no aportan mayor certeza al respecto, el ratón KO ha mostrado tanto protección frente a la esteatosis (299) como ausencia de efecto (300), sin embargo ninguno de ellos muestra aumento de la inflamación hepática por la dieta alta en grasa (299, 300). Por otro lado, el ratón con el PXR humanizado alimentado con HFD presenta obesidad e intolerancia a la glucosa (300, 301). De manera global se considera que PXR es un antiinflamatorio y puede reducir la fibrogénesis hepática estando su activación asociada con un aumento de los ácidos grasos hepáticos, tanto de su toma como de la DNL y una disminución de la β -oxidación (292, 297, 300), obesidad, IR e hipercolesterolemia (286).

Modificaciones postranscripcionales de PXR, como la sumoilación y la ubiquitinación, pueden estar relacionadas con la represión de los PXR de la β -oxidación, inhibición de la gluconeogénesis y reducción de la inflamación (286).

III.2.4.7.4 Constitutive androstane receptor (CAR)

CAR es único entre los receptores nucleares recogidos en esta tesis porque a pesar de tener ligandos bien caracterizados (bilirrubina, ácidos biliares y androstano) es capaz de ser activo en ausencia de unión a ligando.

La actividad de CAR sigue el ritmo circadiano, teniendo un patrón de actividad diurno, así mismo también se estimula tras la ingesta. Parece ser que la actividad de CAR se regula mediante fosforilación/defosforilación, en parte por PKC, ERK y PP2A (302, 303).

CAR participa tanto en el metabolismo energético y como de xenobioticos (304) y es un punto intermediario entre ambos. Además, se están identificando nuevas funciones en el metabolismo de glúcidos y lípidos e incluso en la esteatosis hepática (305). En este último caso, CAR parece tener función protectora frente al estrés metabólico, disminuyendo la esteatosis hepática y la inflamación, la obesidad, la hipercolesterolemia y mejora la diabetes a través de la disminución de la gluconeogénesis y mejora de la sensibilidad a la insulina (306, 307).

La prevención de la gluconeogénesis, así como su impacto en la señalización del receptor de insulina, parece ser debida a una unión de CAR con FOXO1 resultando en la inhibición de este último, lo cual previene la expresión de la PEPCK1 y de la glucosa-6-fosfatasa (308).

En ratones se ha observado que la activación de CAR disminuye los TG y el colesterol plasmático (309) y mejora la esteatosis hepática mediante la disminución de la lipogénesis y la inducción de la β -oxidación (306). Otro de los efectos observados de CAR es la estimulación de INSIG1 (insulin-induced gene 1 protein), proteína antilipogénica (310).

III.2.4.7.5 Farnesoid X receptor (FXR)

FXR, conocido como regulador master de la síntesis de ácidos biliares, ha expandido su rol incluyendo la regulación del eje intestino:hígado en estado postprandial (257).

El rol de FXR en el metabolismo lipídico se conoce como hipótesis del “vector de la energía” (257). La activación de FXR crea un vector de la energía mediante inducción de la absorción de nutrientes en el intestino y la activación postprandial hepática del metabolismo energético. La activación de FXR mejora la esteatosis hepática, la inflamación y la fibrogénesis en NAFLD involucrando varios mecanismos como la integridad de la barrera intestinal, el metabolismo lipídico y glucídico hepático y la regulación del colesterol y de los ácidos biliares.

Al ser los ácidos biliares el principal ligando endógeno de FXR, este sirve como un sensor para regular su metabolismo al nivel del eje enterohepático. En el intestino FXR se activa postprandialmente al detectar los ácidos biliares en el

tubo digestivo para facilitar la absorción de lípidos (311). La activación intestinal de FXR induce la expresión de FGF19 (FGF15 en ratones), el cual se transporta vía portal al hígado donde se une al FGFR4 y β -klotho y suprime la síntesis de ácidos biliares inhibiendo la enzima limitante de esta ruta: CYP7A1 (312-314). En NAFLD la respuesta hepática a FGF19 está alterada contribuyendo al deterioro del metabolismo lipídico. En el hígado, la activación de FXR también afecta la homeostasis de los ácidos biliares, inhibiendo de nuevo CYP7A1 (311). Además regula la expresión de la hepatoquina FGF21, la cual al ser secretada induce en el tejido adiposo la captación de glucosa y en el hígado disminuye la síntesis de lípidos y aumenta la β -oxidación (315). Un estudio reciente también demuestra que FGF21 ejerce sus efectos beneficiosos en el hígado a través de la estimulación de la adiponectina (316).

Además del rol central en el metabolismo de ácidos biliares, la activación de FXR regula la expresión de varias rutas cruciales en el desarrollo de la esteatosis hepática. Muestra de ello es que su ausencia resulta en esteatosis hepática, hiperglucemia, hiperlipidemia y desregulación de ácidos biliares (151, 317-319). Dentro del metabolismo de los ácidos grasos hepático FXR conduce a una disminución de su síntesis, al aumento de la β oxidación, y a la disminución de la internalización. Parte de estos efectos los haría mediante inhibición de SREBP-1c y la disminución de CD36 (151, 320). En el metabolismo del colesterol parece aumentar la hipercolesterolemia, aumentando las LDLs y disminuyendo las HDLs (54). A pesar de que la activación de FXR inhiba la absorción de colesterol en el tubo digestivo y su conversión a ácidos biliares, también inhibe la síntesis y la excreción de colesterol. En contraste los antagonistas de LXR tiene un efecto benéfico contra la hipercolesterolemia (321-323).

Respecto al metabolismo glucídico, existen resultados discrepantes. Por un lado se ha observado que la activación de FXR mejora la sensibilidad a la insulina en humanos (324). Y por otro que la activación de FXR exacerba la ganancia de peso y la intolerancia a la glucosa (325, 326). Esta discrepancia de resultados podría ser explicada por las diferencias entre la activación de FXR en estados de ayunos o alimentación. Tampoco hay consenso en sus efectos dentro del hepatocito, mientras unos han observado en hepatocitos primarios de rata y

ratón que FXR aumenta la expresión de PEPCK y la producción de glucosa (214), otros estudios han observado lo contrario en HepG2 (327).

Todos estos receptores nucleares presentan intercomunicaciones cruzadas entre sus señalizaciones para controlar el metabolismo postprandial y el metabolismo en ayunas, reconociendo que las funciones del receptor y la intercomunicación cruzada puede variar con el estado nutricional. Ejemplo de ello es que CAR activa directamente los genes diana clásicos de PPAR α (328) o que los genes diana de LXR están reprimidos por CAR, y los genes diana de CAR están reprimidos por LXR (329).

Mientras que la esteatosis parece aumentar por la activación de LXR y PXR, y disminuir por la acción de PPAR, FXR y CAR, la inflamación hepática disminuye por efecto de cualquier de esos receptores nucleares. Pudiendo ser un mecanismo protector para atenuar la activación de TLR4 mediante los ácidos grasos derivados de la dieta o del tejido adiposo imitando los LPS (286).

Estos receptores nucleares, a pesar de ser importantes en el desarrollo de la esteatosis hepática, no son los únicos protagonistas en su patogénesis. Recientemente se han propuesto otros receptores nucleares que también podrían jugar un rol, como Rev-Erbs (NR1D1-D2) y los receptores relacionados con el receptor del ácido retinoico (ROR, NR1F1-3) (330).

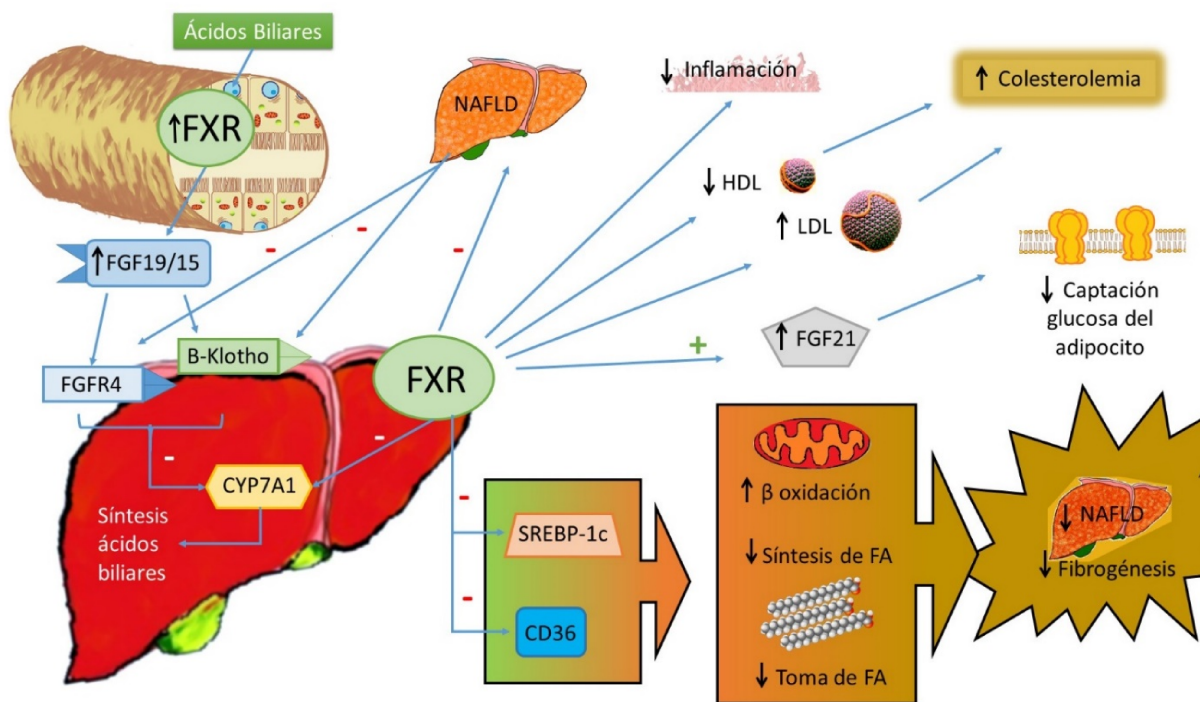


Figura 10. Receptor nuclear FXR durante la esteatosis hepática

III.2.5 Metabolismo de la gota lipídica en el hígado

Las gotas lipídicas (LD) se han considerado durante años como depósitos de grasa inertes. Sin embargo, durante los últimos años se han destacado múltiples funciones, desde el clásico almacenamiento de la energía y protección frente a la lipotoxicidad, a la regulación del estrés oxidativo y del correcto funcionamiento del RE y de las mitocondrias, también parecen asociadas a mecanismos de inflamación, autofagia y muerte celular (331). Las LDs presentan una estructura única entre los orgánulos ya que contienen un núcleo central de lípidos neutros y una monocapa fosfolipídica con varias proteínas periféricas e integradas asociadas (332, 333). La composición proteínica y sus funciones varían en función de tejidos (332, 334). Las gotas lipídicas son unos orgánulos altamente dinámicos que se adaptan a las necesidades de las células y del organismo, alternando periodos de crecimiento y de consumo. Esta adaptación la realiza a través de la hidrólisis enzimática mediante lipasas (lipólisis) o a través de una forma selectiva de autofagia llamada lipofagia para aportar tanto energía como fosfolípidos para la síntesis de membranas (335, 336).

III.2.5.1 Biogénesis de la gota lipídica

El primer paso del ensamblaje de la LD sucede en el RE. Esta se inicia con la síntesis de lípidos neutros, principalmente triglicéridos y ésteres de esteroides. Diferentes enzimas están involucradas en cada caso, todas localizadas principalmente en el RE. Los ésteres de esteroides se forman a través de la acil CoA: colesterol O-aciltransferasa (ACAT1 y ACAT2), mientras que los triglicéridos son el producto de la diacilglicerol aciltransferasa (DGAT1 y DGAT2). En concentraciones bajas, los lípidos neutros se disponen entre las dos capas de la membrana del RE. Cuando su concentración aumenta, los lípidos neutros se unen por coalescencia formando lentes grasas en la membrana del RE. Ninguna proteína provoca este acumulo que es debido únicamente a la necesidad de los lípidos neutros de reducir su interacción con otros componentes de la membrana como fosfolípidos o proteínas más polares (337). Si la formación al azar de lentes a partir de lípidos neutros a lo largo del RE o si hay sitios preferentes para la formación de lentes de grasa está aún por determinar (338).

III.2.5.2 Gemación de gotas lipídicas

La expansión de las lentes de lípidos neutros conduce a brotes de gotas lipídicas en la membrana del RE. El brote de gotas lipídicas en el RE sigue un proceso diferente al de vesículas secretorias desde el RE (339). En el caso de las gotas lipídicas hay dos factores claves relacionados entre sí, la tensión de la superficie de membrana y el coste energético de exponer lípidos neutros al ambiente acuoso celular (337, 340). La tensión de superficie de la membrana dependerá de la composición fosfolipídica (341, 342), las moléculas con forma cónica, como el diacilglicerol o la fosfatidiletanolamina desfavorecen la formación de brotes, mientras que las moléculas con la forma geométrica opuesta como los lisofosfolípidos promueven la formación de brotes (340, 343). Así pues, la adquisición de la forma redondeada de las gotas lipídicas dependerá de los fosfolípidos de la membrana.

Durante los periodos de producción intensa de gotas lipídicas es posible que las fosfolípido translocasas, las cuales mantiene un balance fosfolípido entre las dos capas de la membrana del RE, estén saturadas y requieran la colaboración de los lípidos neutros. Los lípidos neutros, como el monoacilglicerol y el diacilglicerol, son capaces de cambiar rápidamente de un lado de la membrana a otro en función de la necesidad de la membrana, pudiendo convertirse en fosfolípidos para rellenar la monocapa citosólica del RE, la cual es la mayor fuente de fosfolípidos durante la formación de gotas lipídicas (338).

Además de las fosfolípido translocasas, las perilipinas también pueden estar facilitando la biogénesis de gotas lipídicas. Al acceder desde el lado citosólico, las perilipinas pueden facilitar el brote de LD cambiando el equilibrio de la tensión entre las dos monocapas de la membrana (344). La familia de proteínas transmembrana FIT (Fat storage-inducing transmembrane) (FIT1 y FIT2) y la seipina, una proteína de membrana del RE altamente conservada, también participan en este proceso. Esta última se encuentra enriquecida en las zonas de contacto entre LD y RE estabilizando los puentes de membrana que proporcionan continuidad entre los dos orgánulos (345-349).

III.2.5.3 Crecimiento y maduración de la gota lipídica

Después de brotar, las LD se expanden a través de la fusión de las gotas lipídicas con puentes de membrana con el RE que permiten la transferencia de triacilglicéridos a las LD. Otra opción para el crecimiento de las LDs sería la síntesis de triacilglicérol directamente en la superficie de la LD, la cual se debe a la relocalización de varias enzimas desde el RE a la superficie de la LD (350). Los fosfolípidos, sin embargo, proceden únicamente de la cara citoplasmática de la membrana del RE.

Cuando ya hay un número elevado de brotes de LD cercanos entre ellos, solo algunas de ellas se despegan del RE. Como se produce esta fisión todavía no está resuelto. Lo que sí que se conoce es que es un proceso reversible mediante la actuación del complejo coaptómero COPI (350-352). Este complejo es reclutado en la superficie de las LD mediante la GTPasa pequeña ARF1 que promueve la división de las LD grandes en LD de aproximadamente 60 nm de diámetro. Este alto ratio superficie-volumen de esas nanopartículas depleciona los fosfolípidos de la gota original. Resultando en una cobertura pobre y en un aumento de la tensión de superficie, lo que facilita la fusión de gotas lipídicas con la membrana de RE. Después de la fusión, proteínas integrantes de la membrana como DGAT2 y GPAT4 son capaces de difundir desde el RE a las gotas lipídicas, indicando que esos puentes de membrana entre los dos orgánulos se han restablecido.

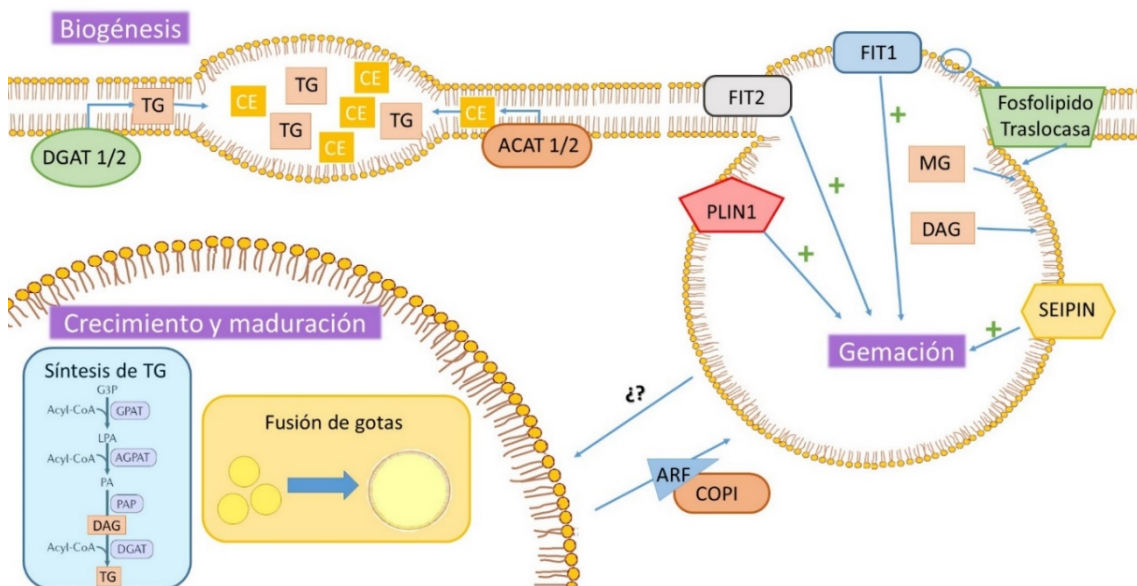


Figura 11. Biogénesis de las gotas lipídicas

III.2.5.4 Proteínas de las gotas lipídicas

El proteoma de las LD está dominado por enzimas relacionadas con el metabolismo lipídico e incluye además otras proteínas con funciones como la señalización de membrana y la degradación de proteínas. En contraste con las proteínas localizadas en otros orgánulos celulares, las proteínas de la LD carecen de señalización específica en su secuencia.

Las proteínas de la LD se clasifican en dos clases. Las que están establemente asociadas con membranas y que se reparten entre las LD y el RE que forman la clase I. Y aquellas proteínas reclutadas desde el citosol a la superficie de la LD que constituirían la clase II (338).

III.2.5.4.1 Proteínas de clase I

Proteínas con diversas funciones pueden encontrarse entre las de clase 1, desde enzimas relacionadas con biosíntesis de lípidos como ACSL3 (long-chain-fatty-acid-CoA ligase 3), GPAT4 y DGAT1/2 a proteínas relacionadas con la proteólisis dependiente de ubiquinina como AUP1 (Ancient ubiquitous protein 1) y UBXD8 (UBX domain-containing protein 8). Las proteínas de clase 1 suelen asociarse con las membranas a través de horquillas hidrofóbicas, las cuales se insertan entre las bicapa fosfolipídica quedando tanto su extremo amino como carboxilo terminal cara al citosol (353). La inserción de proteínas de clase 1 ocurre en el RE, desde aquí difunden a través de puentes de membrana a la superficie de la gota lipídica (350). Un ejemplo bien detallado es la inserción de UBXD8 (354). Esta es capturada en el citosol por el factor de biogénesis peroxisomal 19 (PEX19). Después UBXD8 se transporta a los dominios del RE específicamente ricos en PEX3 para la inserción a través de membrana. Este caso ilustra como los mecanismos de retención del RE ofrecen un importante método de regulación en el direccionamiento de las proteínas de clase 1 a la superficie de la LD.

Un mecanismo alternativo para enriquecer proteínas de clase 1 en la superficie de la LD, sería la degradación selectiva del pool del RE, esto involucraría componentes clave como la ERAD (RE-associated protein degradation) (355, 356). Es posible que las proteínas de clase 1 encuentren en

la monocapa de la LD un ambiente más estable que evita su degradación mientras que si están en la bicapa del RE, presenten una conformación inestable, lo que les lleva al reconocimiento por ERAD. Una vez seleccionadas por el ERAD, estas proteínas serían ubiquitinadas, extraídas de la membrana y llevadas al proteasoma del citosol para su degradación.

III.2.5.4.2 Proteínas de clase II

Varios modelos de asociación a la LD se han descrito para estas proteínas, como la unión a otra proteína de la gota lipídica o la interacción con la monocapa lipídica a través de un lípido de anclaje. Siendo la unión a través de α -hélices anfipáticas la más común (357-359).

Parece ser que la monocapa fosfolipídica de las LD es dada a mostrar defectos de empaquetamiento, especialmente bajo altas tensiones de superficie. Gracias a estos defectos, pueden ser fácilmente modificadas mediante interdigitaciones de lípidos neutros (357, 360) que dan pie a sitios de unión para hélices anfipáticas que contengan aminoácidos hidrofóbicos grandes (357), como los que tiene las proteínas de clase 2. La unión de las perilipinas es a través de oligómeros de 11 residuos de aminoácidos repetidos que se muestran desordenados en el citosol pero plegados en una hélice anfipática en la superficie de la gota lipídica (361).

III.2.5.5 Contacto de las gotas lipídicas con las membranas celulares

Además de su interacción con el RE a través de los puentes de membrana durante la biogénesis de las LD, éstas son capaces de interactuar con la mayoría de orgánulos a lo largo de su etapa madura. Los sitios de contacto de las LD, la identidad de los complejos de agrupamiento, sus mecanismos de regulación y sus funciones continúan desconocidos.

III.2.5.5.1 Contacto de LD con RE

Trabajos recientes sugieren que aproximadamente el 85% de las LD continúan en contacto con el RE, sin que haya necesariamente continuidad de membrana (362). Las LD pueden haber brotado completamente del RE pero continúan unidas al RE siendo esta unión independiente de la seipina (345) y

pudiendo deberse a proteínas adicionales, como la DGAT2 junto con el FATP1, RAB18, ICE2 (Inheritance of cortical RE protein 2) y los complejos NAG-RINT1-ZW10 (NRZ) y SNARE (Suntaxin 18, USE1 y BNIP1) (363, 364).

III.2.5.5.2 Contacto de las LD con la envoltura nuclear

En el interior del núcleo de los hepatocitos se han observado gotas lipídicas cuya monocapa es continua con la cara interna de la membrana nuclear siendo la seipina necesaria clave para esta continuidad (365, 366). Las LD nucleares pueden proporcionar lípidos para la membrana nuclear en caso de expansión, y pueden funcionar como plataformas para la regulación de la expresión de genes al poder contener factores de transcripción. De acuerdo a esto se ha observado PLIN5 en el núcleo celular funcionando como parte de un complejo de regulación transcripcional que controla los programas de genes mitocondriales (367).

III.2.5.5.3 Contacto entre LD y lisosomas

El reclutamiento de lisosomas a las gotas lipídicas esta mediado por RAB7 (368), una GTPasa implicada en la lipofagia. Este reclutamiento puede dar lugar a interacciones entre lisosomas y LD (362, 368, 369) en respuesta a una disminución de los nutrientes y contribuir a la degradación de las perilipinas PLIN2 y 3 en un proceso de autofagia mediada por chaperonas (CMA) (369). En esta situación, las proteínas que contienen un motivo en forma de pentapéptido son reconocidas por HSC70 (heat shock protein 70) facilitando su fosforilación mediante la AMPK y llevadas a la superficie del lisosoma. Una vez aquí son translocadas al interior por la acción del receptor LAMP2A (lysosome-associated membrana protein 2) (370). Se ha observado que la carencia del gen que codifica esta última proteína conlleva a esteatosis hepática (369, 371). PLIN2 también puede ser degradada por el proteasoma (372-375), en particular en células con pocas LD. La contribución relativa de CMA y el proteasoma en la degradación de PLIN2 puede depender de la abundancia de LD.

III.2.5.5.4 Contacto entre LD y mitocondrias

Durante la privación de nutrientes, se liberan ácidos grasos de las LD que utilizados por las mitocondrias para la producción de energía mediante β -oxidación y el ciclo del ácido cítrico. Esta liberación está controlada por la interacción de ATGL (adipose triglyceride lipase) con sus reguladores y su transferencia a la mitocondria sucede en los sitios de contacto a fin de reducir la lipotoxicidad de los NEFA en el citosol y/o la señalización de lípidos aberrante (376, 377). Estos sitios de contactos entre LD y mitocondria también podrían servir como sitio para lipogénesis.

La regulación de la lipólisis viene dada principalmente por las perilipinas, que forman una barrera que previene el acceso de ATGL al TG de las LDs (378). PLIN1 es capaz de secuestrar el activador de ATGL ABHD5 ((1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase), junto con pequeñas cantidades de HSL (hormone sensitive lipase) en la superficie de las LD, reduciendo la lipólisis. La estimulación de hormonas induce la activación de PKA lo cual lleva a la hiperfosforilación de PLIN1. Esto resulta en la liberación de ABHD5 de PLIN1 y la subsiguiente interacción con ATGL, aumentando su actividad catalítica. Además, PKA también fosforila HSL, lo cual la trasloca a la superficie de la LD donde hidroliza el DAG (379, 380). PLIN5 también parece regular la lipólisis ya que por un lado, induce un reclutamiento de mitocondrias a la periferia de las LD (381, 382) y por otro lado interacciona directamente con ATGL y ABHD5 (383). ABHD5, además de activar ATGL, podría estar activando lipasas adicionales aún no identificadas a parte de la ATGL en el hígado (384), habiendo un mayor riesgo de esteatosis hepática cuando ABDH5 está defectuosa.

Otros inhibidores conocidos de ATGL son la proteína G0S2 (385), la HIG2 (hipoxia-inducible gene 2) (386), PEDF (pigment epithelium-derived factor) (387), y CIDEA (Cell death-inducing DNA Fragmentation Factor Alpha (DFFA)-like effector C) (378).

III.2.5.5.5 Contacto entre LD y peroxisomas

Al igual que las mitocondrias, los peroxisomas también tienen funciones centrales en el metabolismo de los lípidos y la energía. Investigaciones recientes indican que para la unión de sitios de contacto entre membranas entre los

peroxisomas y los LD hay pasos comunes durante la biogénesis. Sin embargo, toda esta información proviene de las levaduras, quedando por demostrar si también ocurre en células animales (338).

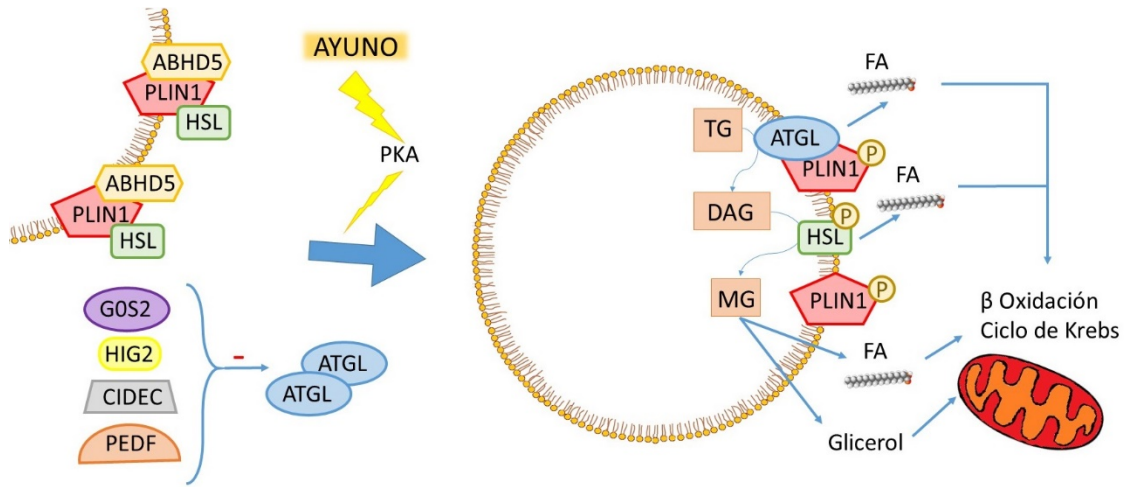


Figura 12. Interacción entre gotas lipídicas y mitocondrias

III.2.5.5.6 Contacto de LD-LD

El contacto entre LDs suele preceder a la fusión de LD, la cual facilita el almacenaje eficiente de triacilglicéridos, reduciendo el área de superficie expuesta en las LD a las lipasas citosólicas para la lipólisis. Cuando las gotas se fusionan, todos los lípidos neutros son transferidos invariablemente desde la gota más pequeña a la más grande en un proceso debido teóricamente a las diferencias de presión interna y presión de superficie (388), el hecho de que las proteínas y los fosfolípidos remanentes no sean transferidos es desconocido.

Este crecimiento a través de la fusión de LD, está mediado por la familia de proteínas CIDE (cell death-inducing DNA fragmentation factor alpha (DFFA)-like effector) CIDEA, CIDEB y CIDEA, también conocido como FSP27 (fat-specific protein 27), primera en ser descubierta, y denominada así por poseer una masa molecular de 27 kDa en adipocitos, en cambio es de 50 kDa en hepatocitos (389-391).

Estas proteínas por su homología con factores de la fragmentación de DNA (CIDEA 39%, CIDEB 29% y FSP27 38%) fueron identificadas en un principio como proteínas apoptóticas. De hecho son capaces de interactúan con DFF45 a través de su dominio conservado (392, 393). En cualquier caso, para

que las proteínas funcionen como apoptóticas tendrían que estar en la mitocondria. Las proteínas CIDE se encuentran asociadas a la gota lipídica donde cumplen un rol crucial en la fusión y crecimiento de gotas lipídicas (394-396).

Esta unión a la LD es a través de una hélice anfipática en su extremo carboxilo terminal y forman dímeros que difunden a lo largo de la superficie de la LD hasta encontrar otra LD que contenga proteínas CIDE, lo cual proporciona la oportunidad para las proteínas CIDE para formar oligómeros estables trans orgánulos (388, 397). Esta conformación precede a la fusión de las LD, sin embargo, la estequiometría, tamaño y estructura del poro putativo de CIDE aún no se ha determinado.

En el hígado, en condiciones normales la proteína que se encarga de promocionar el almacenaje de lípidos es CIDEB, sin embargo, bajo dietas altas en grasas CIDEA y FSP27 aumentan y toman el control del tamaño de las gotas lipídicas (398). FSP27 promueve el crecimiento y la fusión de LD vía agrupamiento y transferencia de lípidos (388, 397). La expresión de FSP27 en hígado se debe a una variante transcripcional hepática: FSP27b, la cual está regulada por CREBH (cyclic AMP-responsive-element-binding protein H) (399). Esta isoforma hepática, comparada con la isoforma del adipocito (FSP27a), regulada por PPAR γ (400), contiene 10 aminoácidos adicionales en el extremo N-terminal y está relacionada con el desarrollo de esteatosis hepática. Durante la fusión de gotas PLIN1 interactúa el dominio CIDEA de FSP27, pero no lo hace con CIDEA ni CIDEB. La unión de PLIN1 posiblemente influya en la oligomerización de CIDEA y por ello aumenta el intercambio de lípidos y la fusión de LD (401, 402). Otros reguladores de la dinámica de la gota lipídica son las GTPasas RAB (332, 403). RAB8a unida a GDP se concentra en los sitios de contacto entre LD y se une directamente a CIDEA activando la fusión de LD mediante CIDEA (404). Esta actividad de RAB8a está positivamente regulada por la AS160, un tipo de GAP (GTPase-activating protein) y negativamente por GEF MESS4 (363). Otros mecanismos de regulación sobre CIDEA implican la regulación postranscripcional a través de la glicosilación (405) y la acetilación. Esta segunda promovida por p300/CREB-binding protein (p300/CBP) y revertida por una desacetilasa de histonas sensible a ácidos grasos (406). La acetilación

podría aumentar la fusión de LD mediada por CIDEC, a través de la estabilidad de CIDEC y/o a la señalización (406).

Aunque la depleción de CIDEC resulta en numerosas LD de pequeño tamaño y una sobreexpresión de estas proteínas aumenta el número de gotas grandes (388, 397), CIDEC no es indispensable para la unión de LD, complejos de agrupamiento, como los homodímeros dependientes de ubiquitina AUP1, también podrían dar lugar a la fusión de las LD (407, 408).

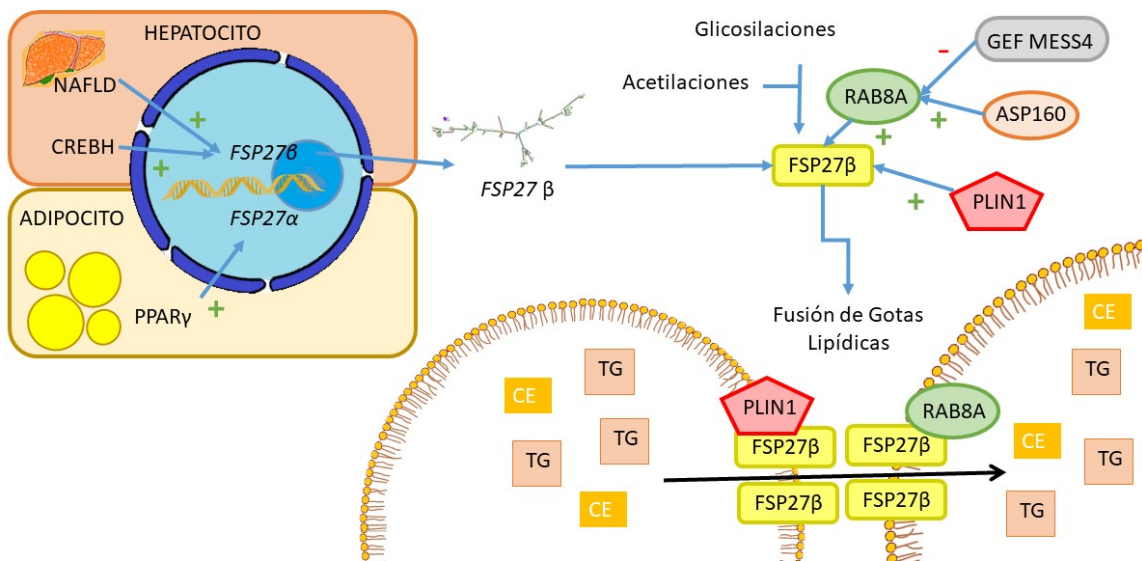


Figura 13. Cascada de activación y efectos de Cidec.

III.3 Aceite de Oliva

La esteatosis hepática ha surgido como consecuencia de una discordancia entre la rápida evolución de nuestra dieta y la capacidad de adaptación de nuestro genoma. Esta evolución de la dieta se ha dirigido a una mayor presencia de la grasa, hasta un 33%, a expensas de una reducción del contenido de fibra (409). Frente a esta inadaptación de nuestro genoma a la dieta occidental, la adherencia a la dieta mediterránea se propone como una opción dietética mejor adaptada a nuestra carga genética (410). La dieta mediterránea tiene una compleja composición de nutrientes. Entre estos, el aceite de oliva virgen, principal fuente de grasa en la dieta mediterránea, ha emergido como el principal responsable de esas propiedades beneficiosas.

Componente	Contenido (g%)
Ácidos grasos	
Mirístico (14:0)	0,0 - 0,05
Palmítico (16:0)	7,5 - 20
Palmitoleico (16:1n7)	0,3 - 3,5
Margárico (17:0)	0 - 0,3
Heptadecenoico (17:1)	0,0 - 0,3
Estearico (18:0)	0,5 - 5,0
Oleico (18:1n9)	55 - 83
Linoleico (18:2n6)	3,5 - 21
α-linolénico (18:3n3)	0,0 - 0,9
Araquidónico (20:0)	0,0 - 0,6
Eicosanoico (20:1n9)	0,0 - 0,4
Behénico (22:0)	0,0 - 0,2
Lignocérico (24:0)	0,0 - 0,2
Componentes minoritarios	
Escualeno	0,1 - 0,8
Carotenos	0,05 - 0,1
Oleanólico	0,0008 - 0,01
Maslínico	0,0004 - 0,005
Eritrodiol	0,0006 - 0,008
Uvaol	0,0001 - 0,002
Fitosteroles	0,1 - 0,2
Compuestos fenólicos	0,05 - 0,2

Tabla 2. Composición aceite de oliva virgen extra. Adaptado de (411)

El aceite de oliva virgen es el zumo del fruto de la *Olea europea* obtenido por procedimientos físicos y no requiere extracción química a diferencia de otros aceites. Este supone una importante fuente de grasas insaturadas ya que su fracción saponificable (98,5-99,5% del total) contiene hasta un 80% de ácido oleico, y únicamente un 8-25% de grasas saturadas (412, 413). Por el otro lado, su fracción no saponificable alberga una gran variedad de compuestos menores que también muestra propiedades antioxidantes y antiinflamatorias (411).

III.4 Escualeno

Dentro de los compuestos menores del aceite de oliva destacan los hidrocarburos, y entre estos, el escualeno (2,5-9,2 gr escualeno/kg aceite).

El escualeno (2,6,10,15,19,23-hexametiltetracosano-2,6,10,14,18,22-hexano) (C₃₀H₅₀), con 6 dobles enlaces, es un lípido neutro con una estructura isoprenoide, perteneciente a la familia de los terpenos y es un conocido intermediario de la biosíntesis de fitosteroles en plantas y de colesterol en animales (413).

Este ha mostrado ser un antioxidante con interés transversal a varias áreas de la biomedicina desde cáncer (414) o sistema inmune (415, 416) hasta las enfermedades cardiovasculares (411, 417). En estrecha relación con esta última, el escualeno también parece mostrar propiedades hepatoprotectoras durante la esteatosis hepática. En cultivo de hepatocitos se ha observado que el escualeno es hipolipodémico ya que mediante activación de PPAR α estimula los genes relacionados con la FAO, la cetogénesis y el transporte reverso del colesterol, mientras que aquellos relacionados con la DNL están disminuidos (418).

En ratones ApoE KO se ha observado que la administración de 1 g escualeno/kg de pienso en una dieta estatósica logra disminuir el contenido hepático de colesterol y triglicéridos, pero no el de la superficie ocupada por gotas lipídicas (419). Cabe recordar que actualmente la gota lipídica está considerada como un mecanismo de defensa frente a la lipotoxicidad de los NEFA y no tanto como un mecanismo patológico (43). En este mismo modelo, al disminuir la dosis a 0,5 g/kg, no se reprodujeron los resultados (7) indicando un efecto dosis dependiente.

La dosis efectiva del escualeno también pueden variar en función del ratio metabólico de la especie (420) y del tipo de dieta que estén consumiendo (7). En los modelos en los que la administración de escualeno no provocó una disminución de la gota, se ha observado que el escualeno se puede estar acumulando en las gotas lipídicas pudiendo desplazar o neutralizar a especies más lipotóxicas (7). La acción del escualeno en el hígado de los animales apunta a una compleja regulación de la expresión genes asociados a proteínas mitocondriales y microsomales tanto postranscripcionales, como postraduccionales (421) en la que se verían involucrados los genes de *Lipin1*, *Txndc5* y *Thr1* (6, 422).

De acuerdo a esos datos la dosis efectiva en humanos sería de 10 veces la que actualmente se consume en una dieta mediterránea acompañada de aceite de oliva virgen extra con alto contenido de escualeno. En cualquier caso, esta afirmación aún requiere de apoyo experimental quedando mucho por

conocer en los efectos del escualeno en la patogénesis de la esteatosis hepática, y las proteínas y genes que median dichos efectos.

III.5 Ómicas

Para poder dar una respuesta que recoja el comportamiento de todas las biomoléculas de una misma familia a un tratamiento en un solo análisis han surgido las Ómicas: genómica, epigenómica, transcriptómica, proteómica, metabolómica,... Estas nuevas tecnologías han revolucionado la bioquímica y suponen un nuevo sistema de estudio a los procesos biológicos.

III.5.1 Genómica

A finales de los años 90 surgió la genómica, siendo la primera ómica en nacer. La genómica se centra en el estudio de la sucesión de nucleótidos en el genoma. Fruto de este trabajo surgieron los GWAS (Genome wide association studies), que utilizan las secuenciaciones genómicas masivas de individuos de distintas poblaciones para tratar de entender que polimorfismos pueden estar asociados a la predisposición/resistencia a una enfermedad y/o respuesta a tratamiento. Esta información facilitaría poder pronosticar la evolución de un paciente a una enfermedad o a un tratamiento al conocer el componente genético de la respuesta del paciente. Gracias a esta técnica polimorfismos en los genes *APOC3*, *PNPLA3*, *NCAN*, *TM6F2* y *PPP1R3B* se han asociado a NAFLD (423, 424). A pesar de que los resultados de los GWAS pueden ser de gran utilidad con propósitos predictivos, no implican directamente un gen particular o una ruta, únicamente sugieren una diana terapéutica (425).

Un buen ejemplo de esta situación es el gen *FTO*. A través de estudios basados en GWAS se observaron variantes alélicas de este gen asociadas a la predisposición a obesidad (426, 427). Sin embargo, ni el silenciamiento ni la sobreexpresión de dicho gen replicaba los resultados (428, 429). Finalmente, en un trabajo vieron que un intrón de dicho gen formaba parte del marco regulatorio de la expresión de otro gen situado a más de 40 Kb de distancia, *IRX3*, el cual sí que está directamente con la obesidad. Estos mismos autores proponen que a

lo largo del genoma hay más de 150 bloques de regulación genómica de este tipo (430).

III.5.2 Epigenómica

La expresión de los genes puede regularse mediante la epigenética, la cual consiste en modificaciones reversibles del DNA o de proteínas asociadas al DNA que logran silenciar la expresión del DNA como la metilación del DNA o la acetilación de histonas. Las modificaciones covalentes del DNA y de las histonas son uno de los mayores reguladores de la transcripción de los genes (431). Las firmas epigenéticas, entre otras funciones, suelen ser responsables de la especialización de los tejidos (432) y pueden estar influenciadas por factores genéticos y ambientales, e incluso a veces son heredables (433). La identificación de estas firmas epigenéticas a lo largo del genoma como consecuencia de un tratamiento es el foco de estudio de la epigenómica.

La epigenómica se ha utilizado para estudiar la evolución de la esteatosis hepática, y parece ser que el estado de metilación del DNA está relacionado con la progresión de la fibrosis (434, 435).

III.5.3 Transcriptómica

La transcriptómica centra su interés en el producto de la expresión de los genes bajo la influencia de un determinado tratamiento. Esta ómica permite estudiar los niveles de RNA tanto cualitativamente (que transcritos están presentes, identificación nuevos sitios de splicing alternativo o de sitios de edición del RNA) y cuantitativamente (cuanto se expresa de cada transcrito).

Tanto la genómica como la transcriptómica se basaron en un principio en la habilidad del DNA de unirse a su hebra complementaria, mediante el uso de microchips cargados de secuencias conocidas y caracterizadas. Sin embargo, el abaratamiento de los métodos de secuenciación (NGS “new generation sequencing”) permiten estudiar los ácidos nucleicos sin necesidad de hibridación, pudiendo encontrar nuevas dianas terapéuticas e incluso estudiar los RNAs no codificantes con capacidades regulatorias. Esto abre un nuevo campo al estudio de la acción de los nutrientes.

Diversos trabajos se han realizado utilizando la transcriptómica para describir tanto la progresión del hígado graso no alcohólico como para conocer los efectos de los componentes de la dieta mediterránea en el hígado.

Respecto a la descripción del NAFLD, un trabajo publicado por Cazanave et al en 2017, recogía los efectos en el transcriptoma de ratones de la esteatosis temprana, de la esteatohepatitis y de la fibrosis avanzada. A través de este trabajo observaron que los genes estimulados en la esteatosis temprana estaban asociados tanto con la activación de la lipogénesis como de la oxidación de lípidos mediada por PPAR α . También se observaron varios genes dianas de PXR activados, indicando desregulación del eje LXR-FXR, y activación de rutas asociadas con el estrés oxidativo, como a la actividad proteasomal, la disfunción mitocondrial, la autofagia, la apoptosis, al estrés del RE y el mecanismo UPR. Mientras que en la esteatohepatitis estas rutas seguían en activo, su activación era menor que con la esteatosis simple, siendo las rutas relacionadas con la inflamación y su señalización las verdaderamente características de la esteatohepatitis (436). Otro trabajo, realizado en ratas con esteatosis hepática, observó que las rutas asociadas a la degradación de ácidos grasos, a la síntesis de ácidos biliares, a la angiogénesis, y a la adherencia celular estaban estimuladas como respuesta a la dieta alta en grasa. Además también observaron un aumento de la ruta de la degradación de aminoácidos ramificados en hepatocitos de las ratas esteatóticas, pudiendo este hecho estar relacionado con una inhibición a las capacidades regenerativas de los hepatocitos (437).

Respecto a los componentes de la dieta mediterránea. En ratas se ha observado que el tipo de grasa, mantequilla frente a una combinación isocalórica de aceite de oliva o aceite de pescado combinado con mantequilla producía cambios en la expresión hepática de más de 250 genes. Algunos de ellos relacionados con la lipólisis o la lipogénesis (438). Experimentos similares se han realizado en cerdo (439) y en ratones, donde se ha encontrado asociación de *Fsp27* con la esteatosis hepática (391, 440).

Los compuestos minoritarios del aceite de oliva también han sido objeto de estudio a través de la transcriptómica. Dos estudios se realizaron para investigar si los triterpenos, ácido maslínico y ácido oleanólico tenían efecto en

el transcriptoma hepático de ratones Apoe KO. Como respuesta a la administración de maslínico, se observó aumento de la expresión de *Cyp2b9*, *Cyp2b13* y *Dbp* mientras *Marco* disminuyó su expresión (441). El oleanólico por su parte provocó aumento de la expresión de genes relacionados con el ritmo circadiano (*Clock* y *Bmal1*) al tiempo que de *Elovl3*, *Tubb2a* y *Cldn1* mientras disminuyó la expresión de *Amy2a5*, *Usp2*, *Per3* y *Thrsp* (442).

III.5.4 Proteómica

La proteómica pretende identificar y estudiar las modificaciones, abundancia e interacciones de proteínas. A diferencia de las ómicas de ácidos nucleicos, la proteómica se basa en la espectrometría de masas (MS). La MS en la última década ha aumentado dramáticamente su sensibilidad al mismo tiempo que ha disminuido la cantidad de muestra necesaria tanto para análisis dirigidos como para análisis masivos.

La proteómica se divide en cinco pasos principales: La extracción proteica, la digestión enzimática de las proteínas para convertirlas en péptidos, la separación/ fraccionamiento mediante cromatografía líquida o gaseosa, seguida de MS. Posteriormente se identifican los péptidos y proteínas y se cuantifican mediante los análisis bioinformáticos pertinentes. Los cromatogramas que se obtiene tras la lectura se comparan posteriormente con bases de datos (443).

Mediante proteómica se han realizado diversos experimentos para tratar de caracterizar la esteatosis o el efecto de la dieta en el hígado. En un trabajo publicado en 2013, se estudiaron los sueros de cerdos alimentados con dieta control, dieta mediterránea o con dieta de cafetería (tipo western). Tras el procesamiento de la muestra observan casi 1000 proteínas distintas, de las cuales entre 6 y 29 podían servir para discernir entre grupos mediante análisis de componentes principales (PCA) (444). Otro trabajo, también para caracterizar la esteatosis y realizado en cerdo, encontró cambio en las proteínas plasmáticas orosomucoide 1, componente amiloide P del suero, transtiretina, paraoxonasa 1 y una proteína parecida al precursor de la alfa2 macroglobulina, además de las apolipoproteínas C3 y B (445, 446).

La proteómica tiene muchos retos por delante. Uno de ellos es la identificación de modificaciones posttraduccionales como proteólisis, glicosilación, fosforilación, sumoylación y ubiquitinación (447, 448) además de meramente cuantificar las proteínas. Otras de las dificultades que presenta la proteómica son la detección de proteínas insolubles o poco abundantes ya que no tiene un paso de amplificación, a diferencia de las ómicas de los ácidos nucleicos. Finalmente, la comunidad científica no tiene aún consenso al respecto de la normalización y limpieza de datos procesados mediante proteómica (449).

III.5.5 Metabolómica

La metabolómica se basa en la detección de moléculas a través de la espectrometría de masas y es capaz de cuantificar al mismo tiempo múltiples tipos de moléculas pequeñas, como los aminoácidos, los ácidos grasos, los carbohidratos, ácidos orgánicos, esteroides, nucleótidos y otros productos presentes en la muestra bien sea tejidos, biofluidos o distintos ambientes geoclimáticos (425). Los metabolitos normalmente son productos finales de una compleja cascada bioquímica que relaciona, el genoma, el transcriptoma y el proteoma con el fenotipo. Siendo una herramienta clave para el descubrimiento de bases genéticas para las variaciones metabólicas (443).

Los principales pasos en la metabolómica son la recogida de muestras, la paralización del metabolismo, la extracción óptima de metabolitos, la reconstitución de las muestras, la derivación química (si estamos estudiando ácidos grasos) MS o NMR y el análisis de datos, incluyendo el filtrado de datos los análisis estadísticos, y la anotación de rutas o redes metabólicas. Cada uno de estos pasos es muy variable dependiendo de la plataforma que se utilice para el análisis de datos. Además, la estructura de datos, la identificación de metabolitos desconocidos, la normalización, el re-escalado y la transformación puede diferir significativamente para cada tipo de dato e instrumento, siendo también posible hacer un estudio dirigido o aleatorio, el cual también variara a su vez el análisis de datos (443).

En función de la aplicación y de los instrumentos, los metabolitos se estudian mediante fase sólida (solid-state NMR), líquida (LC-MS), por electroforesis capilar (CE-MS) o fase gaseosa (LC-MS) utilizando un

espectroscopio (NMR) o un espectrómetro de masas (MS). La combinación de LC-MS y GC-MS detecta la mayoría del espectro químico presente en tejidos o fluido de origen biológico (425).

Multitud de trabajos recogen el efecto de la esteatosis hepática en el metaboloma del suero y hígado. En uno de ellos se ha observado que la administración de una dieta alta en grasa durante 8 semanas en ratones lleva a que triglicéridos, diglicéridos, colesterol libre y colesterol esterificado aumenten en el hígado. Mientras que en plasma disminuyen los NEFA, el glicerol y los TG circulantes. Con la esteatosis también observaron un aumento de ceramidas, esfingomielina y de LPC sin embargo sin modificación en PC. Con respecto a los ácidos biliares, observan que el ácido cólico (CA) aumenta tanto en hígado como en plasma, mientras que el ácido desoxicólico (DCA) solo aumenta en el plasma (450).

Resultados discordantes se han observado en cerdo donde la dieta esteatótica provocó que algunas variantes de PC: PC (38:6), PC (38:5), PC (38:4) y PC (36:4) aumentaban mientras que otras disminuían (PC (36:5)). Lo mismo observaron con la LPC, mientras unas aumentaban en hígado y plasma con la esteatosis LPC(20:3), LPC (18:1), otras disminuían (LPC (16:1) y LPC (16:0)) Respecto a los ácidos biliares, observaron que dos conjugados de la glicina (ácido glicocólico y trihidrooxocolanil-glicina) aumentaban en el hígado con la dieta esteatótica (451). Los estudios con muestras humanas tampoco arrojan más luz a este aspecto ya que, a través del estudio PREDIMED, se ha observado que tanto con la progresión como la regresión de la esteatosis hay una disminución significativa de SFA y monoacilglicerolfosfolina en suero. Con la progresión de la esteatosis, además observan una disminución de N-aciletanolaminas circulantes, así como de los ratio de (MUFA + PUFA) / SFA y LPC/LPE y con la regresión, una disminución de monoacilglicerolfosfoetanolamina, monoeterglicerofosfoetanolamina y LPC en suero (452).

El estudio de la dieta mediterránea, y de sus componentes minoritarios tanto en esta técnica como en la proteómica y epigenómica aún está por abordar.

III.5.6 Multiómicas

En esta introducción solo se han desarrollado 4 ómicas, sin embargo, actualmente hay multitud de ómicas desarrolladas: secretómica, foodómica, glicómica, lipidómica, microbiómica, fenómica, fosfoproteómica, metagenómica... Todas ellas se basan en los mismos principios que las ya desarrolladas (secuenciación de nucleótidos o detección de moléculas mediante espectrometría de masas).

El uso de varias ómicas para realizar un experimento y la integración de la información proveniente de ellas se le conoce como biología de sistemas o multiómicas. Este enfoque actualmente supone un reto para la ciencia ya que no hay consenso en la estandarización de la integración de la información para ninguna ómica. Este problema junto con la dificultad del aprendizaje para poder trabajar con grandes cantidades de información y la dificultad de discernir la señal detectable del ruido son los grandes retos de las ómicas.

III.6 Modelo celular: AML12

El desarrollo de modelos celulares *in vitro* ha sido una de las grandes aportaciones a la ciencia ya que permite el mantenimiento de células procedentes de distintos organismos y tejidos bajo un control absoluto del medio. El cultivo celular, también permite desarrollar estudios con poblaciones celulares idénticas tanto en el grupo control como el en tratamiento. Para este trabajo se han utilizado la línea celular AML12 (alpha mouse liver 12).

Esta línea celular deriva de hepatocitos de ratón (cepa CD1, línea MT42) a los que se han modificado genéticamente para que expresen el TGF α humano. Estas células contienen peroxisomas y son capaces de formar estructuras similares a canalículos biliares. Las AML12 conservan la capacidad de expresar proteínas del suero como la albumina, alfa1 antitripsina, transferrina y las proteínas de unión GAP (conexinas 26 y 32). La expresión de las proteínas hepatoespecíficas cae con los pasajes, pero se reactiva al cultivarlas en medio libre de suero (453).

III.7 Modelo Animal

El modelo animal presenta algunas ventajas respecto al modelo celular dado que es capaz de aportar una respuesta integral, coordinada entre sus órganos y tejidos a un tratamiento de estudio. Además, proporciona bastante más material de estudio que el cultivo celular. Otra de las grandes ventajas de los animales respecto a las líneas celulares, es que estas últimas suelen proceder de líneas tumorales, habiendo perdido en la derivación algunas de sus características originales. En cualquier caso, el modelo animal y el modelo celular no son excluyentes, pudiendo aprovechar las ventajas de ambos a la hora de realizar un estudio.

III.7.1 Ratón

El ratón es el modelo por antonomasia de experimentación animal, en el año 2017 supuso más del 65% de los animales utilizados en experimentación animal en España (454). Se trata de un animal de gran similitud fisiológica y genómica al humano, pero de un tamaño mucho más pequeño, manejable y con un rápido crecimiento (455).

El ratón permite realizar modificaciones estables en su genoma, fruto de esta propiedad surge la gran diversidad de líneas desarrolladas en este animal. Una buena parte de estas líneas de ratón se encuentran en el repositorio EMMA (la colección europea de cepas de ratón), el cual contiene más de 6800 líneas de ratón distintas, este número ha explotado gracias a la simplificación del proceso de elaboración de modificaciones genómicas que proporciona la tecnología CRISPR-cas (456, 457).

Para la elaboración de esta tesis se ha utilizado tanto ratones normales de la cepa C57BL/6J como ratones modificados genéticamente para los siguientes genes:

- ApoE: ApoE es una proteína presente en las apolipoproteínas VLDL, LDL y quilomicrones y cuya función está relacionada con la adquisición de las IDLs por el hígado, una vez hayan concluido su función de distribución de triglicéridos y colesterol al resto de celular del organismo. El silenciamiento del gen que

codifica esta proteína imposibilita la recogida de LDLs por parte del hígado, quedándose en circulación hasta que depositan en el endotelio de los grandes vasos dando lugar a la aterosclerosis (458).

- Ldlr: El receptor de Ldl es una proteína que se encuentra en las membranas celulares de los mamíferos, se encarga de reconocer las LDLs y facilita tanto el acceso de las lipasas celulares al contenido de las LDLs como la endocitosis de la LDL, para esta segunda función necesita la colaboración de clatrin. El silenciamiento del gen que codifica esta proteína imposibilita la recogida de LDLs por parte del hígado, llevando a la misma situación que con el anterior modelo, la aterosclerosis (459).

- Pgc1 α : PGC1A también conocido como PPARGC1A es un coactivador transcripcional que controla la expresión de genes relacionados con el metabolismo oxidativo. Inicialmente se identificó como coactivador de PPAR γ en tejido adiposo marrón, sin embargo, se expresa en muchos tejidos con metabolismo oxidativo. En hígado, PGC1A coordina la respuesta de los receptores nucleares PPAR γ , PPAR α , ERR, LXR y HNF4A pero también interacciona con otros factores de la transcripción como CREB, SREBP-1c o FOXO1. Por si fuese poco complejo toda esta variedad de interacciones, también presenta modificaciones posttraduccionales como la acetilación, la fosforilación y la metilación que modifican su actividad. Aunque se ha observado que su sobreexpresión hepática conlleva a la producción de glucosa y su silenciamiento evita la esteatosis durante el ayuno, sus implicaciones en el metabolismo energético y en la esteatosis hepática siguen siendo un misterio para la ciencia actualmente (460).

III.7.2 Cerdo

El cerdo supone el modelo experimental animal más parecido al hombre tanto a nivel genético (461), anatómico (462) y fisiológico (463-465). Esto lo convierte en un modelo bien adaptado para estudiar la progresión de las enfermedades metabólicas (5, 466-475). El cerdo, como modelo experimental para enfermedades metabólicas se clasifica en dos grupos: razas comerciales modernas (p. e. Large White y Pietrain) y minipigs (e.g Oossabaw. Göttingen, Yucatan) (470, 471, 476). El fácil acceso a una gran variedad de razas

comerciales ofrece la oportunidad de trabajar con diferentes fenotipos en investigación (5). Otra de las ventajas de los cerdos como modelo experimental es que permite una amplia recogida de muestras para hacer fenotipados en profundidad y permite realizar estudios interdisciplinarios relacionando varios tejidos y órganos (445, 467, 476). En este mismo aspecto, el cerdo permite realizar estudios comparativos a lo largo del tiempo (444).

El cerdo tiene una segunda propiedad que le aporta gran valor como modelo experimental de mecanismos moleculares, ya que también está considerado como la fuente de xenotransplantes más probable (477), de hecho, ya se utiliza para algunas indicaciones clínicas (i.e. válvulas del corazón y matrices acelulares) (445, 471, 478, 479). Avances recientes relacionados con la eliminación de los retrovirus endógenos (480) y la delección parcial del sistema de respuesta inmune (481) facilitan la posibilidad de un xenotransplante hepático porcino.

Ningún modelo animal ni celular reproduce exactamente el proceso humano. La utilización de varios modelos animales con diferentes respuestas del metabolismo lipoproteico permitirá desentrañar los mecanismos involucrados en la patogenia de la esteatosis y del transporte de nutrientes al hígado. Por ello, la realización de la experimentación en diversos modelos permitira detectar aquellas rutas evolutivamente conservadas y validar conclusiones de forma independiente del modelo en la esteatosis hepática, y en el papel que desempeña el escualeno en la prevención de su patogénesis.

IV. Objetivos

Dado los numerosos estudios previos recogidos en la revisión bibliográfica que reflejan la importancia y la complejidad de la esteatosis hepática, así como la influencia de la dieta en el desarrollo de la misma, los objetivos de esta investigación fueron los siguientes:

1. Conocer la influencia de la composición lipídica de la dieta en la regulación de la expresión hepática del gen *Cidec*.
2. Estudiar el papel del gen *Cidec* en los mecanismos responsables del dimorfismo sexual en la esteatosis hepática.
3. Caracterizar un modelo de esteatosis de rápida evolución basado en cerdos comerciales a nivel histológico, fisiológico y transcriptómico.
4. Búsqueda de nuevos genes implicados en el desarrollo de la esteatosis hepática y que puedan dar lugar a nuevos biomarcadores no invasivos a nivel plasmático.
5. Estudio del efecto de la suplementación con escualeno a plazo corto en un modelo porcino de esteatosis hepática.
6. Explorar el lipidoma plasmático porcino tras la suplementación dietética con escualeno para encontrar biomarcadores plasmáticos que respondan a dicho triterpeno durante la esteatosis hepática.



V. Material y métodos

V.1 Material biológico

V.1.1 Estudios animales

Todos los estudios realizados para esta tesis que implicasen el uso de animales se realizaron de acuerdo a la ley sobre protección de animales utilizados para la experimentación y otros fines científicos (Real Decreto 53/2013). Así mismo, todos los procedimientos fueron aprobados por la Comisión Ética Asesora para la Experimentación Animal de la Universidad de Zaragoza o por el Comité de Ética de la Investigación de la Universidad Autónoma de Madrid.

Con excepción de los ratones *Pgc1a*^{-/-} que se albergaron en las instalaciones de la Universidad Autónoma de Madrid. El resto de ratones se mantuvieron en el Animalario de la Universidad de Zaragoza. En todas las instalaciones, los animales se alojaron en jaulas con tapa de filtro estériles en habitaciones con un microclima controlado, con una temperatura máxima de 23 °C y mínima de 20 °C, humedad máxima del 60% y mínima del 50% y con una relación de ciclo luz-oscuridad de 12 horas para cada una de las fases y acceso *ad libitum* a alimentos y agua. Todas las dietas se prepararon mensualmente y se mantuvieron en atmósfera de N₂ a -20 °C. Se proporcionó comida fresca a diario durante el tiempo que duró cada experimento. Las dietas fueron bien toleradas. Para establecer los grupos de animales de estudio con un nivel similar de colesterol basal en plasma se tomaron muestras sanguíneas a ratones de dos meses de edad (tras 4 horas de ayuno) de la vena facial. En el plasma obtenido se determinó la concentración de colesterol.

Respecto a los cerdos, se albergaron en las instalaciones de la división de Experimentación Animal del Servicio General de Apoyo a la Investigación, de la Universidad de Zaragoza. Tanto la dieta como el agua se ofrecieron *ad libitum* y el pienso se preparó semanalmente almacenándolo a -20 °C. Las dietas fueron bien toleradas. Las tomas de muestras mediante biopsia se realizaron bajo condiciones anestésicas inducida y mantenida con Propofol® (B/Braun-Vetcare, Rubí, Barcelona, España). Para establecer los grupos de animales de estudio se

tomaron muestras de sangre en ayunas y se asignaron de manera que todos los grupos tuviesen un nivel similar de colesterol basal en plasma.

	Ratones		Cerdos	
	Control	Occidental	Control	Occidental
Proteína (%)	14,2	11,3	14,5	8,5
Fibra (%)	5,0	4,0	15,5	10
CHO (%)	72,1	57,6	62,1	53,2
Azúcares (%)	25,5	20,4	25,3	33,4
Grasa (%)	4	23,35	3,8	25,7
Colesterol (%)	--	0,15	--	2
Colina (%)	0,25	0,2	0,09	0,016
Colato (%)	--	--	--	0,5
Minerales (%)	3,5	2,8	2,3	2,2
Vitaminas (%)	1	0,8	1,8	0,4
Fuente de grasa	Aceite de soja	Aceite de soja y palma	Aceite de palma	Aceite hidrogenado de palma y girasol
Perfil de ácidos grasos:				
Caprílico (C8:0)^a	0	0,01	0,1	0,1
Cáprico (C10:0)^a	0	0,01	0,2	0,04
Laúrico (C12:0)^a	0	0,15	3,9	0,5
Mirístico (C14:0)^a	0,1	0,85	1,8	1,0
Palmítico (C16:0)^a	10,5	38,5	27	39,0
Palmitoleico (C16:1)^a	0,1	0,16	0,1	0,2
Margárico (C17:0)	0,1	0	0	0
Esteárico (C18:0)^a	4,0	4,4	2,9	8,7
Oleico (C18:1)^a	27,5	38,1	28,0	32,7
Linoleico (C18:2 n6)^a	50,9	15,5	32,5	12,6
Linolénico (C18:3 n3)^a	5,1	1,1	2,3	0,1
Araquídico (C20:0)^a	0,6	0,6	0,4	0,4
Gadoleico (C20:1)^a	0,3	0,22	0,4	0,14

Tabla 3. Composición en macronutrientes de los piensos administrados a los animales y perfil de ácidos grasos de los mismos^a, Porcentaje de dicho ácido graso respecto al total de ácidos grasos del pienso.

V.1.1.1 Influencia del colesterol

Se emplearon catorce ratones macho homocigotos deficientes en APOE de dos meses de edad con un fondo genético C57BL/6JxOla129, cedidos por la Dra. Nobuyo Maeda de la Universidad de Carolina del Norte. Los ratones fueron distribuidos en uno de los siguientes grupos experimentales: a) grupo control (*n*

= 7) alimentados con una dieta normal (B & K Universal Ltd, Humberside, UK) y b) un grupo colesterol ($n = 7$) alimentados con la misma dieta suplementada con 0,1% (p/p) de colesterol. Los animales recibieron dichas dietas durante 10 semanas (482).

V.1.1.2 Influencia de una dieta occidental

Ratones

En el modelo murino se exploró la influencia de una dieta occidental mediante el uso de animales *Apoe*^{-/-} con un fondo genético C57BL/6J obtenidos de Charles River (Charles River Laboratories, Barcelona, España) y criados en el Animalario de la Universidad de Zaragoza. Se establecieron dos grupos de ratones machos homocigotos de tres meses de edad, a) un grupo ($n = 13$) recibió una dieta purificada normal y b) otro grupo ($n = 9$) recibió una dieta purificada esteatótica que contenía un 0,15% de colesterol y un 20% de aceite de palma refinado (Gustav Heess, S.L., Barcelona, España) (483).

Cerdos

Los cerdos utilizados para estos experimentos provenían de un cruce de líneas Landrace x Large White de la empresa cooperativa Caspe ganadera, SA. (Caspe, España). Se realizaron dos experimentos con cerdos para caracterizar el efecto de la dieta tipo occidental.

En un primer experimento, se utilizaron 12 cerdos macho de aproximadamente 3 meses de edad a los que tras un periodo de adaptación a las instalaciones se les realizó una biopsia inicial para toma de muestras. A los tres días tras la intervención, se les inició con la dieta esteatótica. Transcurridos estos dos meses, se procedió al sacrificio de los animales y a realizar la toma de muestras final.

En la segunda intervención cuyo objetivo era caracterizar la regresión de la esteatosis, se utilizaron 8 animales, a los cuales, tras un periodo de adaptación se les sometió a una dieta esteatótica durante dos meses. Transcurrido dicho periodo de tiempo se les practicó una biopsia para toma de muestras y a partir de dicho momento se les suministro una dieta control para revertir dicha

esteatosis. Un mes más tarde, se procedió al sacrificio de los animales y a realizar la toma de muestras final.

V.1.1.3 Influencia del ácido oleanólico

El estudio de la influencia del ácido oleanólico, segundo terpeno más abundante del EVOO se realizó con ratones macho homocigotos *Apoe^{-/-}* con un fondo genético C57BL/6J, obtenidos de Charles River (Charles River Laboratories, Barcelona, España). Dos grupos se establecieron: a) un grupo ($n=8$) recibió una dieta esteatósica y b) el otro ($n=9$) recibió la misma dieta suplementada con un 0,01% de ácido oleanólico (Extrasynthese, Genay, Francia), equivalente a una dosis diaria de 10 mg/kg de peso de ratón vivo asumiendo una ingesta diaria de 3 gramos por ratón (442).

V.1.1.4 Influencia del escualeno

Ratones

Se utilizaron ratones macho *Apoe^{-/-}* de la estirpe C57BL/6J alimentados con una dieta semipurificada esteatósica durante 11 semanas. Y se establecieron dos grupos: a) un grupo control ($n=9$) que únicamente recibió la dieta esteatósica y b) un grupo tratamiento ($n=10$) al que además de la dieta esteatósica se les suplementó con un 1% de escualeno (Sigma, Madrid, España) dosis equivalente a 1 g/kg de peso vivo de ratón, asumiendo un consumo de 3 g/día por ratón (484).

Cerdos

A fin de explorar el efecto de escualeno en un modelo animal grande, se escogió el cerdo por ser el más parecido al hombre (464). 24 cerdos macho pertenecientes al cruce de vías Landrace x Large White de 3 meses de edad se adquirieron de la empresa cooperativa Caspe ganadera SA (Caspe, España). Tras un periodo de adaptación se les administró una dieta esteatósica por un mes a todos los animales, transcurrido dicho mes, bajo condiciones anestésicas, se les realizó una toma de muestras y se diferenciaron dos grupos: a) un grupo control ($n=12$) que continuó con la dieta esteatósica y b) un grupo tratamiento

($n=12$) al que además de la dieta esteatósica se les suplementó con un 0,5% de escualeno (MoleKula, Munich, Alemania). Trascurrido un mes con estas dietas se procedió a la eutanasia por sobredosis de anestésico y a la toma de muestras.

V.1.1.5 Influencia del sexo

Ratones

La influencia del sexo en el metabolismo hepático se exploró en ratones *Apoe*^{-/-} alimentados tanto con una dieta esteatósica ($\sigma=9$, $\varphi=10$) como con una dieta normal ($\sigma=13$, $\varphi=13$) durante 11 semanas. Mientras que en los modelos *Ldlr*^{-/-} ($\sigma=17$, $\varphi=18$) y *Pgc1a*^{-/-} ($\sigma=8$, $\varphi=8$) se exploró únicamente en las condiciones esteatósicas durante 11 semanas.

V.1.1.6 Influencia de la castración

Ratones

El estudio de la castración se exploró tanto en ratones *Apoe*^{-/-} machos como hembras C57BL/6J alimentados con una dieta purificada esteatósica durante 11 semanas. Dos grupos machos se establecieron, uno control ($n=9$), y otro ($n=9$), formado por ratones castrados. Respecto a las hembras, un grupo control ($n=9$) y otro ($n=9$) formado por hembras ovariectomizadas.

V.1.2 Sacrificio de los animales

Reactivos:

- PBS (pH 7,4) (NaCl 136 mM, KCl 0,2 g/l, Na₂HPO₄ 1,44 g/l y KH₂PO₄ 0,24 g/l).
- EDTA 0,5 M.
- Formaldehído al 10%.
- Nitrógeno líquido.

Procedimiento:

En el caso de los roedores, tras el período experimental se mantuvieron en ayuno durante 4 horas, tras lo cual se anestesiaron y sacrificaron por sobredosis con CO₂ científicos (Real Decreto 53/2013). A continuación, se inmovilizaron en posición de decúbito supino, se cortó y rebatió la piel abdominal, y se procedió a la extracción de la sangre por aspiración intracardiaca. Por centrifugación de la sangre se obtuvieron el suero y el plasma (recogido con

EDTA), que se emplearon para las determinaciones bioquímicas correspondientes. A posteriori, se perfundió con PBS el sistema circulatorio del animal. Rápidamente, se extrajo el hígado, se pesó y una parte se conservó en formaldehído al 4% para el análisis histológico. El resto se congeló en N₂ líquido y posteriormente se almacenó a -80 °C hasta el momento de su análisis.

Respecto a los cerdos, transcurrido el periodo experimental, se les mantuvo en ayuno durante 12 horas, tras lo cual se anestesiaron con Propofol® y se les eutanasió por sobredosis del mismo anestésico. La toma de muestras se realizó mediante laparotomía, se obtuvieron muestras de grasa subcutánea, grasa abdominal, hígado y sangre mediante punción de la vena esplénica. Una alícuota del hígado se embebió en formaldehído al 4% para el análisis histológico. El resto se congeló en N₂ líquido y posteriormente se almacenó a -80 °C hasta el momento de su análisis.

V.1.3 Cultivo celular

V.1.3.1 Manejo y condiciones de cultivo

El trabajo realizado con cultivo celular se llevó a cabo en campana de flujo laminar en las más estrictas condiciones de asepsia. Las células se mantuvieron a 37 °C en una atmósfera de 95% de aire y 5% de CO₂.

V.1.3.2 Mantenimiento de la línea celular AML12

Reactivos:

- Medio esencial Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) con glucosa (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)
- Medio Ham's F12 (HyClone Laboratoires, Logan, Utah, USA)
- SFB: Suero Fetal Bovino (Thermo Fisher Scientific). Previo a su utilización, se sometió a una temperatura de 56 °C durante 30 minutos en un baño termostatzado para inactivar las proteínas del complemento.
- Penicilina (10000 U/ml) (Thermo Fisher Scientific)
- Estreptomina (10000 µg/ml) (Thermo Fisher Scientific)
- L-glutamina 4 mM (Thermo Fisher Scientific)
- Aminoácidos no esenciales 10 mM (Thermo Fisher Scientific)
- Material de cultivo celular estéril (Sarstedt, Nümbrecht, Alemania)
- Dexametasona (Sigma Aldrich; Merck Millipore, Darmstadt, Alemania)
- Insulina, transferrina y selenio (x500) (Corning, Bedford, MA, USA)

Procedimiento:

Las células se mantuvieron en crecimiento a 37 °C y atmósfera de CO₂ al 5% en botellas de plástico para cultivos de 25 cm². El medio para la línea celular AML12 estaba formado por medio DMEM y Hams F12 en proporción 1:1, suplementado con SFB al 10%, penicilina al 1%, estreptomycin al 1%, dexametasona a 40 ng/ml, insulina a 10 µg/ml, transferrina a 5,5 µg/ml y selenio a 5 ng/ml. El medio de cultivo se cambió cada 2 días.

V.1.3.3 Tripsinización de los cultivos

Reactivos:

- PBS x10 (Thermo Fisher Scientific)
- Agua destilada autoclavada
- PBS x1: PBS x10 en agua destilada autoclavada en proporción 1:9.
- Tripsina al 2,5%, 10X (Thermo Fisher Scientific)
- EDTA 10 mM: 372 mg en 100 ml filtrados bajo campana de flujo laminar por un filtro de esterilidad Millex® de PVDF de 0,22 µm de tamaño de poro (Sigma Aldrich, Merk Milipore)

Procedimiento:

Cada 7 días aproximadamente, cuando las células alcanzaban un 90% de confluencia se procedía a su individualización. Para ello se aspiraba el medio de cultivo, se lavaban con 5 ml de PBS x1 dos veces y se incubaban durante 5-10 minutos a 37 °C con 1 ml de una solución de tripsina (50 ml de agua destilada; 5,5 ml de PBS 10X; 7,7, ml de tripsina 10X; 7,7 ml de EDTA 10 mM). Pasado este tiempo, las células se homogeneizaban en 5 ml de medio de cultivo y se procedía a resembrar en las condiciones oportunas.

V.1.3.4 Siembra de los cultivos

El volumen de siembra de las células varió en función de la superficie a trabajar de manera que, el cultivo empezase con un 15-20% de confluencia tras sembrar las células. Para este trabajo, el mantenimiento de las células se realizó en cajas de 25 cm², mientras que los experimentos se realizaron en placas de 6 pocillos de 3,33 cm² de diámetro. En las primeras se sembraban entre 700.000 y 1.000.000 células con un volumen final de 5 ml, mientras que en las placas se

sembraban unas 100 000 células por pocillo y se llevaban a un volumen final de 2,5 ml con medio de cultivo.

Los experimentos se iniciaban a confluencia de 60% si concurrían incubaciones de 48-72 horas, o a confluencias del 80-90% si el experimento tomo menos de 24 horas. Tras el periodo de incubación las células se recogieron y estudiaron mediante el método oportuno en cada caso.

V.1.3.5 Congelación/descongelación de las células

Reactivos:

- SFB (Thermo Fisher Scientific)
- DMSO (Sigma Aldrich; Merck Millipore)

Procedimiento:

Se procedió de manera similar a la tripsinización, los 5 ml de células resuspendidas en medio de cultivo resultante se centrifugaron a 300 g durante 5 minutos. Posteriormente, se aspiró el medio y al sedimento celular se le añadió 1 ml de SFB con DMSO al 10% gota a gota muy frío. La mezcla se guardó en viales y la congelación se efectuó de manera progresiva en un contenedor con isopropanol (5100 Cryo 1 °C Freezing Container, Mr. Frosty) en un congelador de -80 °C durante 24 h. Posteriormente, los tubos se almacenaron en nitrógeno líquido hasta su utilización.

V.1.3.6 Adición de ácidos grasos al medio

Reactivos:

- Esteárico (C18:0) (Sigma Aldrich; Merck Millipore)
- Hidróxido Sódico 1M (Sigma Aldrich; Merck Millipore)
- Etanol 100% (Sigma Aldrich; Merck Millipore)
- Albúmina (Panbiotech, Aidenbach, Alemania)

Procedimiento:

El esteárico se diluyó en etanol al 100% a una concentración de 100 mM y se almacenó a -20 °C. Posteriormente se pipeteó el volumen pertinente de esteárico 100 mM, y calentado la disolución previamente a 40 °C a fin de evitar precipitaciones del esteárico y un pipeteo erróneo del mismo. Este esteárico era

posteriormente convertido a su sal sódica por adición de una cantidad equimolar de hidróxido sódico 1 M y calentamiento a 50 °C bajo corriente de nitrógeno. Tras la evaporación del alcohol, se reconstituyó el pellet de ácidos grasos saponificados en medio con albúmina al 5%, DMEM para experimentos con HepG2 o DMEM:HamsF12 (1:1) para experimentos con AML12. Finalmente, se pasó por un filtro de esterilidad Millex® en una cabina de flujo laminar.

Previa adición del medio con esteárico a las células en cultivo, se lavaron 2 veces con el mismo volumen de incubación con PBS x1.

V.1.3.7 Incubación con 17 β - estradiol

El 17 β - estradiol (Sigma Aldrich; Merck Millipore) se diluyó en etanol al 100% a concentración 9 mM. A partir de este se preparó una dilución intermedia a 50 μ M de la que se pipeteó el volumen pertinente para añadir al medio de cultivo cuya concentración final fue de 50 nM. Las disoluciones de 17 β -estradiol se almacenaron a -20 °C durante periodos no superiores a 1 mes.

Asimismo, el medio DMEM que se utilizó para aquellos experimentos en los que se adicionó el 17 β estradiol carecía de rojo fenol, ya que este se ha demostrado capaz de interactuar con los receptores de estrógenos (485).

V.2 Estudio de la expresión génica

V.2.1 Extracción del RNA

Reactivos:

- Agua tratada con dietil pirocarbonato (DEPC) al 0,05% (v/v), autoclavada durante 1 hora a 1 atmósfera
- Cloroformo
- Isopropanol
- Solución de etanol al 75% en agua DEPC.
- 1xTBE: Tris base 9 mM, EDTA 50 mM (pH 8) y ácido bórico 90 mM
- Tampón de carga de RNA: Azul de bromofenol al 0,25% (p/v), xileno de cianol al 0,25% (p/v), glicerol al 50% (p/v) y EDTA 1 mM
- Reactivo de extracción de RNA: Tri Reagent (MRC, Inc. Cincinnati, OH, USA)
- Bromuro de etidio (10 mg/ml)
- Gel de agarosa al 1%: 0,5 g de agarosa en 50 ml de tampón 1x TBE.

Procedimiento:

Para la extracción de RNA se utilizó material estéril libre de RNasas y sobre nieve carbónica a fin de mantener los tejidos congelados y evitar la degradación del RNA. El procedimiento de extracción de RNA a seguir fue el mismo tanto para los tejidos de origen animal como para las células en cultivo.

Se tomó para cada muestra una alícuota congelada de unos 50 mg de tejido y se introdujo en un tubo de polipropileno estéril que contenía 1 ml del reactivo de extracción. Se homogenizó inmediatamente mediante el uso de un ultraturrax previamente limpiada y libre de RNasas, el cual además se limpió entre muestra y muestra. Posteriormente se transfirió el contenido a un tubo Eppendorf y se dejó 5 minutos a temperatura ambiente, se añadieron 200 μ l de cloroformo a cada tubo, se agitaron las muestras por inversión, y se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se centrifugaron a 4 °C durante 15 minutos a 12.000 g, y la fase superior acuosa se transfirió a un nuevo tubo eppendorf, al que se añadieron 0,5 ml de isopropanol. Se mezcló vigorosamente por inversión y se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos, pasados los cuales se centrifugó en las mismas condiciones anteriores. Tras la centrifugación, se desechó el sobrenadante, y el precipitado obtenido se lavó con 1 ml de etanol al 75% y se centrifugó a continuación a 12.000 g durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se decantó de nuevo el sobrenadante y, tras dejar secar el precipitado brevemente, se disolvió en agua tratada con DEPC.

Seguidamente se midió la concentración del RNA en el espectrofotómetro Nanodrop ND-1000 UV/Vis por absorbancia a 260 y 280 nm. La concentración se calculó en base a que 1 mOD a la longitud de onda de A_{260} corresponde a una concentración de 40 μ g/ml. Se comprobó que la relación entre las dos longitudes de onda se encontrase entre 1.8 y 2.0. Un ratio inferior reflejaría una posible contaminación con proteínas y DNA.

La calidad del RNA extraído se verificó por electroforesis de 500 ng de RNA de cada muestra en un gel de agarosa al 1% en 1xTBE que contenía bromuro de etidio, a 80 V durante 30 minutos. La visualización de las tres bandas

características del RNA ribosómico (5S, 18S y 28S) se efectuó mediante un transiluminador de UV. Posteriormente, el RNA se mantuvo almacenado a -80 °C.

V.2.2 Eliminación del DNA contaminante

Reactivos:

- Kit comercial Turbo DNasa RNAsa-Free (Thermo Fisher Scientific)
- Agua DEPC

Procedimiento:

Tras la extracción del RNA han podido quedar restos de DNA genómico en las muestras que pueden interferir en análisis posteriores. Por ello, se realizó el tratamiento del RNA con una DNAsa.

El procedimiento se realizó en el termociclador siguiendo las indicaciones del fabricante. Se incubaron durante 30 minutos a 37 °C 5 µg de RNA junto con la DNasa I y el tampón correspondiente. Después se inactivó la enzima, se centrifugó la muestra y se recogió el sobrenadante en un nuevo tubo eppendorf. Tras ellos, se volvió a valorar concentración, pureza e integridad de la muestra

V.2.3 RNA Quality Integration (RQI)

Para el análisis transcriptómico llevado a cabo en el segundo manuscrito se realizó un análisis pormenorizado de la calidad de los RNAs a secuenciar mediante el sistema de Experion™ de electroforesis automatizada y el chip Experion™ RNA StdSens. El equipo realiza una electroforesis con cada muestra elaborando un electroforegrama donde se observan los picos de intensidad de la absorbancia con respecto al tiempo. Posteriormente mediante la medición de las áreas de los picos correspondientes a los RNA 18S y 28S se obtiene el RQI (RNA Quality integration), el cual va de 0 si el RNA está degradado, a 10 si el RNA está en perfectas condiciones. Todos los RNAs enviados a secuenciar obtuvieron un RQI superior a 9.

V.2.4 Secuenciación masiva del RNA (RNAseq)

A fin de desentrañar la expresión de los genes hepáticos implicados en la respuesta a una dieta esteatósica en los cerdos, se llevó a cabo el análisis del transcriptoma hepático mediante secuenciación masiva. Para la secuenciación del RNA se preparó un *pool* para cada una de las condiciones de estudio a secuenciar con cuatro muestras representativas y se enviaron a GATC Biotechnology (Konstanz, Germany) ahora perteneciente a Eurofins Genomics (Ebersberg, Germany) donde se realizó la construcción de la librería, la secuenciación y los análisis bioinformáticos pertinentes. Se realizó una lectura pareada cuyo tamaño era de 125 pb mediante la plataforma de secuenciación Illumina HiSeq 2500 system. Los fragmentos leídos se alinearon al genoma de referencia (Ensembl *Sus scrofa* genome 10.2; www.ensembl.org) utilizando el programa Bowtie y se generó los alineamientos del genoma/transcriptoma. A continuación, los transcritos de este alineamiento se identificaron y cuantificaron utilizando Cufflinks. Posteriormente los fragmentos de transcritos identificados se juntaron para poder cuantificar la totalidad del transcrito y se anotaron los transcritos utilizando el software Cuffmerge. Finalmente, los transcritos de las muestras fueron comparadas utilizando Cuffdiff para determinar los niveles de expresión diferencial de genes y transcritos entre los dos grupos.

V.2.5 Retrotranscripción

Reactivos:

- Kit commercial Prime Script™ Reagent (Perfect Real Time) (Takara, Kusatsu, prefectura de Shiga, Japón)
- Agua DEPC

Procedimiento:

Para llevar a cabo la retrotranscripción del RNA se siguieron las indicaciones del fabricante. Se llevaron 500 ng de RNA a un volumen de 6,5 µl añadiendo agua DEPC, posteriormente se le adicionó 3,5 µl de una mezcla formada por primers oligo dT, primers random, enzima retrotranscriptasa y tampón 5x en las siguientes proporciones 1:1:1:4, se mezcló bien y se incubó a 37 °C durante 15 minutos, seguidos de 5 segundos a 85 °C. Una vez finalizada

la retrotranscripción se diluyó el cDNA con agua de PCR a la concentración adecuada para cada gen, unos a 12,5 ng/ μ l y otros a 1,25 ng/ μ l.

V.2.6 PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR)

Reactivos:

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

Procedimiento:

La qPCR es una técnica capaz de medir la amplificación de un fragmento de DNA diana al tiempo que se desarrolla la reacción a diferencia de la PCR tradicional, en la que solo se permite valorar a tiempo final la presencia o ausencia del fragmento de DNA en nuestra muestra. El proceso de reacción de la qPCR es idéntico a la de una PCR con la adición de un reactivo fluorescente. En este caso se ha trabajado con SYBRGreen®, éste es un agente intercalante que se introduce en la estructura secundaria de la doble hélice de DNA, una vez unido es capaz de emitir una señal fluorescente a 520 nm cuando se excita a 497 nm, la cual es proporcional al número de copias generadas por la PCR. El equipo va realizando mediciones de dicha fluorescencia en cada ciclo para cada una de las muestras a analizar.

Para llevar a cabo la qPCR se realizaron 40 ciclos de amplificación en el termociclador, que constaban de las siguientes etapas: desnaturalización de la doble hebra de DNA a 95 °C durante 15 segundos, hibridación a 60 °C de los cebadores al extremo 3' de cada una de las hebras y extensión de la cadena durante 1 minuto mediante la actividad de la DNA polimerasa.

Esta reacción se llevó a cabo en un volumen de 12,5 μ l por muestra y en duplicado que contenía los siguientes reactivos:

- 1 μ l del cDNA en la dilución óptima en cada caso
- 6,25 μ l de la mezcla de Sybr Green Master
- 0,2-1,25 μ l del primer directo (concentración final de 80-500 nM)
- 0,2-1,25 μ l del primer reverso (concentración final de 80-500 nM)
- Agua hasta un volumen final de 12,5 μ l

En cuanto a los equipos empleados, fueron un ViiA7 Real-Time PCR System para las placas de 384 pocillos, un Step One Real-Time PCR System para las de 48 pocillos y un Step One Plus Real-Time PCR System para las de 96 pocillos. Todos de Thermo Fisher Scientific.

V.2.7 Elección del gen de referencia

Para llevar a cabo una cuantificación con los datos de una qPCR hace falta el uso de un gen de referencia o *housekeeping* para corregir errores durante los procesos de retrotranscripción o extracción del RNA que puedan dar lugar a diferencias en la cantidad de cDNA en nuestras muestras de estudio. El housekeeping o gen de referencia es un gen cuya expresión no varía en las condiciones de estudio. En el caso del ratón, se eligió como gen de referencia la *ciclofilina B*, ya que es un gen muy estable en hígado, como se ha podido comprobar en estudios precedentes de nuestro grupo de investigación (391, 441), mientras que para los estudios de cerdo se exploraron varios posibles genes de referencia siendo *UBA52* el más estable. La cantidad relativa de todos los mRNAs se expresó en relación con la expresión del gen de referencia mediante la ecuación $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (486).

V.2.8 Diseño de cebadores y optimización

A la hora de hacer una qPCR, el diseño de los *primers* es crucial habiendo varios programas para ello. Para esta tesis se optó por la herramienta que ofrece el NCBI, Primer BLAST, (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) con el que se diseñaron primers cuya longitud fuese de 18-24 bases, con un contenido de G:C entre 40 y 60%, cuya T_m fuese de 60 ± 2 °C y su fragmento amplificado de 100-500 pb. Así mismo también se persiguió que estos primers se iniciasen y terminasen por bases púricas, evitado potenciales horquillas internas o formación de dímeros entre ellos e idealmente que la pareja hibridase en exones diferentes, para evitar la amplificación de una potencial contaminación por DNA genómico.

Para confirmar la especificidad de los cebadores, se realizó una segunda comprobación en la base de datos BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) del NCBI para asegurar que cada pareja sólo reconocía la secuencia objeto de estudio.

Con cada pareja de cebadores se efectuaron las rectas de calibrado para conseguir las condiciones en las que su eficiencia de amplificación fuese la correcta (entre 90-110%) y conocer la dilución de trabajo óptima en cada caso. Las secuencias de oligonucleótidos utilizadas se indican en el apartado de resultados según las normas MIQE (487).

V.3 Estudio histológico y determinaciones analíticas del hígado

El estudio histológico se realizó con las muestras de hígado tomadas en paraformaldehído al 10% con todos los animales incluidos en los estudios. Tras 48 horas en formol, se incluyeron en parafina según la técnica convencional, mediante un proceso de deshidratación con alcoholes de graduación creciente, aclaramiento mediante sumersión en xileno y finalmente inclusión en parafina (punto de fusión de 56 °C), todo este trabajo se realizó mediante un inclusor automático. Se separaron los bloques de parafina y se realizaron cortes histológicos de 4 µm de espesor que fueron desparafinados mediante aplicación de calor durante 30 minutos a 60 °C, seguido de dos lavados de 5 minutos en un baño de xileno. Se transfirieron los cortes en las siguientes soluciones para proceder a su hidratación durante 3 minutos a temperatura ambiente: etanol al 100% dos veces; etanol 95%, 90%, 85%, 70%, 50% y 30%; y finalmente 2 lavados en agua destilada. Una vez hidratados, el procedimiento a seguir varió en función de que es lo que se pretendía observar en dicha muestra.

V.3.1 Hematoxilina-eosina

Para la identificación de patologías hepáticas que pudieran generar datos aberrantes, así como para la cuantificación de la gota lipídica los cortes se tiñeron con hematoxilina-eosina (H-E) siguiendo un protocolo estándar de tinción (488). A continuación, se observaron con un microscopio óptico Nikon (Eclipse

E200) y se fotografiaron con una cámara digital Nikon (DS-Fi1) acoplada al microscopio. A partir de estas fotografías se evaluó y cuantificó el contenido de grasa en el hígado mediante un programa de procesamiento de imágenes (Adobe PhotoShop CS3) que nos permitió medir la superficie de las gotas lipídicas. El resultado se expresó como porcentaje del área de la sección ocupada por las gotas lipídicas.

V.3.2 Tricrómico de Masson

Para evidenciar y cuantificar el área de las fibras en el hígado se procedió a realizar la tinción tricrómica de Masson, con la que las fibras de colágeno adquieren un color azul oscuro.

Tras la rehidratación de los cortes histológicos, se sumergieron las muestras 5 minutos en hematoxilina de Weigert seguido de un lavado bajo corriente de agua durante 10 minutos. A continuación, se sumergieron en fucsina acética al 1% y se lavaron con agua acética al 1%, posteriormente en ácido fosfotúngstico al 5% y de nuevo en acético al 1% durante 5 minutos cada uno de los lavados. Posteriormente se introdujeron las muestras en azul de anilina al 1% durante 30 segundos, se lavó de nuevo con acético al 1% y se procedió a deshidratar y montar la preparación.

Las fotografías y la cuantificación se realizaron de manera similar a la descrita para la hematoxilina-eosina, a diferencia de que las microfotografías se tomaron a x100 en vez de a x400, y el objetivo a cuantificar era el área ocupada por fibras.

V.3.3 Inmunohistoquímica

Reactivos

- Tampón citrato (Tris-citrato de sodio 10 mM, ácido cítrico 1,9 mM, pH 6,0)
- Kit de DAKO EnVision+System-HRP (DAB) (DAKO Corporation, Carpinteria, CA, USA)
- TBS (Trizma base 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7,6)

Procedimiento

El estudio inmunohistoquímico pretende detectar las proteínas de interés en un corte histológico del tejido en estudio. Para esta técnica, tras la hidratación de los cortes histológicos, se procedió a la exposición de los epítomos antigénicos mediante incubación con tampón citrato en baño termostático en ebullición durante 30 minutos. A continuación, la peroxidasa endógena fue inactivada incubando las secciones 3 minutos en H₂O₂ con metanol al 3% (suministrado en el kit de DAKO EnVision+System-HRP), seguido del bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente en TBS con BSA al 5%. La inmunohistoquímica se llevó a cabo incubando a 4°C toda la noche con anticuerpos policlonales generados en conejo frente a LGALS3 (ref. 14979-1-AP) e ISG15 (ref. 15981-1-AP) ambos de Proteintech Group, Inc., (Manchester, UK), y diluidos 1/200 en TBS con albúmina al 1%. Para la detección del anticuerpo se utilizó un anticuerpo secundario frente a anticuerpos de conejo unido a peroxidasa (K4010, DAKO) y para su detección se utilizó DAB también procedente del kit de DAKO. Finalmente, las secciones fueron contrastadas con hematoxilina durante 5 minutos. Para evaluar la especificidad de la técnica, se llevaron a cabo controles incubando las secciones de hígado en TBS sin anticuerpo primario.

V.3.4 Lípidos hepáticos

Reactivos

- PBS (pH 7,4) (NaCl 136 mM, KCl 0,2 g/l, Na₂HPO₄ 1,44 g/l y KH₂PO₄ 0,24 g/l)
- Cloroformo: metanol en proporción 2:1
- Isopropanol
- Kit Infinity™ Cholesterol (Thermo Fisher Scientific)
- Kit Infinity™ Triglycerides (Thermo Fisher Scientific)

Procedimiento:

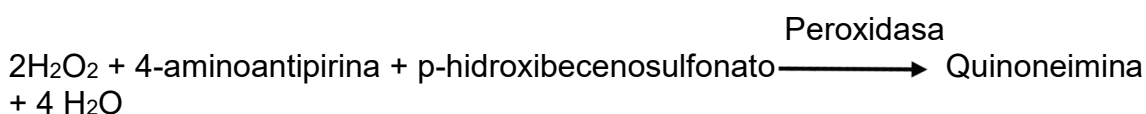
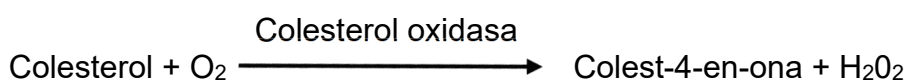
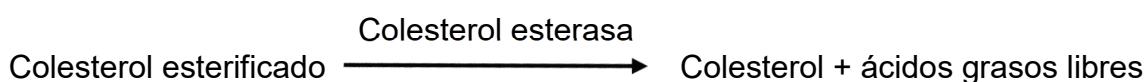
Se tomó una muestra de hígado (20 mg aproximadamente) registrando su peso para referir los resultados al mismo. A continuación, se añadió 1 ml de PBS y se homogeneizó mediante un homogenizador tipo potter hasta la completa disgregación del tejido y se transfirió a un tubo de vidrio. La extracción de lípidos se inició con la adición de 3 ml de cloroformo:metanol en proporción 2:1, se

mezcló y se centrifugó a 500 g durante 5 minutos siguiendo el método de Folch (489).

Tras la centrifugación, en la fase inferior, la orgánica, se encontraban los lípidos solubilizados, los cuales se recogieron con pipeta Pasteur y se transfirieron a otro tubo de vidrio. Se volvió a repetir el proceso de extracción con 1,5 ml de la mezcla cloroformo: metanol y se centrifugó en las mismas condiciones. Se tomó de nuevo la fase orgánica y se combinó con la extraída en la centrifugación anterior. Finalmente se evaporó el cloroformo en un baño a 50 °C bajo corriente de nitrógeno para evitar la oxidación de los lípidos y éstos se solubilizaron en 200 µl de isopropanol. Con los extractos lipídicos disueltos en isopropanol se determinaron los triglicéridos y el colesterol.

V.3.4.1 Determinación del colesterol hepático

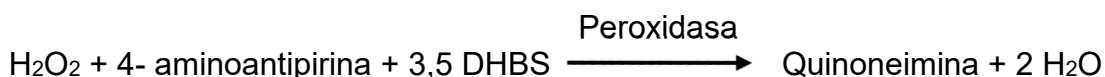
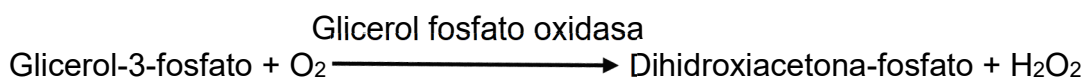
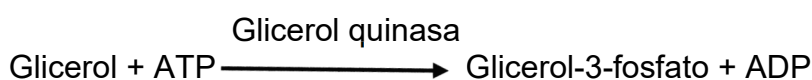
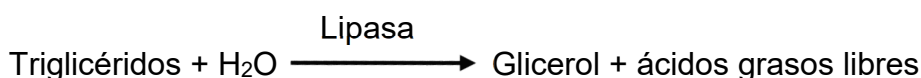
El colesterol hepático se cuantificó mediante el Kit colorimétrico Infinity™ Cholesterol (Thermo Fisher Scientific). El cual contiene las enzimas y sustratos necesarios para convertir todo el colesterol presente en la muestra en una quinona coloreada cuya absorbancia máxima corresponde a 550 nm. Las reacciones que tendrán lugar para dicha reacción son las siguientes:



Para efectuar la reacción, se incubaron 2 µl de muestra con 100 µl de reactivo durante 30 minutos a temperatura ambiente, se incluyó una muestra sin colesterol como blanco y un calibrador de colesterol cuya concentración fue 200 mg/dl. La lectura de las absorbancias se llevó a cabo en el lector de placas ESPECTROstar Nano (BMG labtech, Ottenberg, Alemania) a la longitud de onda de 510 nm.

V.3.4.2 Determinación de los triglicéridos hepáticos

Los triglicéridos hepáticos se cuantificaron mediante el Kit colorimétrico Infinity™ Triglycerides (Thermo Fisher Scientific). El cual contiene las enzimas necesarias para llevar a cabo la hidrólisis enzimática de los triglicéridos y la subsiguiente fosforilación y oxidación del glicerol liberado. Fruto de esta oxidación surge el H₂O₂ que se procesa para dar el mismo compuesto coloreado que con el colesterol: la quinoneimina. Las reacciones que tendrán lugar serán las siguientes:



Las condiciones de lectura fueron las mismas que en el caso del colesterol, a diferencia de que, en esta vez, además del blanco, se incluyó una recta de calibrado de glicerol con concentraciones desde 0,625 hasta 10 mM.

V.3.5 Lipidómica

Reactivos

- Isopropanol (Sigma Aldrich; Merck Millipore)
- Acetronilo (Sigma Aldrich; Merck Millipore)
- Agua calidad HPLC (Sigma Aldrich; Merck Millipore)
- Formiato amónico (Sigma Aldrich; Merck Millipore)
- Cloroformo (Sigma Aldrich; Merck Millipore)
- Metanol (Sigma Aldrich; Merck Millipore)
- Shimadzu HPLC System (Shimadzu UK Limited, Milton Keynes, United Kingdom)
- Columna Waters Acquity UPLC® CSH C18
- Scientific Exactive Orbitrap (Thermo Fisher Scientific)

Procedimiento:

El análisis de lipidómica se llevó a cabo en las instalaciones del Dr. Koulman en el Institute of Metabolomic Science de la Universidad de Cambridge. En primer lugar se realizó una extracción de Folch, para ello 5-10 mg de hígado se lisaron en 1 ml de cloroformo:metanol (2:1) mediante un homogenizador y bolas metálicas. Posteriormente se añadieron 150 µl con los estándares internos recogidos en la tabla 4 y 400 µl de agua. Tras agitar y centrifugar, 300 µl de la fase orgánica se recogieron y secaron mediante el speedvac, para posteriormente reconstituirlos en 100 µl de un mix constituido por isopropanol:acetronilo:agua (2:1:1). Una vez reconstituidos se procedió a su estudio mediante cromatografía líquida seguida de espectrometría de masas.

Clase lipídica	Estándar Interno	Casa comercial	Referencia	Concentración estándares internos en el premix (µg/ml)
Ceramidas	C16-d31	AVANTI	868516P	1,8
Cardiolipinas	TG(45:0-d29)	QMX	D-5213	2,5
Ácido fosfatídico	PA(C16:0-d31/C18:1) Na ⁺	AVANTI	860453P	2,5
Lisofosfatidil colina	LPC(C14:0)-d42	QMX	D-5885	2,5
Lisofosfatidil etanolamina	LPC(C14:0)-d42	QMX	D-5885	2,5
Ácidos grasos	FA(C17:0-d33)	QMX	D-5261	2,5
Fosfatidil colina	PC(C16:0-d31/C18:1)	AVANTI	860399P	2,5
Fosfatidil etanolamina	PE(C16:0-d31/C18:1)	AVANTI	860374P	2,5
Fosfatidil inositol	PI(C16:0-d31/C18:1) NH ₄ ⁺	AVANTI	860042P	2,5
Fosfatidil glicerol	PG(C16:0-d31/C18:1) Na ⁺	AVANTI	860384P	2,5
Fosfatidil serina	PS(C16:0-d62) Na ⁺	AVANTI	860401P	2,5
Triglicéridos	TG(45:0-d29)	QMX	D-5213	2,5
Esfingomielinas	SM(C16:0-d31)	AVANTI	868584P	2,5
Sulfolípidos	PG(C16:0-d31/C18:1) Na ⁺	AVANTI	860384P	2,5

Tabla 4. Estándares internos utilizados para el análisis de lipidómica.

Para ello 10 µl de la muestra se inyectaron con el equipo Shimadzu HPLC System (Shimadzu UK Limited, Milton Keynes, United Kingdom) en una columna Waters Acquity UPLC® CSH C18 mantenida a 55°C. Se utilizaron dos fases móviles en gradiente, una fase móvil A constituida acetronilo y agua (6:4) con formato de amonio 10 mM y una fase móvil B formada a partir de isopropanol y agua (9:1) con formiato de amonio 10 Mm. El flujo se mantuvo a 500 µl/minuto con el siguiente gradiente:

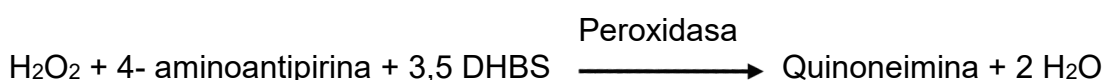
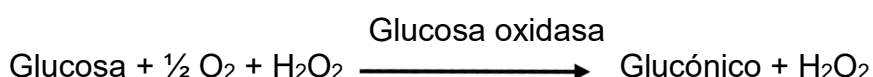
Tiempo (min)	0.00	0.40	0.45	2.40	2.45	7.00	8.00
% Fase B	40%	43%	50%	54%	70%	99%	40%

La aguja de inyección fue limpiada utilizando isopropanol y acetronilo (9:1) con ácido fórmico al 0,1%. El espectrómetro de masas utilizado fue Scientific Exactive Orbitrap con un electrospray de ionización caliente (Thermo Fisher Scientific, Hemel Hempstead, UK). Antes de procesar las muestras, se calibró el espectrómetro de masas utilizando unas soluciones de calibración tanto en ionización negativa como positiva. Adicionalmente, la fuente del electrospray fue optimizada para que con una mezcla 50:50 de la fase móvil A y B rociase/pulverizase/spray la muestra de manera estable (Temperatura del capilar: 380 °C, temperatura del calentador de la fuente; 420 °C, voltaje de la fuente, 3,5 Kv. La resolución del espectrómetro de masas fue puesta a 25.000 a modo full-scan desde 100 hasta 1800 Da, con continuos cambios entre modo positivo y negativo. La cuantificación de los lípidos se realizó utilizando el área bajo la curva (AUC) del correspondiente cromatograma iónico de alta resolución (con una ventana de ± 8 ppm) en su adecuado tiempo de retención. Para hacer el análisis semicuantitativo y corregir cualquier variación durante la extracción o debida al instrumento la AUC de cada analito se relativizó al AUC del estándar interno de dicha clase lipídica.

V.4 Determinaciones analíticas del plasma

V.4.1 Glucosa

La medición de la glucosa presente en la muestra de plasma se realizó utilizando un kit de Biosystems (Barcelona, España), Este kit contiene todas las enzimas necesarias para realizar las reacciones descritas a continuación y poder valorar la presencia de la glucosa en una muestra:



Para ello se incubaron 2 μl de la muestra con 100 μl del reactivo durante 5 minutos a 37 °C. La concentración de glucosa se determinó a partir de la absorbancia medida a 510 nm en el lector de placas ESPECTROstar Nano a la longitud de onda de 510 nm. Como calibrador se utilizó una solución de glucosa a 100 mg/dl y como blanco una muestra de agua.

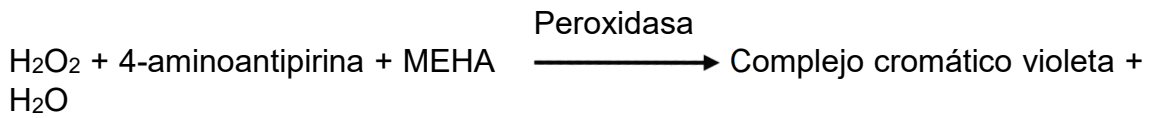
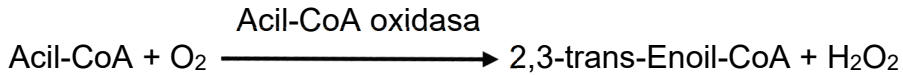
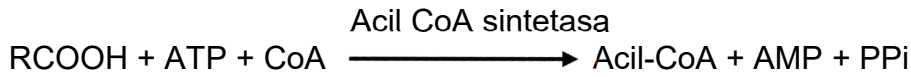
V.4.2 Triglicéridos y colesterol

Las mediciones de triglicéridos y colesterol se realizaron utilizando los kits anteriormente descritos para la medición de estas biomoléculas en el hígado. Se depositaron 2-5 μl de la dilución adecuada del plasma y 100 μl de la mezcla de reacción, se incubó 15 minutos a temperatura ambiente y se leyó la placa en el lector de placas ESPECTROstar Nano a la longitud de onda de 510 nm.

V.4.3 Ácidos grasos no esterificados (NEFA)

Los ácidos grasos no son solubles en soluciones acuosas, por ello para su transporte en suero suelen estar asociados a lipoproteínas en forma de triglicéridos. Esto sucede fundamentalmente cuando los lípidos se desplazan desde el hígado hacia el resto de tejidos. Sin embargo, también puede suceder que estos se desplacen asociados a la albúmina en forma de ácido graso no esterificado, siendo más característico de una situación en la que la movilización de lípidos desde los tejidos periféricos. Para medir este segundo transporte de

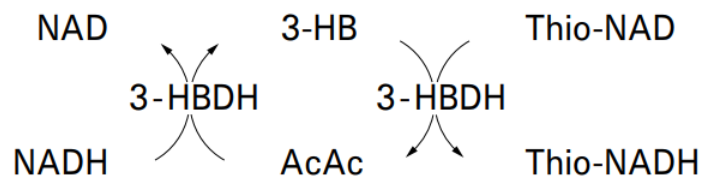
ácidos grasos se utilizó el kit comercial para la determinación de NEFA (Fujifilm Wako Chemicals Europe GMBH, Neuss, Alemania). El cual contiene todas las enzimas necesarias para llevar a cabo la conversión de los NEFA a un sustrato cuantificable mediante colorimetría:



Se incubaron 2-6 μl de plasma con 100 μl del reactivo R1 a 37 °C durante 3 minutos, transcurrida la conversión de los NEFA a acil-CoA, se le añadió 50 μl del reactivo R2 y se incubó durante 4 minutos a 37 °C. Tras esta segunda incubación todo el Acil-CoA se convirtió en un complejo cromático violeta y se procedió a medir la placa en el lector de placas ESPECTROstar Nano a la longitud de onda de 546 nm. Como calibrador se utilizó una dilución de ácido oleico a 100 mg/dl y como blanco una muestra de agua.

V.4.4 Cuerpos cetónicos

La medición de los cuerpos cetónicos plasmáticos se llevó a cabo mediante el uso del kit colorimétrico Autokit total ketone Bodies de (Fujifilm Wako Chemicals Europe). El cual determina la concentración de cuerpos cetónicos midiendo el ratio de producción de Tio-NADH mediante las siguientes reacciones catalizadas por la 3-hidroxiacetil-CoA deshidrogenasa (3-HBDH):



En cada pocillo de una placa de 96 pocillos se incubaron de 1-3 μl de plasma junto con 90 μl del reactivo R1 durante 5 minutos. Posteriormente se le

añadió 30 µl del Reactivo R2 y se volvió a incubar 5 minutos más. Finalmente, una vez transcurrida la reacción, se procedió a medir la placa en el lector de placas ESPECTROstar Nano a la longitud de onda de 405 nm. Como calibrador se utilizó una dilución de cuerpos cetónicos a 300 µM y como blanco una muestra de agua.

V.4.5 Enzimas hepáticas

Para la medición de las enzimas hepáticas ALT, ALP, AST, GGP y de la bilirrubina plasmática, una alícuota de cada una de las muestras plasmáticas fueron enviadas al laboratorio clínico del Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa (Zaragoza, Spain)

V.4.6 Separación de lipoproteínas por cromatografía líquida de filtración por gel (FPLC)

Reactivos:

- Tampón de elución de la columna PBS (NaCl 136 mM, KCl 0,2 g/l, Na₂HPO₄ 1,44 g/l y KH₂PO₄ 0,24 g/l, pH 7,4)
- Tampón de almacenamiento PBS (pH 7,4) con NaN₃ al 0,1%
- Columna cromatográfica de Superose 6B (GE Healthcare)
- Equipo de FPLC (GE Healthcare)
- Colector de fracciones (GE Healthcare)

Procedimiento:

La separación de las lipoproteínas de las muestras de plasma según su tamaño se realizó a través del FPLC. Esta técnica consiste en una columna cuya matriz permite separar los distintos solutos de una muestra en función de sus características. Para las lipoproteínas optamos por una columna cuya matriz estaba formada por pequeñas esferas de un polímero entrecruzado de agarosa, las cuales contienen unos poros por los que las moléculas de tamaño pequeño pueden entrar, teniendo que hacer un recorrido mayor hasta salir de la columna, quedando así retenidas temporalmente mientras que las moléculas mayores no pueden penetrar y son eludidas más rápidamente. La columna utilizada contenía una matriz cuyas esferas tenían unos poros de tamaño seleccionado para un rango de separación óptima de 5×10^3 – 5×10^6 de peso molecular.

La salida de las proteínas de la columna se detecta normalmente por absorción de la luz, a una longitud de onda de 280 nm. A esta longitud de onda, las proteínas absorben mucha radiación debido a la composición de sus aminoácidos, y utilizando un espectrofotómetro se pueden detectar las proteínas eluidas. Los datos se registran en un diagrama de elución indicando la posición de las proteínas que se han separado.

Para analizar el perfil lipoproteico del plasma, se cargaron 100 µl de plasma procedente de un pool de los animales de cada grupo. El volumen total de la elución fue de 21 ml, la filtración se realizó con un flujo de 0,3 ml/min y se recogieron fracciones de 0,5 ml.

V.4.6 Colesterol total y libre en las fracciones separadas por FPLC

Para la determinación de colesterol total y libre de las fracciones obtenidas por FPLC se utilizó un Kit Fluorimétrico basado en el reactivo Amplex Red.

Reactivos:

- Tampón de reacción x1 (fosfato potásico 100 mM, cloruro sódico 50 mM, ácido cólico 5 mM y Triton X-100 al 0,1%, pH 7,4)
- Enzimas: Peroxidasa de rábano (HRP) 200 U/ml, colesterol esterasa 200 U/ml y colesterol oxidasa 200 U/ml. Las dos primeras diluidas en tampón de reacción x1 y la colesterol oxidasa en tampón fosfato potásico 50 mM a pH 7.
- Amplex Red (ARr) 20 mM en DMSO.
- Agua destilada y desionizada (ADDE)

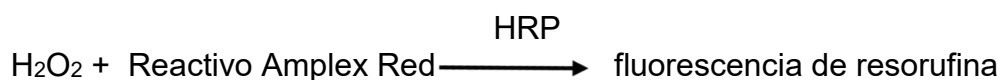
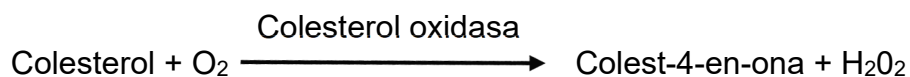
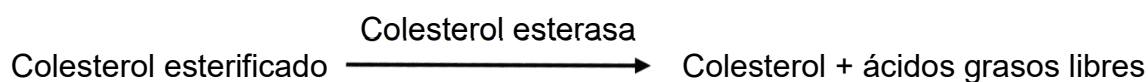
Procedimiento:

Se realizó una recta patrón de colesterol en un rango de 0,25 a 10 µM. En cada placa se cargaron por duplicado 50 µl del blanco, de los estándares de colesterol y de las muestras a la dilución óptima y 50 µl de la mezcla de reacción. La mezcla de reacción contenía HRP, colesterol esterasa y colesterol oxidasa para la medición del colesterol total y carecía de colesterol esterasa para la valoración del colesterol libre. La medición del colesterol esterificado se obtuvo mediante la diferencia entre el colesterol total y el colesterol libre. La mezcla se

formuló de acuerdo a la siguiente tabla (volúmenes para cargar una placa de 96 pocillos):

	Colesterol total	Colesterol libre
Agua ADDE	4,82 ml	4,82 ml
Tampón x1	4,82 ml	4,82 ml
Colesterol esterasa	5 µl	-
Colesterol oxidasa	50 µl	50 µl
HRP	50 µl	50 µl
Amplex Red	75 µl	75 µl

Y las reacciones que sucedieron fueron las siguientes:



Tras cargar la placa, se incubó 30 minutos a 37 °C y se midió la fluorescencia usando un filtro de excitación de 550 nm y un filtro de 595 nm para la emisión en el equipo Spectrostar OMEGA. Se corrigió la fluorescencia del blanco y el factor de dilución de la muestra y se interpoló en la recta de calibración para conocer la concentración del colesterol en cada una de las fracciones lipoproteicas obtenidas.

V.4.7 Lipidómica

Para el estudio de lipidómica de los plasmas, a 25 µl de plasma se le adicionó a 1 ml de cloroformo:metanol (2:1). Y se continuó con el mismo procedimiento que el descrito para los hígados.

V.5 Detección de proteínas

V.5.1 Extracción y cuantificación de proteínas

La extracción de las proteínas se hizo mediante homogenización del tejido en un tampón con urea 8M/tiourea 2M a pH 9. El procedimiento que se siguió consiste en la toma de una alícuota de aproximadamente 50 mg de tejido y su homogenización en 1 ml de dicho tampón mediante un ultraturrax a revoluciones bajas. Tras la destrucción del tejido, se procedió a una centrifugación a 1200 g durante 10 minutos para eliminar restos de tejidos, y se recogió el sobrenadante en otro tubo eppendorf para su cuantificación y estudio.

La cuantificación de proteínas se realizó siguiendo el protocolo basado en el método Bradford (Bradford, 1976), el cual consiste en el cambio de color del Azul Brillante de Coomasie al interaccionar con los aminoácidos aromáticos y con los residuos de arginina (490).

Para ello, se crea una recta de calibrado con el blanco y 7 puntos por duplicado con concentraciones comprendidas entre 0 y 1.00 $\mu\text{g/ml}$ de un estándar de albúmina de suero bovino (BSA). En una placa de 96 pocillos se depositaron 2 μl de muestra a la dilución oportuna, del blanco y de la recta de calibrado y 100 μl del reactivo de Bradford (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) diluido en agua 1/5, se dejó incubar la reacción durante 15 minutos a temperatura ambiente para completar la reacción y la lectura se realizó a 595 nm con el lector de placas Spectrostar Nano.

V.5.2 Análisis de proteómica dirigida (PRM)

Tras la extracción y cuantificación de proteínas, una muestra de 250 μg fue enviado a las instalaciones del servicio de proteómica de la Universidad Complutense de Madrid (Madrid, España) para la detección de proteínas mediante el método de proteómica dirigida ("PRM" Parallel Reaction Monitoring). Una vez allí, 25 μl de cada muestra se concentraron mediante un gel SDS PAGE al 4%, seguida del separador al 10% (la formulación de estos geles queda detallada en el apartado de electroforesis desnaturizante para separación de

proteínas) y se aislaron las bandas de proteína concentrada para ser digeridas con tripsina recombinante (Roche Molecular Biochemicals) en bicarbonato amónico 25 mM (pH 8,5) en un ratio 1/20 (w/w) y se incubó durante toda la noche a 37 °C. Tras extracción de péptidos con acetonitrilo (ACN) al 80%, TFA 0,1% durante 15 min, los péptidos procedentes de la digestión se desalaron y concentraron mediante cromatografía de fase reversa C18 en punta (Omix C18, Agilent technology), se secaron por centrifugación en vacío (SpeedVac, Savant) y se reconstituyeron en 30 µl de 2% ACN, ácido fórmico (AF) 0,1%, siendo congelados hasta el momento de su análisis por LC-MS.

V.5.2.1 Diseño del análisis por PRM

Para realizar un análisis por proteómica dirigida necesitamos conocer cuáles son los péptidos únicos de las proteínas de interés, que en nuestro caso eran SPP1, PAQR7, LGALS3, SMPDL3 e ISG15. Estos péptidos se buscaron utilizando una simulación de digestión con tripsina a partir de las secuencias de dichas proteínas y sus isoformas obtenidas del proteoma humano (UP000005640) y del proteoma porcino (UP000008227) descargados desde Uniprot (<http://www.uniprot.org>). Los péptidos candidatos tenían que cumplir con los siguientes criterios: ser péptidos trípticos, sin error de corte y con un mínimo de 6 y un máximo de 25 aminoácidos y su valor de m/z (siempre que la carga sea >1) comprendida entre 250 y 1500 Da.

Tras este estudio, fueron incluidos 43 péptidos únicos en el método PRM, 86 de ellos precursores, ya que los péptidos incluyen diferentes estados de carga (+2 y +3), pertenecientes a las proteínas (tr|Q9TSY3|Q9TSY3_PIG; sp|P14287|OSTP_PIG; sp|Q865K8|PAQR7_PIG; tr|A3EX84|A3EX84_PIG; sp|Q92484|ASM3A_HUMAN; sp|Q92485|ASM3B_HUMAN; tr|A0A287AB58|A0A287AB58_PIG).

V.5.2.2 Análisis por PRM

Los péptidos fueron analizados por nano-cromatografía líquida (nano Easy-nLC 1000, Thermo Fisher Scientific) acoplada a un espectrómetro de masas de alta resolución Q-Exactive HF (Thermo Fisher Scientific). La entrada

de los péptidos se realizó por ionización con electrospray utilizando la punta integrada en la columna analítica.

La adquisición de datos se realizó con un voltaje de 1,8 kV para el electrospray y el 'ion transfer tube' que guía los iones desde el spray hasta el interior del espectrómetro de masas tenía una T^a de 250 °C. Los péptidos de cada muestra fueron analizados con un método que combina la detección de forma dirigida o PRM (Parallel Reaction Monitoring) y un método Shotgun MSMS, este último con el fin de detectar otras proteínas presentes en las muestras además de las de interés.

V.5.3 Detección inmuno-específica

V.5.3.1 Western-Blot

Es una técnica analítica usada para detectar proteínas específicas en una muestra determinada, previa separación por tamaño y mediante el uso de anticuerpos marcados conjugados directa o indirectamente (491).

V.5.3.1.1 Electroforesis desnaturizante para separación de proteínas

La electroforesis es una técnica que permite diferenciar moléculas en función de su tamaño y carga eléctrica por ello es la técnica más utilizada para separar moléculas biológicas. Esta técnica aplica una corriente eléctrica continua a través de un material conductor, en el caso de las proteínas es un gel de poli-acrilamida con SDS (sodio dodecil sulfato). Logrando separar las proteínas de acuerdo a su peso molecular, de esta manera, las proteínas más ligeras recorren una mayor distancia. La resistencia que ofrece el gel dependerá del porcentaje de acrilamida del gel ya que el tamaño de poro del gel viene determinado por la proporción de acrilamida y bisacrilamida que son los que polimerizan y realizan los entrecruzamientos.

Para el presente trabajo se utilizaron dos tipos de métodos para la separación desnaturizante de proteína. El primero caracterizado por la presencia de glicina en el buffer de electroforesis, y el segundo por la presencia de tricina en su buffer de electroforesis y la adición de glicerol en los geles. Estos

segundos fueron utilizados para las proteínas cuyo peso molecular era inferior a 30 kDa (ISG15, LGALS3).

Geles de glicina

Reactivos:

- Tampón de electroforesis, Tris/HCl (pH 8,3) 25 mM, glicina 192 mM y SDS al 0,1%
- Solución de acrilamida al 30%: Acrilamida 29,2% y bisacrilamida 0,8%.
- Tampón del gel Inferior, Tris/HCl (pH 8,8) 1,39 mM, EDTA 8 mM y SDS al 0,4%.
- Tampón del gel Superior, Tris/HCl (pH 6,8) 0,45 M, EDTA 8 mM y SDS al 0,4%.
- (APS 10%: Solución de persulfato amónico al 10%.
- TEMED (N,N,N,N'-tetrametilnediamina)
- Tampón de carga, Tris/HCl (pH 6,8) 45 mM, EDTA 0,8 mM, glicerol al 10% (v/v), β -mercapto etanol (v/v) al 5%, azul de bromofenol al 0,004% y SDS al 3%.
- Marcador de pesos moleculares (Biorad).
- Isopropanol.
- Agua destilada desionizada y estéril (ADDE).

Procedimiento:

Los geles de poliacrilamida se forman debido a la polimerización de la acrilamida por acción de un agente entrecruzador ('cross-linking') la bis-acrilamida en presencia de un iniciador TEMED y un catalizador, el ión persulfato, que se añade en forma de persulfato amónico (APS). La electroforesis desnaturizante, la más común, es la que somete a las proteínas a migración asegurando la pérdida de la estructura tridimensional. El agente desnaturizante más empleado es el o SDS, un detergente que provoca la ruptura de los enlaces que mantienen la estructura de las proteínas proporcionándoles además una carga neta negativa, por lo que éstas se separan en función de su peso molecular.

Para los geles al 12% se añadieron en último lugar el TEMED y el APS al 10%, que son los responsables de la polimerización, según las siguientes cantidades:

	Gel inferior	Gel superior
Acrilamida 30%	1.95 ml	333 μ l
Tampón del gel inferior	1,25 ml	500 μ l
Agua	1,8 ml	1,2 ml
TEMED	4 μ l	7 μ l
Persulfato amónico 10%	34 μ l	20 μ l

Los geles se realizaron entre dos cristales de 10,2 x 8,1 cm de longitud con un espaciador de 0,75 mm, utilizando el sistema de Biorad Mini-Protean II. En primer lugar, se introdujo el gel inferior o separador y se añadió isopropanol para favorecer su polimerización. Posteriormente se eliminó el isopropanol, y se añadió el gel superior o concentrador, introduciéndose inmediatamente el peine adecuado donde posteriormente se cargan las muestras.

Geles de tricina

Reactivos:

- Solución de acrilamida (30%).
- Tampón del gel (Gel Buffer) (Tris/HCl 3 M y SDS al 0,3%, pH 8,45).
- Persulfato amónico al 30% (APS 30%).
- TEMED
- Glicerol
- Agua destilada desionizada y estéril (ADDE).

Procedimiento:

Los geles de tricina se realizaron al 16%, el modo de preparar los geles fue idéntico al descrito para los geles de glicina, cambiando la composición de los geles:

	Gel inferior	Gel superior
Acrilamida 30%	4 ml	333 μ l
Tampón del gel	2,5 ml	500 μ l
Agua	0,25 ml	1,2 ml
Glicerol	0,75 ml	-
TEMED	7 μ l	7 μ l
APS 30%	7 μ l	20 μ l

En cada pocillo se cargó 10-20 µg de las muestras, a las que previamente se les había añadido tampón de carga en un volumen correspondiente al 20% del volumen final de muestra para aumentar su densidad facilitando su depósito en el gel y para desnaturalizar la muestra ya que el tampón de carga contiene β-mercaptoetanol, el cual durante 20-24 horas de incubación a 4°C logra romper los puentes disulfuro.

Tampones de electroforesis:

Estos varían en función del tipo de gel elegido. En el caso de los de glicina, solo se utilizó (Tris/HCl 25 mM, glicina 192 mM y SDS al 0,1%). Mientras que en el caso de los geles de tricina se utilizaron dos, uno para el tanque del ánodo (el inferior) (Tris/HCl 2 M) y otro para el tanque del cátodo (el superior) (Tris 1M, Tricina 1M y SDS al 1%).

Para visualizar en todo momento el estado de la electroforesis y comparar el tamaño de las proteínas se utilizó un marcador coloreado de pesos moleculares (Fermentas).

V.5.2.1.2 Transferencia a membrana de PVDF, detección con anticuerpos y revelado

Reactivos:

- Tampón de transferencia Tris base 25 mM, con metanol al 10%.
- Tampón PBS (NaCl 136 mM, KCl 0,2 g/l, Na₂HPO₄ 1,44 g/l y KH₂PO₄ 0,24 g/l).
- Solución de Bloqueo: Tampón PBS (pH 7,4) con BSA al 5%.
- Solución dilución anticuerpos: Tampón PBS (pH 7,4) con BSA al 2,5% y Tween 20 al 1%.
- Solución lavados: Tampón PBS (pH 7,4) con Tween 20 al 1%.
- Anticuerpo policlonal anti LGALS3 generado en conejo (ref. 14979-1-AP, Proteintech Group, Inc., Manchester).
- Anticuerpo policlonal anti ISG15 generado en conejo (ref. 15981-1-AP, Proteintech Group).
- Anticuerpo policlonal anti PARQ7 generado en conejo (ref. HPA046936), Sigma-Merk).
- Anticuerpo monoclonal frente a ACTINA generado en conejo (ref. A2066, Sigma-Merk)
- Anticuerpo secundario de cabra anti conejo IgG (H&L) DyLight 800 (ref. SA5-35575, Thermo Fisher Scientific).

Procedimiento:

Tras la electroforesis, se realizó una transferencia semiseca de las proteínas a una membrana de PVDF (GE Healthcare) utilizando un aparato de transferencia trans-blot SD (Bio-Rad) durante 30 minutos a 20 V y a 1,5 mA/cm² de membrana.

A continuación, se procedió al bloqueo de los sitios de unión inespecíficos, introduciendo la membrana entre 1-3 horas a temperatura ambiente en la solución de bloqueo. La expresión de las proteínas de interés se evidenció diluyendo los anticuerpos primarios en PBS con BSA al 2,5% y Tween 20 al 1% a la dilución oportuna (anti-LGALS3 (1/2 000); anti-ISG15 (1/2 000) y anti-PAQR7 (1/1 000)) e incubando las membranas durante toda la noche a 4 °C y al día siguiente 2 horas a temperatura ambiente con el anticuerpo primario. Se lavaron 3 veces las membranas con PBS con Tween 20 al 0,1% (10 minutos/ lavado) y a continuación se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario diluido en PBS con BSA al 2,5% y Tween 20 al 1%. Como control de carga, se utilizó anticuerpo frente a ACTINA a la dilución 1/3000 en las mismas condiciones de incubación que las descritas para las proteínas de interés. Para la detección de LGALS3, ISG15 y PAQR7 se utilizó un anticuerpo secundario anti conejo DyLight 800 generado en cabra a una dilución 1/150.000. Después de la incubación se lavó 3 veces con PBS con Tween20 al 0,1% (10 minutos/ lavado) y tras un cuarto lavado con agua destilada se procedió a la captura de las imágenes usando el aparato Odyssey® C1x (LI-COR, Bad Homburg, Germany). Todas las incubaciones con anticuerpos descritas se realizaron con agitación moderada, mientras que los lavados se realizaron con agitación intensa.

V.5.3.2 ELISA Sandwich

El ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay) es una técnica basada en la unión específica antígeno-anticuerpo que permite a través de una recta de calibrado hacer medidas cuantitativas de una proteína de interés. Una variante del ELISA es del ELISA tipo Sandwich, en el cual encontramos una primera capa de anticuerpos o anticuerpo de captura (generalmente monoclonales) fijados en

la superficie del pocillo, posteriormente se le adiciona la muestra y se incuba, de manera que nuestras proteínas de interés se unirán a este anticuerpo. A continuación, se añade un segundo anticuerpo frente a la proteína de interés o anticuerpo de detección que reconozca un epítipo distinto al que reconoce el primer anticuerpo primario. Finalmente, se le añade un anticuerpo secundario capaz de reconocer al segundo primario, y se revela con distintos sustratos en función del marcaje del anticuerpo secundario. Este sistema permite obtener una señal proporcional a la cantidad de antígeno presente en la muestra (14).

Para este trabajo se utilizaron varios kits comerciales basados en esta técnica para detectar las siguientes proteínas: Leptina (EP0103, Finetest Wuhan, Hubei, China), Adiponectina (EP0006 Finetest), Galectina-3 (MBS7606136, Mybiosource, San Diego, CA, USA) e Insulina (EP0100, Finetest). La presencia de ISG15 en plasma también fue caracterizada mediante un ELISA tipo sándwich con el siguiente par de anticuerpos: anticuerpo de captura a la dilución 0,2 µg/ml, y anticuerpo de detección marcado con biotina a la dilución 0,25 µg/ml (MBS7041946, Mybiosource) junto con un sistema de detección basado en una peroxidasa unida a estreptavidina diluida 1/2000 (MBS2090690, Mybiosource), y el uso de tetrametilbencidina (TMB) (MBS135892, Mybiosource) como sustrato de la peroxidasa.

Tras las diversas incubaciones, la reacción se paró mediante la adición de ácido sulfúrico 2 M y las placas fueron leídas a 450 nm de absorbancia utilizando el equipo Spectrostar nano.

V.5.3.3 Multiplex

La tecnología multiplex ha surgido como una técnica capaz de medir cuantitativamente diferentes analitos simultáneamente utilizando un volumen de muestra reducido. El multiplex utilizado está basado en los principios de ELISA tipo sándwich utilizando microesferas magnéticas de diversos tamaños unidas a anticuerpos de captura frente a cada una de las proteínas de interés. Una vez unida la muestra, se adiciona el anticuerpo de detección, el cual está marcado mediante fluorescencia. Combinando 3 microsferas de distintos tamaños y tres canales de fluorescencia se pueden medir 9 analitos.

Mediante esta tecnología los siguientes analitos: IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p40, IFN- α , IFN- γ , y TNF- α fueron detectados en el plasma porcino a través de una procartaplex multiplex (EPX090-60829-901, Thermo Fisher Scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante y utilizando el analizador multiplex LABSCAN 100 IS del servicio de separación celular y citometría del Centro de Investigaciones Biomédicas de Aragón (CIBA, Zaragoza, España).

V.6 Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se llevaron a cabo mediante el software GraphPad (San Diego, CA, USA). El test de *Shapiro-Wilk* se aplicó para analizar el tipo de distribución. Cuando este rechazó la hipótesis de distribución normal de la muestra, las diferencias entre los grupos se calcularon por el test de *Mann-Whitney* para muestras no apareadas. En caso contrario, las diferencias se evaluaron por el test ANOVA de Tukey para muestras no apareadas. Asimismo, las correlaciones entre los distintos parámetros analizados se realizaron mediante el programa SPSS 15 (IBM, Amonk, NY, USA) mediante el test de Spearman para distribuciones no paramétricas. En todos los análisis estadísticos realizados en el presente trabajo el nivel de significación se estableció en un valor de probabilidad inferior a 0,05.



VI. Resultados

VI. 1 Pgc1a is responsible for the sex differences in hepatic Cidec/Fsp27 mRNA expression in hepatic steatosis of mice fed a Western diet

Abstract

Hepatic fat-specific protein 27 (*Cidec/Fsp27*) mRNA levels have been associated with hepatic lipid droplet extent under certain circumstances. To address its hepatic expression under different dietary conditions and both sexes, *ApoE*-deficient mice were subjected to different experimental conditions for 11 weeks to test the influence of cholesterol, Western diet, squalene, oleanolic acid, sex and surgical castration on *Cidec/Fsp27* mRNA expression. Dietary cholesterol increased hepatic *Cidec/Fsp27* expression, an effect that was suppressed when cholesterol was combined with saturated fat as represented by Western-diet feeding. Using the latter diet, oleanolic acid or squalene did not modify its expression. Females showed lower levels of hepatic *Cidec/Fsp27* expression than males when they were fed Western diets. A result also confirmed in *Ldlr*-deficient mice and in AML12 cells incubated with estradiol. While male surgical castration did not modify the expression, ovariectomized females did show increased levels compared to control females. Females also showed increased expression of *Pgc1a*, suppressed by ovariectomy, and the values were significantly and inversely associated with those of *Cidec/Fsp27*. When *Pgc1a*-deficient mice were used, the sex-differences on *Cidec/Fsp27* expression disappeared. Therefore, hepatic *Cidec/Fsp27* expression has a complex regulation influenced by diet and sex hormonal milieu. The sex differences are controlled by *Pgc1a*.

Keywords: Lipids/liver, lipid droplets, animal models, gene expression, non-alcoholic fatty liver disease *Cidec/Fsp27*, *Pgc1a*, apolipoprotein E deficient mice, high-fat diet, sex.

Abbreviations: AML12, American murine liver 12; ApoE, apolipoprotein E; BAT, brown adipose tissue; Cide, Cell-death-inducing DNA fragmentation effector (CIDE); Crebh, Factor cyclic-AMP-responsive-element-binding protein H; CRTC2, CREB regulated transcription coactivator 2; Fsp27, fat specific protein 27; LXR, liver X receptor; LD, lipid droplet; Ldlr, ldl receptor; Pgc1a, PPAR coactivator alpha; PKA, protein kinase A; PPAR, peroxisomal proliferator; Prka2, PALM2 and AKAP2 fusion gene; SREBP1c, sterol regulatory element binding protein 1c; TAK1/TR4/NR2C2, nuclear orphan receptor subfamily 2 group C member 2; TNF α , Tumor necrosis factor alpha; and WD, western diet.

1. Introduction

Fat-specific protein 27 (*FSP27*) gene encodes a protein of 27 kDa with 238 amino acids, belonging to the cell-death-inducing DNA fragmentation effector (CIDE) family, composed of CIDEA, CIDEB, and CIDE/CIDE-3/*FSP27*, all of which contain a conserved CIDE N-domain and a unique C-terminal domain. *Cidec/Fsp27* is expressed at high levels in white adipose tissue (1). By

alternative splicing in HepG2, *CIDE-3* gene displays two transcripts, *CIDE-3* and *CIDE-3alpha*. While *CIDE-3* comprises a full-length open reading frame, *CIDE-3alpha* encodes a truncated protein (2). In the liver, a third transcript, *FSP27beta*, which contains 10 additional amino acids at the N-terminus of the original protein and is activated through the liver-enriched transcription factor cyclic-AMP-responsive-element-binding protein H (CREBH) but not by peroxisome proliferator-activated receptor gamma, has been described (3, 4). In this organ, *CIDE/CIDE-3/FSP27* contributes to triglyceride accumulation both in humans and pigs (5) and to the regulation of lipitation and maturation of very low-density lipoproteins (6). It is localized to lipid droplets (LD) and endoplasmic reticulum (7). The latter participates in the regulation of LD formation, expansion, and morphology under lipid-deficient conditions (8). To promote the formation of a unilocular droplet, the formation a ternary complex of AS160, the GTPase activating protein for RAB8a, *FSP27* and RAB8a is required (9).

Fsp27-deficient mice show increased energy expenditure and lower levels of plasma triglycerides and free fatty acids (10). Only when they are crossed with leptin-deficient mice or BATless mice, or are fed them a high-fat diet, hepatic steatosis and insulin resistance are observed. Therefore, *Fsp27* deficiency requires further implication of genes to display hepatic insulin resistance (11, 12). In contrast, mice with adipocyte-specific disruption of the *Fsp27* gene upon high-fat diet feeding are resistant to weight gain and fat-storing. This results in a lipid overflow from adipose tissue that generates hepatosteatosis, dyslipidemia, and systemic insulin resistance pointing out a role for this adipocyte protein to prevent lipodystrophies (13). An increased expression of *Cidec* has been found in a number of experimental or pathological conditions, such as in endoplasmic reticulum stress (14), spontaneous mouse insulin resistance (15) and hepatocellular carcinoma cells (16). Similar effects have been described in liver steatosis and in obese humans (17), being the latter increase reduced by weight loss (18). A homozygous human mutation of CIDEA has been reported to induce

lipodystrophy and insulin-resistant diabetes (19, 20). Reduced expression of hepatic *Fsp27* abolished fasting-induced liver steatosis (21) and the former condition in combination with a PPARalpha agonist was also found to reduce hepatic steatosis (22) and even atherosclerosis (23) in *Ldlr*-deficient mice, a model of atherosclerosis and hepatosteatosis (24).

The expression of CIDEA is controlled at both transcriptional and posttranslational levels (17, 25). Different molecules seem to be involved in its expression, such as CD44 (26) or osteopontin, whose absences decrease its levels (27), while leptin absence displays the opposite (28). Ceramide (29) and TNF-alpha reduced its expression while insulin upregulated it. In the latter response, the activity of phosphatidylinositol 3-kinase was involved (30), so was the phosphatase and tensin homologue, an enzyme involved in degradation of phosphorylated phosphatidylinositol (31). Final effectors of these signaling pathways seem to be nuclear receptors such as TAK1/TR4/NR2C2, RORalpha and

PPARalpha, nuclear proteins (CAAT-enhancer-binding proteins), LXR α and SREBP-1c (21, 32-36). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma2 (PPARgamma2) also plays a role (37). Posttranslational regulation of FSP27 involves stability through the proteasomal ubiquitin-dependent protein catabolic process (38), glycosylation (39) and acetylation (40).

A complex physiological regulation of CIDEC seems to exist, in which fasting and diet composition play important roles. In this regard, during the initial stages of fasting, *Fsp27* expression has been found dramatically increased by involvement of the PKA-CREB-CRTC2 signaling pathway (41). The fasting effect was not present in PPARalpha-deficient mice (42). However, after a long period of fasting, a decrease in *Fsp27* expression was observed (41). Despite the observed hepatic steatosis after a choline-deficient diet, no changes were observed for *Fsp27* (42). Nevertheless, a marked induction of its expression was found in the high-fat- or methionine- and choline-deficient diet-induced fatty

liver, but not in alcohol-induced fatty liver. The induction of *Fsp27* mRNA was independent of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) levels and completely absent in the liver from PPARgamma-deficient mice (43). In less extreme dietary conditions, it has been reported that a high fat diet increased *Fsp27* expression through activation of PPARgamma (44). In vitro, a high supply of fatty acids stimulated hepatic expression (8). Using *ApoE*-deficient mice as a model of spontaneous hepatosteatosis, nature of fatty acids was important to increase its expression in these mice fed a Western-type diet enriched with linoleic acid isomers since only those mice receiving trans-10, cis-12-conjugated linoleic acid showed this effect. Furthermore, consuming olive oil-enriched diet reduced *Fsp27* expression (45). In addition, only one study has addressed the influence of sex on its expression in young mice (46). Growth hormone has also found to regulate this protein (47, 48). Therefore, influence of sex may be different in adult mice. Based on these facts, it was hypothesized that *Fsp27* hepatic regulation might be complex. To this end, the present

work was undertaken to characterize the influence of different dietary conditions and sex on *Fsp27* gene expression in adult liver of several animal models.

1. Material and methods

Animals: Charles River (Charles River Laboratories, Barcelona, Spain) was the source of *Apoe*-deficient mice on the C57BL/6J genetic background. Dr. Nobuyo Maeda (University of North Carolina at Chapel Hill, NC, USA) generously provided these mice on the C57BL/6JxOla129 genetic background. *Ldlr*-deficient mice on the C57BL/6J.SJL genetic background were obtained from Dr. Vicente Andrés from CNIC, (Madrid, Spain). C57BL/6J wild-type and *Pgc1a*-deficient mice were part of a colony established at the IIB animal facility (Madrid) and originally derived from mice provided by Dr. Bruce Spiegelman (DFCI, Boston, USA). Wistar rats were obtained from Charles River (Charles River Laboratories, Barcelona, Spain).

For all experiments, two-month-old mice were used. Blood samples were taken (after four-hour fasting) from the facial vein to determine plasma cholesterol and accordingly

establish groups with similar initial values. Animals, housed in sterile filter-top cages, were maintained under a 12-h light/12-h dark cycle at the CIBA, Universidad de Zaragoza. *Pgc1a*-deficient mice were maintained at Autónoma Universidad de Madrid. Wistar rats were maintained at Universidad de Córdoba. Animals were handled and killed observing guidelines (Directive 2010/63/UE) from the European Union for care and use of laboratory animals in research. All had ad libitum access to food and water and study protocols were approved by the Ethics Committees for Animal Research of the Universities of Zaragoza, Madrid and Córdoba. After the diet intervention, and four-hour fast, the animals were killed by suffocation with CO₂. The livers were removed, weighed, frozen in liquid nitrogen, and stored at – 80 °C until analysis.

Experimental design: Table S1 shows a summary of all experiments. In *Apoe*-deficient mice, the effects on *Cidec/Fsp27* expression of dietary cholesterol, Western diet, oleanolic acid, squalene, sex, interaction of sex and diet and surgical castration were

studied. Detailed composition of purified diets are shown in Table S2. The sex-differences were also tested in *Ldlr*- or *Pgc1*-deficient mice on C57BL/6J genetic background fed a purified Western diet. A confirmation of the effects of ovariectomization on *Cidec/Fsp27* expression was carried out in female Wistar rats fed a Western diet.

Isolation and quantification of hepatic RNA: RNA was isolated using Tri-reagent (Ambion, Austin, TX, USA). Contaminant DNA was removed using the DNA removal kit from Ambion. Absorbance at $A_{260/280}$ served to quantify RNA concentrations and the ratio 28S/18S ribosomal RNAs used to estimate their quality. Changes in mRNA expression were determined by RT-qPCR. cDNA synthesis was carried out using the First Strand synthesis kit (Thermo Scientific, Madrid, Spain). The Sybr Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA) was used to analyze gene expression by qPCR. Specific primers, designed and checked as previously described (49) were purchased from Applied Biosystems. Sequences are shown in Table S3. RT-qPCR reactions were performed

on a Step One Real Time PCR System (Applied Biosystems) following the standard procedure and using equal amounts of DNA-free RNA from each animal. The relative amount of all mRNAs was calculated using the comparative $2^{-\Delta\Delta Cq}$ method and *Cyclophilin B (Pipb)* mRNA expression as the reference gene.

Liver histology analysis:

Aliquots of liver, stored in neutral formaldehyde, were used and processed as described (50).

Hepatic homogenate

preparation: A piece of liver was homogenized in homogenization buffer (Phosphate buffered solution with protease inhibitor cocktail, Roche) and used to estimate protein concentration by the BioRad dye binding assay (BioRad, Madrid, Spain).

Hepatic lipid extraction:

Extracted lipids according to Folch's method (51) were evaporated under N_2 stream and dissolved in 100 μ L of isopropanol. Infinity kits (Thermo Scientific) were used to measure total cholesterol and triglycerides.

AML12 cell culture:

The murine hepatocyte cell line was grown in a humidified atmosphere of

5% CO₂ at 37°C in Dulbecco's modified Eagle's minimum essential medium (DMEM) (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA): F12-Ham's medium (GE Healthcare Life Science, South Logan, Utah) in 1:1 ratio supplemented with 10% foetal bovine serum (ThermoFisher Scientific), 1:500 insulin/transferrin/selenium (Corning, Bedford, MA, USA), 40 ng/ml dexamethasone (Sigma-Aldrich; Merck Millipore, Darmstadt,

Germany) 1% nonessential amino acids (ThermoFisher Scientific), 1% penicillin (1000 U/ml) (ThermoFisher Scientific), 1% streptomycin (1000 mg/ml) (ThermoFisher Scientific) and 4 mM L-glutamine (ThermoFisher Scientific) in a 6 multiwell plate (in triplicate). Medium was changed every two days. After one week of growth, this medium was removed, and cells were washed twice with phosphate buffered saline (PBS) prior to the addition of the serum-free

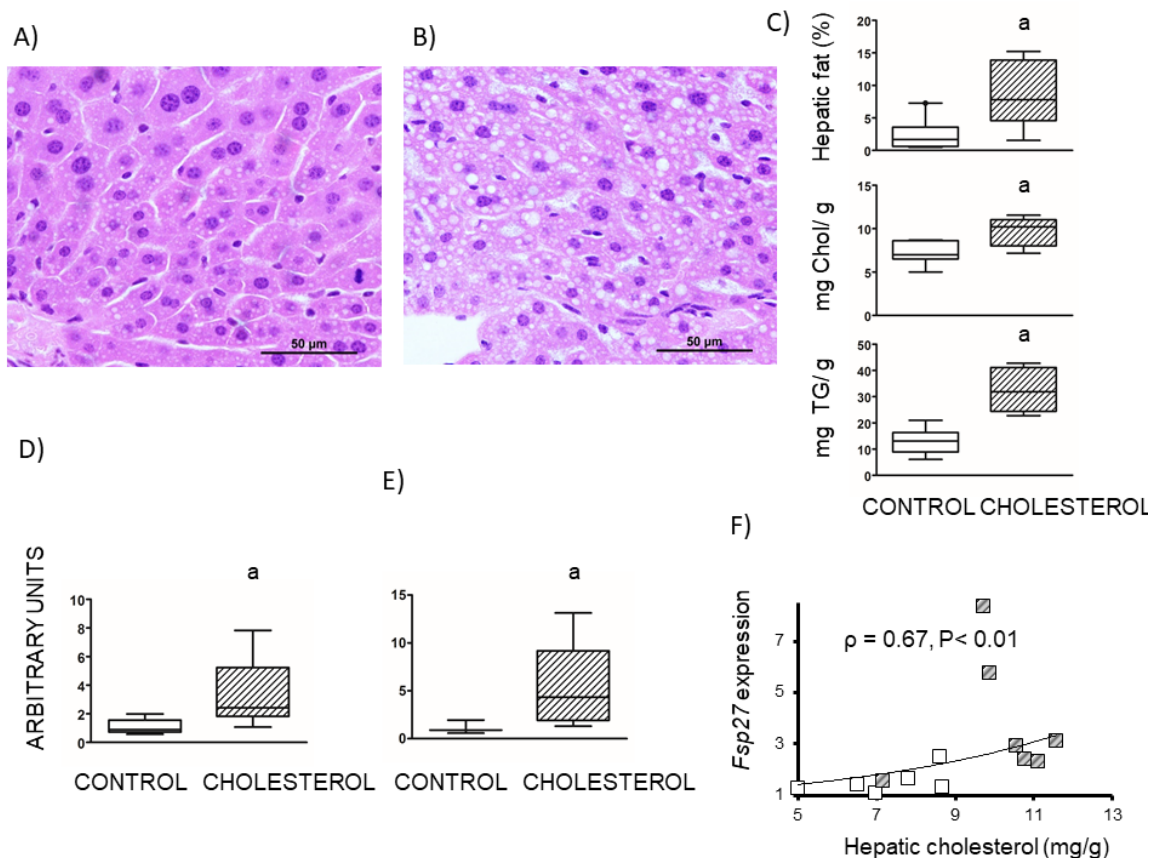


Figure 1. Effect of dietary cholesterol on hepatic steatosis and *Cidec/Fsp27* expression in male *Apoe*-deficient mice. Representative liver micrographs at x600 magnification from *Apoe*-deficient mice consuming the chow (A) and cholesterol-enriched (B) diets. Morphometric evaluation of surface of liver section occupied by fat, total cholesterol and triglyceride contents (C). Hepatic *Cidec/Fsp27* and *Fsp27B* expressions determined by RT-qPCR normalized to *Cyclophilin B* (D and E, respectively). Data are medians and 10-90 percentile range for control (n=7) and cholesterol (n=7) groups. Statistical analyses were done according to Mann-Whitney's U test. a, P < 0.05 vs control. Association between hepatic cholesterol content and *Cidec/Fsp27* expression (F). Open squares correspond to control and striped squares to cholesterol-fed mice. Spearman's correlation is shown.

media supplemented with 200 μ M stearic acid for 24 hours or 200 μ M stearic acid for 24 hours and 50 nM estradiol dissolved in ethanol for 6 hours. Then, media were removed and cells collected with Tri-reagent solution (Ambion). RNA isolation and cDNA synthesis were performed as above described.

Statistical analysis: The Statistical Package for Social Sciences version 15 (SPSS, Chicago, IL, USA) or Prism 5 for windows software for Windows (GraphPad, S. Diego, CA, USA) were used for statistical analyses. Variables, not showing normal distribution (according to the Shapiro-Wilk's test), or homology of variance, were analyzed with the Mann-Whitney's U test. Data are shown as medians and 10-90 percentile range of the values. Correlations between variables were tested using the Spearman's correlation test. The statistical significance was considered when $p < 0.05$.

2. Results

Dietary fat and hepatic *Cidec/Fsp27* expression in Apoe-deficient mice.

To characterize the dietary regulation of the expression of this gene in mice, the supplement of dietary cholesterol to male mice was tested. Increased hepatic surface occupied by lipid droplets as well as hepatic total cholesterol and triglyceride contents (Figure 1a, b and c) was observed following dietary cholesterol supplementation. The latter induced a significant increase in the hepatic *Cidec/Fsp27* expression as shown in Figure 1d.

When using primers specific to analyze *Fsp27 β* isoform, the observed increase corresponded to this transcript (Figure 1e). Accordingly, no expression of *Fsp27 α* was detected (data not shown). Correlation analyses between both transcripts reached a $\rho = 0.93$ ($P < 0.000$). Hepatic cholesterol content was associated with hepatic *Cidec/Fsp27* expression (Figure 1f).

In a second study, the influence of a Western diet (WD), containing cholesterol and palm oil as source of saturated fat, was explored in male *Apoe*-deficient mice on C57BL/6J genetic background (Figure 2). Significant increased hepatic areas

occupied by lipid droplets (Figure 2a, b and c) as well as hepatic total cholesterol and triglyceride contents were also observed in mice on the Western diet. Unexpectedly, a significant decrease of hepatic *Cidec/Fsp27* expression was found (Figure 2d). expression was inversely associated with hepatic cholesterol (Figure 2e).

To further explore this dissociation between hepatic

Cidec/Fsp27 and Western diet, its expression was tested in two dietary components that had been shown to influence dietary droplets without altering lipid content (oleanolic acid) or viceversa (squalene). In the first experiment and as expected, male mice receiving an oleanolic acid-enriched WD showed an increase in the hepatic area occupied by lipid droplets (Figure S1a, b and c) without changes in hepatic (Figure S1c). In these conditions, no

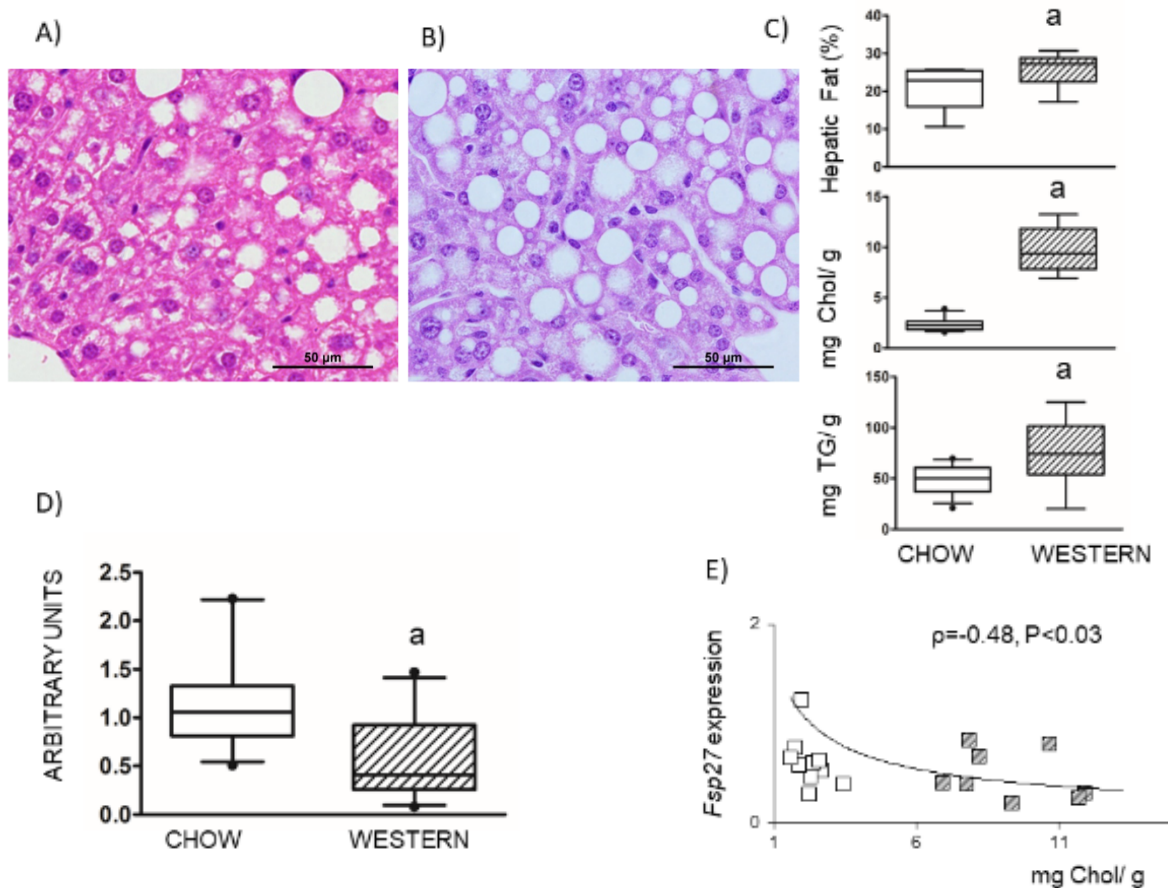


Figure 2. Effect of Western diet on hepatic steatosis and *Cidec/Fsp27* expression in male *Apoe*-deficient mice. Representative liver micrographs at x600 magnification from *Apoe*-deficient mice consuming the chow (A) and Western (B) diets. Morphometric evaluation of surface of hepatocyte occupied by fat and hepatic total cholesterol and triglyceride contents (C). Analysis of hepatic *Cidec/Fsp27* expression determined by RT-qPCR normalized to Cyclophilin B (D). Data are medians and 10-90 percentile range for chow (n=13) and Western (n=9) groups. Statistical analyses were done according to Mann-Whitney's U test. a, $P < 0.05$ vs chow. Association between hepatic cholesterol content and *Cidec/Fsp27* expression (E). Spearman's correlation is shown. Open squares correspond to control and striped squares to Western-fed mice.

significant change was observed for hepatic *Cidec/Fsp27* expression (Figure S1d). In the second experiment, the effect of a squalene-enriched WD was explored, again in males. No significant changes were noted for the percentage of hepatic surface occupied by lipid droplets despite the decreased liver cholesterol and triglyceride contents (Figure S2a, b and c). Nor was there any significant change in the hepatic *Cidec/Fsp27* expression by squalene

(Figure S2e). Overall, these nutritional experiments emphasize that hepatic *Cidec/Fsp27* expression possesses a fine nutritional regulation at transcriptional level in *ApoE*-deficient mice, where cholesterol increased its levels and saturated fat reverted this finding, being the latter not influenced by minor dietary components, such as oleonic acid or squalene, despite the changes in hepatic lipids.

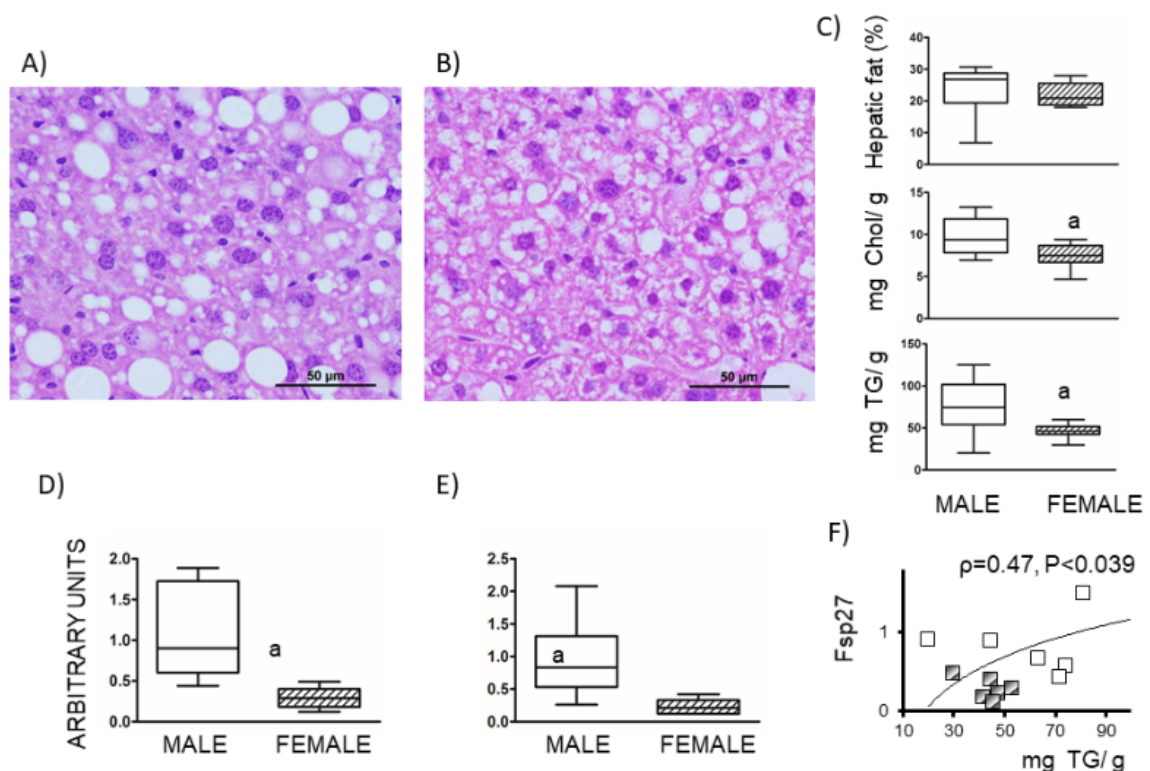


Figure 3. Effect of sex on hepatic steatosis and *Cidec/Fsp27* expression in *ApoE*-deficient mice fed on a Western diet. Representative liver micrographs at x600 magnification from male (A) and female (B) *ApoE*-deficient mice consuming Western diets. Morphometric evaluation of surface of hepatocyte occupied by fat and hepatic total cholesterol and triglyceride contents (C). Analysis of hepatic *Cidec/Fsp27* expression was determined by RT-qPCR normalized to *Cyclophilin B* (D). Hepatic expression of *Fsp27beta* normalized to *Cyclophilin B* (E). Data are medians and 10-90 percentile range for male (n=9) and female (n=10) groups. Statistical analyses were done according to Mann-Whitney's U test. ^a, P< 0.05 vs male. Relationship between hepatic triglyceride content and *Cidec/Fsp27* gene expression (F). Open squares correspond to males and striped squares to females. Correlations were calculated according to Spearman's test.

Hepatic Cidec/Fsp27 expression is influenced by sex hormones in *Apoe*-deficient mice and in vitro.

The influence of sex on *Cidec/Fsp27* expression was explored in *Apoe*-deficient mice on a chow diet of low fat content. As females showed lower surface occupied by lipid droplets despite a significant increase in hepatic cholesterol content and no changes

in triglycerides. In this experiment, no significant changes were observed in hepatic *Cidec/Fsp27* between sexes. In the second experiment, the differences between sexes were explored when both groups received a WD. As shown in Figure 3a, b and c, no significant change was observed in the percentage of liver surface occupied by lipid droplets. However, the levels of hepatic total cholesterol and triglycerides were

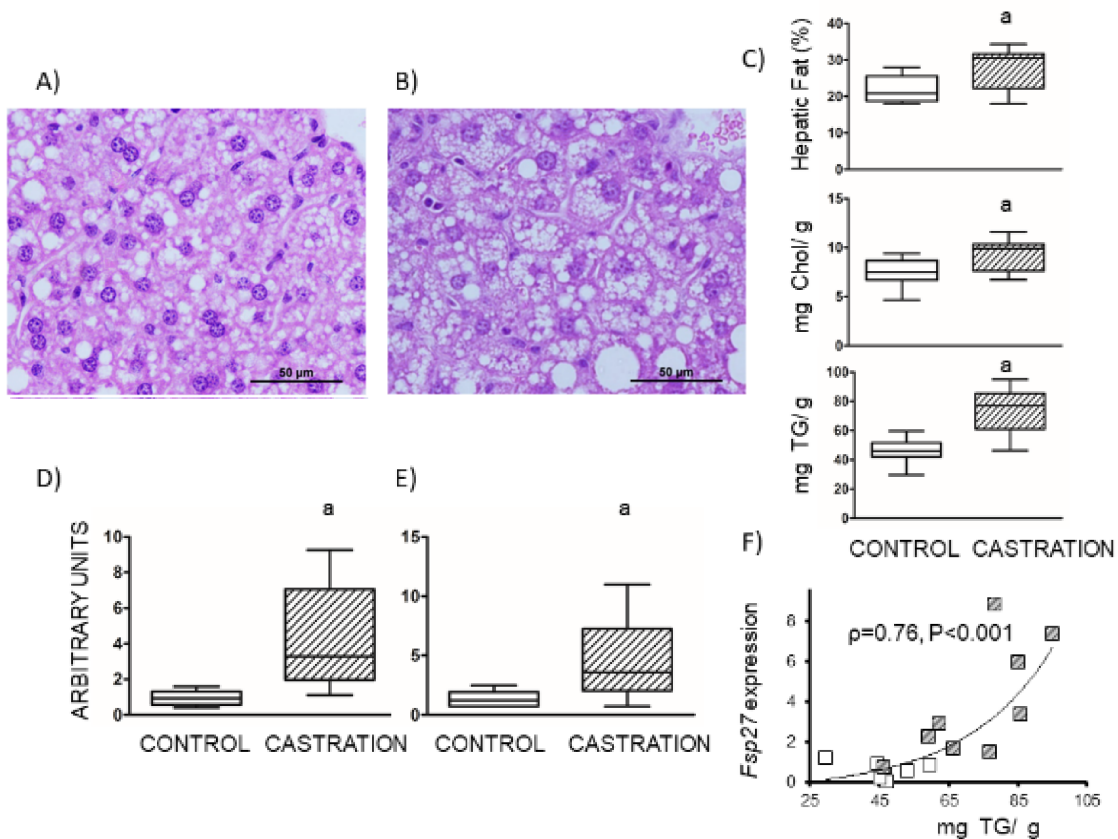


Figure 4. Effect of ovariectomy on hepatic steatosis and *Cidec/Fsp27* expression in female *Apoe*-deficient mice fed on a Western diet. Representative liver micrographs at x600 magnification from control (A) and surgically castrated (B) female *Apoe*-deficient mice consuming Western diets. Morphometric evaluation of surface of hepatocyte occupied by fat and hepatic total cholesterol and triglyceride contents (C). Analysis of hepatic *Cidec/Fsp27* expression determined by RT-qPCR normalized to Cyclophilin B (D). Hepatic expression of *Fsp27beta* normalized to Cyclophilin B (E). Data are medians and 10-90 percentile range for control (n=9) and castrated (n=9) groups. Statistical analyses were done according to Mann-Whitney's U test. a, $P < 0.05$ vs control. Relationship between hepatic triglyceride content and *Cidec/Fsp27* gene expression (F). Open squares correspond to control and striped squares to ovariectomized females. Correlations were calculated according to Spearman's test.

significantly lower in females than in males. In this experimental approach, females showed significantly decreased hepatic *Cidec/Fsp27* and *Fsp27beta* expressions (Figure 3d and e). These data indicate that sex is playing an important role in hepatic *Cidec/Fsp27* expression in the presence of WD.

The involvement of hormonal changes on sex-differences was

characterized in *Apoe*-deficient mice of both sexes that underwent surgical removal of gonads and were fed a purified Western diet. As shown in Figure S4, no significant change in *Cidec/Fsp27* expression was observed in orchietomized males; nor was there any significant change in hepatic total cholesterol, or in hepatic triglycerides. However, there was a significant increase in the liver surface occupied by lipid droplets in orchietomized males. A significant

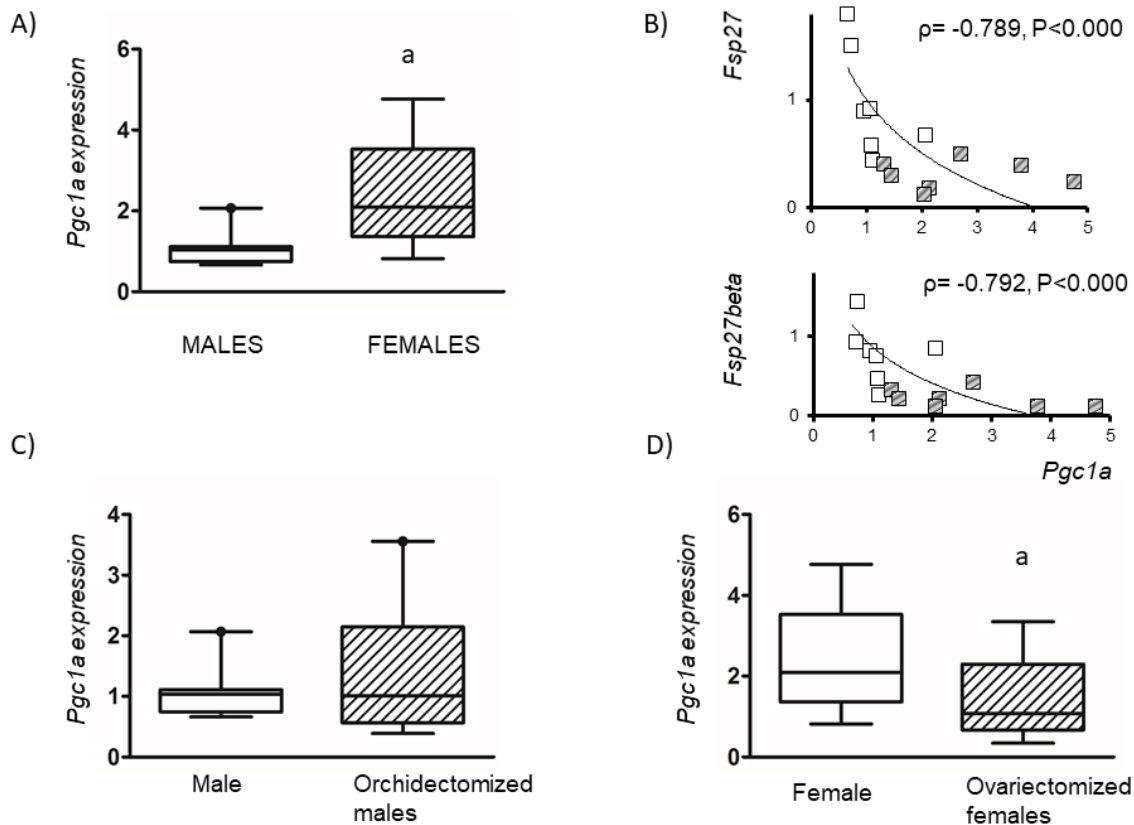


Figure 5. Effect of sex and castration on hepatic *Pparg1a/Pgc1a* expression in *Apoe*-deficient mice fed on a Western diet. Influence of sex in *Apoe*-deficient mice (A). Relationship among *Cidec/Fsp27*, *Fsp27beta* and *Pgc1a* gene expression levels (B). Open squares correspond to males and striped squares to females. Correlations were calculated according to Spearman's test. Effect of orchietomy on hepatic *Pgc1a* expression in male *Apoe*-deficient mice (C). Effect of ovariectomy on *Pgc1a* expression in female *Apoe*-deficient mice (D). Analysis of hepatic *Pgc1a* expression was determined by RT-qPCR normalized to Cyclophilin B. Data are medians and 10-90 percentile range for each group. Statistical analyses were done according to Mann-Whitney's U test. a, $P < 0.05$ vs control.

association was obtained between *Cidec/Fsp27* expression and surface of lipid droplets (Figure S4f). In contrast, ovariectomized females (Figure 4d and e) showed a significant increase in *Cidec/Fsp27* and *Fsp27β* expressions compared to control females. Ovariectomy resulted in significant increases in hepatic cholesterol, triglycerides, and in the surface occupied by lipid droplets. A positive significant

association was also found between hepatic *Cidec/Fsp27* values and those of hepatic triglycerides (Figure 4f). These results indicate that ovarian hormones are responsible for the decreased hepatic *Cidec/Fsp27* expression observed in females consuming WD. In fact, incubation of stearic-stimulated hepatic AML12 cells with estradiol resulted in a significant decrease in *Cidec/Fsp27* expression (Figure S5).

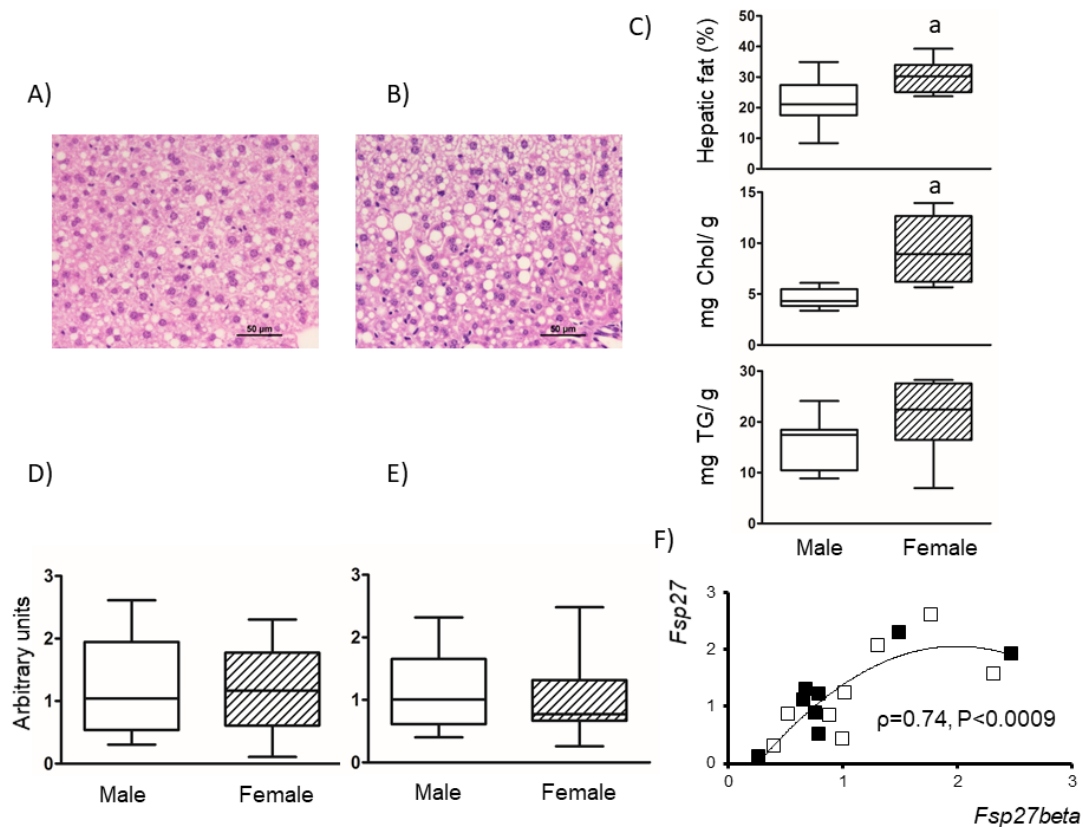


Figure 6. Effect of sex on hepatic steatosis and *Cidec/Fsp27* expression in *Pgc1a*-deficient mice fed on a Western diet. Representative liver micrographs at x400 magnification from male (A) and female (B) *Pgc1a*-deficient mice consuming Western diets. Morphometric evaluation of surface of hepatocytes occupied by fat and hepatic total cholesterol and triglyceride contents (C). Analysis of hepatic *Cidec/Fsp27* expression was determined by RT-qPCR normalized to Cyclophilin B (D). Hepatic expression of *Fsp27beta* normalized to Cyclophilin B (E). Data are medians and 10-90 percentile range for male (n=8) and female (n=8) groups. Statistical analyses were done according to Mann-Whitney's U test. a, $P<0.05$ vs male. Relationship between *Cidec/Fsp27* and *Fsp27β* gene expression levels (F). Open squares correspond to males and black squares to females. Correlations were calculated according to Spearman's test.

Pgc1a is involved in hepatic Cidec/Fsp27 expression sex differences in vivo.

PKA and PPAR have been described in the regulation of hepatic *Cidec/Fsp27* expression (21, 32-36). To verify whether or not those agents were involved in the observed sex-dependent responses, hepatic *Prka2* expression was determined and no significant changes were observed (data not shown). Regarding PPARgamma, the hepatic expression of its regulator, *Pgc1a*, was significantly increased in females compared to males consuming the Western diet (Figure 5a) and an inverse significant relationship was found between *Cidec/Fsp27* expression and that of *Pgc1a* in both sexes (Figure 5b). While orchietomy had no effect on *Pgc1a* expression (Figure 5c), ovariectomy induced a significant decrease in its expression in *ApoE*-deficient females (Figure 5d). Likewise, ovariectomized female rats also showed a trend to increase *Cidec/Fsp27* expression (Figure SS6e) and decreased hepatic *Pgc1a* expression (Figure S6f). Both effects were even more pronounced in rats neonatally androgenized by

testosterone administration and then ovariectomized. In this model, hepatic fat, cholesterol and TG contents followed a similar pattern (Figure S6d) and *Cidec/Fsp27* expression was associated with hepatic TG content (Figure S6g). The sex differences in *Cidec/Fsp27* expression were observed *Ldlr*-deficient fed on WD as well. As shown in Supplementary Figure 7d and e, female mice showed significantly lower levels of hepatic *Cidec/Fsp27* expression and this corresponded to a decrease in *Fsp27b*. Concomitantly, a significant increase in *Pgc1a* was observed in these female mice (Figure S7f). Overall, these findings are suggestive of an inverse association between *Cidec/Fsp27* and *Pgc1a* expressions as a general response, independent of absence of APOE.

According to this association, it was hypothesized that sex-differences in hepatic *Cidec/Fsp27* would be abolished in the absence of *Pgc1a*. To test this hypothesis, *Pgc1a*-deficient mice from both sexes were fed WD. In this model, female mice increased hepatic fat area, total cholesterol and TG contents (Figure 6a, b, c). As shown

in Figure 6d and e, no differences were observed in hepatic *Cidec/Fsp27* and *Fs27b* expressions between sexes when using homozygous *Pgc1a*-deficient mice. These results provide further support to the *in vivo* involvement of *Pgc1a* in the female decrease of hepatic *Fsp27b* expression in response to WD.

3. Discussion

The present work explores the putative hepatic *Cidec/Fsp27* transcriptional changes induced by dietary components and sex. Using *Apoe*-deficient mouse as a model of hepatic steatosis, dietary cholesterol increased hepatic *Cidec/Fsp27*, which was repressed when combined with saturated fat. The latter was not influenced by dietary minor components such as oleanolic acid or squalene administered at pharmacological doses. Moreover, our study revealed a previously unnoticed sex regulation dependent on the prevailing diet, being the female sex a negative regulator. An effect observed in two models of genetic hepatic steatosis (*Apoe*- and *Ldlr*-deficient mice). Using ovariectomized females, it was shown that ovarian hormones are

crucial for the observed decrease in *Cidec/Fsp27* expression noted in *Apoe*-deficient mice. This effect was also observed in Wistar female rats. An increased expression of *Pgc1a* inversely associated with that of *Cidec/Fsp27* and the lack of such effect after ovariectomy in *Apoe*-deficient mice allow us to infer that ovarian hormones are executing their action through *Pgc1a*. This was confirmed in mice lacking *Pgc1a* where the sex differences on hepatic *Cidec/Fsp27* were erased providing further *in vivo* support for this role.

The present work has explored the influence of two main components of Western diet, cholesterol and saturated fat. Using the first dietary component, an increase in the expression of this gene was noted. The increase corresponded to *Fsp27beta*, a recently described isoform of the protein regulated by CREBH (3). Using information from ENCODE, it was observed that both SREBP1 and 2 bind to this gene (52). Recently, the involvement of SREBP-1c has been proved (36). Surprisingly, the combination of cholesterol and saturated diet decreased hepatic *Cidec/Fsp27* expression. In this

regard, variable effects of high fat diets have been described depending on the length of fat administration (53). While a short-term administration (3 weeks) increased the expression, a long-term administration of 12 weeks had the opposite effect. In this sense, our study lasted 11 weeks and would be in agreement with the latter finding. Similar results were observed in *Apoe*-deficient mouse males receiving an olive oil-enriched diet (45). Likewise, a decreased expression was found in a postprandial regimen after a virgin olive oil bolus in male Wistar rats and this decrease was inversely associated with hepatic triglyceride and cholesterol contents (54). In the latter case, the hepatic mRNA changes occurred just 4 hours after fat intake. In fasting rats, a rapid increase was equally observed four hours after its start (41). Elevations of *Cidec/Fsp27* mRNA expression by high fat diets required additional dietary deficiencies such those of methionine and choline (Table S4) or under certain metabolic derangements such as those posed by Db mice, PPAR- α -deficient mice (Table S4). In a previous study, using *Apoe*-deficient mice with

C57BL/6JxOla129 genetic background and fed Western diets with different conjugated linoleic acid (CLA) isomers, we observed high hepatic *Cidec/Fsp27* mRNA expression in those mice receiving the trans-10,cis-12 CLA isomer and the levels were associated with the hepatic surface occupied by lipid droplets. In contrast, when the cis-9, trans-11 CLA isomer was provided resulted in decreased *Cidec/Fsp27* mRNA expression (45). Overall, regimen of administration and nutritional components are critical modulators of hepatic *Cidec/Fsp27* expression and this mRNA undergoes a rapid metabolic variation in few hours.

In the present study, the intake of oleanolic acid, a pentacyclic triterpene, and squalene, a lineal triterpene, had no effect on *Cidec/Fsp27* expression despite the changes induced in lipid droplet area (55). Similar finding was reported by the administration of a dietary supplement of *Boswellia serrata*, an extract rich in particular derivatives of boswellic acid, also a pentacyclic triterpene-based compound (56). As triterpenes tend to accumulate in the liver altering distribution of

triglycerides in lipid droplets (57, 58), it could be hypothesized that those lipid droplets would not need changes in *Cidec/Fsp27* expression or these are not executed at the mRNA level.

In a previous study, we observed that hepatic *Cidec/Fsp27* gene expression was significantly associated with hepatic steatosis in *Apoe*-deficient mice fed different conjugated linoleic acid isomers, in *Cbs*-deficient mice and in olive oil-fed *Apoe*-deficient mice (45). When this association has been searched for in the present study, it was only observed in the study of castration in males (Supplementary Figure 4). Notably, *Cidec/Fsp27* expression was associated with hepatic triglyceride (Figures 3 and 4) or cholesterol contents (Figures 1 and 2). The genetic background and the diet composition are main differences between the previous and the current study. The former one used Ola129xC57BL/6J mixed genetic background mice while the present study has been carried out using C57BL/6J mice. Due to both strains do have important differences in hepatic fat content (59), the experimental setting may have

influenced the outcome. The second aspect is the use of AIN-93 purified diet (60) in the present study compared to commercial ones in the previous one. This choice was forced by the high variability noted in our lab among control mice for years in atherosclerotic lesions when using commercial chows and the failure of obtaining the same batch throughout years. Indeed, source of protein has also been shown to induce changes in *Cidec/Fsp27* expression (61, 62). By and large, dietary components are an important source of variation (24), and our current study, in well-defined conditions of mouse strains and purified diets, adds further evidence supporting this contention.

A striking result observed in this work was the decreased hepatic *Cidec/Fsp27* expression in female mice consuming WD in *Apoe*- and in *Ldlr*-deficient mice. An effect that was abolished when ovariectomy was performed in *Apoe*-deficient mice and Wistar rats. Interestingly, female mice lacking steroid receptor coactivator-2 showed increased hepatic expression of this gene (Table S4). Steroid receptor coactivator-2 promotes the transcriptional activation of estrogen

receptor in some tissues (63). These results are indicating a negative regulation of the gene by the influence of female hormones. This could be executed by *Pgc1a* due the significant inverse association noted between *Pgc1a* and *Cidec/Fsp27*, the binding of PGC1a to this gene reported by the ENCODE consortium (52) and the suppression of the effect by ovariectomy. Indeed, estradiol action has been found modulated by *Pgc1a* (64). The experiment carried out in *Pgc1a*-deficient mice is also supporting the role of *Pgc1a* in the *in vivo* sex differences.

In conclusion, the present report evidences two axes of hepatic *Cidec/Fsp27* regulation defined by diet and sex. Regarding the first one, cholesterol and the nature of fatty acids are a key component. On the other hand, the fact that the female decrease in hepatic gene expression was not observed in ovariectomized mice strongly suggests that ovarian hormones are involved in the control of hepatic *Cidec/Fsp27* expression and this is modulated by *Pgc1a*.

Acknowledgments

We thank Silvia Garcés and M^a Pilar Lierta for their help in

maintaining the animals. This research was supported by grants from *Ministerio de Economía y Competitividad-Fondo Europeo de Desarrollo Regional* (SAF2015-63904-R, SAF2016-75441-R), *Fondo Social Europeo-Gobierno de Aragón* (B16_17R), and from the European Union's Horizon 2020 research and innovation program under the Marie Skłodowska-Curie grant agreement 721236-TREATMENT to M.M. CIBER de *Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición* (CIBEROBN, CB06/03/1012) is an initiative of ISCIII. L.V.H.M. and S.S.K. were recipients of *Fondo Social Europeo-Gobierno de Aragón* and *Fundación Cuenca-Villoro* (BE 203/2009) fellowships, respectively.

No competing financial interests exist.

References

1. Li JZ, Li P. Cide proteins and the development of obesity. *Novartis Found Symp.* 2007;286:155-9; discussion 9-63, 96-203.
2. Liang L, Zhao M, Xu Z, Yokoyama KK, Li T. 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):195-203.
3. Xu X, Park JG, So JS, Lee AH.

- Transcriptional activation of Fsp27 by the liver-enriched transcription factor CREBH promotes lipid droplet growth and hepatic steatosis. *Hepatology*. 2015;61(3):857-69.
4. Gao G, Chen FJ, Zhou L, Su L, Xu D, Xu L, et al. Control of lipid droplet fusion and growth by CIDE family proteins. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*. 2017;1862(10 Pt B):1197-204.
 5. Li YH, Lei T, Chen XD, Xia T, Peng Y, Long QQ, et al. Molecular cloning, chromosomal location and expression pattern of porcine CIDEa and CIDEc. *Mol Biol Rep*. 2009;36(3):575-82.
 6. Xu L, Zhou L, Li P. CIDE proteins and lipid metabolism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2012;32(5):1094-8.
 7. Tan JS, Seow CJ, Goh VJ, Silver DL. Recent advances in understanding proteins involved in lipid droplet formation, growth and fusion. *J Genet Genomics*. 2014;41(5):251-9.
 8. Li H, Chen A, Shu L, Yu X, Gan L, Zhou L, et al. Translocation of CIDEc in hepatocytes depends on fatty acids. *Genes Cells*. 2014;19(11):793-802.
 9. Wu L, Xu D, Zhou L, Xie B, Yu L, Yang H, et al. Rab8a-AS160-MSS4 regulatory circuit controls lipid droplet fusion and growth. *Dev Cell*. 2014;30(4):378-93.
 10. Nishino N, Tamori Y, Tateya S, Kawaguchi T, Shibakusa T, Mizunoya W, 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):2808-21.
 11. Toh SY, Gong J, Du G, Li JZ, Yang S, Ye J, 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):e2890.
 12. Zhou L, Park SY, Xu L, Xia X, Ye J, Su L, et al. Insulin resistance and white adipose tissue inflammation are uncoupled in energetically challenged Fsp27-deficient mice. *Nat Commun*. 2015;6:5949.
 13. Tanaka N, Takahashi S, Matsubara T, Jiang C, Sakamoto W, Chanturiya T, et al. Adipocyte-specific disruption of fat-specific protein 27 causes hepatosteatosis and insulin resistance in high-fat diet-fed mice. *J Biol Chem*. 2015;290(5):3092-105.
 14. Lee JS, Mendez R, Heng HH, Yang ZQ, Zhang K. Pharmacological RE stress promotes hepatic lipogenesis and lipid droplet formation. *Am J Transl Res*. 2012;4(1):102-13.
 15. Satoh H, Ide N, Kagawa Y, Maeda T. Hepatic steatosis with relation to increased expression of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in insulin resistant mice. *Biol Pharm Bull*. 2013;36(4):616-23.
 16. Min J, Zhang W, Gu Y, Hong L, Yao L, Li F, et al. CIDE-3 interacts with lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor, and overexpression increases apoptosis in hepatocellular carcinoma. *Med Oncol*. 2011;28 Suppl 1:S219-27.
 17. Gong J, Sun Z, Li P. CIDE proteins and metabolic disorders. *Curr Opin Lipidol*. 2009;20(2):121-6.
 18. Hall AM, Brunt EM, Klein S, Finck BN. Hepatic expression of cell death-inducing DFFA-like effector C in obese subjects is reduced by marked weight loss. *Obesity (Silver Spring)*. 2010;18(2):417-9.
 19. Rubio-Cabezas O, Puri V, Murano I, Saudek V, Semple RK, Dash S, et al. Partial lipodystrophy and insulin resistant diabetes in a patient with a homozygous nonsense mutation in CIDEc. *EMBO Mol Med*. 2009;1(5):280-7.
 20. Nolis T. Exploring the pathophysiology behind the more common genetic and acquired lipodystrophies. *J Hum Genet*. 2014;59(1):16-23.
 21. Langhi C, Baldan A. CIDEc/FSP27 is regulated by peroxisome proliferator-activated receptor alpha and plays a critical role in fasting- and diet-induced hepatosteatosis. *Hepatology*. 2015;61(4):1227-38.
 22. Rajamoorthi A, Arias N, Basta J, Lee RG,

- Baldan A. Amelioration of diet-induced steatohepatitis in mice following combined therapy with ASO-Fsp27 and fenofibrate. *J Lipid Res.* 2017;58(11):2127-38.
23. Rajamoorthi A, Lee RG, Baldan A. Therapeutic silencing of FSP27 reduces the progression of atherosclerosis in *Ldlr(-/-)* mice. *Atherosclerosis.* 2018;275:43-9.
24. Sarria AJ, Surra JC, Acín S, Carnicer R, Navarro MA, Arbonés-Mainar JM, et al. Understanding the role of dietary components on atherosclerosis using genetic engineered mouse models. *Frontiers in Biosciences.* 2006;11:955-67.
25. Cerk IK, Wechselberger L, Oberer M. Adipose triglyceride lipase regulation: An overview. *Curr Protein Pept Sci.* 2018;19(2):221-33.
26. Kang HS, Liao G, DeGraff LM, Gerrish K, Bortner CD, Garantziotis S, et al. CD44 plays a critical role in regulating diet-induced adipose inflammation, hepatic steatosis, and insulin resistance. *PLoS One.* 2013;8(3):e58417.
27. Lancha A, Rodriguez A, Catalan V, Becerril S, Sainz N, Ramirez B, et al. Osteopontin deletion prevents the development of obesity and hepatic steatosis via impaired adipose tissue matrix remodeling and reduced inflammation and fibrosis in adipose tissue and liver in mice. *PLoS One.* 2014;9(5):e98398.
28. Matsusue K, Kusakabe T, Noguchi T, Takiguchi S, Suzuki T, Yamano S, et al. Hepatic steatosis in leptin-deficient mice is promoted by the PPARgamma target gene *Fsp27*. *Cell Metab.* 2008;7(4):302-11.
29. Li Y, Dong J, Ding T, Kuo MS, Cao G, Jiang XC, et al. Sphingomyelin synthase 2 activity and liver steatosis: an effect of ceramide-mediated peroxisome proliferator-activated receptor gamma2 suppression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2013;33(7):1513-20.
30. Kim JY, Liu K, Zhou S, Tillison K, Wu Y, Smas CM. Assessment of fat-specific protein 27 in the adipocyte lineage suggests a dual role for FSP27 in adipocyte metabolism and cell death. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2008;294(4):E654-67.
31. Sato W, Horie Y, Kataoka E, Ohshima S, Dohmen T, Iizuka M, et al. Hepatic gene expression in hepatocyte-specific *Pten* deficient mice showing steatohepatitis without ethanol challenge. *Hepatology Res.* 2006;34(4):256-65.
32. Kang HS, Okamoto K, Kim YS, Takeda Y, Bortner CD, Dang H, et al. Nuclear orphan receptor TAK1/TR4-deficient mice are protected against obesity-linked inflammation, hepatic steatosis, and insulin resistance. *Diabetes.* 2011;60(1):177-88.
33. Kang HS, Okamoto K, Takeda Y, Beak JY, Gerrish K, Bortner CD, et al. Transcriptional profiling reveals a role for RORalpha in regulating gene expression in obesity-associated inflammation and hepatic steatosis. *Physiol Genomics.* 2011;43(13):818-28.
34. Danesch U, Hoeck W, Ringold GM. Cloning and transcriptional regulation of a novel adipocyte-specific gene, FSP27. CAAT-enhancer-binding protein (C/EBP) and C/EBP-like proteins interact with sequences required for differentiation-dependent expression. *J Biol Chem.* 1992;267(10):7185-93.
35. Aibara D, Matsusue K, Takiguchi S, Gonzalez FJ, Yamano S. Fat-specific protein 27 is a novel target gene of liver X receptor alpha. *Mol Cell Endocrinol.* 2018;474:48-56.
36. Chen A, Chen X, Cheng S, Shu L, Yan M, Yao L, et al. FTO promotes SREBP1c maturation and enhances CIDEA transcription during lipid accumulation in HepG2 cells. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids.* 2018;1863(5):538-48.
37. Matsusue K. A physiological role for fat specific protein 27/cell death-inducing DFF45-like effector C in adipose and liver. *Biol Pharm Bull.* 2010;33(3):346-50.
38. Zhang X, Heckmann BL, Xie X, Saarinen

- AM, Liu J. Regulation of FSP27 protein stability by AMPK and HSC70. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2014;307(11):E1047-56.
39. Yonezawa T, Kurata R, Kimura M, Inoko H. Which CIDE are you on? Apoptosis and energy metabolism. *Mol Biosyst.* 2011;7(1):91-100.
40. Qian H, Chen Y, Nian Z, Su L, Yu H, Chen FJ, et al. HDAC6-mediated acetylation of lipid droplet-binding protein CIDEC regulates fat-induced lipid storage. *J Clin Invest.* 2017;127(4):1353-69.
41. Vila-Brau A, De Sousa-Coelho AL, Goncalves JF, Haro D, Marrero PF. 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):592-601.
42. Yu S, Matsusue K, Kashireddy P, Cao WQ, Yeldandi V, Yeldandi AV, et al. Adipocyte-specific gene expression and adipogenic steatosis in the mouse liver due to peroxisome proliferator-activated receptor gamma1 (PPARgamma1) overexpression. *J Biol Chem.* 2003;278(1):498-505.
43. Aibara D, Matsusue K, Matsuo K, Takiguchi S, Gonzalez FJ, Yamano S. Expression of hepatic fat-specific protein 27 depends on the specific etiology of fatty liver. *Biol Pharm Bull.* 2013;36(11):1766-72.
44. Okumura T. Role of lipid droplet proteins in liver steatosis. *J Physiol Biochem.* 2011;67(4):629-36.
45. Guillen N, Navarro MA, Arnal C, Noone E, Arbones-Mainar JM, Acin S, et al. Microarray analysis of hepatic gene expression identifies new genes involved in steatotic liver. *Physiol Genomics.* 2009;37(3):187-98.
46. Gasparin FRS, Carreno FO, Mewes JM, Gilgioni EH, Pagadigorria CLS, Natali MRM, et al. Sex differences in the development of hepatic steatosis in cafeteria diet-induced obesity in young mice. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2018;1864(7):2495-509.
47. Sharma R, Luong Q, Sharma VM, Harberson M, Harper B, Colborn A, et al. Growth hormone controls lipolysis by regulation of FSP27 expression. *J Endocrinol.* 2018;239(3):289-301.
48. Sharma VM, Vestergaard ET, Jessen N, Kolind-Thomsen P, Nellemann B, Nielsen TS, et al. Growth hormone acts along the PPARgamma-FSP27 axis to stimulate lipolysis in human adipocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2019;316(1):E34-E42.
49. Martinez-Beamonte R, Navarro MA, Larraga A, Strunk M, Barranquero C, Acin S, et al. Selection of reference genes for gene expression studies in rats. *J Biotechnol.* 2011;151(4):325-34.
50. Guillen N, Acin S, Navarro MA, Perona JS, Arbones-Mainar JM, Arnal C, et al. Squalene in a sex-dependent manner modulates atherosclerotic lesion which correlates with hepatic fat content in apoE-knockout male mice. *Atherosclerosis.* 2008;196:558-64.
51. Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem.* 1957;226(1):497-509.
52. Consortium TEP. An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature.* 2012;489(7414):57-74.
53. Matsuzawa N, Takamura T, Kurita S, Misu H, Ota T, Ando H, et al. Lipid-induced oxidative stress causes steatohepatitis in mice fed an atherogenic diet. *Hepatology.* 2007;46(5):1392-403.
54. Martinez-Beamonte R, Navarro MA, Acin S, Guillen N, Barranquero C, Arnal C, et al. Postprandial changes in high density lipoproteins in rats subjected to gavage administration of virgin olive oil. *PLoS One.* 2013;8(1):e55231.
55. Gabas-Rivera C, Martinez-Beamonte R, Rios JL, Navarro MA, Surra JC, Arnal C, et al. Dietary oleanolic acid mediates circadian clock gene expression in liver independently of diet and animal model but requires apolipoprotein A1. *J Nutr Biochem.* 2013;24(12):2100-9.
56. Kiela PR, Midura AJ, Kuscuoglu N, Jolad

- SD, Solyom AM, Besselsen DG, et al. Effects of *Boswellia serrata* in mouse models of chemically induced colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2005;288(4):G798-808.
57. Lou-Bonafonte JM, Martinez-Beamonte R, Sanclemente T, Surra JC, Herrera-Marcos LV, Sanchez-Marco J, et al. Current insights into the biological action of squalene. *Mol Nutr Food Res*. 2018:e1800136.
 58. Martinez-Beamonte R, Alda O, Sanclemente T, Felices MJ, Escusol S, Arnal C, et al. Hepatic subcellular distribution of squalene changes according to the experimental setting. *J Physiol Biochem*. 2018;74(4):531-8.
 59. Surra JC, Guillen N, Arbones-Mainar JM, Barranquero C, Navarro MA, Arnal C, et al. Sex as a profound modifier of atherosclerotic lesion development in apolipoprotein E-deficient mice with different genetic backgrounds. *J Atheroscler Thromb*. 2010;17(7):712-21.
 60. Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC, Jr. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr*. 1993;123(11):1939-51.
 61. Xiao CW, Wood CM, Weber D, Aziz SA, Mehta R, Griffin P, et al. Dietary supplementation with soy isoflavones or replacement with soy proteins prevents hepatic lipid droplet accumulation and alters expression of genes involved in lipid metabolism in rats. *Genes Nutr*. 2014;9(1):373.
 62. Yamazaki T, Kishimoto K, Miura S, Ezaki O. Dietary beta-conglycinin prevents fatty liver induced by a high-fat diet by a decrease in peroxisome proliferator-activated receptor gamma2 protein. *J Nutr Biochem*. 2012;23(2):123-32.
 63. Xu J, Li Q. Review of the in vivo functions of the p160 steroid receptor coactivator family. *Molecular Endocrinology*. 2003;17(9):1681-92.
 64. Besse-Patin A, Leveille M, Oropeza D, Nguyen BN, Prat A, Estall JL. Estrogen signals through peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1alpha to reduce oxidative damage associated with diet-induced fatty liver disease. *Gastroenterology*. 2017;152(1):243-56.
 65. Acin S, Navarro MA, Carnicer R, Arbones-Mainar JM, Guzman MA, Arnal C, et al. Dietary cholesterol suppresses the ability of olive oil to delay the development of atherosclerotic lesions in apolipoprotein E knockout mice. *Atherosclerosis*. 2005;182(1):17-28.
 66. Moreno-Indias I, Sanchez-Alcoholado L, Sanchez-Garrido MA, Martin-Nunez GM, Perez-Jimenez F, Tena-Sempere M, et al. Neonatal androgen exposure causes persistent gut microbiota dysbiosis related to metabolic disease in adult female rats. *Endocrinology*. 2016;157(12):4888-98.

Supplemental data:

Table S1. Summary of experimental conditions

Experiment	Genetic background	Diet	Sex	Groups and sample size	Influence
ApoE-deficient mice					
1	C57BL/6J x OLA 129	Commercial chow (B & K Universal Ltd, Humberside, UK) w/wo 0.1% cholesterol for 10 weeks (65)	Males	Control (n=7) Cholesterol (n=7)	Cholesterol
2	C57BL/6J	Purified chow and Western diets for 11 weeks	Males	Chow (n=13) Western (n=9)	Western diet
3	C57BL/6J	Purified Western w/wo 0.01% oleanolic acid (OA) (Extrasynthese, Genay, France) for 11 weeks (55)	Males	Western (n=8) Western + OA (n=9)	Oleanolic acid
4	C57BL/6J	Purified Western w/wo 1% squalene (Sigma, Madrid, Spain) for 10 weeks (50)	Males	Western (n=9) Western + Squalene (n=10)	Squalene
5	C57BL/6J	Purified chow for 11 weeks	Both sexes	Males (n=13) Females (n=13)	Sex in chow diet
6	C57BL/6J	Purified Western for 11 weeks	Both sexes	Males (n=9) Females (n=10)	Sex in Western diet
7	C57BL/6J	Purified Western for 11 weeks	Orchiectomized and non- orchiectomized	Control (n=9)	Testicular contribution in

			males	Orchiectomized on postnatal day 30 (n=9)	males
8	C57BL/6J	Purified Western for 11 weeks	Ovariectomized and non- ovariectomized females	Control (n=9) Ovariectomized on postnatal day 30 (n=9)	Ovarian contribution in females
Ldlr-deficient mice	C57BL/6J. SJL	Purified Western for 11 weeks	Both sexes	Males (n=17) Females (n=18)	Sex in Western diet
Pgc1a-deficient mice	C57BL/6J	Purified Western for 11 weeks	Both sexes	Males (n=8) Females (n=8)	Sex in Western diet
Rats	Wistar	Purified Western for 100 post-weaning days(66)	Ovariectomized and non- ovariectomized females	Control (n=6) Ovariectomized (n=6) Ovariectomized + a single injection of 1250 µg of testosterone propionate on postnatal day 1 (n=6)	Ovarian contribution and neonatal androgenization in females

w/wo, with or without

Table S2. Composition of purified diets used in the different studies, based on AIN-93 recommended diets for laboratory rodents (60)

Ingredients	Chow (g/kg)	Western (g/kg)
Corn starch ^a	465.7	371.9
Casein ^b	140.0	111.8
Maltodextrin ^a	155.0	123.8
Saccharose ^c	100.0	79.9
Soybean oil ^d	40.0	31.9
Cellulose ^e	50.0	39.9
Mineral mix ^f	35.0	27.9
Vitamin mix ^g	10.0	8.0
Choline bitartrate ^h	2.5	2.0
L-Cystine ^h	1.8	1.4
Cholesterol ^h	--	1.5
Palm oil ⁱ	--	200

^a Cargill, Barcelona, Spain. ^b Lactalis Ingredients, Bourgbarré, France. ^c Azucarera Ibérica S.L., Madrid, Spain. ^d Aceites Muñoz, Toledo, Spain. ^e Vitacel R200, Rettenmaier Ibérica S.L, Barcelona, Spain. ^f AIN-93M Mineral Mix (MP Biomedicals, Illkirch, France). The salt mixture contains the following amounts (g/kg): calcium carbonate, 357; monopotassium phosphate, 250; potassium citrate monohydrate, 28; sodium chloride, 74; potassium sulphate, 46.6; magnesium oxide, 24; ferric citrate, 6.06; zinc carbonate, 1.65; manganese carbonate, 0.63; copper carbonate, 0.3; potassium iodate, 0.01; sodium selenate anhydrous, 0.01025; ammonium molybdate.4H₂O, 0.00795; sodium metasilicate.9H₂O, 1.45; chromium potassium sulfate.12H₂O, 0.275; lithium chloride, 0.0174; boric acid, 0.0815; sodium fluoride, 0.0635; nickel carbonate, 0.0318; ammonium vanadate, 0.0066 and powdered sugar, 209.806. ^g AIN-93-VX Vitamin Mix (MP Biomedicals, Illkirch, France). Vitamin mixture contains the following amounts (mg/kg): nicotinic acid, 3; D-calcium pantothenate, 1.6; pyridoxine HCl, 0.7; thiamine HCl, 0.6; riboflavin, 0.6; folic acid, 0.2; D-biotin, 0.02; vitamin B₁₂ (0.1% triturated in mannitol), 2.5; α-tocopherol powder (250 U/g), 30; vitamin A palmitate (250,000 U/g), 1.6; vitamin D₃ (400,000 U/g), 0.25; phylloquinone, 0.075 and powdered sucrose, 959.655. ^h Sigma-Aldrich Química, Madrid, España. ⁱ Gustav Heess, Barcelona, Spain

Table S3. Characteristics of primers used in qPCR according to MIQE guidelines.

Gene symbol	Accession	Sequence	Amplicon length	Junction	[Primer]	Efficiency
<i>Cidec/Fsp27</i>	NM_178373.3	Sense: CATCAGAACAGCGCAAGAAGAG Antisense: TGTCATAGAGGGTTGCCTTCAC	151	Exon 4-5	100 nM	95
<i>Fsp27b</i>	XM_006505531.3	Sense: GTGACCACAGCTTGGGTCGGA Antisense: GGGTCTCCCGGCTGGGCT TA	170	Exons 1-2	100/50 nM	104
<i>Prkaa2</i>	NM_178143.2	Sense: TACATCTGCAAACATGGGCG Antisense: TGGACAACCATATGCCTGTGAC	100	Exons 3-4	200 nM	95
<i>Ppara</i>	NM_001113418	Sense: CATCGAGTGTGCAATATGTGGG Antisense: TTCGCCGAAAGAAGCCCTTA	89	Exons 4-5	100 nM	98
<i>Ppargc1a/Pgc1a</i>	NM_008904	Sense: GTGTTCCCGATCACCATATTCC Antisense: AGGGTGACCTTGAACGTGATCT	151	Exons 8-9	100 nM	90
<i>Ppib</i>	NM_011149	Sense: GGAGATGGCACAGGAGGAA Antisense: TAGTGCTTCAGCTTGAAGTTCTCAT	71	Exon 3	100 nM	97
<i>Rat Fsp27</i>	NM_001024333.2	Sense: TCACTGTCCAGGCATGTAGCA Antisense: CCTTTGCGAACCTTCCGAT	117	Exons 2-3	100 nM	100
<i>Rat Pgc1a</i>	NM_031347.1	Sense: GTGTTCCCGATCACCATATTCC Antisense: AGGGTGACCTTGAACGTGATCT	153	Exons 8-9	100 nM	90
<i>Rat Pjpb</i>	NM_022536.1	Sense: TCGGAGCGCAATATGAAGGT Antisense: CTTCTTCTTATCGTTGGCCACG	102	Exons 1-2	100 nM	97

Table S4. Changes in hepatic *Cidec/Fsp27* expression according to Genome Expressed Omnibus data bank and Array express.

Experimental condition	Type of change	Accession number
Steroid receptor coactivator-2-deficient female mice	Increased	GDS4785
NADH-cytochrome P450 reductase deletion effect on liver	Increased	GDS1093
Hepatocyte nuclear factor 4 alpha depletion on hepatocellular carcinoma cell line	Increased	GDS4798
Stearoyl-CoA desaturase 1-deficient mutants on a very low-fat, high-carbohydrate diet	Increased	GDS1517
Metabolic stress effect on MCAD-deficient mutants	Increased by fasting and LPS	GDS4546
Thioredoxin reductase 1-null liver	Increased	GDS4928
Alcoholic hepatitis	Increased	GDS4389
Sebacic acid supplemented diet effect on db/db liver	Increased	GDS3807
Ketogenic diet effect on the liver	Increased	GDS2738
Resveratrol and high-fat high-calorie diet effect on liver	Increased	GDS2413
Liver response to a high fat diet deficient in methionine and choline	Increased	GDS4883
Diet induced changes in liver	Increased	GDS279
Perfluorooctanoic acid effect on livers lacking PPAR-alpha	Increased	GDS3407
Peroxisome proliferator-activated receptor subtype activation effect on liver cell	Increased by PPARg2	GDS1373
Liver response to a high fat diet: time course	Increased 12 h	GDS4783
Transcriptional coactivator PGC-1beta hypomorphic mutation effect on the liver	Decreased	GDS3197
RORa-deficient staggerer mice	Decreased	GSE23736

SIRT3 deficient liver response to a high fat diet	Decreased	GDS4817
GPR120-deficient liver response to a high fat diet	Decreased	GDS4830
TAK1/TR4-deficient mice	Decreased	GSE21903
Conditional GBA1 deletion model of Type 1 Gaucher Disease	Decreased	GDS4162
Atherogenic diet effect on the liver: time course	Decreased long term	GDS2292
Streptozotocin induced type 1 diabetes	Decreased	GDS4845
Adrenalectomized liver at light and dark periods of the circadian cycle	Variable	GDS1870
Sex specific transcription in somatic and reproductive tissues	No change	GDS565

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gds/>

<https://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/>

Figure S1. Effect of dietary oleanolic acid on hepatic steatosis and *Cidec/Fsp27* expression in *ApoE*-deficient mice fed on a Western diet. Representative liver micrographs at x400 magnification from *ApoE*-deficient mice consuming the Western (a) and oleanolic acid-enriched (b) diets. Morphometric evaluation of surface of hepatocyte occupied by fat and hepatic cholesterol and triglyceride contents (c). Analysis of hepatic *Cidec/Fsp27* expression determined by RT-qPCR normalized to *Cyclophilin B* (d). Data are medians and 10-90 percentile range for control (n=8) and oleanolic acid (n=9) groups. Statistical analyses were done according to Mann-Whitney's U test. ^a, P < 0.05 vs control.

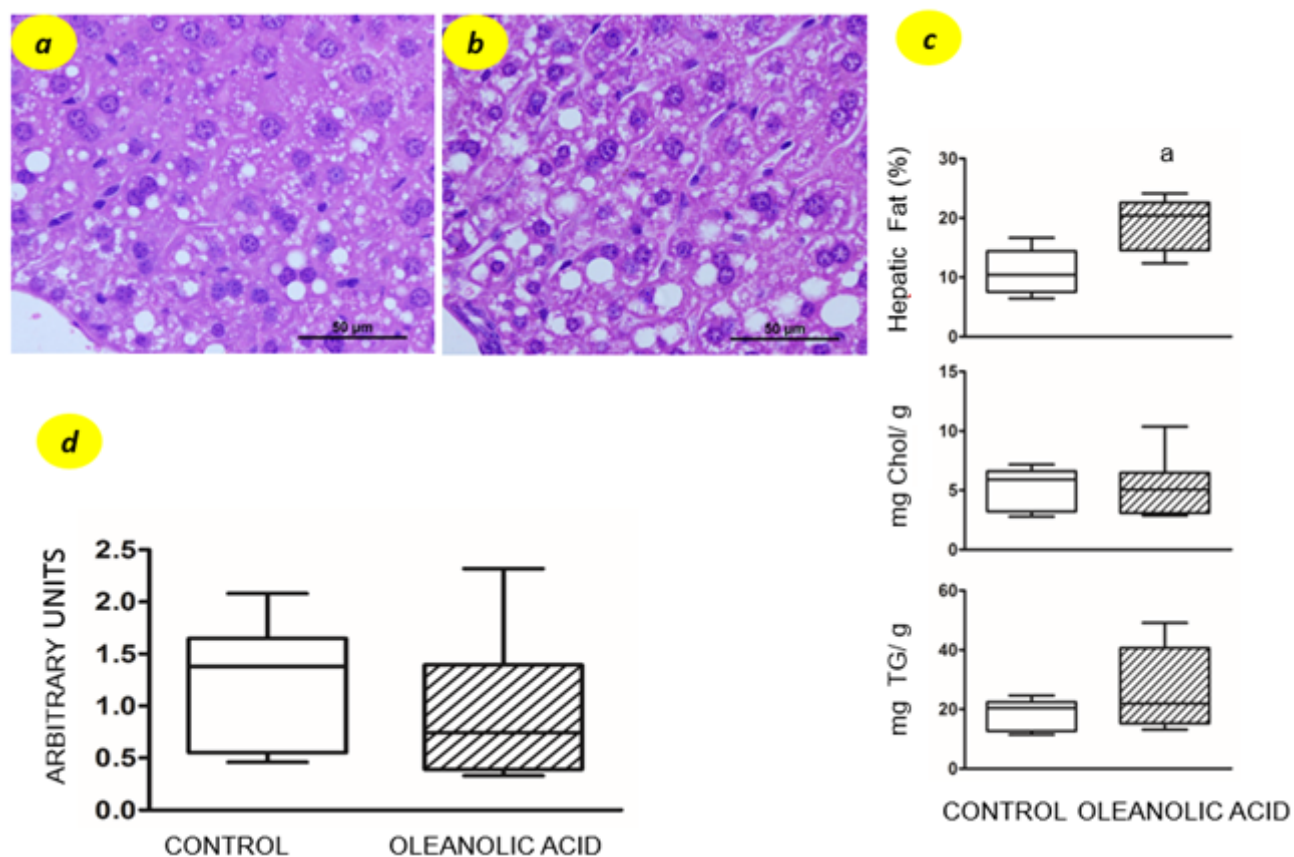


Figure S2. Effect of dietary squalene on hepatic steatosis and Cidec/Fsp27 expression in Apoe-deficient mice fed on a Western diet. Representative liver micrographs at x400 magnification from Apoe-deficient mice consuming the Western (a) and squalene-enriched (b) diets. Morphometric evaluation of surface of hepatocyte occupied by fat and hepatic cholesterol and triglyceride contents (c). Analysis of hepatic Cidec/Fsp27 expression determined by RT-qPCR normalized to Cyclophilin B (d). Data are medians and 10-90 percentile range for control (n=9) and squalene (n=10) groups. Statistical analyses were done according to Mann-Whitney's U test. a, $P < 0.05$ vs control.

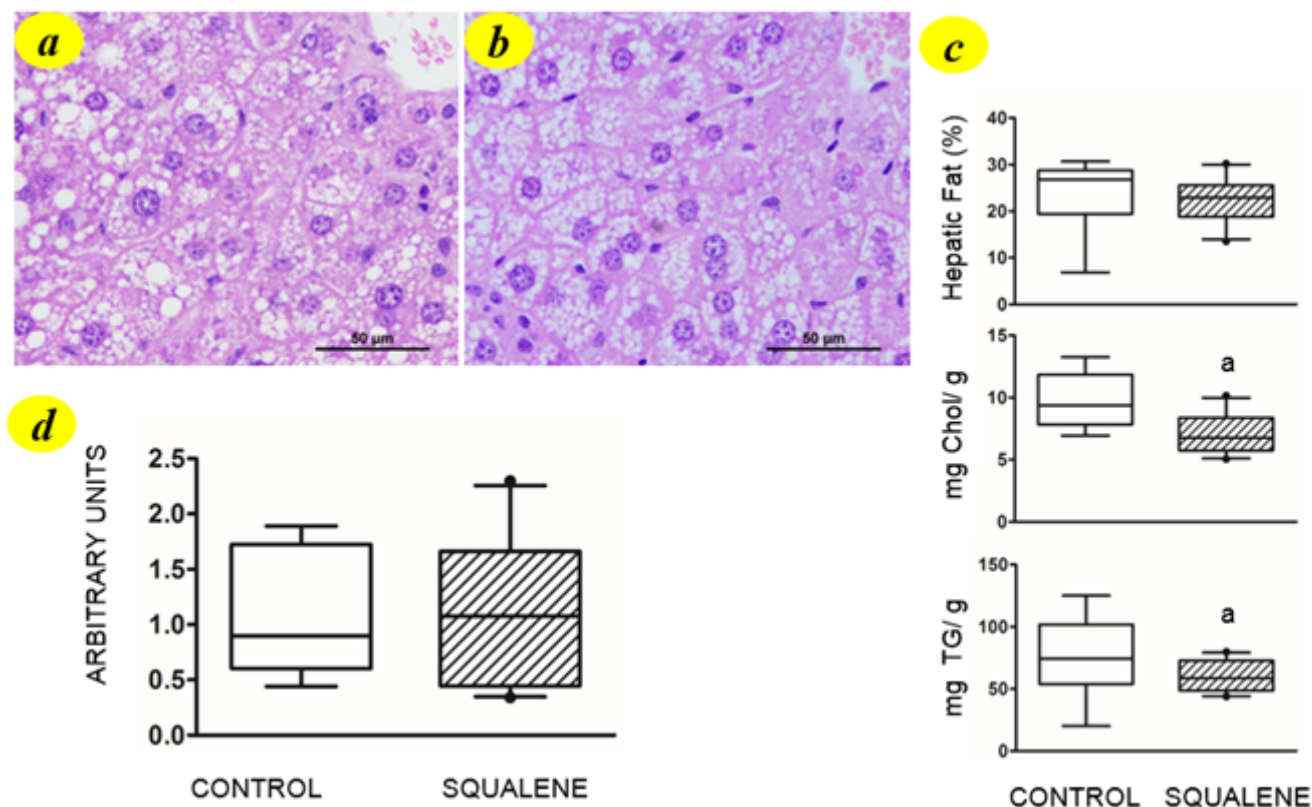


Figure S3. Effect of sex on hepatic steatosis and Cidec/Fsp27 expression in Apoe-deficient mice fed on a chow diet. Representative liver micrographs at x400 magnification from male (a) and female (b) Apoe-deficient mice consuming chow diets. Morphometric evaluation of surface of hepatocyte occupied by fat, and hepatic cholesterol and triglyceride contents (c). Analysis of hepatic Cidec/Fsp27 expression determined by RT-qPCR normalized to Cyclophilin B (d). Data are medians and 10-90 percentile range for male (n=13) and female (n=13) groups. Statistical analyses were done according to Mann-Whitney's U test. a, $P < 0.05$ vs control.

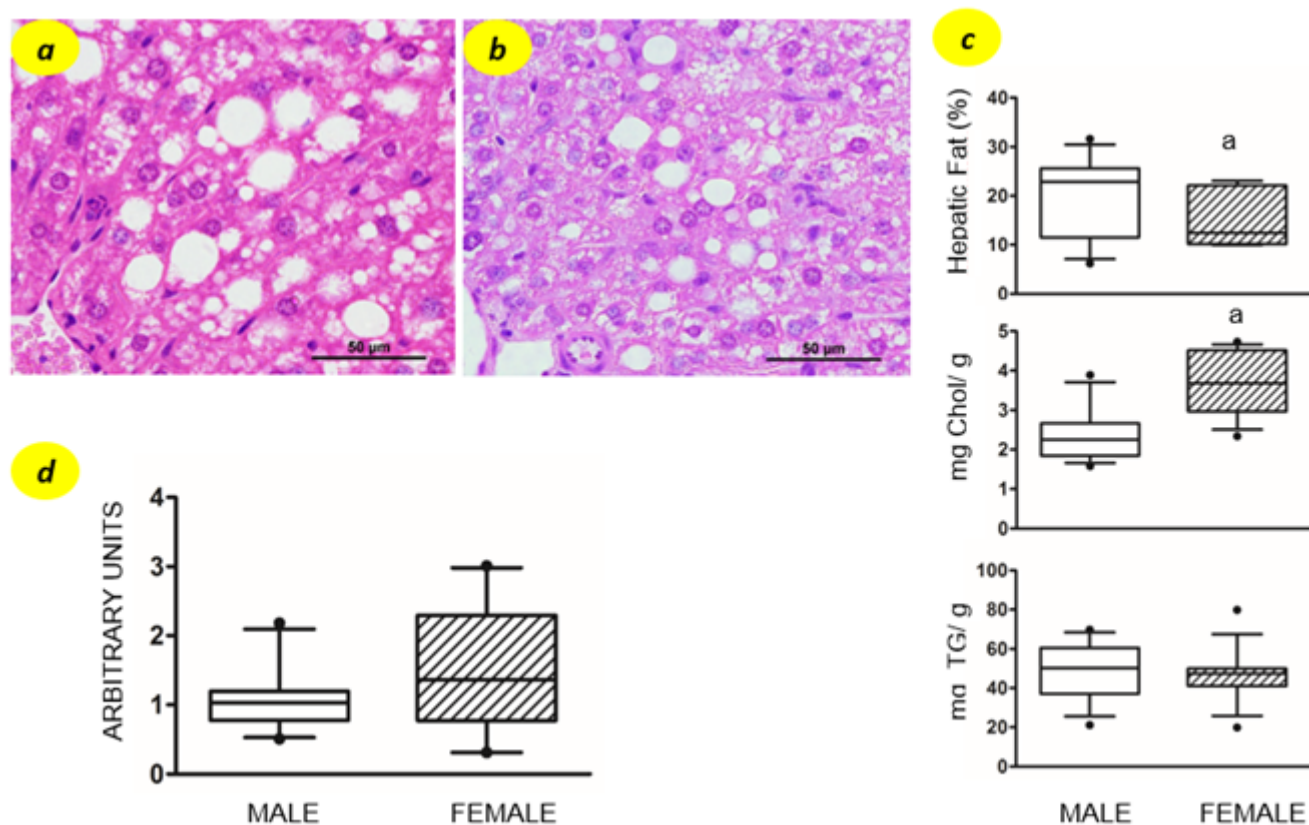


Figure S4. Effect of orchietomy on hepatic steatosis and Cidec/Fsp27 expression in male Apoe-deficient mice fed on a Western diet. Representative liver micrographs at x400 magnification from control (a) and orchidectomized (b) Apoe-deficient mice consuming Western diets. Morphometric evaluation of surface of hepatocyte occupied by fat and hepatic cholesterol and triglyceride contents (c). Analysis of hepatic Cidec/Fsp27 expression determined by RT-qPCR normalized to Cyclophilin B (d). Hepatic expression of Fsp27beta normalized to Cyclophilin B (e). Data are medians and 10-90 percentile range for control (n=9) and castrated (n=9) groups. Statistical analyses were done according to Mann-Whitney's U test. a, $P < 0.05$ vs control. Association between hepatic fat content and Cidec/Fsp27 expression (f). Spearman's correlation is shown. Open squares correspond to control and black squares to castrated mice.

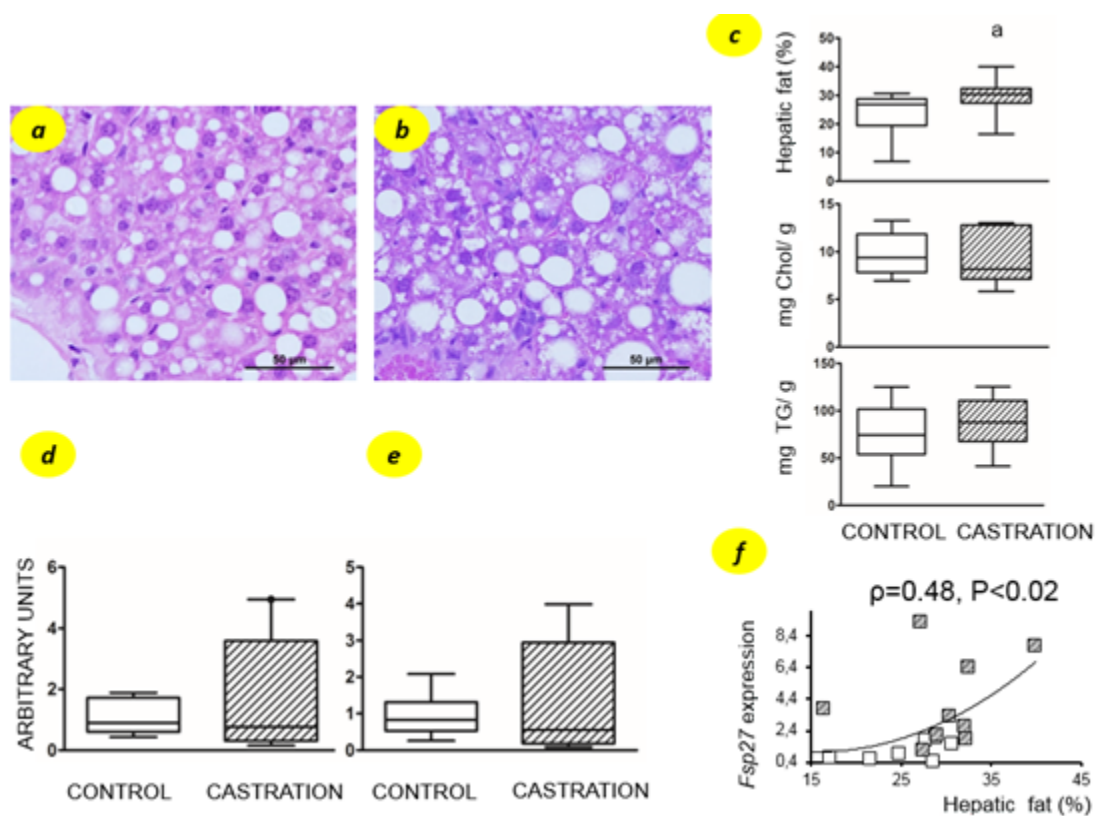


Figure S5. Effect of estradiol and stearic acid on Cidec/Fsp27 expression in hepatic AML12 cells. Cells were incubated in presence of 200 μ m stearic acid (18:0) or in presence of stearic acid for 24 hours and 50 nM estradiol (E2) for 6 hours. Then RNA was extracted and Cidec/Fsp27 expression normalized to Cyclophilin B was determined by RT-qPCR. Three independent experiments in sextuplicate were carried out. Data are medians and 10-90 percentile range for each group. Statistical analyses were done according to Mann-Whitney's U test. a, $P < 0.05$ vs vehicle.

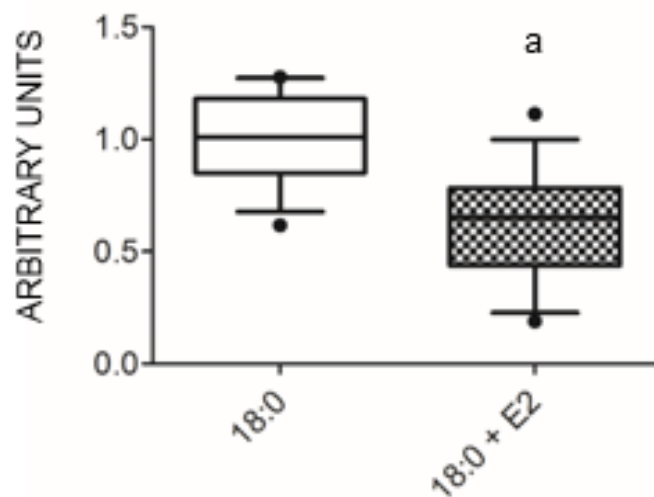


Figure S6. Effect of ovariectomy and neonatal androgenization on hepatic steatosis and Cidec/Fsp27 expression in female Wistar rats fed on a Western diet. Representative liver micrographs at x400 magnification from control (a), ovariectomized (b) and ovariectomized and neonatally androgenized females (c) on Western diets. Morphometric evaluation of surface of hepatocyte occupied by fat and hepatic cholesterol and triglyceride contents (d). Analysis of hepatic Cidec/Fsp27 expression determined by RT-qPCR normalized to Cyclophilin B (e). Hepatic expression of Pgc1a normalized to Cyclophilin B (f). Data are medians and 10-90 percentile range for 6 rats each group. Statistical analyses were done according to Mann-Whitney's U test. a, $P < 0.05$ vs control and b, $P < 0.05$ vs ovariectomized rats. Relationship between percentage of hepatic triglyceride content and Cidec/Fsp27 gene expression (g). Open and black squares correspond to control and ovariectomized rats, respectively, and crosses reflect results from ovariectomized and neonatally androgenized rats. Correlations were calculated according to Spearman's test.

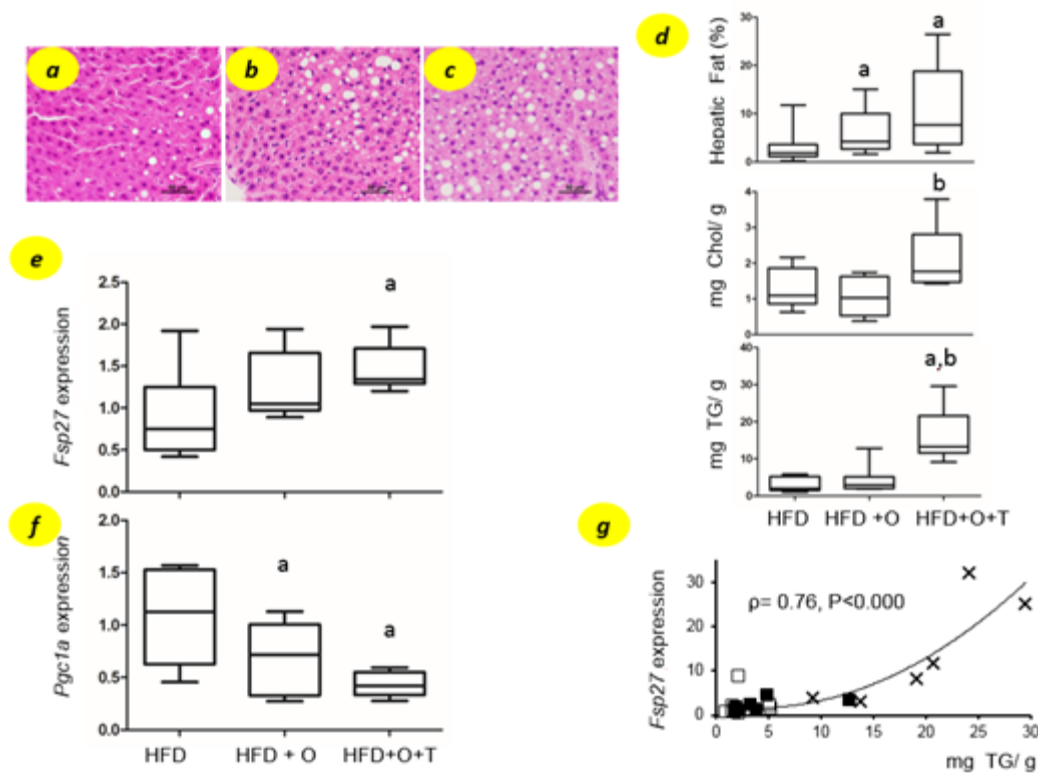
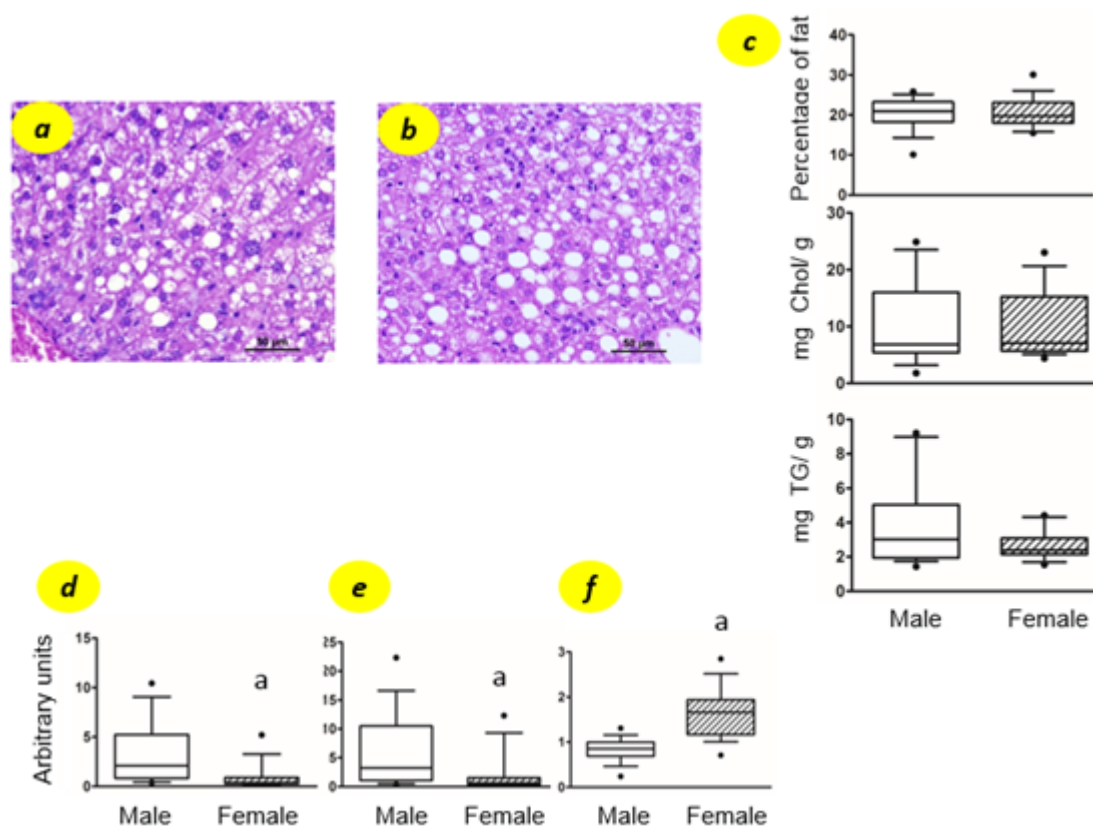


Figure S7. Effect of sex on hepatic steatosis and *Cidec/Fsp27* expression in *Ldlr*-deficient mice fed on a Western diet. Representative liver micrographs at x400 magnification from male (a) and female (b) *Ldlr*-deficient mice consuming Western diets. Morphometric evaluation of surface of hepatocytes occupied by fat and hepatic cholesterol and triglyceride contents (c). Analysis of hepatic *Cidec/Fsp27* expression was determined by RT-qPCR normalized to *Cyclophilin B* (d). Hepatic expression of *Fsp27beta* normalized to *Cyclophilin B* (e). Hepatic expression of *Pgc1a* normalized to *Cyclophilin B* (f). Data are medians and 10-90 percentile range for range for male (n=17) and female (n=18) groups. Statistical analyses were done according to Mann-Whitney's U test. ^a, P < 0.05 vs males.



VI. 2 Transcriptomic and proteomic analyses identify potential biomarkers of hepatic steatosis in a cross-bred porcine model

Abstract:

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is currently a growing epidemic disease that can lead to cirrhosis and hepatic cancer and it remains partially understood. To characterize this disease, pigs have surged as the most similar to human experimental animal model. Until the date all swine-based settings have been carried out using rare predisposed breeds or long-term experiments. Herein, we fully describe a new experimental swine model for early and reversible NAFLD using cross-bred animals fed on a high saturated fat, cholesterol and cholate, and choline and methionine deficient diet. To gain insight into the hepatic transcriptome that undergoes steatosis, we used RNA sequencing and verified its results by RT-qPCR. Several genes modified their expression in the studied conditions: *ISG15*, *LGALS3*, *PAQR7*, *SMPDL3*, *SPP1*, and *SRGN* augmented their expression while *APC5*, *CYP51*, *FDPS*, and an *unknown RNA* were found to decrease their expression. This phenomenon was verified in a second experiment in which we studied the regression of NAFLD. *LGALS3* and *ISG15* were confirmed at the protein level in liver and serum using several analysis methods. As a result, we detected potential new biomarkers whose expression is highly related to the hepatic steatosis status, increasing when the disease appears, and vanishing as soon as NAFLD reverts.

Keywords: NAFLD, non-alcoholic fatty liver disease, RNAseq, transcriptome, steatosis, pig, swine, *LGALS3*, *ISG15*.

Abbreviations: ALP, alkaline liver phosphatase; APC5, anaphase promoting complex subunit 5; AST, aspartate aminotransferase; CYP51, cytochrome p450 family 51; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; FDPS, farnesyl diphosphate synthase; GULO, gulonolactone (L-) oxidase; GEO, gene expression omnibus; GGT, gamma-glutamyl Transpeptidase; HDLc, HDL cholesterol; ISG15, ubiquitin like modifier 15; KB, ketone bodies; LDLc, LDL cholesterol; LGALS3/GAL3, galectin 3; NAFLD, non-alcoholic fatty liver disease; NASH, non-alcoholic steatohepatitis; NEFA, non-esterified fatty acids; PAQR7, progestin and adipoQ receptor family member 7; PLD3, phospholipase D family member 3; PTPRU, protein tyrosine phosphatase receptor type U; RT-qPCR, real time quantitative polymerase chain reaction; SMPDL3A, sphingomyelin phosphodiesterase acid like 3A; SPP1, secreted phosphoprotein 1; SRGN, serglycin; TG, triglycerides; UBA52, ubiquitin A-52 residue ribosomal protein fusion product 1; VLDL, very low density lipoprotein

1. Introduction:

Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) is currently the most common liver disease among Western countries with a prevalence of 20–34% in the general population. In the Middle East and South America it reaches its highest prevalence (14-58%) and its lowest

in Africa (6-29%) (1). An evolved form is predicted to become the predominant cause of cirrhosis requiring liver transplantation within the next two decades (2). These features highlight the pressing need to improve our understanding of the pathophysiology and progression of NAFLD and to identify new therapeutics targets (3).

The liver has a key role as a regulator of lipid metabolism, being responsible for the lipid uptake, the synthesis of fatty acids, their export and relocation to other tissues, as well as their consumption as energy substrates (4). An imbalance of one or more of these pathways, in absence of alcohol abuse, results in accumulation of fat within the liver and the subsequent development of NAFLD (5). However, the molecular mechanisms underlying the pathological fat store within the liver are not fully elucidated (5, 6).

Histologically, NAFLD is largely categorized into simple steatosis, corresponding to the presence of steatosis without additional liver damage, and nonalcoholic steatohepatitis (NASH) which is thought to be a progressive condition which can lead to advanced fibrosis,

cirrhosis, hepatocellular carcinoma and liver failure (3, 7-10). This classification corresponds to the “two-hit hypothesis”, an initial framework for understanding the pathogenesis of NASH (11). However, the validity of this oversimplified concept has been questioned (12, 13). Other authors propose a modified “two-hit” hypothesis wherein non-esterified fatty acids (NEFAs) coming from lipolysis or *de novo* lipogenesis play a direct role in promoting oxidative stress and inflammation-mediated liver injury, whereas the esterification of NEFAs can function as a protective mechanism (14). Moreover, there is also a “multiple parallel hits” hypothesis, which considers the role of gut microbiota and adipose tissue-derived factors (15).

Transcriptomics, either by DNA- microarrays or sequencing, offers a new possibility to understand the pathophysiology and progression of NAFLD. Both techniques have been validated in nutraceutical studies (16). RNAseq provides accurate transcript levels and their isoforms (17). Despite this fact, few examples of RNAseq have been

carried out in swine (only 13 references using RNAseq and swine or pig as key words in Pubmed database). Selected examples address microRNA expression in adipose tissue and inflammation-related genes in NASH of Bama minipigs (18, 19)

To find out the molecular mechanisms of NAFLD, animal models offer possibilities that would be inviable in humans (20). In this regard, swine is emerging as a valuable translational model to close the gap between rodents and humans. The pig has evolved genetic, anatomical and physiological human resemblances (21) such as cardiovascular system, gastrointestinal tract, morphology and physiology of the pancreas, body fat distribution, proportional organ sizes, propensity for sedentary behavior, fat cell size or metabolic disease progressions (19, 22-24). Swine also provide a variety of genetic backgrounds, classified in two main groups: the modern commercial breeds (e.g. Large White, Pietrain) and the minipigs (e.g. Ossabaw, Göttingen, Yucatan, Bama) (20, 23). The easy access to commercial and diverse (natural or

selected) pig populations offers an opportunity to combine different phenotypes for specific research purposes (25). Another important benefit is the availability of biological samples (26). Therefore, pigs are good models for studying human metabolic diseases in a time-dependent manner (27). Despite all those advantages, which makes swine an excellent model for NAFLD, detailed information at the molecular level including gene expression and proteome composition is lagging behind in comparison to other available organisms (19, 24, 25).

Pig could also be a potential source of liver for xenotransplantation in order to provide a therapeutic solution to meet the increasing demand. In this regard, the pig is considered the most suitable donor source for xenogeneic applications (28) and is already in use for various clinical indications (i.e. heart valves and acellular matrices) (23, 26). Moreover, the elimination of pig endogenous retroviruses (29) and the partial deletion of the immune system response (30) will favor this choice. Characterization of swine liver is, therefore, crucial to achieve

successful xenotransplantation and a pressing condition to characterize better biomarkers to establish functionality of steatotic livers. With this aim, we have tested a dietary intervention wherein a reversible NAFLD is developed in just 8 weeks with easily accessible commercial breeds. To our knowledge, this is the first report achieving an early NAFLD in a commercial breed swine model, and an RNAseq approach has been used to characterize this pathology.

2. Material and methods:

Animals. They had unrestricted access to food and water. Two experimental settings, the progression and the regression of liver steatosis, are the basis of this report. Regarding the first approach, after one month of adaptation, twelve male Large White x Landrace pigs, weighing 42 ± 1.5 kg, were used to induce liver steatosis by feeding a steatotic diet for two months. Once completed the analyses of this experiment, the second approach was tackled. In the latter, after one month of adaptation, eight male Large White x Landrace pigs, weighing 38 ± 2.8 kg, were fed the steatotic diet for 2 months. At this moment, they were switched to the

control diet for a month and then, euthanized. Unfortunately, only six out of eight animals completed this second experiment.

Diets. Control diet, purchased from CADEBRO (Casetas, Zaragoza, Spain), provided 72.8% of energy from complex carbohydrates, 18% from protein and 9.2% from fat (Supplemental Table 1). The steatotic diet, prepared at the Veterinary School Facility, was designed to be methionine-deficient and choline-restricted. It was also enriched in 2% cholesterol (Sigma-Aldrich, Germany), 0.5% sodium cholate (Molekula Group, Darlington, UK) and saturated fat (JL Supervía, Cuarte de Huerva, Zaragoza, Spain). This diet provided 50% of energy

from hydrogenated palm and sunflower oil (approximately, saturated fatty acids represented a 50%), 43% from complex carbohydrates and 7% from protein.

Sampling. As displayed in Figure 1, samples were obtained at the beginning and at the end of the experiments for both experimental settings after overnight fasting. Sampling was performed under general anesthesia, induced and maintained with Propofol® (B/Braun-Vetcare, Rubí, Barcelona, Spain) administration. The abdomen was opened through a middle line laparotomy and open liver biopsies were obtained. At the end of the experiment, pigs were euthanized by an anesthetic overdose and liver

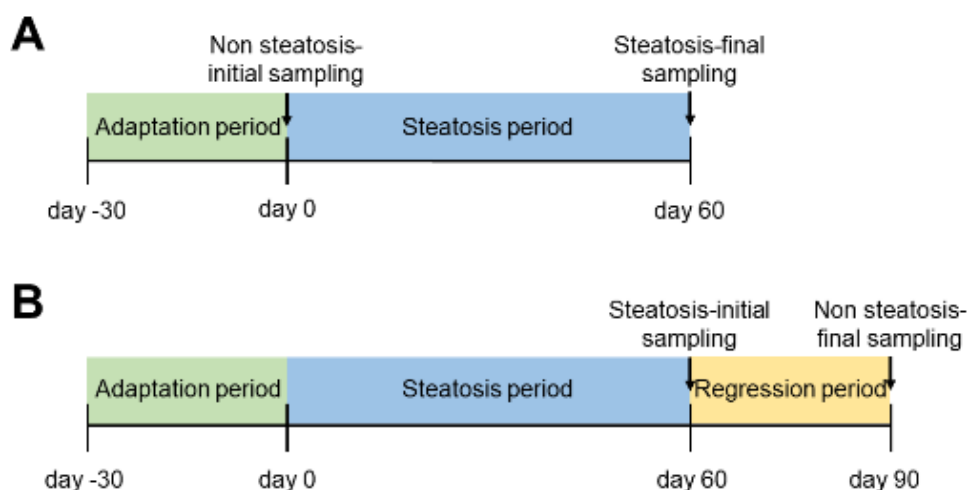


Figure 1. Scheme displaying the used experimental approaches. NAFLD progression study design (A) and NAFLD regression experimental setting (B).

samples were taken. All the procedures were performed according to the European Union guidelines for the handling and care of laboratory animals and the protocol was approved by the Ethics Committee for Animal Research of the University of Zaragoza.

Hematoxylin-eosin staining:

Liver samples were stored in 4% paraformaldehyde and embedded in paraffin. Sections (4 μm) were stained with hematoxylin and eosin and observed using a Nikon microscope. Images were captured and hepatic fat content was blindly evaluated as previously described (31).

Trichromic staining.

Paraffin sections were stained following the Masson's trichromic technique. Morphometric analyses of fiber area was carried out in each liver section with Adobe Photoshop CS3 and expressed as percentage of total liver section.

Lipid extraction and triglyceride and cholesterol measurements. Livers (20 mg) were extracted according to Folch's method (32). The organic phases were evaporated under N_2 stream.

Isopropanol extracts were used to measure cholesterol and triglyceride contents using Infinity Reagents from Thermo (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

Plasma parameters: Plasma samples were analyzed for triglycerides using Infinity Reagent (Thermo) and total, free, low-density lipoprotein (LDLc) and high-density lipoprotein cholesterol (HDLc) using a fluorometric method (Amplex Red, Molecular Probes, USA). Ketone bodies and non-esterified fatty acids were assayed using kits from Fujifilm (Wako Pure Chemical Corporation, Tokyo, Japan). Biochemistry parameters (glucose, bilirubin, AST, ALP, ALT, GGT) were measured at the Clinical Laboratory of Hospital Clínico Universitario (Zaragoza, Spain). Insulin (EP0100, Finetest Wuhan, Hubei, China), leptin (EP0103, Finetest), adiponectin (EP0006, Finetest) and LGALS3 (MBS7606136, Mybiosource, San Diego, CA, USA) were determined by commercial ELISAs following manufacturers' instructions. In-house ELISA with the following pair of antibodies analyzed ISG15: (0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ capture antibody and 0.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ detection antibody labeled with

biotin) (MBS7041946, Mybiosource). HPR-labeled streptavidin diluted 1/2000 (MBS2090690, Mybiosource) and TMB (MBS135892, Mybiosource) as substrate. The following analytes: IL-1beta, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p40, IFN-alpha, IFN-gamma, and TNF-alpha were assayed using multiplex (EPX090-60829-901, Thermo) according to manufacturer's instructions.

RNA isolation: Liver samples were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C. RNA of each liver was isolated using Tri Reagent from Ambion® (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) following the manufacturer's instructions. DNA contamination was removed using TURBO DNase treatment and removal kit from Ambion® (Life Technologies).

Quantification and evaluation of RNA quality: RNA was quantified by absorbance at 260 nm, and purity was verified regarding the A260/280 ratio (greater than 1.8) with SPECTROstar Spectrophotometer's LVis plate (BMG Labtech, Offenburg, Germany). Integrity of the 28 S and 18 S ribosomal RNAs was verified by 1% agarose gel electrophoresis followed by ethidium bromide

staining. Furthermore, quality of RNAseq samples was verified by a Bio-Rad experion chip (Hercules, CA, USA) in order to know that their RQI were superior to 9.

RNAseq analysis. Two RNA pools were prepared with 4 animals of each condition of the first experiment (non steatosis-initial and steatosis-final stages) and sent to GATC biotechnology (Konstanz, Germany), now belonging to Eurofins genomics (Ebersberg, Germany), to perform the RNA library construction, sequencing and bioinformatics analysis. They executed a paired end run which read length was 2 x 125 bp with an Illumina Hiseq 2500 system as a sequencing platform. The RNA-Seq reads were aligned to the reference genome (Ensembl *Sus scrofa* genome 10.2; www.ensembl.org) using Bowtie generating genome/ transcriptome alignments. Then, the transcripts from the preprocessed RNA-Seq alignment assembly were identified and quantified using Cufflinks. Identified transcripts were merged to full length transcripts and annotated based on the given annotations using Cuffmerge software. Finally, merged transcripts from samples were

compared using Cuffdiff to determine the differential expression levels. RNA sequencing results have been deposited in GEO database with the accession number: GSE130924.

RT-qPCR: 500 ng of total RNA of each animal was reverse transcribed using the First Strand cDNA Synthesis Kit from Thermo Scientific. PCR real time reactions were performed using 2x qPCR BIO Sgreen Mix Hi-ROX, from PCR Biosystems (London, UK), according to the manufacturer's instructions, in a ViiA7 Real-TIME PCR System (Life Technologies). The used primers (Supplementary Table 3) were designed with NCBI primer design software and checked by BLAST analysis (National Center for Biotechnology Information) to verify gene specificity. The relative amount of all mRNAs was calculated using comparative $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. Three reference genes were assayed, being *UBA52* (NM_214211.1) mRNA the most stable, therefore it was selected as the reference (house-keeping) gene.

Western blotting: An approximate 50-mg sample of liver was homogenized in 500 μ l of 8M urea/2M thiourea buffer pH 9 with an

ultraturrax homogenizer followed by a centrifugation during 10 minutes. Protein concentration was measured by Bio-Rad dye binding assay (Bio-Rad, Madrid, Spain). 20 μ g of protein were loaded onto a 16% tricine-SDS-polyacrylamide gel (33) and electrophoresed for 150 min at 85V in a Bio-Rad Miniprotein cell (Hercules, CA). Proteins were transferred to PVDF membranes (GE Healthcare, Madrid, Spain) using semidry transfer cell Bio-Rad Trans-Blot SD apparatus with 1.5 mA/cm² membrane 25 min at 20V. Membranes were blocked with PBS buffer containing 5% BSA for 1 h at room temperature. The primary antibody, diluted in PBS buffer containing 2.5% BSA and 1% Tween 20, was added, and the membranes were incubated overnight at 4°C and then 2 h at room temperature. Protein presence was evidenced by using a rabbit polyclonal antibody against the different protein targets: LGALS3 (ref. 14979-1-AP) (1/2,000), ISG15 (ref. 15981-1-AP) (1/2,000) both from Proteintech (Manchester, UK) and PAQR7 (ref. HPA046936) (1/1,000) from Sigma-Merk (St Louis, MO USA). Equal loadings were confirmed by using a rabbit polyclonal anti-actin (1/3,000)

from Sigma (St Louis, MO, USA). Membranes were washed three times with PBS buffer containing 0.1% Tween 20 and incubated for 1 h at room temperature with conjugated goat anti-rabbit IgG (H&L) DyLight 800 secondary antibody (SA5-35575, Thermo-scientific, diluted 1/ 200,000). Images were captured using an Odyssey®Clx (LI-COR, Bad Homburg, Germany).

Targeted proteomics.

Proteins extracted following the previous method were sent to the proteomic facility of the Complutense University (Madrid, Spain). After concentration, digestion and desalting, peptides were subjected to PRM-MS (parallel reaction monitoring-mass spectrophotometry) to detect the proteins of interest (tr|Q9TSY3|Q9TSY3_PIG; sp|P14287|OSTP_PIG; sp|Q865K8|PAQR7_PIG; tr|A3EX84|A3EX84_PIG; Sp|Q92484|ASM3A_HUMAN; Sp|Q92485|ASM3B_HUMAN; tr|A0A287AB58|A0A287AB58_PIG) using a RP-LC-ESI-MS/MS in an EASY-nLC 1000 System coupled to the Q-Exactive HF mass spectrometer (Thermo Scientific)

through the Nano-Easy spray source. The data acquired in the Q-EXACTIVE HF were analyzed using Skyline v 4.1 software where they were manually inspected to confirm the peptides and transitions that provided accurate detection of peptides/proteins. The MS/MS data were carried out using Proteome Discoverer software v.2.2 (Thermo Scientific) with search engine MASCOT 2.6 (MatrixScience, London, UK) to identify the peptides against in house DataBase with the fasta sequence of targeted protein (8 sequence), Contaminant data Base (247 sequence) and *Sus scrofa* proteome (48918 sequences; 2018/05/18) (UP000008227) downloaded from Uniprot (www.uniprot.org).

Immunohistochemistry: The antigenic sites were retrieved by incubation of the sections in boiling citrate buffer. Next, endogenous peroxidase activity was quenched by incubating the sections with the peroxidase blocking solution from Dako Kit (K4010) (DAKO Corporation, Carpinteria, CA, USA). Immunohistochemistry was

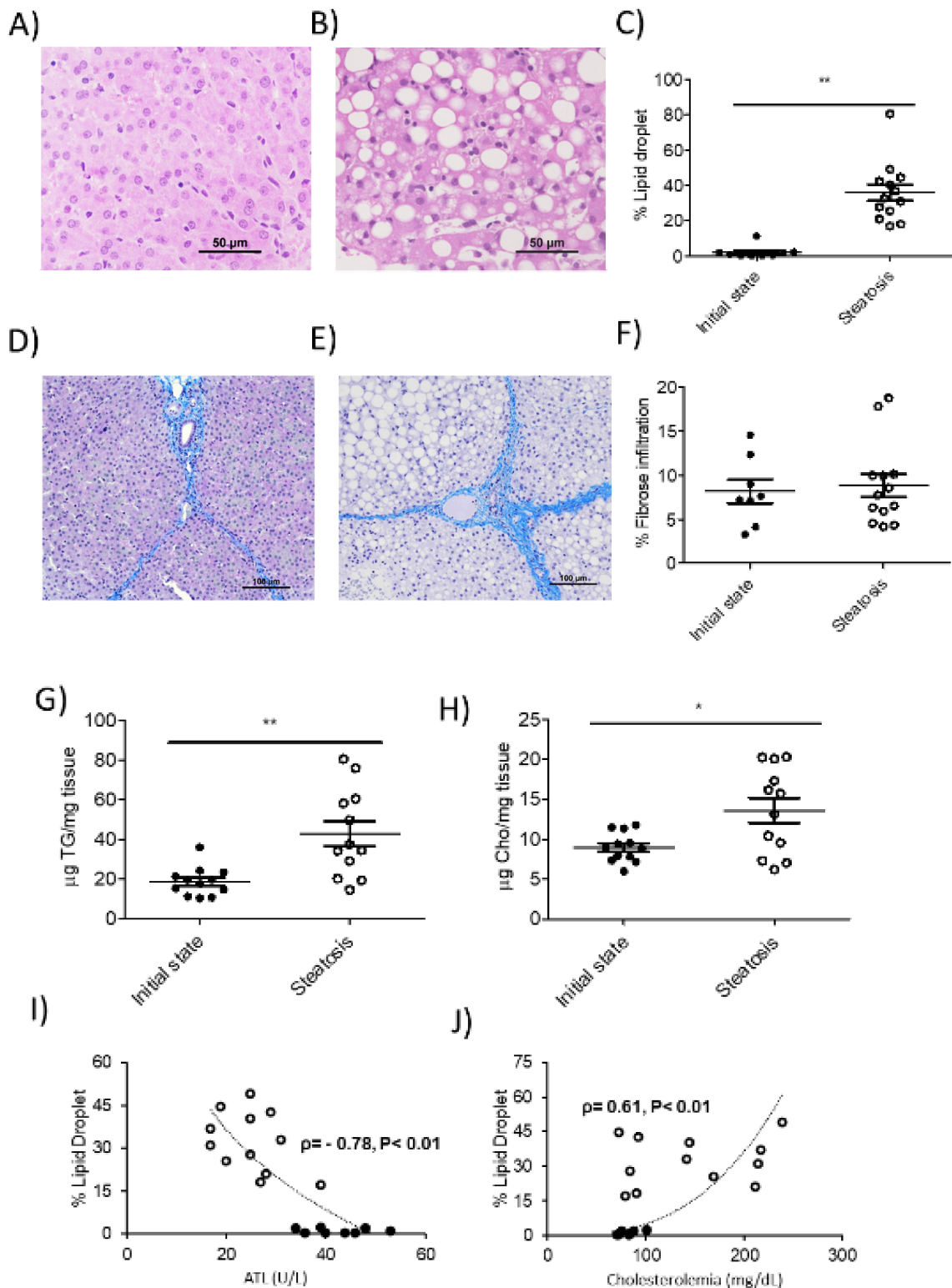


Figure 2. **Characterization of liver in a porcine model of dietary NAFLD development.** Representative liver micrographs, stained with hematoxylin-eosin, at $\times 400$ magnification from commercial breed swine before (A) and after consuming the steatosis diet for 2 months (B). Bar denotes $50\ \mu\text{m}$. Morphometric changes in hepatic fat content expressed as percentage of area of total liver section (C). Representative liver micrographs at $\times 100$ magnification from initial state (D) and steatosis (E) using Masson's trichrome staining. Bar denotes $100\ \mu\text{m}$. Morphometric changes in fiber area (F) of livers, expressed as percentage of total liver section. Hepatic triglyceride (G) and cholesterol (H) contents before and after consuming the steatosis diet for 2 months. Data are expressed as mean \pm SD for each group. Statistical analyses were carried out using (C, F-H) Mann-Whitney U test. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$. Associations among hepatic lipid droplet and ATL (I) and serum cholesterol levels (J). Correlations were calculated by the Spearman's rho test.

performed using rabbit polyclonal (14979-1-AP) and ISG15 (ref. 15981-1-AP), both from Proteintech Group, Inc., Manchester, UK), diluted 1/200 in 1% BSA TBS incubated overnight at 4°C. For peroxidase signal detection EnVision+System-HRP (DAB) for rabbit primary antibodies (K4010, DAKO Corporation, Carpinteria, CA, USA) was used following the manufacturer's instructions. Finally, the sections were counterstained with hematoxylin. To assess the specificity of the immunolabeling, controls were performed by incubating the liver sections with 1% BSA TBS instead of the primary antibody.

Statistical analyses: Results are expressed as mean \pm SD. Data were analyzed by one tail Mann–Whitney's test using InStat 3.02 software for Windows (GraphPad, San Diego, CA, USA). Differences were considered significant when $P < .05$. Correlations between variables were tested by calculating the Pearson or Spearman correlation coefficients.

3. Results:

Characterization of fast and simple development of steatosis in a commercial cross-breed swine

One of the main problems working with commercial cross-breed swine is their genetically resistance to generate NAFLD due to the human directed selection over the last decades to convert all their intakes in muscle weight gain (34). Based in our previous experience with medium term experiments (35), swine fed a high saturated fat, high cholate, high cholesterol, methionine and choline deficient diet (Table S1) for two months could overcome this drawback for the use of this large animal as NAFLD model. In fact, the percentage of hepatic area occupied by lipid droplets (Figure 2A-C) significantly increased in the studied animals consuming this diet for two months. Meanwhile, fiber areas remained unmodified and no inflammatory cells were observed according to histological analyses (Figure 2D-F). Hepatic triglyceride and cholesterol (Figure 2G-H) contents also augmented reinforcing the histological data. Regarding the hepatic plasma parameters (Table

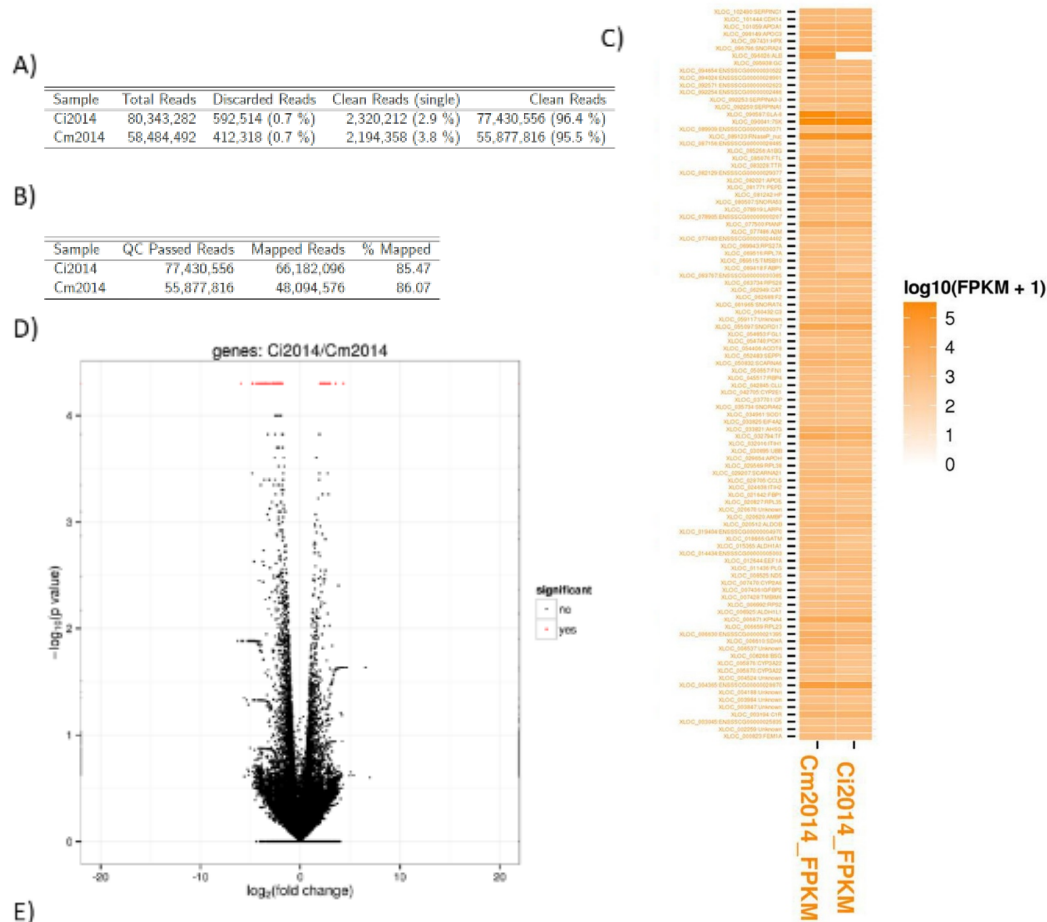


Figure 3. RNAseq experiments comparing expressions of livers in a porcine model of dietary NAFLD development. Ci2014 denotes the group of sequences obtained from a representative pool of hepatic RNAs at the initial state, while Cm2014 represents those of the steatosis group (the same animals on the steatotic diet for 2 months). Total amount of raw sequence data and results of the quality iterating (A). Number of reads mapped to the reference genome/transcriptome for each sample (B). The 100 most abundant genes from the samples and their heatmaps (C). Volcano plots of the genes that significantly differ between the conditions tested based on the fold change and test statistics performed on the RNAseq data between conditions (D). List of genes with differential pattern RNA expression in the studied conditions (E).

S2): ALP, GGT and total bilirubin augmented, ALT diminished and AST remained unchanged after the two-month dietary intervention. Other serum parameters such as glucose, insulin and adiponectin (Table S2) did not increase, indicating the lack of insulin resistance; neither was an open systemic inflammation observed due to their low levels of inflammatory cytokines (even if there were significant increases of IL-6 and IL-8, they remained in a low level). Interestingly, a diminution of an anti-inflammatory cytokine, IL12p40, was observed. Triglycerides (TG), ketone bodies (KB), and non-esterified fatty acids (NEFA) significantly diminished after the dietary treatment. Plasma total cholesterol significantly augmented due to the increase in LDL (Table S2 and Figure S1). There was a striking increase in plasma leptin by the dietary administration. Overall, it has been obtained a simple steatotic model in a commercial cross-breed swine with a fast two-month development. Interesting features of the model are the absence of inflammation and insulin resistance, and the hyperleptinemia.

Gene expression in NAFLD progression study

To meet this end, we selected four representative animals, isolated their RNA before and after consuming the steatotic diet and characterized their transcriptome by RNAseq (Figure 3). More than 80 million reads (96.4% clean) and almost 60 million (95.5% clean) were collected in the initial state and steatotic samples, respectively (Figure 3A). With these reads, we were able to map more than 85% of genome in both conditions (Figure 3B). The fragment per kilobase per million mapped reads (FPKM) for each transcript of both samples were used, and only those reaching a log₂ signal ratio higher than 2 (for up-regulated genes) or lower than -2 (for down-regulated) were enlisted in Figure 3E.

Due to the novelty of RNAseq, the relatively poor annotation of pig genome compared with the human or mouse genomes, and the existence of cross-bred animals, the RNAseq data require further verification by a more established technique, such as RT-qPCR. Therefore, 14 differentially expressed genes from the RNAseq data were assayed by

RT-qPCR (Figure 4A). Surprisingly, not all of them showed the same differential expression pattern, even a few of them showed an inverse pattern (Table S4). Thereby, the

absence of correlation between both techniques was not a surprise (Figure 4B). Nevertheless, according to the RT-qPCR data for some of the studied genes, a high inverse

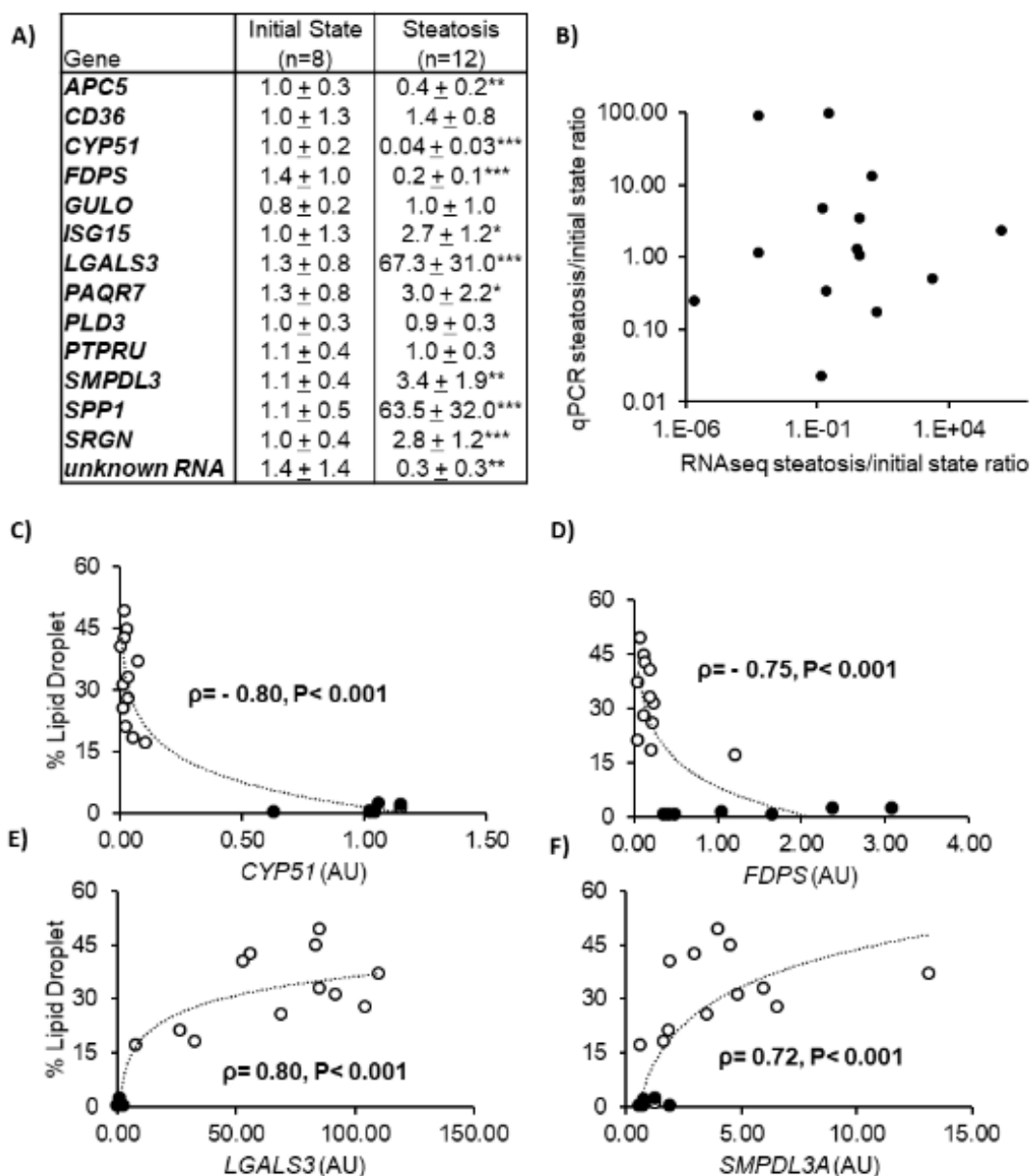


Figure 4. Validation and biological meaning of RNAseq data in a porcine model of dietary NAFLD development. Verification by RT-qPCR of the changes in 14 differentially expressed genes according to RNAseq analysis (A). Data (mean ± SD) represent arbitrary units normalized to UBA52 expression. Statistical analyses were carried out by Mann-Whitney's U test. *, p<0.05; **, p<0.01 and ***, p<0.005. Correlation analysis between RNAseq and RT-qPCR data (B). Log2 of steatosis/initial state ratio of RNAseq values of selected genes were plotted against the steatosis/non-steatosis ratio of mean expression values of the same genes by RT-qPCR (see Table S4). Association among hepatic lipid droplet content and CYP51 (C), FDPS (D) LGALS3 (E) and SMPDL3A (F) gene expressions. Correlations were calculated according to the Spearman's rho test.

(*CYP51* and *FDPS*) and direct (*LGALS3* and *SMPDL3A*) correlations with hepatic lipid droplet accumulation were observed (Figure 4C-F).

Characterization of NAFLD regression in a commercial cross-breed swine

One of the characteristics of a simple steatosis is its ability to revert to a healthy status. Thereby, to study this characteristic in our steatosis model and to verify whether the observed metabolic and genetic changes were consistent, we carried out a second intervention in which we studied the regression of the disease. To this end, pigs once done steatotic were switched to their control diet. As shown in figure 5, after a month on the control diet, hepatic lipid accumulation was decreased as well as hepatic triglycerides and cholesterol. Strikingly, fiber amount continued to increase (Figure 5 D-F), this could be an effect of a faster diminution of cell size compared with the collagen resorption. Regarding serum parameters, once again, ALT showed a reverse correlation with cholesterolemia and a direct one with lipid droplet enlargement (Figure 5 I-

J). Among the modifications observed in the serum parameters (Table S2) of regression experiment: ALT, ALP, GGT, total bilirubin, cholesterol, LDLc, and IL12p40 were consistent with the previous experiment. In this experiment, as no leptin augmentation was observed in the steatotic condition, no diminution could have been observed as an effect of the regression procedure.

Gene expression in NAFLD regression study

Those genes differentially expressed in the progression experiment were assayed. As shown in Figure 6A, 8 out of 11 genes repeated their pattern, two (*CD36* and *unknown RNA*) did not reach a significant difference, and only one (*APC5*) showed an inverse result. Due to this high conservation of the expression pattern, we observed a positive correlation between genetic expression changes in the progression and the regression experiments (Figure 6B). In addition, hepatic lipid droplet accumulation displayed a reverse correlation with *CYP51* and *FDPS* and a direct correlation with *LGALS3* and *SMPDL3A* (Figure 6 C-F), thereby

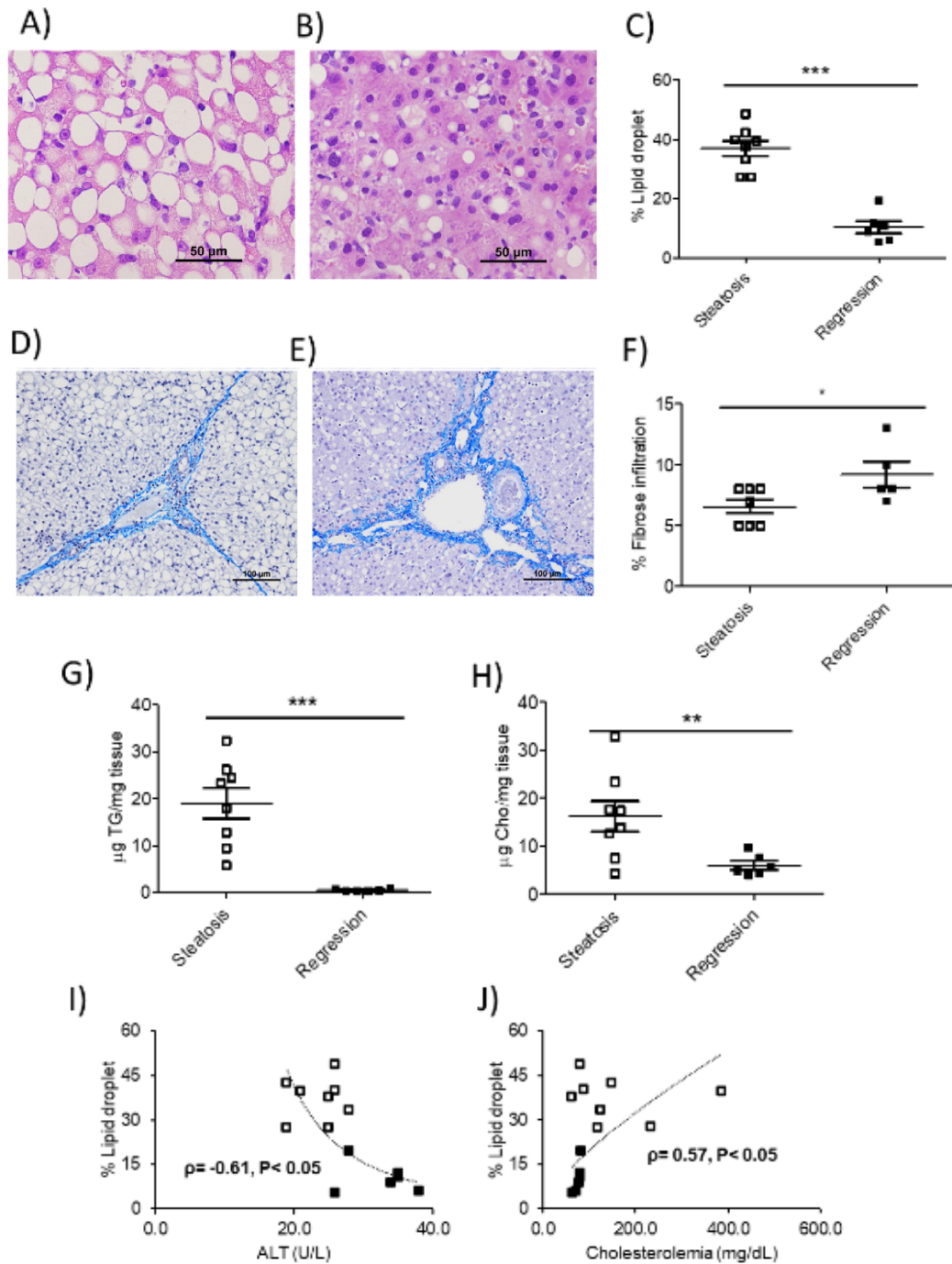


Figure 5. Characterization of NAFLD regression in the porcine model. Representative liver micrographs, stained with hematoxylin-eosin, at $\times 400$ magnification from commercial breed swine fed the steatotic diet for two months (A) and after consuming the control diet for 1 month (B). Bar denotes 50 μm . Morphometric changes in hepatic lipid droplet expressed as percentage of area of total liver section (C). Representative liver micrographs at $\times 100$ magnification from steatosis (D) and regression (E) using Masson's trichrome staining. Bar denotes 100 μm . Morphometric changes in fiber extent (F) of livers, expressed as percentage of fiber area of total liver section. Hepatic triglyceride (G) and cholesterol (H) contents before and after consuming the control diet for one month. Data are expressed as mean \pm SD for each group. Statistical analyses were carried out using Mann-Whitney's U test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$. Associations among hepatic lipid content and ALT (I) and serum cholesterol levels (J). Correlations were calculated by the Spearman's rho test.

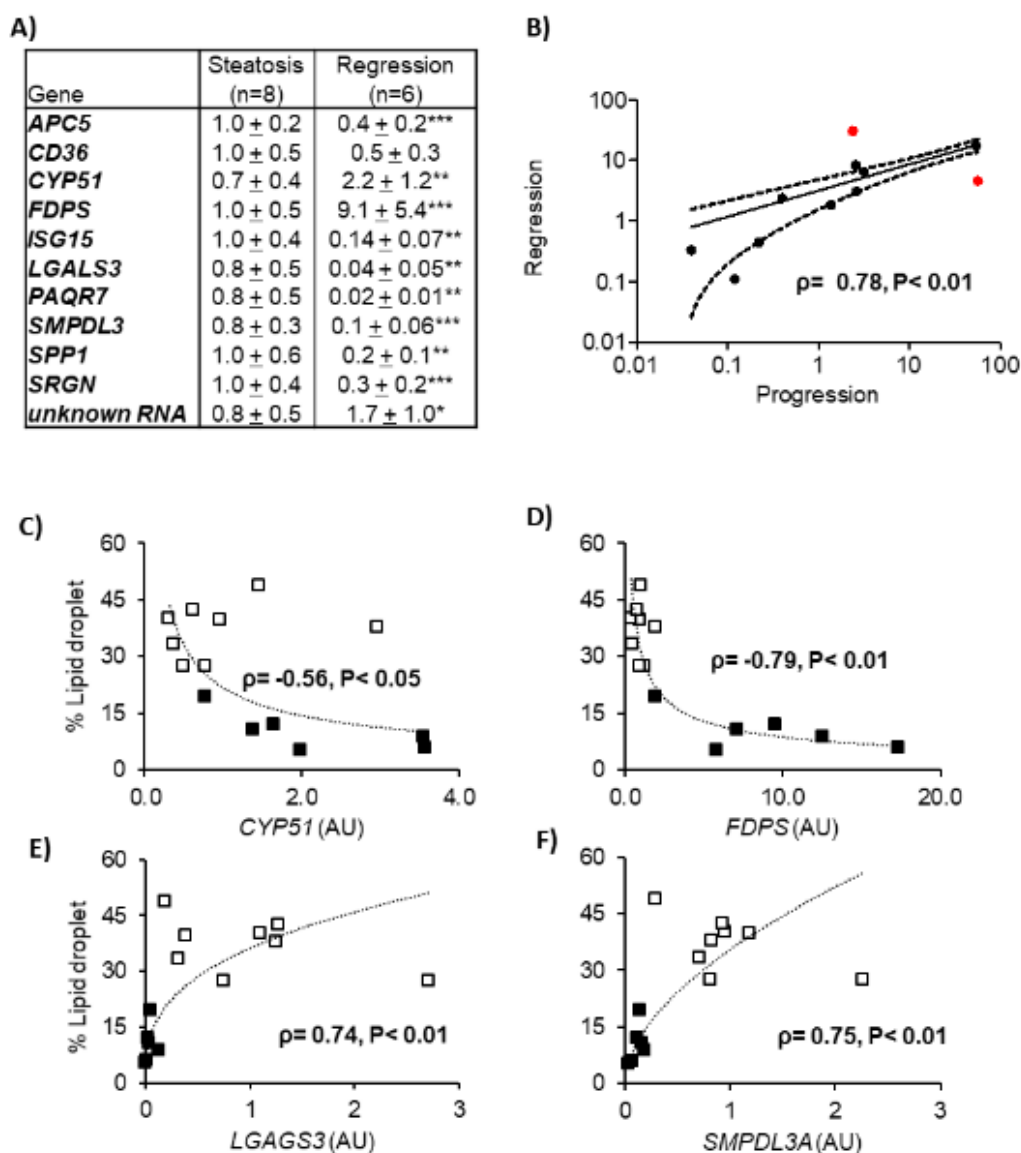


Figure 6. Confirmation of mRNA gene expression changes in the regression experiment using the porcine model of dietary NAFLD development. Analyses by RT-qPCR of 11 previously observed differentially expressed genes (A). Data (mean ± SD) represent arbitrary units normalized to UBA52 expression. Statistical analyses were carried out by Mann-Whitney U test. *, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$ and ***, $p < 0.005$. Correlation analysis between qPCR data from progression and regression experiments (B). Log₂ of steatosis/non-steatosis ratios from progression experiment samples were plotted against the regression samples values (see Table S4). Association among hepatic lipid droplet content and CYP51 (C), FDPS (D) LGALS3 (E) and SMPDL3A (F) gene expressions. Correlations were calculated according to the Spearman's rho test.

corroborating the results obtained in the previous experiment.

Confirmation at protein level of RNA changes

We studied proteins codified by genes whose RNA expression ratios were higher than 5 in any of the studied conditions (Table S4). According to this, ISG15, LGALS3, PAQR7, SMPDL3A and SPP1 were

assayed. By Western blot (Figure 7A), significant changes regarding ISG15, LGALS3, PAQR7 were observed in agreement with their RNA findings. Notwithstanding, SPP1 showed no differences between steatotic and healthy samples and SMPDL3A antibody was unable to detect its target in the studied conditions (Data not shown). In order to corroborate the Western blot results, we performed proteotypic peptides detection with mass-spectrometry. For two of them, we were able to gather the quality parameters needed to carry out a quantitative determination (unmistakably detection of at least three proteotypic peptides from a protein) (Figure 7B). The obtained results corroborated those seen by Western blot. Likewise, immunohistochemistry analysis was in agreement with these previous findings. LGALS3 and ISG15 showed a cytoplasmic distribution but with different patterns. ISG15 was diffuse and homogeneous along the tissue in contrast to LGALS3 that tended to cluster and displayed an irregular pattern (Figure 7C).

Selected proteins: ISG15 and LGALS3 as potential biomarkers of NAFLD

According to UNIPROT (<https://www.uniprot.org/>), ISG15 (A0A287AB58_PIG) and LGALS3 (A3EX84_PIG= K7GRV5) are secreted proteins. Using ELISA, we quantified them in plasma (Figure 8 A-D). Plasma ISG15 showed no differences neither in NAFLD progression nor in regression, and plasma LGALS3 only displayed an augmentation for the steatotic condition in the progression model. Interestingly, plasma LGALS3 levels were positively correlated with leptin levels in both experimental approaches (Figure 8 E-F), but no correlation with its hepatic gene expression or hepatic lipid accumulation was observed (Table S7).

4. Discussion:

This study shows an experimental model of NAFLD in a large animal such as the commercial breed pig through altering its diet for a short period. The diet manipulation

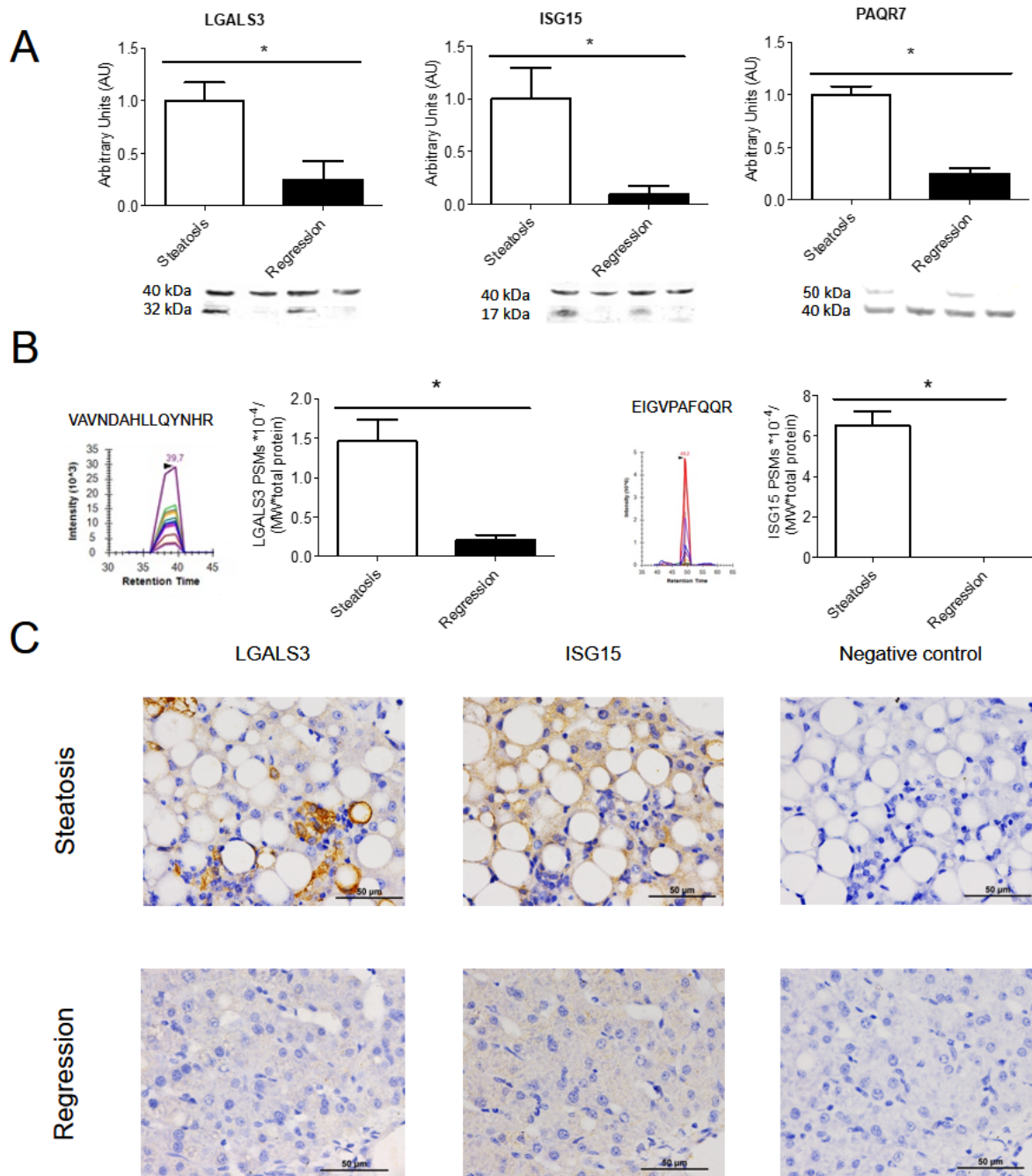


Figure 77. Confirmation of selected protein expression changes in the regression experiment using the porcine model of dietary NAFLD development. Representative Western blots of proteins and quantification of their expressions normalized to the actin (40 kDa) as loading control (A). Parallel reaction monitoring detection of proteotypic peptides and quantification of detectable proteins in targeted proteomics (B). Representative chromatograms of proteotypic peptides (VAVNDAHLLQYNHR and EIGVPAFQQR for LGALS3 and ISG15, respectively). PSMs mascot values were divided by their protein molecular weight and the number of detected proteins of each sample. Data are expressed as mean \pm SD for each group. Statistical analyses were carried out using Mann–Whitney U test. * $p < 0.05$. Immunohistochemical localization of LGALS3 and ISG15 proteins in liver (C). Representative liver micrographs at $\times 400$ magnification. Positive signals of immunolabeling are shown in brown. Bar denotes 50 μm .

involved a combination of high saturated fat and cholesterol, cholate and low methionine and choline contents. This diet was able to

develop a reproducible model of hepatic steatosis in two months. Our biochemical characterization proved that this model showed

hypercholesterolemia, low level of inflammation, absence of insulin resistance and variable leptinemia (Table S2). The hepatic lipid accumulation was reverted when the steatotic diet was removed for a month but not the fiber extent (Figure 2 and 5). Using RNAseq to assess hepatic transcriptome, several changes in gene expression were identified and confirmed by RT-qPCR (*APC5*, *CYP51*, *FDPS*, *ISG15*, *LGALS3*, *PAQR7*, *SMPDL3*, *SPP1*, *SRGN*, and an *unknown RNA*) (Figure 3 and 4). Most of the genes maintained their expression pattern in both experiments (Figure 6). Finally, we verified the hepatic protein expression within the steatosis condition of two genes, whose proteins had secretable properties (*ISG15*, *LGALS3*), by three different methods (Figure 7), and we were able to detect their serum presence (Figure 8) which could have a complex regulation implying interaction within different tissues.

The availability of a large animal model of NAFLD in a short period may be of particular interest to explore new treatments for this ailment and to better characterize

this type of livers for transplant procedures. Moreover, the usage of cross-bred animals is reflecting the genetic makeup of any subject regarding disease in human studies where each subject has a unique genome stemmed from the combination of two different options for thousands of genes which can lead to very different responses to a treatment (36). The fact that these increased gene expression levels were clear even with such a variable genetic background reinforces the key role of detected genes in early steatosis.

Plasma, triglycerides (TG), ketone bodies (KB) and non-esterified fatty acids (NEFA) were found significantly diminished with the steatosis treatment (Table S2), which could be due to a deficient mobilization of stored fat, decreased use of fat as source of energy and an impediment of TG to be loaded into VLDL because of the deficiency of methionine in the diet. Nonetheless, hypercholesterolemia, in particular carried by LDL (Figure S1), was present with the dietary intervention, as well as augmented total bilirubin, ALP and GGT. These increases could indicate a blockage of bile

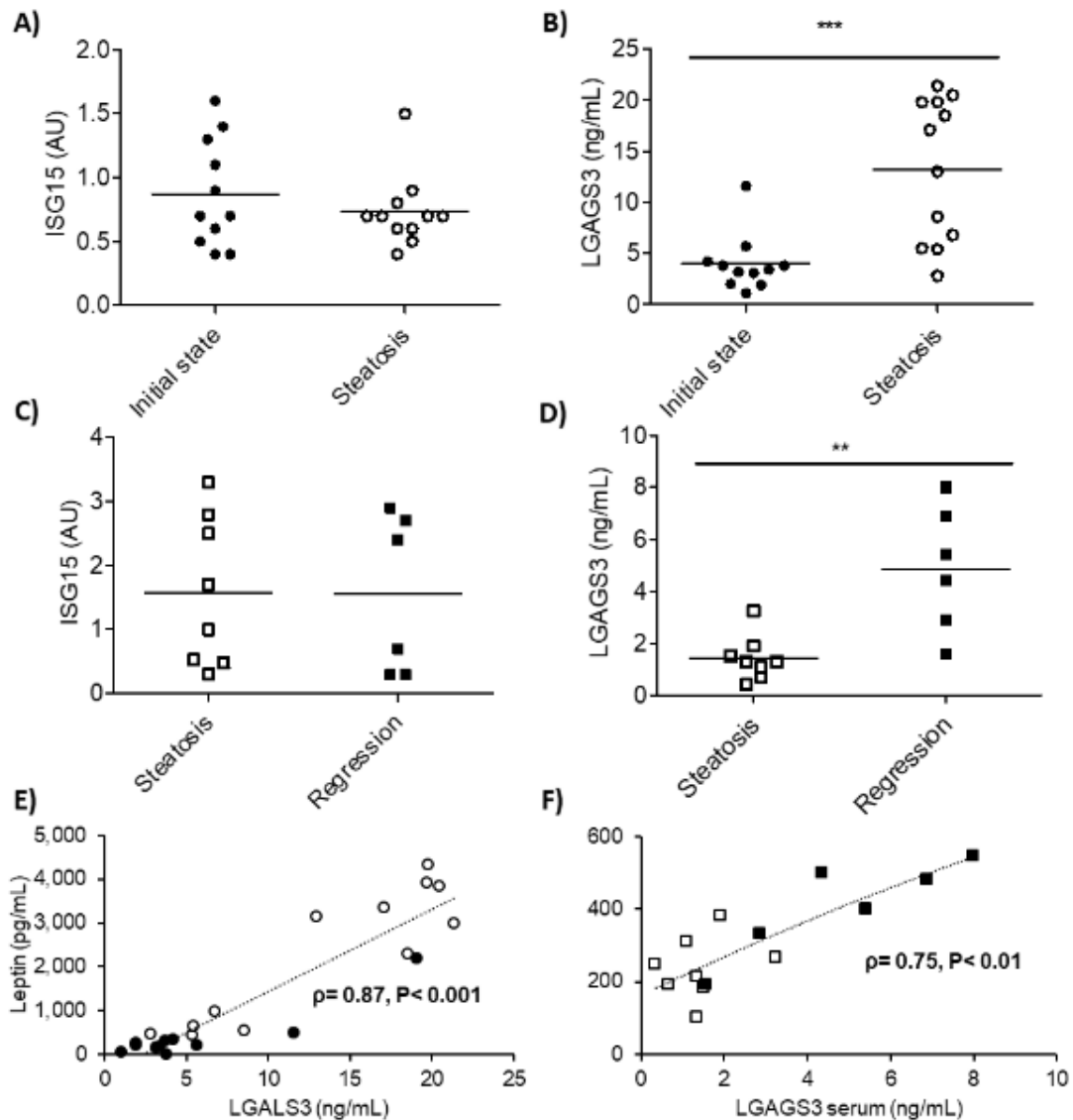


Figure 8. Serum determination of ISG15 and LGALS3. Serum ISG15 (A, C) and LGALS3 (B, D) levels in both progression (A-B) and regression (C-D) experiments. Statistical analyses were carried out using (A-D) Mann–Whitney U test: ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$. Leptin correlation with LGALS3 in progression (E) and regression (F) experiments. Correlation were calculated according to the spearman’s rho test.

secretion and higher availability of cholesterol to accumulate in the liver and to be secreted as VLDL.

The 10-fold increase in leptinemia found in the first experiment of progression was not observed in the regression experiment. Several aspects should be considered. First, the second

experiment was carefully designed by artificial insemination with only one boar as progenitor to decrease genetic variability, so a founder effect cannot be rejected. Second, in the second experiment the steatotic group showed an early peak in the FPLC cholesterol profile compatible with the presence of VLDL or chylomicron remnants (Figure S1).

Fatty acids are known to inhibit leptin secretion from adipocytes (37), and this effect could have been carried out by VLDLs. Furthermore, in our experimental designs, serum IL12P40 showed a strikingly significant association with the steatosis process, being this a new aspect not previously reported in humans (38) or mice (39). Further investigation should be carried out to discern whether or not this association between this anti-inflammatory protein and NAFLD is consistent among species.

Regarding hepatic gene expression, the absence of correlation between RNAseq and qPCR data was an unexpected result (Figure 4B and table S4). Nevertheless, we ought to remember that pig genome and transcriptome are not as studied as mouse and human transcriptomes. Also, the absence of a uniform genetic background due to the use of cross-bred animals could have interfered with the transcriptome response and the following RNAseq analysis (36). Most of the verified genes maintained their expression pattern both in NAFLD progression and regression reflecting that 1-month

period after 2 months of steatotic diet was enough to revert the progress in agreement with the histological analyses.

LGALS3 gene expression was increased with the hepatic steatosis in both experiments (Figure 4 and 6) and increased hepatic protein expression was also confirmed (Figure 7). But, its serum presence was only augmented for the progression model steatotic condition (Figure 8). This fact, together with its high direct correlation with leptinemia in both experiments reveal a complicate regulation of its serum presence (Figure 8 and Table S7). Two possibilities could explain this effect: first, maybe its serum presence is due to other tissue secretion (40). The second possibility implies a leptin effect on liver *LGALS3* secretion. Leptin is known to regulate liver metabolism in a highly intricate mode depending on the insulinemia and the liver state (41). This fact, together with the absence of hyperleptinemia in the steatosis condition in the second setting could imply a regulatory role for leptin in hepatic secretion of *LGALS3*, in which low leptinemia would lead to

the absence of LGALS3 hepatic secretion.

LGALS3 has already been related to cardiometabolic disease (42) and hepatic steatosis (43). Its gene absence has been observed to cause both steatosis (44) and resistance to steatosis in mice (45). The latest works point to a role for LGALS3 promoting fibrosis and inflammation in mouse models (43, 46). The second fully characterized protein, ISG15, has already be linked to hepatitis from viral infection (47, 48) but no relation to NAFLD has been described. According to GEO database, further evidences for a link between *LGALS3* liver expression and diet interventions exists, but a slight one for *ISG15* liver expression, which could have a more complicated behavior (see Table S5 and S6). Further experiments will be required to discern the link between leptinemia and LGALS3 secretion and the implication of LGALS3 and ISG15 in steatosis.

5. Conclusions:

Several approaches have been performed concerning NAFLD in swine, most of them based on predisposed breeds and long term experiments (49, 50). Hence, we

present a fast dietetic development of a reversible simple steatosis model in commercial breed swine characterized by hepatic lipid accumulation without fibrosis development, neither systemic inflammation nor insulin resistance. We propose ALT, ALP, GGT, total bilirubin, cholesterol, LDLc, and IL12P40 as the best serum parameters to study steatosis among the studied parameters. Further attention should be addressed regarding IL12P40 serum levels and their implication in NAFLD pathology.

Regarding protein results, LGAL3 seems to be a candidate to have a key role in steatosis development and in the interaction of the liver with the rest of the body. Further research should be carried out to understand its function and relevance, as well as its interaction with serum leptin levels.

Commercial cross-breed swine can be a steatosis experimental model and LGALS3, ISG15, SMPDL3A, CYP51, and FDPS could play an important and unknown role in early NAFLD and pathology of big livers.

6. Acknowledgments:

We thank the University of Zaragoza Veterinary Hospital for their anesthesia support and the *Servicio General de Apoyo a la Investigación, División of Experimentación Animal, Universidad de Zaragoza* for their help in maintaining the animals. This research was supported by grants from the *Ministerio de Economía y Competitividad-Fondo Europeo de Desarrollo Regional* (SAF2016-75441-R) and the *Fondo Social Europeo-Gobierno de Aragón* (B16_17R). CIBER de Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición (CIBEROBN, CB06/03/1012) is an initiative of ISCIII. L.V.H.M. was recipient of a *Fondo Social Europeo-Gobierno de Aragón* contract.

No competing financial interests exist.

7. References:

1. Younossi ZM, Koenig AB, Abdelatif D, Fazel Y, Henry L, Wymer M. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease-Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology* 2016;64:73-84.
2. Charlton MR, Burns JM, Pedersen RA, Watt KD, Heimbach JK, Dierkhising RA. Frequency and outcomes of liver transplantation for nonalcoholic steatohepatitis in the United States. *Gastroenterology* 2011;141:1249-1253.
3. Liang T, Alloosh M, Bell LN, Fullenkamp A, Saxena R, Van Alstine W, Bybee P, et al. Liver injury and fibrosis induced by dietary challenge in the Ossabaw miniature Swine. *PLoS One* 2015;10:e0124173.
4. Nguyen P, Leray V, Diez M, Serisier S, Le Bloc'h J, Siliart B, Dumon H. Liver lipid metabolism. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)* 2008;92:272-283.
5. Ipsen DH, Lykkesfeldt J, Tveden-Nyborg P. Molecular mechanisms of hepatic lipid accumulation in non-alcoholic fatty liver disease. *Cell Mol Life Sci* 2018;75:3313-3327.
6. Lou-Bonafonte JM, Arnal C, Osada J. New genes involved in hepatic steatosis. *Curr Opin Lipidol* 2011;22:159-164.
7. Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, Behling C, Contos MJ, Cummings OW, Ferrell LD, et al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2005;41:1313-1321.
8. Angulo P. Nonalcoholic fatty liver disease. *N Engl J Med* 2002;346:1221-1231.
9. Torres DM, Harrison SA. Diagnosis and therapy of nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology* 2008;134:1682-1698.
10. Vuppalanchi R, Chalasani N. Nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis: Selected practical issues in their evaluation and management. *Hepatology* 2009;49:306-317.
11. Day CP, James OF. Steatohepatitis: a tale of two "hits"? *Gastroenterology* 1998;114:842-845.
12. de Alwis NM, Day CP. Non-alcoholic fatty liver disease: the mist gradually clears. *J Hepatol* 2008;48 Suppl 1:S104-112.
13. Jou J, Choi SS, Diehl AM. Mechanisms of disease progression in nonalcoholic fatty liver disease. *Semin Liver Dis* 2008;28:370-379.
14. Cohen JC, Horton JD, Hobbs HH. Human fatty liver disease: old

- questions and new insights. *Science* 2011;332:1519-1523.
15. Yang SL, Xia JH, Zhang YY, Fan JG, Wang H, Yuan J, Zhao ZZ, et al. Hyperinsulinemia shifted energy supply from glucose to ketone bodies in early nonalcoholic steatohepatitis from high-fat high-sucrose diet induced Bama minipigs. *Sci Rep* 2015;5:13980.
 16. Herrera-Marcos LV, Lou-Bonafonte JM, Arnal C, Navarro MA, Osada J. Transcriptomics and the mediterranean diet: a systematic review. *Nutrients* 2017;9.
 17. Wang Z, Gerstein M, Snyder M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat Rev Genet* 2009;10:57-63.
 18. Mentzel CM, Anthon C, Jacobsen MJ, Karlskov-Mortensen P, Bruun CS, Jorgensen CB, Gorodkin J, et al. Gender and obesity specific microRNA expression in adipose tissue from lean and obese pigs. *PLoS One* 2015;10:e0131650.
 19. Xia J, Yuan J, Xin L, Zhang Y, Kong S, Chen Y, Yang S, et al. Transcriptome analysis on the inflammatory cell infiltration of nonalcoholic steatohepatitis in bama minipigs induced by a long-term high-fat, high-sucrose diet. *PLoS One* 2014;9:e113724.
 20. Litten-Brown JC, Corson AM, Clarke L. Porcine models for the metabolic syndrome, digestive and bone disorders: a general overview. *Animal* 2010;4:899-920.
 21. Lunney JK. Advances in swine biomedical model genomics. *Int J Biol Sci* 2007;3:179-184.
 22. Zhang N, Jing W, Cheng J, Cui W, Mu Y, Li K, Lei X. Molecular characterization and NF-kappaB-regulated transcription of selenoprotein S from the Bama minipig. *Mol Biol Rep* 2011;38:4281-4286.
 23. Walters EM, Wolf E, Whyte JJ, Mao J, Renner S, Nagashima H, Kobayashi E, et al. Completion of the swine genome will simplify the production of swine as a large animal biomedical model. *BMC Med Genomics* 2012;5:55.
 24. Verma N, Rettenmeier AW, Schmitz-Spanke S. Recent advances in the use of *Sus scrofa* (pig) as a model system for proteomic studies. *Proteomics* 2011;11:776-793.
 25. Bendixen E, Danielsen M, Larsen K, Bendixen C. Advances in porcine genomics and proteomics--a toolbox for developing the pig as a model organism for molecular biomedical research. *Brief Funct Genomics* 2010;9:208-219.
 26. Bassols A, Costa C, Eckersall PD, Osada J, Sabria J, Tibau J. The pig as an animal model for human pathologies: A proteomics perspective. *Proteomics Clin Appl* 2014;8:715-731.
 27. te Pas MF, Koopmans SJ, Kruijt L, Calus MP, Smits MA. Plasma proteome profiles associated with diet-induced metabolic syndrome and the early onset of metabolic syndrome in a pig model. *PLoS One* 2013;8:e73087.
 28. Ekser B, Ezzelarab M, Hara H, van der Windt DJ, Wijkstrom M, Bottino R, Trucco M, et al. Clinical xenotransplantation: the next medical revolution? *Lancet* 2012;379:672-683.
 29. Niu D, Wei HJ, Lin L, George H, Wang T, Lee IH, Zhao HY, et al. Inactivation of porcine endogenous retrovirus in pigs using CRISPR-Cas9. *Science* 2017;357:1303-1307.
 30. Lai L, Kolber-Simonds D, Park KW, Cheong HT, Greenstein JL, Im GS, Samuel M, et al. Production of alpha-1,3-galactosyltransferase knockout pigs by nuclear transfer cloning. *Science* 2002;295:1089-1092.
 31. Acin S, Navarro MA, Perona JS, Surra JC, Guillen N, Arnal C, Sarria AJ, et al. Microarray analysis of hepatic genes differentially expressed in the presence of the unsaponifiable fraction of olive oil in apolipoprotein E-deficient mice. *Br J Nutr* 2007;97:628-638.
 32. Folch J, Less M, Sloan-Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipids from the

- animal tissues. *J Biol Chem* 1957;33:497-509.
33. Schagger H. Tricine-SDS-PAGE. *Nat Protoc* 2006;1:16-22.
 34. Cheng J, Newcom DW, Schutz MM, Muir WM, Cui Q, Li B, Zhang H, et al. Selection for feed efficiency in Duroc pigs with the addition of daily feed intake data in a 2-stage selection procedure. *Applied Animal Science* 2019;35:20-29.
 35. Gonzalo MA, Martinez-Beamonte R, Palacios P, Marin J, Castiella T, Surra J, Burdio F, et al. Analysis of tissue bioimpedance as a measurement of liver steatosis: experimental model in large animals. *Transplant Proc* 2012;44:1579-1583.
 36. Sevillano CA, Ten Napel J, Guimaraes SEF, Silva FF, Calus MPL. Effects of alleles in crossbred pigs estimated for genomic prediction depend on their breed-of-origin. *BMC Genomics* 2018;19:740.
 37. Cammisotto PG, Gelinias Y, Deshaies Y, Bukowiecki LJ. Regulation of leptin secretion from white adipocytes by free fatty acids. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2003;285:E521-526.
 38. Ajmera V, Perito RE, Bass NM, Terrault NA, Yates KP, Gill R, Loomba R, et al. Novel plasma biomarkers associated with liver disease severity in adults with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2017;65:65-77.
 39. Hall D, Poussin C, Velagapudi VR, Empsen C, Joffraud M, Beckmann JS, Geerts AE, et al. Peroxisomal and microsomal lipid pathways associated with resistance to hepatic steatosis and reduced pro-inflammatory state. *J Biol Chem* 2010;285:31011-31023.
 40. ProteinAtlas H. 2019 [updated 15/11/2018. version 18.1 <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000131981-LGALS3/tissue>. Access date: 18 december 2018
 41. D'Souza A M, Neumann UH, Glavas MM, Kieffer TJ. The glucoregulatory actions of leptin. *Mol Metab* 2017;6:1052-1065.
 42. Dong R, Zhang M, Hu Q, Zheng S, Soh A, Zheng Y, Yuan H. Galectin-3 as a novel biomarker for disease diagnosis and a target for therapy (Review). *Int J Mol Med* 2018;41:599-614.
 43. Jetic I, Jovicic N, Pantic J, Arsenijevic N, Lukic ML, Pejnovic N. Galectin-3 ablation enhances liver steatosis, but attenuates inflammation and il-33-dependent fibrosis in obesogenic mouse model of nonalcoholic steatohepatitis. *Mol Med* 2015;21:453-465.
 44. Nakanishi Y, Tsuneyama K, Nomoto K, Fujimoto M, Salunga TL, Nakajima T, Miwa S, et al. Nonalcoholic steatohepatitis and hepatocellular carcinoma in galectin-3 knockout mice. *Hepato Res* 2008;38:1241-1251.
 45. Iacobini C, Menini S, Ricci C, Blasetti Fantauzzi C, Scipioni A, Salvi L, Cordone S, et al. Galectin-3 ablation protects mice from diet-induced NASH: a major scavenging role for galectin-3 in liver. *J Hepatol* 2011;54:975-983.
 46. Tian J, Yang G, Chen HY, Hsu DK, Tomilov A, Olson KA, Dehnad A, et al. Galectin-3 regulates inflammasome activation in cholestatic liver injury. *FASEB J* 2016;30:4202-4213.
 47. Sooryanarain H, Rogers AJ, Cao D, Haac MER, Karpe YA, Meng XJ. ISG15 modulates type i interferon signaling and the antiviral response during hepatitis e virus replication. *J Virol* 2017;91.
 48. Hoan NX, Van Tong H, Giang DP, Toan NL, Meyer CG, Bock CT, Kreamsner PG, et al. Interferon-stimulated gene 15 in hepatitis B-related liver diseases. *Oncotarget* 2016;7:67777-67787.
 49. Bell LN, Lee L, Saxena R, Bemis KG, Wang M, Theodorakis JL, Vuppalachchi R, et al. Serum proteomic analysis of diet-induced steatohepatitis and metabolic syndrome in the Ossabaw miniature swine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2010;298:G746-754.
 50. Lee L, Alloosh M, Saxena R, Van Alstine W, Watkins BA, Klaunig JE, Sturek M, et

al. Nutritional model of steatohepatitis and metabolic syndrome in the Ossabaw miniature swine. *Hepatology* 2009;50:56-67.

Supplemental data:

Table S1. Diet composition and fatty acid profile.

	Control Diet	Steatosis Diet
Average energy intake (kcal/pig/day)	2622 ± 219	3832 ± 576
Carbohydrates (%)^a	72.8	43.0
Starch (%)^a	45.0	17.2
Sucrose (%)^a	8.1	1.5
Fructose (%)^a	8.5	13.5
Glucose (%)^a	6.7	10.8
Protein (%)^a	18.0	7.0
Fat (%)^a	9.2	50.0
Fat Source	Palm oil	Hydrogenated palm and sunflower oil
Caprilic (C8:0)^b	0.1	0.1
Capric (C10:0)^b	0.2	0.04
Lauric (C12:0)^b	3.9	0.5
Miristic (C14:0)^b	1.8	1.0
Palmitic (C16:0)^b	27	39.0
Palmitoleic (C16:1)^b	0.1	0.2
Stearic (C18:0)^b	2.9	8.7
Oleic (C18:1)^b	28.0	32.7 ^c
Linoleic (C18:2 n6)^b	32.5	12.6 ^c
Linolenic (C18:3 n3)^b	2.3	0.1
Araquic (C20:0)^b	0.4	0.4
Gadoleic (C20:1)^b	0.4	0.14
Cholesterol (ppm)	Nil to negligible	20 000
Sodium Cholate (ppm)	Nil to negligible	500
Methionine (ppm)	2160	100
Choline (ppm)	90	16

^aValues represent percent of total daily calories.

^bFatty acid profile percentage

^cTrans isomers observed. Oleic: 4%, linoleic: 0.2%

Table S2. Serum biochemistry parameters

	Experiment A. Progression		Experiment B. Regression	
	Non Steatosis-initial stage (n = 12)	Steatosis-final stage (n = 12)	Steatosis-initial stage (n = 8)	Regression-final stage (n = 6)
Glucose (mg/dL)	91 ± 9	93 ± 20	92 ± 22	92 ± 13
TG (mg/dl)	33 ± 10	24 ± 7 ^a	22 ± 15	26 ± 6
Cholesterol (mg/dl)	82 ± 10	147 ± 62 ^b	156 ± 107	77 ± 7 ^d
cLDL (mg/dL)	23 ± 3	90 ± 38 ^c	64 ± 44	29 ± 3 ^e
cHDL (mg/dL)	54 ± 7	52 ± 22	58 ± 40	43 ± 4
Free Chol (mg/dL)	17 ± 2	23 ± 10	60 ± 41	24 ± 2 ^e
KB (µM)	149 ± 87	36 ± 35 ^c	31 ± 35	0 ± 0
NEFA (mM)	0.11 ± 0.11	0.05 ± 0.09 ^a	0.23 ± 0.35	0.37 ± 0.36
AST (U/L)	48 ± 16	60 ± 22	60 ± 24	33 ± 23 ^d
ALT (U/L)	42 ± 6	24 ± 5 ^c	24 ± 4	34 ± 4 ^e
ALP (U/L)	5 ± 2	132 ± 74 ^c	136 ± 84	3 ± 1 ^e
GGT (U/L)	51 ± 13	60 ± 10 ^a	50 ± 10	34 ± 5 ^e
Bil T (mg/dL)	0.2 ± 0.2	0.5 ± 0.3 ^b	0.4 ± 0.2	0.1 ± 0.0 ^e
Insulin (ng/mL)	3 ± 1	2 ± 1 ^a	4 ± 2	2 ± 1 ^d
Adiponectin (µg/mL)	14 ± 2	13 ± 2	14 ± 4	17 ± 3 ^d
Leptin (pg/mL)	199 ± 138	2229 ± 1531 ^c	236 ± 86	408 ± 132 ^d
TNFα (pg/mL)	25 ± 20	43 ± 70	40 ± 17	74 ± 53
IL-1beta (pg/mL)	16.3 ± 27.8	11 ± 17	3 ± 5	22 ± 29
IL-4 (pg/mL)	0 ± 0	0.1 ± 0.2	0 ± 0	0.3 ± 0.4
IL-6 (pg/mL)	4 ± 8	16 ± 16 ^a	7 ± 18	43 ± 68
IL-8 (pg/mL)	3 ± 4	7 ± 6 ^b	3 ± 4	6 ± 6
IL-10 (pg/mL)	26 ± 24	50.1 ± 46.9	26 ± 24	49 ± 49
IL-12p40 (pg/mL)	384 ± 227	129 ± 94 ^c	177 ± 121	392 ± 238 ^d
IFN-alpha (pg/mL)	0.9 ± 2	0.9 ± 2	4 ± 5	1 ± 1
IFN-gamma (pg/mL)	0.0 ± 0.0	13 ± 20	5 ± 13	20 ± 29

Data were analysed using one tail Mann Whitney U test. Data are presented as the mean ± SD. Experiment A: ^a, P < 0.05; ^b, P < 0.01; ^c, P < 0.001. Experiment B: ^d, P < 0.05; ^e, P < 0.01

Table S3. Characteristics of primers used in RT-qPCR assays according to MIQE guidelines.

Gene symbol	Accession	Sequence	Amplicon length	Junction	[Primer]	Efficiency
<i>APC5</i>	XM_001929287.5	Sense: GAGACCAAAGCCCTCACTCC Antisense: TGGACTCCTGTGCGATCCTA	324	/	100 nM	97%
<i>CD36</i>	NM_001044622.1	Sense: CACTGCCTCACTGGAGTGTT Antisense: GCTTCAAGTGCTGGGTCAA	104	/	100 nM	97%
<i>CYP51</i>	NM_214432.1	Sense: GGCTTACTGCAAGCTGGG Antisense: GACTGGATAGGAGATTGACGCC	76	Exon 1	100 nM	106%
<i>FDPS</i>	NM_001185131.1	Sense: GGCACAGACATCCAGGACAA Antisense: GCCACCTTCTCAGCATCCTT	122	/	50 nM	96%
<i>GULO</i>	NM_001129948.1	Sense: CGCTGTTTGTTTGGGTGGAG Antisense: GCCATAGGTCTTTGCCAG	268	Exon 1-2	100 nM	104%
<i>ISG15</i>	NM_001128469.3	Sense: GGTGAGGAACGACAAGGGTC Antisense: GGCTTGAGGTCATACTCCCC	176	Exon 2	100 nM	92%

<i>LGALS3</i>	NM_001097501.2	Sense: TCTGGACCACTGAATGTGCC Antisense: GAGCATCATTGACCGCAACC	318	Exon 3-5	100 nM	92%
<i>PAQR7</i>	NM_213739.1	Sense: CAGGGGACAGAAACCAGTCA Antisense: GGATGGACCTGTCGCAAAC	182	Exon 1-3	100 nM	108%
<i>PLD3</i>	NM_001244500.1	Sense: CACCATGGAGTTCTCCCACC Antisense: AGCCAGGGAGAGCAGGAAG	154	/	200 nM	94%
<i>PTPRU</i>	XM_021095725.1	Sense: GATCACCAAGCTGGTGGAGG Antisense: GGAGCAGAGGGTCTTCACAC	400	/	200 nM	94%
<i>SMPDL3A</i>	XM_003480256.4	Sense: ACTGGCCACAGGATCAACTG Antisense: TAGGGTCACGACATTTGGGC	183	/	100 nM	90%
<i>SPP1</i>	XM_005667004.3	Sense: CACATTGTAGCGAGGTGGGA Antisense: GACCGTCGACTAAACCCTGA	170	/	100 nM	96%
<i>SRGN</i>	XM_013990411.2	Sense: TTCCGCACAGGAGAACCTTG Antisense: GTGAGCCTGTCACAATGCAG	106	/	90 nM	101%

<i>Unknown RNA</i>	AK345473.1	Sense: GGCCCCTCTTAAGAAGCCAG	139	/	100 nM	97%
		Antisense: GAACCGCTGACAAGTCCTCA				
<i>HMBS</i>	NM_001097412.1	Sense: CGCAACGGCGGAAGAAAATA	493		100 nM / 200 nM	108%
		Antisense: GTGTGTTGAGGTTTCCCCGA				
<i>UBA52</i>	NM_214211.1	Sense: ACCCTGACGGGCAAGACCAT	142		100 nM	90%
		Antisense: CGGCCATCCTCCAGCTGTTT				
<i>18S</i>	NR_046261.1	Sense: TTTTCGGAAGTGGCCATG	81		100 nM	90%
		Antisense: CCGGTCCAAGAATTTACCTCT				

Table S4. Comparison of loci expression ratio. Comparison of RNAseq and qPCR techniques. Log₂ of steatosis/initial state ratio of RNAseq values of 14 selected genes and the steatosis/non-steatosis ratio of mean expression values of the same genes obtained by RT-qPCR (A). Comparison between progression and regression studies (B). Log₂ of steatosis/ non-steatosis ratios from progression and regression experiments are shown.

Gene	A		B	
	Steatosis/Initial state Ratio		Steatosis/ Non-esteatose Ratio	
	RNA seq (n=8)	qPCR (n=8)	Progression (n=20)	Regression (n=14)
APC5	0.24	0.34	0.40	2.37
CD36	12.85	11.04	1.38	1.84
CYP51	0.16	0.02	0.04	0.33
FDPS	20.18	0.15	0.12	0.11
GULO	0.00	0.92	-	-
ISG15	2517.44	0.42	2.57	8.26
LGALS3	0.00	74.0	53.93	17.46
PAQR7	1040699.33	1.84	2.38	30.26
PLD3	3.46	1.01	-	-
PTPRU	4.12	1.05	-	-
SMPDL3	0.16	3.85	3.17	6.48
SPP1	0.28	76.84	56.9	4.60
SRGN	4.12	2.7	2.62	3.09
unknown RNA	0.00	0.2	0.22	0.44

Table S5. Changes in hepatic *Lgals3* expression levels related to diet.

Experimental condition	Type of change	Ratio (tx/control)	Accession number
High fat diet deficient in methionine and choline diet in mice	Increase	24.7	GDS4883
Ketogenic diet in WT mice	Increase	23.6	GDS2738
Low-fat, high-carbohydrate diet in SCD1 null mice	Increase	15.8	GDS1517
Sebacic acid supplementation in db null mice	Increase	6.8	GDS3807
HFD in Rldl null mice	Increase	6.14	GDS279
Rldl null mutation in HFD	Increase	4.2	GDS279
HFD in GPR120 null mice	Increase	4.1	GDS4830
GPR120 null mutation in HFD	Increase	3.3	GDS4830
Genetic obesity in mice	Increase	2.3	GDS4506
Dietary intervention in obese humans	Decrease	0.44	GDS3423

Data obtained from Genome Expressed Omnibus data bank and Array express.

Table S6. Changes in hepatic *Isg15* expression levels related to diet.

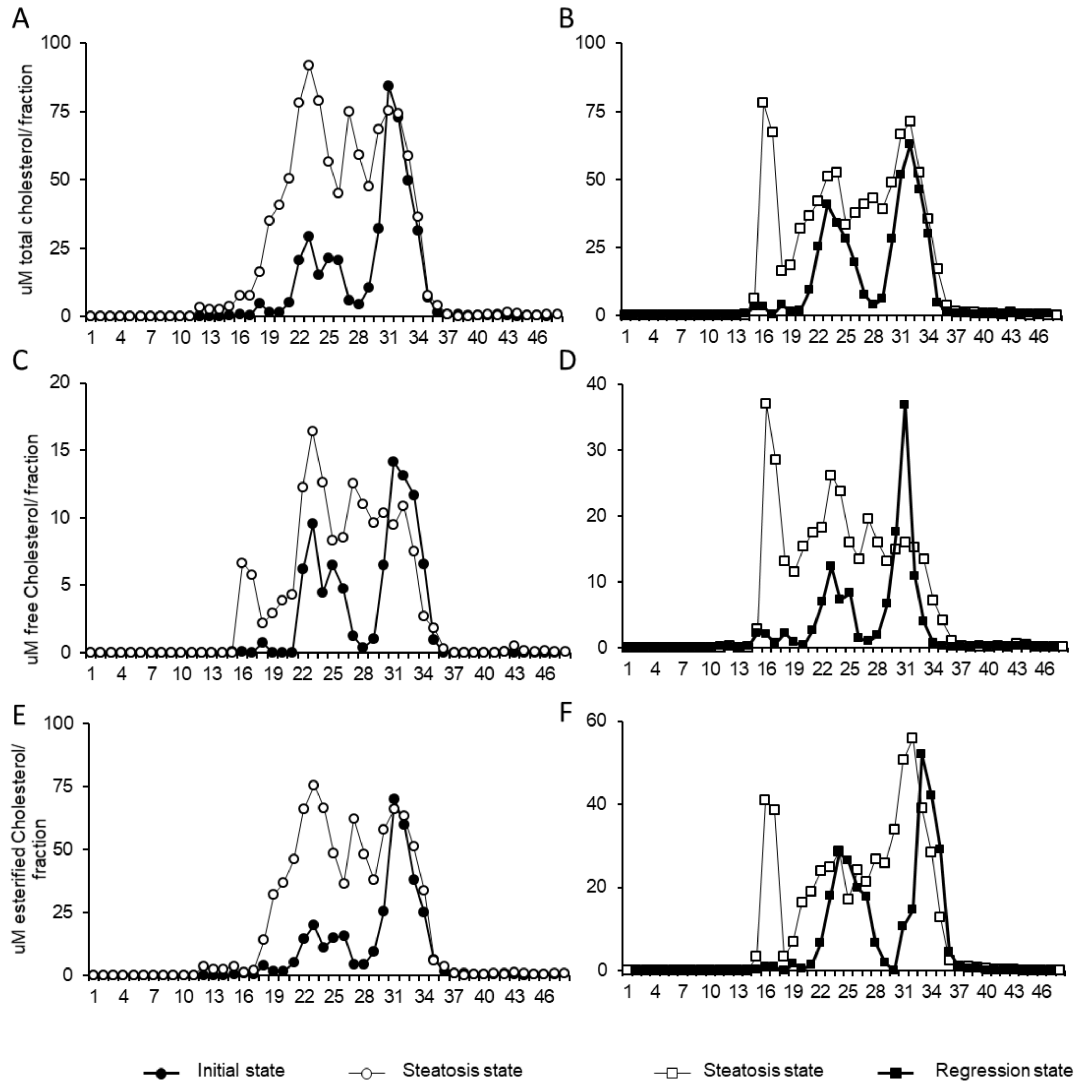
Experimental condition	Type of change	Ratio (tx/control)	Accession number
High fat high cholesterol diet in WT mice	Increase	2.8	GDS2413
HFD in GPR120 null mice	Increase	2.8	GDS4830
Mogat null genetic modification in mice	Increase	2.8	GDS5425
Low-fat, high-carbohydrate diet in SCD1 null mice	Increase	2.5	GDS1517
Ketogenic diet in WT mice	Increase	2.4	GDS2738
Soy protein diet	Increase	2.3	GDS3923
ABCA1 cassette overexpression in mice	Increase	2.2	GDS2303
High fat diet deficient in methionine and choline diet in mice	Decrease	0.6	GDS4883
Ob/ob genetic modification in mice	Decrease	0.6	GDS4506
Resveratrol on high fat high cholesterol fed WT mice	Decrease	0.2	GDS2413

According to Genome Expressed Omnibus data bank and Array express.

Table S7. Correlation analyses of serum GAL3. Correlations were calculated by the Spearman's rho test: Only significant correlations with a coefficient of correlation higher than 0.6 or lower than -0.6 are shown.

		Hepatic parameters			Plasma parameters				
		LD%	TG	Cho	ALP	BiIT	Leptin	IL12p40	
GAL3 serum	Progression r^2						0.87		
	P						0.00		
GAL3 serum	Regression r^2	-0.72	-0.83	-0.68	-0.82	-0.65	0.75	0.61	
	P	0.00	0.00	0.01	0.00	0.01	0.00	0.02	
		Hepatic gene expression							
		SMPDL3A	ISG15	LGALS3	SPP1	CIDEA	FPDS	CYP51	PARQ7
GAL3 serum	Progression r^2				0.60			-0.62	
	P				0.01			0.01	
GAL3 serum	Regression r^2	-0.83	-0.61	-0.73	-0.68	-0.65	0.66	0.60	-0.61
	P	0.00	0.02	0.00	0.01	0.01	0.01	0.02	0.02

Figure S1: Plasma lipoprotein profiles of pigs in the progression and regression experiments. Independent pools of all samples per experimental group were prepared. Lipoproteins were separated using fast protein liquid chromatography (FPLC) and collected fractions analyzed for total (A-B), free (C-D) and esterified cholesterol (E-F). Fraction numbers 11–19 corresponded to VLDL, 20–28 to LDL (two types of LDL are characteristic of swine LDL) and 29–35 to HDL. Representative profiles are shown from progression experiment (left panels) and regression experiment (right panels).



VI. 3 Short-term squalene supplementation decreases triglyceride accumulation in a new swine steatosis model

Abstract:

Squalene is the major minor component of olive oil, the main source of fat in the mediterranean diet, and has shown to improve liver metabolism in rabbits and mice. This experimental setting was carried out to decipher if this squalene effect was conserved in a new swine model of hepatic steatosis. The current study reveals that a 0.5% squalene supplementation during a month has been able to change the hepatic metabolism of the steatosis decreasing the amount of lipid droplets and triglycerides without influencing the cholesterol trend nor the fibrosis area. The repercussion of this effect was studied at two different levels. On the one hand, gene expression was interrogated and only changes in the expression of *PLIN2* and *Unknown RNA* were detected. On the other hand, the lipid composition was assessed by liquid chromatography-mass spectrometry, revealing important changes regarding the ceramides, cardiolipins and triglycerides. These facts together points to a lipid metabolism regulation activity for the squalene in a transcriptional independent manner. This squalene supplementation had little effect on plasma biochemistry parameters, but important changes in plasma lipidome where an unexpected increase in ceramide content and a decrease of triglycerides, especially short-chain triglycerides, were observed. Lipids such as the 36:2 and 42:1 ceramides and the 46:1 triglyceride have been especially sensitive to the squalene supplementation. To sum up, squalene has been able to improve the steatosis in swine through the modification of hepatic and plasma lipid metabolism.

Keywords: Squalene, swine, NAFLD, lipidomic, cardiolipins, triglycerides, ceramides.

Abbreviations: Cer, ceramides; CL, cardiolipins; FA, fatty acids; GGT, gamma-glutamyl transpeptidase; LPC- lysophosphatidylcholine; LPE, lysophosphatidylethanolamine; LC-MS, Liquid chromatography-mass spectrometer; NAFLD, non-alcoholic liver disease; PA, phosphatic acid; PC, phosphatidylcholine; PE, phosphatidylethanolamine; PG, phosphatidylglycerol; Plin2, perilipin 2; PI, phosphatidylinositol; PS, phosphatidylserine; TG, triglycerides; SM, sphingomyeline; S, sulpholipids; and RT-qPCR, Real time quantitative polimerase chain reaction.

1. Introduction:

The Mediterranean dietary pattern has been proposed as a healthy choice for preventing diseases. Its main source of fat is virgin olive oil (1). Extra virgin olive oil (EVOO), as a fruit juice, is a complex mixture where triglycerides are combined with other biologically active substances (minor components) (2). Its administration had shown healthy properties independently of its oleic acid content pointing to benefits of these minor components (3) such as

squalene, which is the major minor component (1.5 to 9.6 g/ kg) (4). This cholesterol precursor has antioxidant and anti-inflammatory properties both *in vitro* and *in vivo* models that have been explored in different experimental settings such as adaptive (5, 6) and innate (7) immune system, cancer (8), atherosclerosis (9, 10), and non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) (11).

The latter disease “characterized by intracellular accumulation of fat in hepatocytes” has become a burden disease in Western countries which prevalence has surpassed 40% in some epidemiology studies (12). NAFLD is an entity inducing whole genome expression changes (13) and compromises cell homeostasis through the effect in diverse organelles such as mitochondria (14), endoplasmic reticulum (15) and lipid droplets (16). NAFLD develop a spectrum of liver pathologies such as steatohepatitis, cirrhosis and hepatocellular carcinoma (16) and the effect of squalene on the progression of this disease remains partially understood.

Few works have been carried out in mice and rabbits to characterize the effect of squalene on NAFLD showing that squalene accumulates in the liver and decreases hepatic cholesterol and triglycerides in a sex-dependent manner (17, 18), and these actions are exerted through a complex network of gene expression changes both at transcriptional and posttranscriptional level (19, 20). Nonetheless, these animal models could be undergoing their own metabolic response which could differ from the human one. In this aspect, swine is one of closest animal models and has emerged as a valuable model to fill the gap between rodents and humans.

The pig offers a large diversity of genetic backgrounds regarding NAFLD, from resistant (commercial breeds) to predisposed (minipigs) breeds that could reflect the genetic makeup of human society. In addition, swine is the most suitable donor source for xenogeneic application, being already in use for various clinical indications (i.e. heart valves and acellular matrices) (21, 22), and is likely to become a source for organ xenotransplantation

regarding the elimination of pig endogenous retroviruses (23) and partial deletion of the immune system response (24) have already been achieved.

Despite all this swine advantages, no study has been addressed yet to characterise the squalene effect on porcine livers. Considering together the squalene positive effects diminishing the severity of NAFLD, the need to characterise the swine liver to achieve a successful xenotransplantation method and the pressing condition to find better biomarkers to establish functionality of steatosis livers (25), we decided to study the squalene effects on hepatic gene expression and hepatic and serum lipidome based on an early NAFLD swine model using easy accessible commercial breeds.

2. Material and methods:

Animals and experimental procedure: After one month of adaptation, twenty-four male Large White x Landrace pigs, weighing 38 ± 2.8 kg, were fed the steatotic diet for 1 months. At this moment, the initial sampling took place and they

were split in two groups according to their intrahepatic triglycerides and cholesterol baseline levels. One of them supplemented with 0.5% squalene to evaluate the squalene effect on NAFLD progression. After one month, all animals were reintervented and euthanized except 6 animals of the control group that were maintained one extra month with a conventional diet to achieve a regression state (Figure 1). Animals were housed at the facilities of *Servicio General de Apoyo a la Investigación, División of Experimentación Animal, Universidad de Zaragoza*. Animals had unrestricted access to food and water, and food.

Diets. The diet, prepared weekly at the Veterinary School facility and frozen preserved, was

designed to be methionine-deficient and choline-restricted. It was also enriched in 2% cholesterol (Sigma-Aldrich, Germany), 0.5% sodium cholate (Molekula Group, Munich, Germany) and saturated fat (JL Supervía, Cuarte de Huerva, Zaragoza, Spain). The squalene of the treatment group was provided by Molekula Group. This diet provided 50% of energy from hydrogenated palm and sunflower oil (approximately, saturated fatty acids represented a 50%), 43% from complex carbohydrates and 7% from protein (Table S1, Ms#2).

Sampling. As displayed in Figure 1, two sampling took place, the first one after one month of steatosis diet, and the other at the end of the experiment. First sampling was performed under general

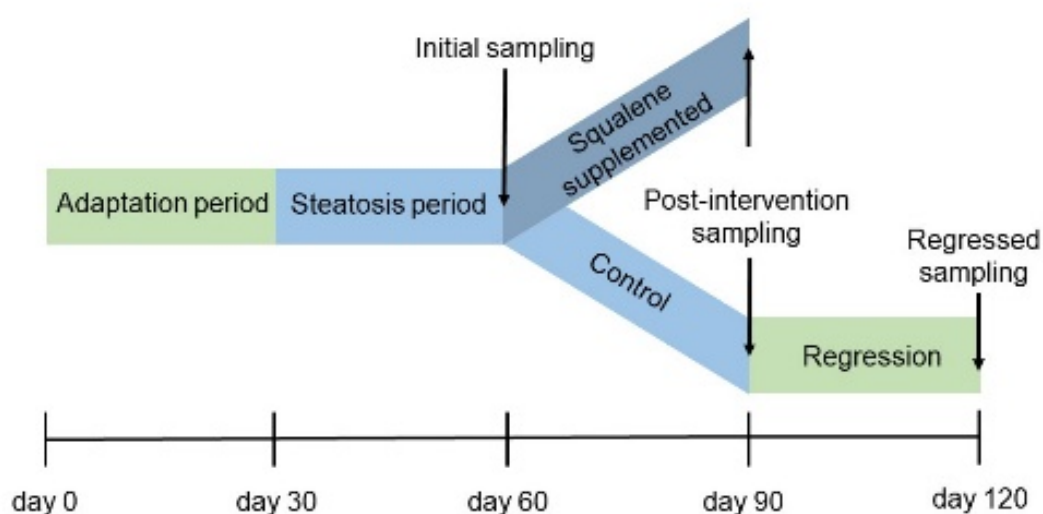


Figure 1. Scheme displaying the used experimental setting.

anaesthesia conditions, induced and maintained with propofol® (B/Braun-Vetcare, Rubí, Barcelona, Spain) administration. The abdomen was opened through a middle line laparotomy and blood sample and liver biopsies were obtained. At the end of experiment, pigs were euthanized by an anaesthetic overdose and samples were taken. All the procedures were performed according to the European Union guidelines for the handling and care of laboratory animals and the protocol was approved by the Ethics Committee for Animal Research of the University of Zaragoza.

Hematoxylin-eosin staining:

Aliquots from swine livers were stored in 4% paraformaldehyde and embedded in paraffin. Sections (4 µm) were deparaffinised, hydrated, stained with hematoxylin and eosin and observed using a Nikon microscope. Hepatic fat content was evaluated by quantifying the extent of fat droplets in each section using Adobe Photoshop CS2 and expressed as percentage of total liver section (26).

Trichromic staining.

Sections were initially processed as described above but for the tinction.

Once deparaffinized and hydrated, samples were stained following the Masson's trichromic technique. Hepatic fibrosis content was evaluated by quantifying the extent of fibrosis infiltration in each liver section with Adobe Photoshop CS2 and expressed as percentage of total liver section.

Lipid extraction and colorimetric measurements: 20 mg of liver tissue were homogenized in 1 mL of PBS and lipids were extracted according to Folch's method (27) and dissolved in 200 µL of isopropanol. Cholesterol and triglyceride concentrations were measured using Infinity Reagent kits from Thermo Scientific (Thermo Fisher Scientific Waltham, MA, USA).

Squalene quantification: Squalene extraction and measurement were carried out as previously described (18).

Plasma parameters:

Fasting plasma triglycerides were measured using Infinity Reagent from Thermo Scientific (Thermo Fisher Scientific) and a fluorometric method (Amplex Red, Molecular Probes, USA) was used to

determinate total cholesterol. Ketone bodies and non-esterified fatty acids were assayed by commercial colorimetric kits from FUJIFILM (Wako Pure Chemical Corporation, Tokyo, Japan). Serum biochemistries parameters (glucose, bilirubin, AST, ALP, ALT, GGT) were analysed at the Clinical Laboratory of Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa (Zaragoza, Spain). Plasma levels of IL-1beta, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p40, IFN-alpha, IFN-gamma, and TNF-alpha were assayed through a procartaplex multiplex (EPX090-60829-901, Thermo Fisher Scientific) according to manufacturer's instructions. The proteins insulin (EP0100, finetest Wuhan, Hubei, China), leptin (EP0103, finetest Wuhan, Hubei, China), adiponectin (EP0006 Wuhan, Hubei, China).

RNA isolation and quantification: Livers samples were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C. RNA of each liver was isolated using Trigent reagent (MRC, Cincinnati, OH, USA) following the manufacturer's instructions. DNA contamination was removed by TURBO DNase treatment and removal kit from

Ambion® (Life Technologies). RNA was quantified by absorbance at 260 nm, and purity was verified regarding the A260/280 ratio (greater than 1.8) with SPECTROstar Spectrophotometer's LVis plate (BMG Labtech, Offenburg, Germany). Integrity of the 28 S and 18 S ribosomal RNAs was verified by 1% agarose gel electrophoresis followed by ethidium bromide staining.

RT-qPCR: 500 ng of total RNA of each animal were reverse transcribed in a volume of 10 µL using the Prime Script™ Reagent (Perfect Real Time) from Takara (Kusatsu, Japón). PCR real time reactions were performed using 2x qPCRBIO Sgreen Mix Hi-ROX, from PCR Biosystems (London, UK), according the manufacturer's instructions, in a ViiA7 Real-TIME PCR System (Life Technologies) using 384-well plates. The primers used (Table S1) were designed with NCBI primer design program and checked by BLAST analysis (National Center for Biotechnology Information) to verify gene specificity. The relative amount of all mRNAs was calculated using comparative 2^{-ΔΔCt} method and normalized with the

reference gene *UBA52*
(NM_214211.1).

Liver and plasma lipidomics: For lipidomics studies samples of 5-10 mg of liver and 25 μ L of plasma were extracted according to Folch method in 1 mL of Chloroform:methanol (2:1), 400 μ L of water and 150 μ L of internal standard mix (Table S2). 300 μ L from the resultant organic phase were dried down and reconstituted in 100 μ L of isopropanol:acetonitrile:water (2:1:1). Posteriorly, full chromatographic separation of intact lipids (Virtue et al., 2018) was achieved using Shimadzu HPLC System (Shimadzu UK Limited, Milton Keynes, United Kingdom) with the injection of 10 μ L onto a Waters Acquity UPLC[®] CSH C18 column; 1.7 μ m, I.D. 2.1 mm X 50 mm, maintained at 55°C. Mobile phase A was 6:4, acetonitrile and water with 10 mM ammonium formate. Mobile phase B was 9:1, propan-2-ol and acetonitrile with 10 mM ammonium formate. The flow was maintained at 500 μ L per minute through the following gradient: 0.00 minutes_40% mobile phase B; 0.40 minutes_43% mobile phase B; 0.45 minutes_50% mobile phase B; 2.40

minutes_54% mobile phase B; 2.45 minutes_70% mobile phase B; 7.00 minutes_99% mobile phase B; 8.00 minutes_99% mobile phase B; 8.3 minutes_40% mobile phase B; 10 minutes_40% mobile phase B. The sample injection needle was washed using 9:1, 2-propan-2-ol and acetonitrile with 0.1 % formic acid. The mass spectrometer used was the Thermo Scientific Exactive Orbitrap with a heated electrospray ionisation source (Thermo Fisher Scientific, Hemel Hempstead, UK). The mass spectrometer was calibrated immediately before sample analysis using positive and negative ionisation calibration solution (recommended by Thermo Scientific). Additionally, the heated electrospray ionisation source was optimised at 50:50 mobile phase A to mobile phase B for spray stability (capillary temperature; 380°C, source heater temperature; 420°C, sheath gas flow; 60 (arbitrary), auxiliary gas flow; 20 (arbitrary), sweep gas; 5 (arbitrary), source voltage; 3.5 kV. The mass spectrometer resolution was set to 25,000 with a full-scan range of m/z 100 to 1800 Da, with continuous switching between positive and negative mode. Lipid quantification was achieved using

the area under the curve (AUC) of the corresponding high resolution extracted ion chromatogram (with a window of ± 8 ppm) at the indicative retention time. The ratio of AUCs for each lipid analyte relative to its associated internal standard for that lipid class was used to semi-quantify and correct for any extraction/instrument variation (28).

Statistical analyses: Results are expressed as mean \pm SD. Data were analysed by one tail Mann–Whitney’s test using InStat 3.02 software for Windows

(GraphPad, San Diego, CA, USA). Differences were considered significant when $P < .05$. Correlations between variables were tested by calculating the Pearson or Spearman correlation coefficients. The heatmaps were generated using the platform of metaboanalyst.ca.

3. Results:

Short-time squalene supplementation is able to decrease the amount of lipid droplets in swine steatosis liver without modifying expected expressed genes

Being squalene a known antioxidant with cardiovascular and

hepatic properties we wondered whether or not the effects observed in other animal models were conserved in pigs. Thereby, a two-time intervention experiment was set up using commercial crossbred swine where after steatosis liver development, a surveillance of the squalene supplementation versus the natural progression of the disease was explored. The liver histological analysis revealed a decrease in the surface occupied by lipid droplets (Figure 2C) and no change in the evolution of fibrosis area (Figure 2D) by the squalene treatment. The first trend was also observed for the hepatic triglyceride content (Figure 2E), but not for cholesterol content (Figure 2F). After studying the squalene accumulation in the liver (Figure 2G), the amount of squalene after the intervention was inversely correlated with the observed trends of the lipid droplets (Figure 2H) and triglycerides (Figure 2I). This fact points to a positive role for squalene supplementation in the decreasing of triglycerides and lipid droplets in a short period.

Previous experience in other animal models have shown a considerable squalene effect on liver

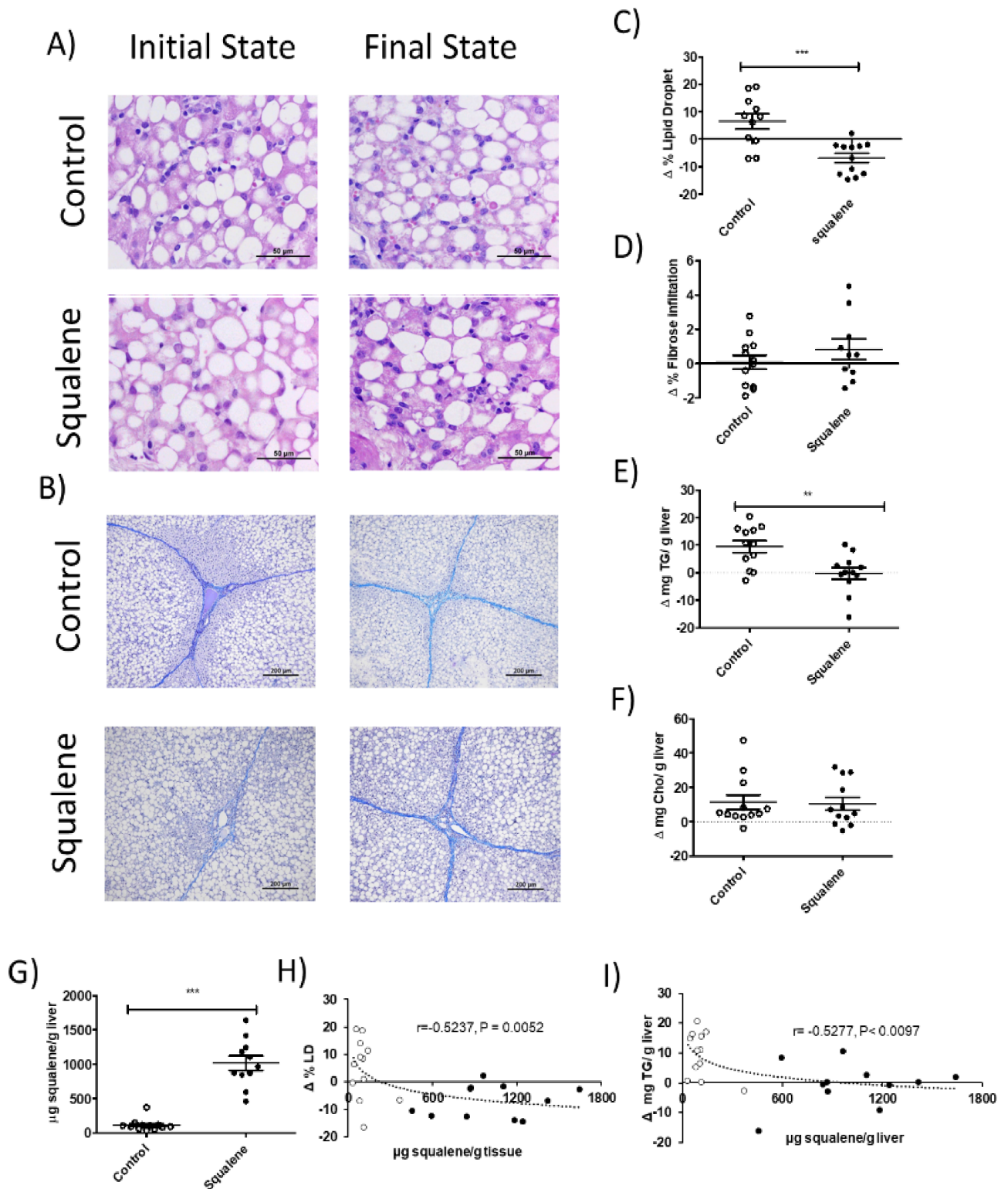


Figure 2. Hepatic characterization of commercial bred swine after one month consuming the steatosis diet (control) or this supplemented with 0.5% squalene (squalene). Representative liver micrographs of hematoxylin-eosin staining at $\times 400$ magnification of initial and final state of control and squalene groups (A). Bar denotes $50 \mu\text{m}$. Masson's trichomic liver histology staining of representative liver micrographs at $\times 100$ magnification of initial and final state of control and squalene groups (B). Bar denotes $200 \mu\text{m}$. Morphometric changes in hepatic fat content (C) and in fibrosis area (D), both expressed as percentage of area of total liver section. Changes in hepatic triglycerides (E) and cholesterol (F). Squalene hepatic content at the end of study measured by GS-MS (G). Correlation of squalene hepatic content and variations in lipid droplet surface (H) and in hepatic triglycerides (I). Data are expressed as mean \pm SD for each group. Statistical analyses in panels C to G were carried out using Mann–Whitney U test. $**n < 0.05$; $***n < 0.01$. Correlations were calculated by the Spearman's rho test (H, I).

transcriptome. Hence, we aimed to study if this short time response swine steatosis was carried out at genetic level as observed in murine models. Thereby, we interrogated different genes related to lipid metabolism, to hepatic steatosis in this model and to squalene metabolism in previous animal experiments (Table S3). Strikingly, only 2 of the 40 studied genes modified its expression trend after the squalene administration: *PLIN2*, which augmented its expression and an *Unknown RNA*, which decreased its expression.

Squalene decreases various lipid classes in the steatotic liver

Having such little effect in gene expression, we aimed to know what type of triglycerides were diminishing in the liver, and if the squalene-induced decrease in hepatic lipid droplets and triglycerides were implying changes in other lipids. To answer these question, we carried out a lipidomic assay where we assessed different lipid classes: 20 ceramides (Cer), 56 cardiolipins (CL), 27 phosphatidic acids (PA), 23 lysophosphatidylcholines (LPC), 19

lysophosphatidylethanolamines (LPE), 27 fatty acids (FA), 43 phosphatidylcholines (PC), 19 phosphatidylethanolamines (PE), phosphatidylinositol (PI), 34 phosphatidylglycerols (PG), 18 phosphatidylserines (PS), 89 triglycerides (TG), 28 sphingomyelins (SM), 45 sulpholipids (S). We detected 15 Cer, 37 CL, 14 PA, 15 LPC, 8 LPE, 2 FA, 39 PC, 11 PE, 19 PI, 15 PG, 10 PS, 64 TG, 15 SM and 26 S (Figure 3A). When analysing the evolution pattern of the lipids classes after the squalene treatment, five of them were modified: Cer which seems to increase while the control decrease (Figure 3B). PC (Figure 3D) and PI (Figure 3E) remain stable in the squalene group while the control group diminishes and CL (Figure 3C) and TG (Figure 3F) that decrease with the squalene supplementation while the control group did not modify its content. 102 lipids have been detected to evolve differently between the squalene supplementation and the natural progression of the steatosis (Table S4, figure 3G). A deeper analysis in the lipid species of ceramides (Figure 3H) and TG (Figure 3I) allowed us to corroborate that these changes imply

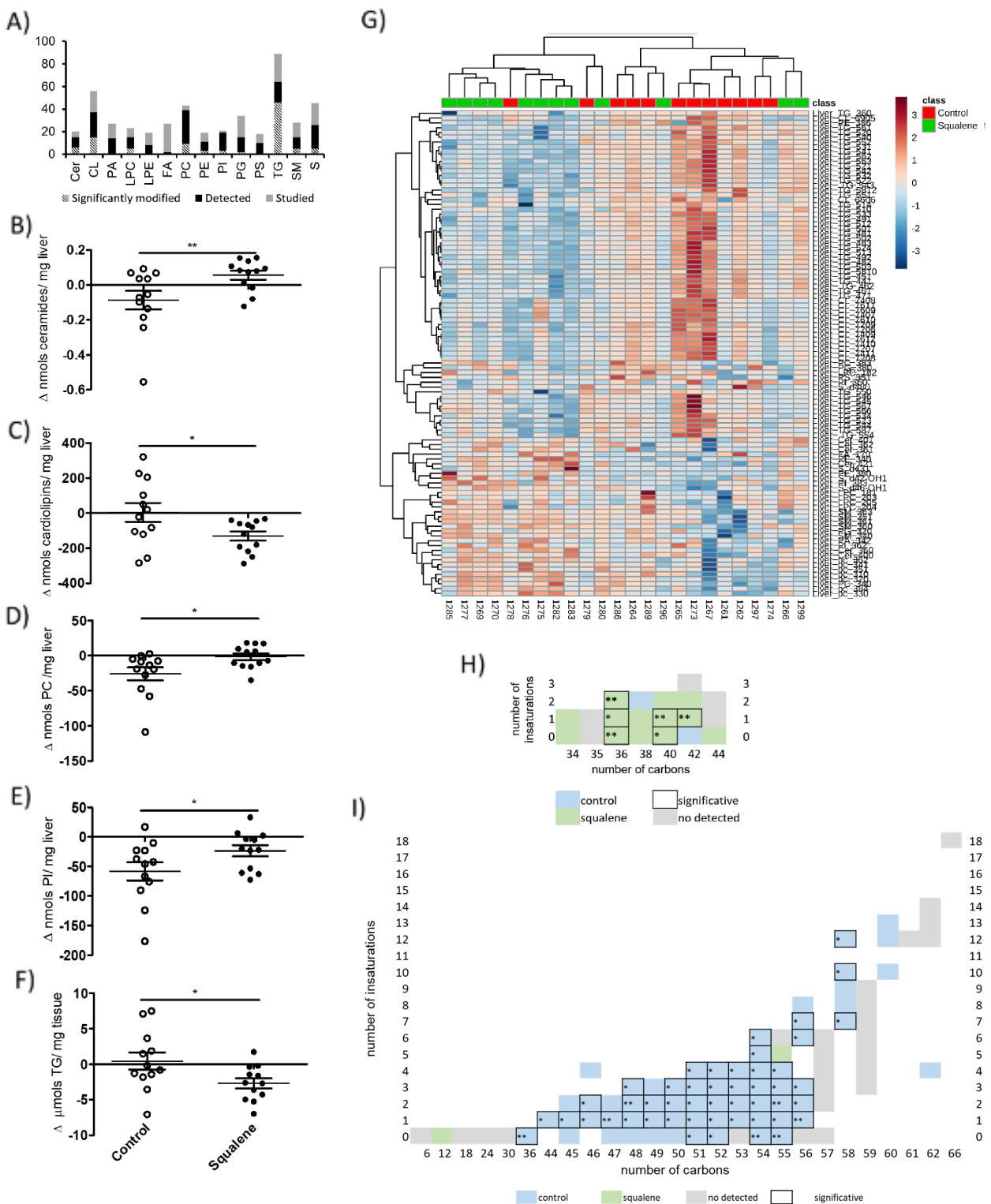


Figure 3. Liver lipidomic assay of control and squalene-supplemented pigs. Number of lipids studied, detected and significantly modified according to their class: Cer, ceramides; CL, cardiolipins; PA, phosphatic acid; LPC- lysophosphatidylcholine; LPE, lysophosphatidylethanolamine; FA, fatty acids, PC, phosphatidylcholine; PE, phosphatidylethanolamine; PI, phosphatidylinositol; PG, phoshatidylglycerol; PS, phosphatidylserine; TG, triglycerides; SM, sphingomyeline and S, sulpholipids (A). Lipid class showing significant variation in each experimental condition ceramides (B), cardiolipins (C), phoshatidylcholine (D), phosphatidylinositol (E) and triglycerides (F). Heatmap of differentially expressed lipids in each animal (G). Comparison of hepatic ceramide (H) and TG (I) trends associated with the squalene intake according to their number of carbon atoms and number of insaturations. Data are expressed as mean \pm SD for each group. Statistical analyses were carried out using (B-C,E-I) Mann-Whitney U test. * p <0.05; ** p <0.01.

almost all the species in each lipid class independently of their number of carbons or insaturations.

Willing to know if the changes in these 5 lipids classes after the squalene supplementation were leading to a healthier non-steatosis state, we compared their concentration in the final step of the experimental condition against those observed for 6 control animals after recovering from the steatosis. The changes observed for Cer, CL, PC and TG after the squalene treatment seems indeed to lead to a state more similar to the regressed one (Figure 4), while PI did not show any change (data non shown).

Short-time squalene supplementation modify plasma lipidome but not plasma biochemistry.

Changes in liver homeostasis frequently result in changes in plasma biochemistry parameters, taking it into consideration that the liver is their source, we wondered whether or not squalene hepatic effects in lipid metabolism would be translated into changes in plasma parameters. Consequently, a total of 27 parameters were studied and

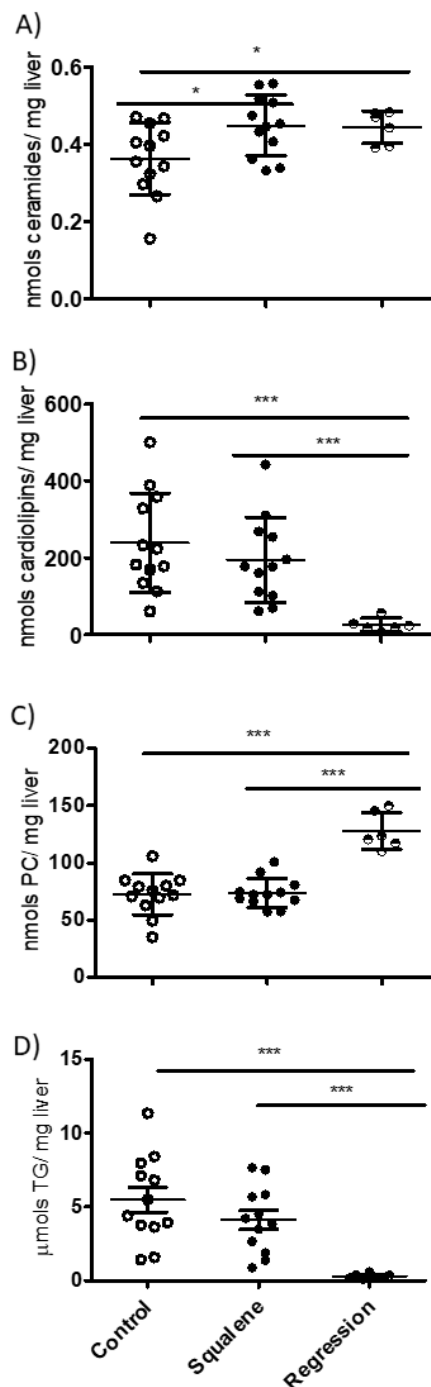


Figure 4. Content of hepatic lipids in swine at the end of experimental conditions. Controls received the steatotic diet, squalene the steatotic diet supplemented with squalene and regression animal received the steatotic diet for 2 months and then one month of chow diet. Only differently expressed lipid class are represented: ceramides (A), cardiolipins (B), phosphatidylcholines (C), and triglycerides (D). Individual data and mean \pm SD for each group are shown. Statistical analyses were carried out using (A-E) Mann–Whitney U test. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

surprisingly only three parameters conserved changes in the trend and in the final stage comparison: GGT, and two inflammatory markers IL-1b and IL12P40 (Table S5). Plasma

lipids were also explored (Figure 5) and as a result 16 Cer, 0 CL, 16 PA, 15 LPC, 8 LPE, 20 FA, 36 PC, 6 PE, 16 PI, 5 PG, 6 PS, 45 TG, 13 SM and 31 S were detected (Figure 5A).

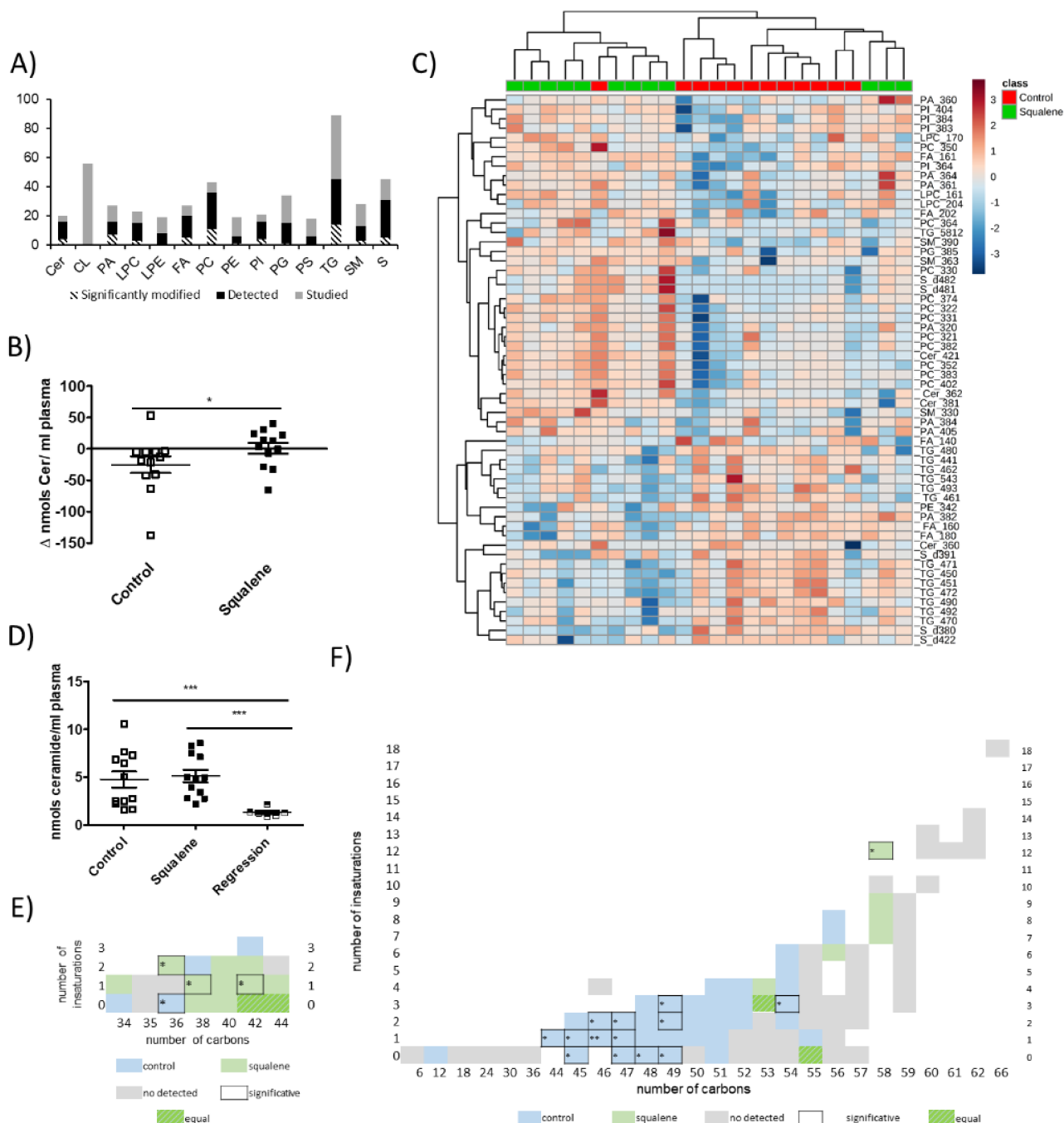


Figure 5. Plasma lipidomic assay of control and squalene-supplemented pigs. Number of lipids studied, detected and significantly modified according to their class (A). Lipid class showing significant variation in each experimental condition ceramides (B). Heatmap of differentially expressed lipids in each animal (C). Concentration of plasma ceramides at final step of each experimental condition (D). Comparison of plasma ceramide (E) and TG (F) trends associated with the squalene intake according to their number of carbon atoms and number of insaturations. Data are expressed as mean \pm SD for each group. Statistical analyses were carried out using (B, D-F) Mann–Whitney U test. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

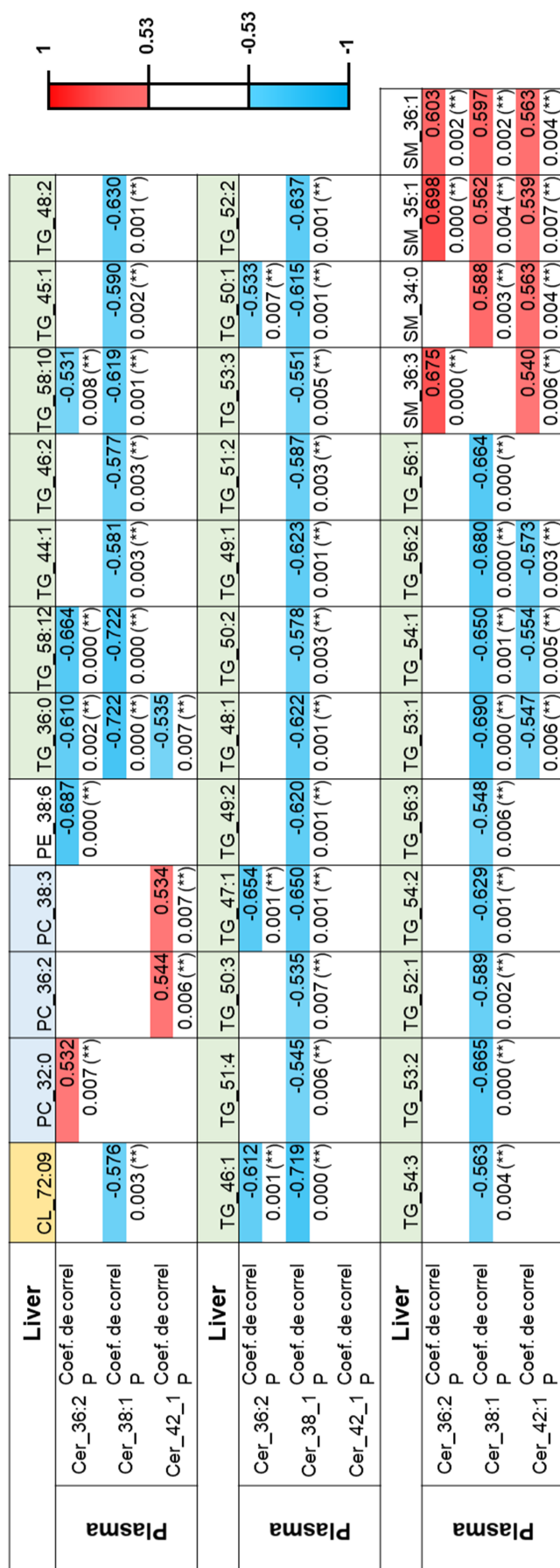


Figure 6. Serum ceramides correlation with modified hepatic lipids. Correlations were calculated by the Spearman's rho test: **p<0.01. Only significant correlations with a coefficient of correlation bigger than 0.53 or smaller than -0.53 are shown.

Regarding the changes in lipid classes, only the ceramide significantly changed with the squalene supplementation (Figure 5B). Surprisingly, this change does not seem to reflect the state of a non-steatosis state where ceramides are decreased (Figure 5D). Analysing the changes in the composition of ceramides, all studied ceramides were increased except the ceramides 34:0, 36:0, 38:0, and 42:3 (Figure 5E), and interestingly, we observed that despite diminishing all type of TG, squalene administration was especially efficient decreasing the short chain triglycerides (Figure 5F). These changes in plasma ceramides were positively related to the hepatic SM and inversely related to hepatic TG trend than to the hepatic ceramide trend (Figure 6).

Analysing each lipid individually, we detected that twelve species had

conserved changes in liver and plasma after the squalene supplementation: Cer_{36:2}, Cer_{42:1}, LPC_{20:4}, PC_{33:0}, PI_{38:3}, TG_{44:1}, TG_{46:2}, TG_{45:1}, TG_{46:1}, TG_{49:2}, TG_{54:3} and SM_{36:3} (Table S4 and S6). As a surprise, their correlations showed that only Cer_{42:1}, PC_{33:0}, and TG_{46:1} had a significant correlation between their plasma and liver contents. Another interesting fact derived of the correlation analysis was that the plasma Cer_{36:2}, Cer_{42:1} and PC_{33:0} had significant correlations with 75%, 75%, 50% respectively of the selected 12 parameters in liver while the liver TG_{46:1} has the

biggest reflect in these plasma parameters correlating significantly with the 75% of them (Figure 7).

4. Discussion:

This experimental setting was carried out to decipher the squalene effects on hepatic steatosis. The 0.5% squalene supplementation has been able to modify the hepatic steatosis regarding its decrease in the amount of lipid droplets and triglycerides without influencing the cholesterol trend nor the fibrosis area (Figure 2). The repercussion of this effect was studied at two different levels. On the one hand, gene expression was interrogated and only changes in the expression of

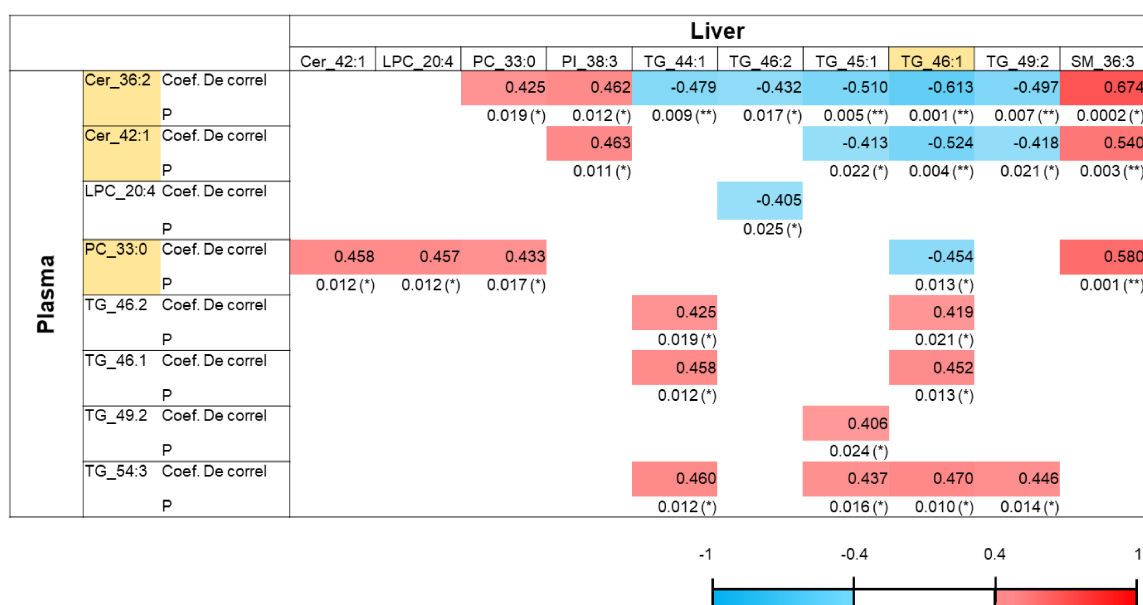


Figure 7. Correlation of conserved lipid changes between plasma and the liver. Correlations were calculated by the Spearman's rho test: *p<0.05; **p<0.01. Only significant correlations with a coefficient of correlation higher than 0.4 or lower than -0.4 are shown.

PLIN2 and *Unknown RNA* were significantly altered (Table S3). On the other hand, the lipid composition was assessed by LC-MS, confirming the decrease in triglycerides and revealing an increase of ceramides and a decrease of cardiolipins (Figure 3 y Table S4). Exploring the impact of these hepatic changes in plasma metabolism, we detected an increase in GGT, and IL12P40 and a IL-1b decrease (Table S5) and we also interrogated the plasma lipidome. As a result, we observed changes in the total ceramides (Figure 5 y Table S6) and 12 lipid species with conserved changes in liver and plasma, having the plasma Cer_36:2 and Cer_42:1 significant correlations with the majority of these twelve parameters in liver while the liver TG_46:1 had the biggest impact in these plasma parameters (Figure 7).

Previous experience in mouse and rabbit models has already shown that squalene is able to reduce the triglyceride content within the liver as we have observed in our model (17-20). Apparently, in mice and rabbits this effect resides in a few differential expressed genes and this effect seems not to be completely

conserved in this experimental setting. Two reason could explain this, there could be specie-specific effects or maybe these genomic effects require a longer time, experiments in mice and rabbit took 8-11 weeks and the present study has explored the effects of one-month supplementation (Figure 1). As result of the transcript analyses, only an increase in *PLIN2* and a decrease in *Unknown RNA* have been detected (Table S3). *PLIN2* is a member of perilipins family which protein is involved in LD formation, stability and trafficking and, according to the results observed in liver specific *PLIN2* KO mice, *PLIN2* promotes microvesicular steatosis and the progression of NAFLD (29). Nevertheless, we ought to remember that *PLIN1*, the best characterised member of perilipins family, has phosphorylation as his principal form of regulation (30). This regulation could play a key role on the *PLIN2* function due to the presence of 64 out of 437 amino acids that are able to be phoshorylated (Figure S1). It is known that *PLIN2* reaches its effect through an inhibition of the autophagy without involving neutral lipases (31). Thereby, squalene could be modulating the way that the

hepatocyte consumes the TG leading to a pathway independent of the autophagy and involving neutral lipases.

Regarding the *Unknown RNA*, that according to nsemble database could be related to the ZBTB16 mRNA, little is known. The only previous information relating it to a metabolic process is that the steatosis decreases its expression when regressing a non-steatosis state increases it (2nd manuscript of this thesis). The squalene diminishes it, indicating that this RNA could be related to a compensative mechanism.

While no important changes have been observed in the transcript analyses, the lipidome analyses have been more fruitful (Table S4). The diminution of TG has been consistent between the LC-MS and the colorimetric assay, also we have been able to detect an increase of Cer and PC and a decrease of CL (Figure 3). According with literature the increase in ceramides is one of the pathological effects of NAFLD (32) even if recently Turner and cols have proven that the inhibition of ceramide synthesis does no protect against insulin resistance (33).

Probably the key to the ceramides' homeostasis is that it should always be considered regarding their balance with the sphingosine-1-phosphate (S1P), a interconvertible molecule of ceramides who has opposite effects to ceramides and which function in NAFLD still remains poorly understood (34). In addition, in this setting we have seen that the actual amount of the regressed livers is actually higher than the steatotic and the squalene is leading to this state. Further investigation on liver ceramides should be carried on to decipher the paper of the sphingolipid rheostat in liver steatosis or if the contribution of ceramides to the liver state depend on their subcellular location as well as the S1P role does. Concerning the increase in PC, this could be a positive effect and play a paper delaying the progression to steatohepatitis (34, 35). And regarding the decrease in CL, it has been already described that the steatosis leads to an increase in CL (36) and even an interventional experiment shown that the impairment of their biosynthesis prevents from hepatic steatosis with an improved electron flux between mitochondrial respiratory complexes

(37) and our results after the squalene supplementation points to this direction. This is not the first report of squalene modifying the mitochondrial metabolism, in 2012 Ramirez-Torres et al. showed a complex regulation of mitochondrial activity by the squalene supplementation (19). This changes in hepatic lipidome shows new possibilities for squalene independently of gene expression modifications.

The plasma results show an increase in IL12p40 protein in the squalene group (Table S5). IL12p40 is an antagonist of the pro-inflammatory protein IL12 (38). Thereby, this effect reinforces the ant-inflammatory role of squalene. Being IL12P40 a subunit of IL12, further analysis should be carried on to discern whether this increase in IL12P40 involves an increase in IL12 or not.

Regarding the plasma lipidome results, the trend of diminishing triglycerides observed in the liver is maintained in the plasma, particularly in short-chain TG (Figure 5 y table S6). In contrast, there is an unexpected ceramide increase and apparently unhealthy because the

non-steatotic state has low concentration of ceramides, while the squalene seems to increase it independently of the ceramide species. In this regard, a previous work has described an increase in ceramides after the diet supplementation with fitosterols(39), this points to the idea that there could be different ways to recover from the steatosis and not only a equitable diminution of every lipid class as well as there are several mechanism to install it (40). Maybe the answer to this incongruence resides in the lipoproteins. In this aspect, a work using pigs as experimental model has already study from a lipidomic perspective the influence of a hypercholesterolemic on HDL revealing a decrease in their PC content (41).

This is not the only published study regarding lipidomics in pigs, a previous study has been carried on to understand the hepatic and plasma lipidome response to a steatosis diet. Even a work has been published regarding lipidomics, pigs and steatosis. Ossabaw female pigs received a steatosis diet (n=5) or a basal diet (n=5) during 16 weeks and little effect on plasma biochemistry

was observed, but some modifications regarding plasma and liver lipids were observed as a decrease in PC in the steatosis group. No change in ceramides or cardiolipins was described by the authors (42).

Concerning the twelve conserved changed lipids in liver and plasma (Figure 7), it is surprising that their plasma presence does not mainly depend on their liver homologue and had a higher correlation with other hepatic lipids. This fact reinforces a role for squalene in the modulation of liver lipid secretion where their targeted lipids do not follow a mere secretion and a lipid processing is taking place while secreting. This fact is highly interesting and the mechanism underneath the effects of squalene on the liver lipid secretion during steatosis should be studied.

5. Conclusion:

Even if previous works have been done regarding lipidomics, pigs and diets intervention(33, 36, 41, 42), this is the first time squalene effects have been explored in steatotic pigs. In this context squalene has been able to improve the steatosis in

different models being the first evidence that this effect is conserved in swine. Squalene is modifying the mitochondrial metabolism through their cardiolipins even before a gene response takes place and could be regulating the oxidation of fatty acids to other organelles, being the increase of ceramides a consequence of it. Furthermore, squalene is modifying plasma lipidome. Analyses regarding the mitochondrial activity, the balance between ceramides and S1P, and the implications of the ceramides increase in plasma should be done to characterise whether these effects are a consequence of a postraductional regulation of proteins or a consequence of modifying gene transcription.

6. Acknowledgements

We thank the University of Zaragoza Veterinary Hospital for their anesthesia support and the *Servicio General de Apoyo a la Investigación, División of Experimentación Animal, Universidad de Zaragoza* for their help in maintaining the animals. This research was supported by grants from the *Ministerio de Economía y Competitividad-Fondo Europeo de*

Desarrollo Regional (SAF2016-75441-R) and the *Fondo Social Europeo-Gobierno de Aragón* (B16_17R). CIBER de *Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición* (CIBEROBN, CB06/03/1012) is an initiative of ISCIII. L.V.H.M. was recipient of a *Fondo Social Europeo-Gobierno de Aragón* contract.

No competing financial interests exist.

7. Bibliography:

1. Estruch R, Ros E, Salas-Salvado J, Covas MI, Corella D, Aros F, Gomez-Gracia E, et al. Primary prevention of cardiovascular disease with a mediterranean diet supplemented with extra-virgin olive oil or nuts. *N Engl J Med* 2018;378:e34.
2. Covas MI, Ruiz-Gutiérrez V, de la Torre R, Kafatos A, Lamuela-Raventós RM, Osada J, Owen RW, et al. Minor components of olive oil: Evidence to date of health benefits in humans. *Nutrition Reviews* 2006;64:s20-s30.
3. Arbones-Mainar JM, Ross K, Rucklidge GJ, Reid M, Duncan G, Arthur JR, Horgan GW, et al. Extra virgin olive oils increase hepatic fat accumulation and hepatic antioxidant protein levels in APOE^{-/-} mice. *J Proteome Res* 2007;6:4041-4054.
4. Murkovic M, Lechner S, Pietzka A, Bratacos M, Katzogiannos E. Analysis of minor components in olive oil. *J Biochem Biophys Methods* 2004;61:155-160.
5. Desbien AL, Reed SJ, Bailor HR, Dubois Cauwelaert N, Laurance JD, Orr MT, Fox CB, et al. Squalene emulsion potentiates the adjuvant activity of the TLR4 agonist, GLA, via inflammatory caspases, IL-18, and IFN-gamma. *Eur J Immunol* 2015;45:407-417.
6. Kedl JD, Kedl RM. How squalene GLAdly helps generate antigen-specific T cells via antigen-carrying neutrophils and IL-18. *Eur J Immunol* 2015;45:376-379.
7. Lovaszi M, Mattii M, Eyerich K, Gacsi A, Csanyi E, Kovacs D, Ruhl R, et al. Sebum lipids influence macrophage polarization and activation. *Br J Dermatol* 2017;177:1671-1682.
8. Garcia-Bermudez J, Baudrier L, Bayraktar EC, Shen Y, La K, Guarecuco R, Yucel B, et al. Squalene accumulation in cholesterol auxotrophic lymphomas prevents oxidative cell death. *Nature* 2019;567:118-122.
9. Chmelik Z, Kotolova H, Piekutowska Z, Horska K, Bartosova L, Suchy P, Kollar P. A comparison of the impact of amaranth flour and squalene on plasma cholesterol in mice with diet-induced dyslipidemia. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 2013;126:251-255.
10. Gabas-Rivera C, Barranquero C, Martinez-Beamonte R, Navarro MA, Surra JC, Osada J. Dietary squalene increases high density lipoprotein-cholesterol and paraoxonase 1 and decreases oxidative stress in mice. *PLoS One* 2014;9:e104224.
11. Lou-Bonafonte JM, Martinez-Beamonte R, Sanclemente T, Surra JC, Herrera-Marcos LV, Sanchez-Marco J, Arnal C, et al. Current Insights into the Biological Action of Squalene. *Mol Nutr Food Res* 2018:e1800136.
12. Williams CD, Stengel J, Asike MI, Torres DM, Shaw J, Contreras M, Landt CL, et al. Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis among a largely middle-aged population utilizing ultrasound and liver biopsy: a prospective study. *Gastroenterology* 2011;140:124-131.
13. Lou-Bonafonte JM, Arnal C, Osada J. New genes involved in hepatic

- steatosis. *Curr Opin Lipidol* 2011;22:159-164.
14. Nguyen P, Leray V, Diez M, Serisier S, Le Bloc'h J, Siliart B, Dumon H. Liver lipid metabolism. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)* 2008;92:272-283.
 15. Puri P, Mirshahi F, Cheung O, Natarajan R, Maher JW, Kellum JM, Sanyal AJ. Activation and dysregulation of the unfolded protein response in nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 2008;134:568-576.
 16. Musso G, Gambino R, Cassader M. Recent insights into hepatic lipid metabolism in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Prog Lipid Res* 2009;48:1-26.
 17. Guillen N, Acin S, Navarro MA, Perona JS, Arbones-Mainar JM, Arnal C, Sarria AJ, et al. Squalene in a sex-dependent manner modulates atherosclerotic lesion which correlates with hepatic fat content in apoE-knockout male mice. *Atherosclerosis* 2008;197:72-83.
 18. Martinez-Beamonte R, Alda O, Sanclemente T, Felices MJ, Escusol S, Arnal C, Herrera-Marcos LV, et al. Hepatic subcellular distribution of squalene changes according to the experimental setting. *J Physiol Biochem* 2018;74:531-538.
 19. Ramirez-Torres A, Barcelo-Batlloiri S, Fernandez-Vizarra E, Navarro MA, Arnal C, Guillen N, Acin S, et al. Proteomics and gene expression analyses of mitochondria from squalene-treated apoE-deficient mice identify short-chain specific acyl-CoA dehydrogenase changes associated with fatty liver amelioration. *J Proteomics* 2012;75:2563-2575.
 20. Ramirez-Torres A, Barcelo-Batlloiri S, Martinez-Beamonte R, Navarro MA, Surra JC, Arnal C, Guillen N, et al. Proteomics and gene expression analyses of squalene-supplemented mice identify microsomal thioredoxin domain-containing protein 5 changes associated with hepatic steatosis. *J Proteomics* 2012;77:27-39.
 21. Walters EM, Wolf E, Whyte JJ, Mao J, Renner S, Nagashima H, Kobayashi E, et al. Completion of the swine genome will simplify the production of swine as a large animal biomedical model. *BMC Med Genomics* 2012;5:55.
 22. Bassols A, Costa C, Eckersall PD, Osada J, Sabria J, Tibau J. The pig as an animal model for human pathologies: A proteomics perspective. *Proteomics Clin Appl* 2014;8:715-731.
 23. Niu D, Wei HJ, Lin L, George H, Wang T, Lee IH, Zhao HY, et al. Inactivation of porcine endogenous retrovirus in pigs using CRISPR-Cas9. *Science* 2017;357:1303-1307.
 24. Lai L, Kolber-Simonds D, Park KW, Cheong HT, Greenstein JL, Im GS, Samuel M, et al. Production of alpha-1,3-galactosyltransferase knockout pigs by nuclear transfer cloning. *Science* 2002;295:1089-1092.
 25. Oh H, Jun DW, Saeed WK, Nguyen MH. Non-alcoholic fatty liver diseases: update on the challenge of diagnosis and treatment. *Clin Mol Hepatol* 2016;22:327-335.
 26. Acin S, Navarro MA, Perona JS, Surra JC, Guillen N, Arnal C, Sarria AJ, et al. Microarray analysis of hepatic genes differentially expressed in the presence of the unsaponifiable fraction of olive oil in apolipoprotein E-deficient mice. *Br J Nutr* 2007;97:628-638.
 27. Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem* 1957;226:497-509.
 28. Virtue S, Petkevicius K, Moreno-Navarrete JM, Jenkins B, Hart D, Dale M, Koulman A, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma2 controls the rate of adipose tissue lipid storage and determines metabolic flexibility. *Cell Rep* 2018;24:2005-2012 e2007.
 29. Orlicky DJ, Libby AE, Bales ES, McMahan RH, Monks J, La Rosa FG, McManaman JL. Perilipin-2 promotes obesity and progressive fatty liver disease in mice through

- mechanistically distinct hepatocyte and extra-hepatocyte actions. *J Physiol* 2019;597:1565-1584.
30. Hansen JS, de Mare S, Jones HA, Goransson O, Lindkvist-Petersson K. Visualization of lipid directed dynamics of perilipin 1 in human primary adipocytes. *Sci Rep* 2017;7:15011.
 31. Tsai TH, Chen E, Li L, Saha P, Lee HJ, Huang LS, Shelness GS, et al. The constitutive lipid droplet protein PLIN2 regulates autophagy in liver. *Autophagy* 2017;13:1130-1144.
 32. Chaurasia B, Tippetts TS, Mayoral Monibas R, Liu J, Li Y, Wang L, Wilkerson JL, et al. Targeting a ceramide double bond improves insulin resistance and hepatic steatosis. *Science* 2019;365:386-392.
 33. Turner N, Lim XY, Toop HD, Osborne B, Brandon AE, Taylor EN, Fiveash CE, et al. A selective inhibitor of ceramide synthase 1 reveals a novel role in fat metabolism. *Nat Commun* 2018;9:3165.
 34. Musso G, Cassader M, Paschetta E, Gambino R. Bioactive lipid species and metabolic pathways in progression and resolution of nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology* 2018;155:282-302 e288.
 35. Puri P, Baillie RA, Wiest MM, Mirshahi F, Choudhury J, Cheung O, Sargeant C, et al. A lipidomic analysis of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2007;46:1081-1090.
 36. Peng KY, Watt MJ, Rensen S, Greve JW, Huynh K, Jayawardana KS, Meikle PJ, et al. Mitochondrial dysfunction-related lipid changes occur in nonalcoholic fatty liver disease progression. *J Lipid Res* 2018;59:1977-1986.
 37. Cole LK, Mejia EM, Vandel M, Sparagna GC, Claypool SM, Dyck-Chan L, Klein J, et al. Impaired cardiolipin biosynthesis prevents hepatic steatosis and diet-induced obesity. *Diabetes* 2016;65:3289-3300.
 38. Gillessen S, Carvajal D, Ling P, Podlaski FJ, Stremlo DL, Familletti PC, Gubler U, et al. Mouse interleukin-12 (IL-12) p40 homodimer: a potent IL-12 antagonist. *Eur J Immunol* 1995;25:200-206.
 39. Feng S, Dai Z, Liu AB, Huang J, Narsipur N, Guo G, Kong B, et al. Intake of stigmaterol and beta-sitosterol alters lipid metabolism and alleviates NAFLD in mice fed a high-fat western-style diet. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids* 2018;1863:1274-1284.
 40. Tu LN, Showalter MR, Cajka T, Fan S, Pillai VV, Fiehn O, Selvaraj V. Metabolomic characteristics of cholesterol-induced non-obese nonalcoholic fatty liver disease in mice. *Sci Rep* 2017;7:6120.
 41. Padro T, Cubedo J, Camino S, Bejar MT, Ben-Aicha S, Mendieta G, Escola-Gil JC, et al. Detrimental Effect of hypercholesterolemia on high-density lipoprotein particle remodeling in pigs. *J Am Coll Cardiol* 2017;70:165-178.
 42. Hanhineva K, Barri T, Kolehmainen M, Pekkinen J, Pihlajamaki J, Vesterbacka A, Solano-Aguilar G, et al. Comparative nontargeted profiling of metabolic changes in tissues and biofluids in high-fat diet-fed Ossabaw pig. *J Proteome Res* 2013;12:3980-3992.

Supplemental data:

Table S1. Characteristics of primers used in RT-qPCR assays according to MIQE guidelines.

Gene symbol	Accession	Sequence	Amplicon length	Junction	[Primer]	Efficiency
<i>ACADS</i>	NM_213898.1	Sense: TTCATCAAGGAGCCGGCAAT Antisense: AGGGTAAAGGCACATGGCTC	306	Exon 9-10	200 nM	92%
<i>ACACA</i>	NM_001114269.1	Sense: ACCCAGGAGGATGTGCTAT Antisense: AGCTGGCTAGTGGAGGTGT	531	/	80 nM	110%
<i>ACACB</i>	NM_001206399.1	Sense: CTGCACGGAAATGATCGCTG Antisense: CCCTCATCTGGGTTTTTCGCT	213	/	200 nM	99%
<i>ACLY</i>	NM_001257276.1	Sense: GGCCTTTCGTAGAGAGCAGG Antisense: CCATCCAGGGTGAGGTTGAC	281	/	200 nM	107%
<i>ACOX1</i>	NM_001101028.1	Sense: CCGCCGAGAGATCGAAAACAT Antisense: TGTCCTCGCTGCACAAAGTT	192	Exon 1-3	250 nM	96%
<i>APC5</i>	XM_001929287.5	Sense: GAGACCAAAGCCCTCACTCC Antisense: TGGACTCCTGTGCGATCCTA	324	/	100 nM	97%
<i>ARNTL1</i>	NM_001097425.1	Sense: TAGTGGCCTACTCCCAGGAC	130	Exon 1	100 nM	103%

<i>CAV1</i>	NM_001348935.1	Antisense: GGGACTGCTTGAGCCTTGAT Sense: GGTCAGCAGCCTCCCTAAAG	248	Exon 3	200 nM	104%
<i>CASP1</i>	NM_214162.1	Antisense: CATTCAGCTGGTGAGAGGCA Sense: AGGAGGCTGTTTGTCCGTTT	249	Exon 1-2	250/350 nM	92%
<i>CD36</i>	NM_001044622.1	Antisense: ACCTGTGGAGAGTTTCGAGGA Sense: CACTGCCTCACTGGAGTGTT	104	/	100 nM	97%
<i>CIDEA</i>	NM_001112696.2	Antisense: GCTTCAAGTGCTGGGTCAA Sense: CAAGGCCACCATGTACGAGA	459	Exon 4-5	No signal	
<i>CIDEB</i>	NM_001112688.1	Antisense: AAGCAGAGATGAAGAGGAAGCAT Sense: GGCCTGCTCAGGTCAGTATC	299	Exon 1-3	200 nM	96%
<i>CS</i>	NM_214276.1	Antisense: GGCCTCCATTTCTGTCCCAA Sense: CATGGCCTTACTCACTGCGG	230	/	200 nM	92%
<i>CPT1A</i>	NM_001129805.1	Antisense: CCTTCATGCCTCTCATGCCA Sense: TTCAGTTCACGGTCACTCCG		/	90 nM	104%
<i>CYP2C42</i>	NM_001167835.1	Antisense: TGACCACGTTCTTCGTCTGG Sense: GGTTGTGGTCCTGGTGCTTA	161	Exon 1-2	200 nM/ 250 nM	90%

<i>CYP2B2</i>	NM_214413.1	Antisense: GGCCATAGACTTCTGCGAG Sense: AAACGCTTCGCCTACAGAGA	103	/	450 nM	100%
<i>CYP51</i>	NM_214432.1	Antisense: TCAAGAAGGCGGAGTAGAGC Sense: GGCTTACTGCAAGCTGGG	76	Exon 1	100 nM	106%
<i>CYP7A1</i>	NM_001005352.3	Antisense: GACTGGATAGGAGATTGACGCC Sense: GGTTAAAGCGCCCAGAGACT	269	Exon 1-3	No signal	
<i>DBP</i>	XM_013998600.2	Antisense: CCACAGGTATCAGAAGCGGA Sense: AGACCTTTGACCCTCGGAGA	135	Exon 2-3	80 nM	95%
<i>FABP1</i>	NM_001004046.2	Antisense: TATTCTTGTACCGCCGGCTC Sense: GTCTGCCCGACGAACTCAT	106	Exon 2	100 nM	102%
<i>FASN</i>	NM_001099930.1	Antisense: ACCTTGGACCCGGTAGTGAT Sense: ACGTCCTGCTGAAGCCTAAC	311	/	200 nM	108%
<i>FATP1 / SLC27A1</i>	NM_001083931.1	Antisense: GGCTTCGATGTACTIONCAGGG Sense: GGTGCTTGTGGCTTCAACAG	266	Exon 9-10	No Signal	
<i>FATP2 / SLC27A2</i>	NM_001278777.1	Antisense: TCACCTGATAGGTAGGCGCT Sense: GGACGAGACGCTCACCTATG	143	Exon 1	250 nM	91%
		Antisense: CCAGCCAGAGCCACACATAA				

<i>FATP4 / SLC27A4</i>	XM_021069609.1	Sense: ATCTTATTCGCTGCCACCGT Antisense: GCAGGTTGGTGTGATGAGC	250	/	250 nM	94%
<i>FATP5 / SLC27A5</i>	XM_021097370.1	Sense: GTCCTCAGCTGCTTGGA Antisense: CTGGATCACAGTCACGCCAT	105	Exon 3-4	200 nM	90%
<i>FDPS</i>	NM_001185131.1	Sense: GGCACAGACATCCAGGACAA Antisense: GCCACCTTCTCAGCATCCTT	122	/	50 nM	96%
<i>GPX4</i>	NM_214407.1	Sense: TGGCCTCTCAATGAGGCAAG Antisense: CCCTTGGGCTGGACTTTCAT	253	Exon 3-4	500 nM	94%
<i>GULO</i>	NM_001129948.1	Sense: CGCTGTTTGTGGGTGGAG Antisense: GCCATAGGTCTTTGCCAG	268	Exon 1-2	100 nM	104%
<i>HMBS</i>	NM_001097412.1	Sense: CGCAACGGCGGAAGAAAATA Antisense: GTGTGTTGAGGTTTCCCCGA	494	/	100 nM / 200 nM	108%
<i>ISG15</i>	NM_001128469.3	Sense: GGTGAGGAACGACAAGGGTC Antisense: GGCTTGAGGTCATACTCCCC	176	Exon 2	100 nM	92%
<i>LGALS3</i>	NM_001097501.2	Sense: TCTGGACCACTGAATGTGCC Antisense: GAGCATCATTGACCGCAACC	318	Exon 3-5	100 nM	92%

<i>MAT1A</i>	NM_001243187.1	Sense: TCTCCATCTGTGGTTGGCAC Antisense: GAAGCCCAGATTCCAGTGCT	125	Exon 9	250 nM	94%
<i>PAQR7</i>	NM_213739.1	Sense: CAGGGGACAGAAACCAGTCA Antisense: GGATGGACCTGTCGCAAACCT	182	Exon 1-3	100 nM	108%
<i>PGC1A</i>	NM_213963.2	Sense: TGCTCTGGTTGGTGAAGACC Antisense: TAGAGACGGCTCTTCTGCCT	370	Exon 2-4	300 nM	93%
<i>PLD3</i>	NM_001244500.1	Sense: CACCATGGAGTTCTCCCACC Antisense: AGCCAGGGAGAGCAGGAAG	154	/	200 nM	94%
<i>PLIN1</i>	NM_001038638.1	Sense: TGGTGGCGTCTGTATGCAAT Antisense: CAGCACCGAGGACTTTGTCT	288	Exon 2-4	No signal	
<i>PLIN2</i>	NM_214200.2	Sense: TCGACTCTAATTTGCTGCTGGT Antisense: CTTGGCCCCAGTCACAGTAG	427	Exon 1-5	100 nM	100%
<i>PLIN5</i>	NM_001123135.1	Sense: TGGCCACCGTGAATGATCTC Antisense: TGGGCATGATGCTTCCTCTG	427	Exon 3-5	100 nM	92%
<i>PNPLA2</i>	NM_001098605.1	Sense: TGTTCCCCAAAGAGACGACG Antisense: CGTTGGCCACTAGGGAGGA	117	Exon 1	No signal	

<i>PTPRU</i>	XM_021095725.1	Sense: GATCACCAAGCTGGTGGAGG Antisense: GGAGCAGAGGGTCTTCACAC	400	/	200 nM	94%
<i>SCD</i>	XM_021072070.1	Sense: ACCCAGCCGTCAAAGAGAAG Antisense: GGGCCACATTTCTCAGTT	420	Exon 4-6	100 nM	95%
<i>SLC25A1</i>	NM_001190189.1	Sense: CCAGCCCCGACCCATAACC Antisense: CTGCGTCTTCACGTACTIONCGG	243	/	No signal	
<i>SMPDL3A</i>	XM_003480256.4	Sense: ACTGGCCACAGGATCAACTG Antisense: TAGGGTCACGACATTTGGGC	183	/	100 nM	90%
<i>SPP1</i>	XM_005667004.3	Sense: CACATTGTAGCGAGGTGGGA Antisense: GACCGTCGACTAAACCCTGA	170	/	100 nM	96%
<i>SRGN</i>	XM_013990411.2	Sense: TTCCGCACAGGAGAACCTTG Antisense: GTGAGCCTGTCACAATGCAG	106	/	90 nM	101%
<i>THRSP</i>	NM_001244376.1	Sense: ACTCGGCATGGACGAGAAAG Antisense: GTCTGCCTTCCGTCGTGTAG	522	Exon 1-2	300 nM	92%
<i>TXNDC5</i>	XM_021100160.1	Sense: GGAAGGCGTGACCTTCATCA Antisense: AAAGGGATCACGAGTTGCGT	457	Exon 8-10	450 nM	90%

<i>UBA52</i>	NM_214211.1	Sense: ACCCTGACGGGCAAGACCAT Antisense: CGGCCATCCTCCAGCTGTTT	142	Exon 1-3	100 nM	90%
<i>Unknown RNA</i>	AK345473.1	Sense: GGCCCCTCTTAAGAAGCCAG Antisense: GAACCGCTGACAAGTCCTCA	139	/	100 nM	97%
<i>18S</i>	NR_046261.1	Sense: TTTTCGGAACTGAGGCCATG Antisense: CCGGTCCAAGAATTTACCTCT	82	/	100 nM	90%

Table S2. Internal standards for lcms lipidomic assays.

Lipid Class	Internal standard	Supplier	Reference	concentration ($\mu\text{g/ml}$)
Ceramides	C16-d31	AVANTI	868516P	1.8
Cardiolipins	TG(45:0-d29)	QMX	D-5213	2.5
Phosphatic acids	PA(C16:0-d31/C18:1) Na ⁺	AVANTI	860453P	2.5
Lysophosphatidylcholine	LPC(C14:0)-d42	QMX	D-5885	2.5
Lysophosphatidylethanolamine	LPC(C14:0)-d42	QMX	D-5885	2.5
Fatty acids	FA(C17:0-d33)	QMX	D-5261	2.5
Phosphatidylcholine	PC(C16:0-d31/C18:1)	AVANTI	860399P	2.5
Phosphatidylethanolamine	PE(C16:0-d31/C18:1)	AVANTI	860374P	2.5
Phosphatidylinositol	PI(C16:0-d31/C18:1) NH ₄ ⁺	AVANTI	860042P	2.5
Phosphatidylglycerol	PG(C16:0-d31/C18:1) Na ⁺	AVANTI	860384P	2.5
Phosphatidylserine	PS(C16:0-d62) Na ⁺	AVANTI	860401P	2.5
Triglycerides	TG(45:0-d29)	QMX	D-5213	2.5
Sphingomyelins	SM(C16:0-d31)	AVANTI	868584P	2.5
Sulpholipids	PG(C16:0-d31/C18:1) Na ⁺	AVANTI	860384P	2.5

Table S3. Hepatic RNA expression in different experimental conditions.

	Control group			Squalene group		
	Initial stage (n = 12)	Final stage (n = 12)	Trend	Initial stage (n = 12)	Final stage (n = 11)	Trend
ACACA	1.1 ± 0.5	1.4 ± 0.8	1.9 ± 2.3	1.1 ± 0.5	1.2 ± 0.5	1.3 ± 1.1
ACACB	1.1 ± 0.7	1.3 ± 1.0	1.6 ± 1.2	1.4 ± 1.0	1.3 ± 1.3	0.9 ± 0.5
ACADS	1.1 ± 0.6	1.1 ± 0.4	1.3 ± 1.1	1.0 ± 0.2	1.4 ± 0.9	1.4 ± 0.9
ACOX1	1.1 ± 0.5	1.4 ± 0.7	1.7 ± 1.5	1.2 ± 0.6	1.7 ± 0.9	2.2 ± 2.1
ACLY	1.0 ± 0.3	1.0 ± 0.3	1.1 ± 0.6	1.1 ± 0.6	1.0 ± 0.3	1.0 ± 0.5
APC5	1.1 ± 0.4	1.2 ± 0.4	1.2 ± 0.7	1.0 ± 0.5	0.9 ± 0.4	1.0 ± 0.6
APCS	1.4 ± 1.4	1.8 ± 1.7	1.6 ± 1.4	1.2 ± 0.9	2.6 ± 2.3	2.5 ± 2.7
ARNTL1	1.1 ± 0.5	0.8 ± 0.6	0.7 ± 0.6	1.0 ± 0.4	0.6 ± 0.4 ^a	0.7 ± 0.6
CASP1	0.9 ± 0.3	1.1 ± 0.8	1.3 ± 0.8	1.4 ± 1.2	1.5 ± 1.3	1.7 ± 1.8
CAV1	1.2 ± 0.5	1.5 ± 0.8	1.7 ± 1.6	1.1 ± 0.7	2.1 ± 2.4 ^a	4.0 ± 9.1
CD36	1.3 ± 0.8	2.2 ± 2.0 ^a	1.3 ± 0.5	1.0 ± 0.6	1.9 ± 1.1 ^a	2.1 ± 1.2
CIDEB	1.1 ± 0.4	1.0 ± 0.6	1.1 ± 0.7	1.0 ± 0.4	1.1 ± 0.6	1.3 ± 1.3
CIDEC	1.1 ± 0.4	1.0 ± 0.4	1.0 ± 0.5	1.0 ± 0.3	0.8 ± 0.3	0.9 ± 0.5
CS	1.2 ± 0.4	1.8 ± 0.6 ^b	1.7 ± 0.8	1.0 ± 0.5	1.2 ± 0.4	1.5 ± 1.0
CPT1A	1.2 ± 0.4	1.0 ± 0.6	0.9 ± 0.7	0.9 ± 0.2	0.9 ± 0.4	1.0 ± 0.6
CYP2B22	1.3 ± 1.4	3.2 ± 3.2 ^b	3.5 ± 3.6	2.2 ± 2.0	3.0 ± 1.7	8.4 ± 13.3
CYP2C42	1.4 ± 0.6	1.5 ± 1.3	1.1 ± 1.0	1.1 ± 0.7	0.9 ± 0.9	1.0 ± 0.8
CYP51	1.0 ± 0.6	1.1 ± 0.9	1.4 ± 1.2	1.4 ± 1.3	0.6 ± 0.3	0.8 ± 0.6
DBP	1.4 ± 0.9	2.7 ± 1.8 ^a	2.6 ± 1.8	1.0 ± 0.8	2.7 ± 2.5 ^a	3.3 ± 2.7
FABP1	1.2 ± 0.8	1.2 ± 0.4	1.4 ± 0.8	1.1 ± 0.6	2.5 ± 2.2 ^a	2.8 ± 3.3
FASN	1.5 ± 1.0	2.9 ± 2.0	3.7 ± 4.5	2.2 ± 3.4	2.1 ± 1.5	3.6 ± 4.7
FATP2	1.1 ± 0.4	1.0 ± 0.6	1.1 ± 1.2	1.1 ± 0.5	1.1 ± 0.6	1.7 ± 2.2
FATP4	1.1 ± 0.4	1.7 ± 0.6 ^a	2.3 ± 2.8	1.1 ± 0.5	2.1 ± 1.0 ^c	2.2 ± 1.4
FATP5	1.2 ± 0.8	2.0 ± 1.0	3.1 ± 4.3	1.2 ± 0.7	2.0 ± 1.4	2.8 ± 2.8
FDPS	0.9 ± 0.4	1.4 ± 0.7	1.9 ± 1.6	1.5 ± 1.2	1.0 ± 0.5	1.0 ± 0.6
GPX4	1.1 ± 0.4	0.7 ± 0.3 ^a	0.8 ± 0.6	1.0 ± 0.3	0.8 ± 0.4	0.9 ± 0.6
ISG15	1.5 ± 1.4	2.4 ± 2.3	2.7 ± 4.6	2.3 ± 3.1	9.4 ± 23.6	14.5 ± 39.4

LGALS3	1.1 ± 0.8	1.8 ± 1.2	2.1 ± 1.8	1.8 ± 2.5	1.9 ± 1.4	1.9 ± 1.4
MAT1A	1.2 ± 0.5	0.7 ± 0.3 ^b	0.6 ± 0.3	1.0 ± 0.5	0.7 ± 0.5	1.0 ± 1.0
PARQ7	1.4 ± 0.7	3.2 ± 2.9 ^b	2.3 ± 1.4	1.4 ± 1.8	4.4 ± 5.6 ^b	5.9 ± 10.8
PLIN2	1.3 ± 0.8	0.6 ± 0.4 ^c	0.5 ± 0.2	1.0 ± 0.6	0.7 ± 0.4	1.1 ± 1.1 ^d
PLIN5	1.8 ± 1.9	1.0 ± 0.5	1.7 ± 2.2	1.2 ± 0.9	1.4 ± 1.5	3.4 ± 7.1
PGC1A	1.1 ± 0.7	1.6 ± 0.8	2.0 ± 2.2	1.2 ± 0.7	2.0 ± 1.3 ^a	2.2 ± 1.8
SCD1	1.1 ± 1.0	2.7 ± 2.4	5.2 ± 6.2	2.5 ± 2.5	2.9 ± 1.3	4.5 ± 8.0
SMPDL3A	1.0 ± 0.6	1.6 ± 1.2	2.3 ± 2.7	1.9 ± 2.6	1.7 ± 0.9	1.7 ± 1.2
SRGN	1.1 ± 0.4	1.2 ± 0.5	1.2 ± 0.4	1.1 ± 0.6	1.4 ± 0.9	1.4 ± 0.8
SPP1	1.3 ± 0.7	3.4 ± 2.2 ^b	7.3 ± 15.7	3.1 ± 7.4	2.5 ± 1.9	2.8 ± 2.4
THRPS	1.5 ± 1.7	2.7 ± 2.6	7.3 ± 19.3	1.7 ± 1.5	1.8 ± 1.9	2.6 ± 4.3
TXNDC5	1.2 ± 0.6	1.1 ± 0.4	1.2 ± 0.8	1.0 ± 0.4	1.3 ± 0.5	1.6 ± 1.3
Unknown RNA	1.7 ± 1.9	1.7 ± 1.6	3.6 ± 8.0	1.2 ± 0.9	0.5 ± 0.5 ^b	0.4 ± 0.2 ^d

Results are shown as media ± standard deviation. Statistical analyses were carried out using paired Wilcoxon test when comparing initial and final state in each group: ^a, p<0.05; ^b, p<0.01; ^c, p<0.01 and Mann–Whitney U test when comparing the trend of control vs squalene samples: ^d, p<0.05.

Table S4. Lipids significantly changed in the liver according to lipid classes.

Increases denoted as (“+”) and decreases as (“-“) reflect the trend of squalene supplemented group when comparing to the control group. Statistical analyses were carried out using Mann–Whitney U test. *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001.

Ceramides (Cer):	“+”: Cer_36:2**, Cer_36:1*, Cer_36:0**, Cer_40:1*, Cer_40:0*, Cer_42:1**
Cardiolipins (CL):	“-“: CL_(66:06)**, CL_(72:09)*, CL_(74:11)*, CL_(74:10)*, CL_(72:08)*, CL_(74:09)*, CL_(76:12)*, CL_(72:07)*, CL_(74:08)**, CL_(69:05)**, CL_(76:11)**, CL_(72:06)*, CL_(74:07)*, CL_(76:10)*, CL_(76:09)*
Phosphatidic acids (PA):	“+”: PA_(34:2)*
Lysophosphatidylcholines (LPC):	“+”: LPC_(20:5)**, LPC_(18:2)*, LPC_(18:1)*, LPC_(20:4)*, LPC_(20:3)*
Fatty acids (FA):	“+”: FA_(17:0)*
Phosphatidylcholines (PC):	“+”: PC_(31:0)*, PC_(32:0)**, PC_(34:1)*, PC_(38:4)*, PC_(33:0)**, PC_(36:2)***, PC_(35:1)*, PC_(38:3)**, PC_(34:0)**
Phosphatidylethanolamines (PE):	“+”: PE_(34:0)**, PE_(38:0)*** “-“: PE_(38:6)*
Phosphatidylinositols (PI):	“+”: PI_(36:2)*, PI_(38:3)* “-“: PI_(36:0)*
Phosphatidylglycerols (PG):	“+”: PG_(32:0)* “-“: PG_(38:0)*
Phosphatidylserines (PS):	“-“: PS_(35:1)*
Triglycerides (TG):	“-“: TG_(36:0)**, TG_(58:12)*, TG_(44:1)*, TG_(46:2)*, TG_(58:10)*, TG_(48:3)*, TG_(45:1)*, TG_(48:2)**, TG_(46:1)*, TG_(51:4)*, TG_(50:3)*, TG_(52:4)*, TG_(54:6)*, TG_(56:7)*, TG_(47:1)**, TG_(49:2)*, TG_(51:3)*, TG_(48:1)*, TG_(50:2)*, TG_(53:4)**, TG_(54:5)*, TG_(56:6)*, TG_(52:3)*, TG_(49:1)*, TG_(51:2)*, TG_(54:4)*, TG_(58:7)*, TG_(53:3)*, TG_(55:4)*, TG_(50:1)*, TG_(52:2)*, TG_(54:3)*, TG_(53:2)*, TG_(51:0)*, TG_(52:1)*, TG_(54:2)*, TG_(56:3)*, TG_(52:0)*, TG_(53:1)*, TG_(55:2)**, TG_(54:1)*, TG_(55:1)*, TG_(56:2)*, TG_(54:0)**, TG_(55:0)**, TG_(56:1)**
Sphingomyelins (SM):	“+”: SM_(36:3)*, SM_(34:0)*, SM_(35:1)**, SM_(36:1)*, SM_(36:0)**
Sulpholipids (S):	“+”: S_(d42-OH:1)**, S_(d43:1)*, S_(d46-OH:1)** “-“: S_(d40:2)*, S_(d48:0)*

Table S5. Plasma biochemistry parameters.

	Control group			Squalene group		
	Initial stage (n = 12)	Final stage (n = 12)	Trend	Initial stage (n = 12)	Final stage (n = 12)	Trend
Glucose (mg/dL)	99 ± 16	99 ± 24	0 ± 29	103 ± 22	112 ± 38	8 ± 21
TG (mg/dl)	27 ± 11	19 ± 8 ^a	-7 ± 12	38 ± 20	33 ± 18	-6 ± 25
Cholesterol (mg/dl)	257 ± 121	203 ± 142	-54 ± 161	164 ± 108	194 ± 87	30 ± 88 ^c
Free Chol (mg/dL)	73 ± 36	125 ± 128	51 ± 141	147 ± 322	106 ± 87	-41 ± 344
KB (µM)	23 ± 31	52 ± 56	30 ± 61	47 ± 54	76 ± 59	29 ± 87
NEFA (mM)	0.20 ± 0.31	0.22 ± 0.36	0.02 ± 0.36	0.12 ± 0.19	0.35 ± 0.37	0.23 ± 0.47 ^c
AST (U/L)	61 ± 48	67 ± 47	6 ± 71	71 ± 46	86 ± 68	15 ± 90
ALT (U/L)	25 ± 7	22 ± 5	-3 ± 7	27 ± 8	22 ± 3 ^a	-5 ± 8
ALP (U/L)	205 ± 102	150 ± 88	-55 ± 127	235 ± 68	163 ± 94 ^a	-71 ± 89
GGT (U/L)	44 ± 15	46 ± 14	1 ± 10	46 ± 10	55 ± 11 ^b	8.5 ± 6 ^c
Total billirubin (mg/dL)	0.4 ± 0.4	0.4 ± 0.4	0.0 ± 0.3	0.3 ± 0.1	0.5 ± 0.2 ^a	0.18 ± 0.3
Insulin (ng/mL)	3.6 ± 1.4	4 ± 1.8 ^a	0.45 ± 1.5	3.6 ± 1.2	3.0 ± 0.8	-0.6 ± 1.6
Adiponectin (µg/mL)	18 ± 16	18 ± 8	0 ± 19	16 ± 9	14 ± 5	-2 ± 8
Leptin (pg/mL)	204 ± 101	322 ± 331	117 ± 367	471 ± 1030	279 ± 229	-192 ± 1082
TNFα (pg/mL)	59 ± 48	50 ± 55	-9 ± 60	53 ± 35	48 ± 25	-4.5 ± 43
IL-1beta (pg/mL)	7 ± 11	5 ± 15	-2.2 ± 19	3 ± 6	11 ± 17	8 ± 18 ^c
IL-4 (pg/mL)	0.9 ± 2.2	0.4 ± 1.3	-0.5 ± 2.6	0 ± 0	0.7 ± 1.6	0.6 ± 1.6
IL-6 (pg/mL)	4 ± 10	10 ± 33	5 ± 36	2 ± 4	19 ± 43	17 ± 44
IL-8 (pg/mL)	2.6 ± 1.8	3.3 ± 5.2	0.6 ± 4.6	4.0 ± 3.5	4.6 ± 4.8	0.6 ± 6.1
IL-10 (pg/mL)	24 ± 25	25 ± 52	1.1 ± 44	12 ± 29	17 ± 19	4.5 ± 31
IL-12p40 (pg/mL)	203 ± 147	130 ± 115 ^a	-72 ± 116	150 ± 87	320 ± 194 ^b	171 ± 182 ^e
IFN-alpha (pg/mL)	0.1 ± 0.4	5.7 ± 8.3 ^b	5.6 ± 8.3	1.0 ± 2.8	6.4 ± 8.1 ^a	5.4 ± 9.2
IFN-gamma (pg/mL)	13 ± 43	6 ± 15	-7 ± 34	0 ± 0	1 ± 3	1 ± 3

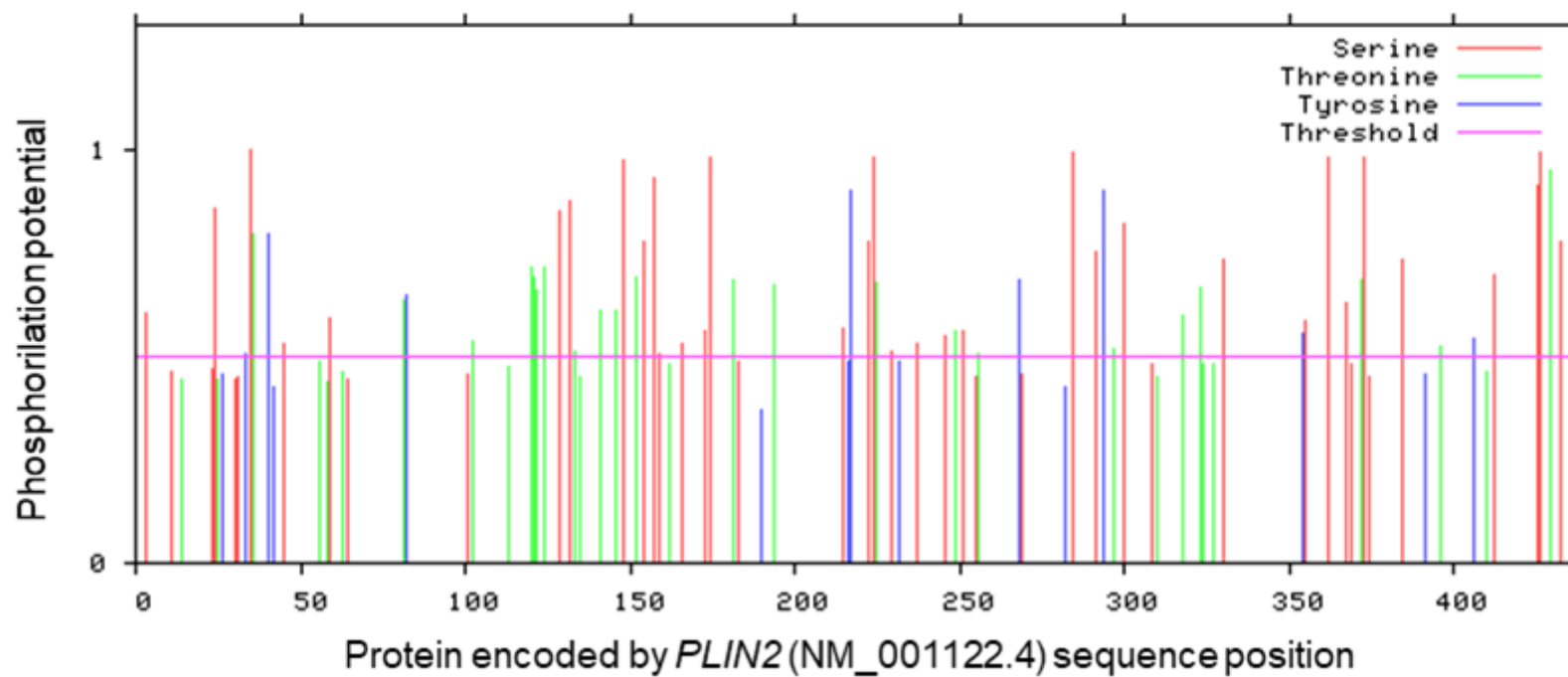
Results are shown as media ± standard deviation. Statistical analyses were carried out using Wilcoxon matched pairs test when comparing initial and final state in each group: (^a, P<0.05; ^b, P<0.01) and Mann–Whitney U test when comparing the evolution of control vs squalene samples: ^c, P<0.05; ^d, P < 0.01; ^e, P < 0.001.

Table S6. Lipids significantly changed in plasma grouped by lipid classes

Ceramides (Cer):	“+”: Cer_36:2*, Cer_38:1*, Cer_42:1** “-”: Cer_36:0*
Phosphatidic acids (PA):	“+”: PA_(36:4)*, PA_(32:0)*, PA_(38:4)*, PA_(40:5)*, PA_(36:1)*, PA_(36:0)* “-”: PA_(38:2)*
Lysophosphatidylcholines (LPC):	“+”: LPC_(16:1)*, LPC_(17:0)*, LPC_(20:4)*
Fatty acids (FA):	“+”: FA_(16:1)***, FA_(20:2)* “-”: FA_(14:0)*, FA_(16:0)**, FA_(18:0)**
Phosphatidylcholines (PC):	“+”: PC_(32:2)**, PC_(32:1)*, PC_(36:4)*, PC_(33:1)*, PC_(35:2)*, PC_(37:4)**, PC_(33:0)*, PC_(38:3)*, PC_(38:2)*, PC_(35:0)*, PC_(40:2)*
Phosphatidylethanolamines (PE):	“-”: PE_(34:2)*
Phosphatidylinositols (PI):	“+”: PI_(36:4)*, PI_(38:4)*, PI_(38:3)*, PI_(40:4)*
Phosphatidylglycerols (PG):	“+”: PG_(38:5)*
Triglycerides (TG):	“+”: TG_(58:12)*, TG_(49:0)* “-”: TG_(44:1)*, TG_(46:2)*, TG_(45:1)*, TG_(47:2)*, TG_(49:3)*, TG_(46:1)**, TG_(45:0)*, TG_(49:2)*, TG_(47:1)*, TG_(47:0)*, TG_(48:0)*, TG_(54:3)*
Sphingomyelins (SM):	“+”: SM_(36:3)*, SM_(33:0)*, SM_(39:0)*
Sulpholipids (S):	“+”: S_(d48:2)**, S_(d48:1)* “-”: S_(d38:0)**, S_(d39:1)*, S_(d42:2)*

Increases denoted as (“+”) and decreases as (“-“) reflect the trend of squalene supplemented group when comparing to the control group. Statistical analyses were carried out using Mann–Whitney U test. *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001.

Figure S1. Phosphorylation predicted sites for PLIN2 (NM_001122.4) according to the online platform NetPhos 3.1a.



VII. Discusión de resultados

El hígado es el órgano central del metabolismo y la dieta uno de los factores determinantes de su metabolismo (492). A través de sus distintos componentes, tanto macronutrientes como micronutrientes, ejerce efectos muy variados y complejos en las distintas rutas metabólicas y su interacción constituyendo auténticas redes metabólicas con regulaciones en todos los niveles conocidos, epigenéticos (434, 435), transcriptómicos (436), postranscripcionales (493), posttraduccionales (494).

El cambio en los patrones alimentarios de la sociedad occidental lleva a la aparición inusitada de nuevas patologías como la esteatosis hepática no alcohólica. Frente a esta situación se ha propuesto la dieta mediterránea como una alternativa saludable. Esta tiene por peculiaridad el uso de aceite de oliva como principal aporte de grasa, cuyos componentes minoritarios parecen explicar algunos de los efectos beneficiosos de la dieta mediterránea (495). Teniendo esto en consideración es lógico que exista un gran interés por conocer y entender los mecanismos a través de los cuales estos compuestos ejercen sus efectos, siendo este el objetivo que nuestro grupo de investigación lleva más de dos décadas investigando.

VII.1. *Pgc1a* is responsible for the sex differences in hepatic *Cidec/Fsp27* mRNA expression in mice fed a Western diet

A fin de ayudar a descifrar este entramado bioquímico que se establece durante la esteatosis hepática no alcohólica nos planteamos caracterizar la expresión hepática de *Cidec/Fsp27*. Como ya se ha comentado en la introducción, este gen tiene una función clave en el metabolismo lipídico ya que parece coordinar la fusión de gotas lipídicas pudiendo convertir una esteatosis microvesicular, caracterizada por la presencia de múltiples gotas pequeñas, en una macrovesicular caracterizada por la presencia de una única gota lipídica que puede llegar a ocupar la mayor parte del hepatocito desplazando el núcleo. En este contexto, y trabajando con un modelo carente de *Apoe*, encontramos que el colesterol dietético aumentaba la expresión de *Cidec/Fsp27*, lo cual no sucedía cuando se combinaba esta suplementación con ácidos grasos saturados. Bajo estas últimas circunstancias tampoco la suplementación con componentes

minoritarios de la dieta como el ácido oleanólico o el escualeno variaba la expresión de *Cidec/Fsp27*. A través de estos experimentos observamos que existía una regulación dependiente del sexo activada con la dieta esteatósica, existiendo una menor expresión de *Cidec* en el sexo femenino. Este efecto se observó tanto en el modelo deficiente de *ApoE* como en el deficiente de *Ldlr*.

En un intento para definir cuál era el rol de las hormonas sexuales en este fenómeno procedimos a realizar una castración en ambos sexos la cual reveló que las hormonas del ovario eran cruciales para la disminución de la expresión de *Cidec/Fsp27* y la ausencia de dicho efecto tras una ovariectomía en ratones deficientes de *ApoE* nos permitió observar que este efecto se producían a través de la expresión de *Pgc1a*.

Observando esto nos planteamos que ocurriría si elimináramos la expresión de *Pgc1a* en los ratones en vez de eliminar el estímulo hormonal. La ausencia de *Pgc1a* también logro la desaparición del efecto de las hormonas ováricas sobre la expresión hepática de *Cidec*. Reforzando dicha hipótesis.

A través de este trabajo se ha explorado dos de los principales componentes de la dieta occidental, el colesterol y las grasas saturadas. El aumento observado como respuesta al colesterol correspondía a la isoforma *Fsp27beta*, una variante transcripcional recientemente descrita y regulada por CREBH (399). Utilizando información de ENCODE, se ha observado que tanto SREBP1 como SREBP2 se unen a este gen (496). Además, la implicación de SREBP1 se ha demostrado experimentalmente (497). Sorprendentemente la combinación de colesterol y grasas saturadas disminuyen su expresión hepática. En este aspecto, varios efectos de las dietas altas en grasas se han descrito dependiendo en la duración de la administración de la grasa (498). Mientras una administración corta (3 semanas) aumenta su expresión, una administración de larga duración (12 semanas) tiene el efecto contrario. Nuestro estudio se ajusta más a la segunda situación, ya que duró 11 semanas y podría estar de acuerdo con este último hallazgo. Otros trabajos previos encontraron los mismos resultados en ratones deficientes de *ApoE* machos recibiendo una dieta enriquecida en aceite de oliva (391). De la misma manera, una disminución de la expresión de *Cidec* se encontró en régimen posprandial tras la administración

de un bolo de aceite de oliva virgen a ratas macho Wistar y esta disminución fue inversamente proporcional al contenido de triglicéridos y colesterol hepático (499). En este último caso, los cambios en el mRNA hepático ocurrieron solo 4 horas tras la ingesta. En ratas ayunadas, un aumento rápido se observó también tras cuatro horas de ayuno (500). La elevación del mRNA de *Cidec/Fsp27* mediante dietas altas en grasas requiere de deficiencias dietéticas adicionales como en metionina y colina o bajo ciertos desordenes metabólicos como los que poseen los ratones Db, o los deficientes en PPAR α . En un estudio previo, utilizando ratones deficientes en *Apoe* con un sustrato genómico C57BL/6JxOla129 y alimentados con dietas occidentales con diferentes isómeros del ácido linoleico conjugado (CLA) se observó una alta expresión hepática del mensajero *Cidec/Fsp27* en los ratones recibiendo el isómero trans-10, cis-9 CLA asociada al porcentaje de superficie hepática ocupada por gotas lipídicas. En contra, cuando se les alimentó con el isómero cis-9, trans-11 CLA el resultado fue una disminución de la expresión del mRNA de *Cidec/Fsp27* (391). De manera global, tanto el régimen de administración como los componentes nutricionales de la dieta son moduladores críticos de la expresión hepática de *Cidec/Fsp27* cuyo mensajero puede sufrir rápidas variaciones metabólicas en unas pocas horas como se observó en el modelo celular AML12, en el que la incubación con 17 β estradiol durante 6 horas fue suficiente para reducir su expresión en condiciones proesteatóticas.

En este estudio, la administración de ácido oleanólico, un triterpeno pentacíclico y escualeno, un triterpeno lineal, no tuvieron efecto en la expresión de *Cidec/Fsp27* a pesar de los cambios inducidos la extensión de las gotas lipídicas (442). Hallazgos similares se encontraron tras la administración de una dieta suplementada con un extracto de *Boswellia serrata* rico en derivados del ácido boswélico, también un componente triterpénico pentacíclico (501). Como los triterpenos tienden a acumularse en el hígado alterando la distribución de los triglicéridos en gotas lipídicas(7, 413), se podría hipotetizar que esas gotas lipídicas no necesitan cambios en la expresión de *Cidec/Fsp27* o que al menos no se ejecutan a nivel del mRNA.

Intervención	Modelo KO	Cambio observado
Colesterol 0,15%	Apoe	Aumento
Dieta tipo occidental	Apoe	No significativo
Acido Oleanólico 0,01%	Apoe	No significativo
Escualeno 1%	Apoe	No significativo
Sexo en dieta baja en grasas	Apoe	No significativo
Sexo en dieta occidental	Apoe	Disminución en hembra
Sexo en dieta occidental	Rldl	Disminución en hembra
Sexo en dieta occidental	Pgc1a	No significativo
Orquiectomía	Apoe	No significativo
Ovariectomía	Apoe	Aumento

Tabla 5. Resumen cambios en la expresión hepática de *CIDEC* en los distintos modelos murinos estudiados mediante qPCR.

En la descripción inicial de la expresión del gen hepático *Cidec/Fsp27*, observamos asociaciones significativas con la esteatosis hepática en ratones deficientes de *Cbs* y en ratones deficientes de *Apoe*, estos últimos bien sean alimentados con diferentes isómeros conjugados del ácido linoleico, o con aceite de oliva (391). Esta asociación solo se observó en el estudio de castración en machos del presente trabajo (Figura S4, manuscrito 1). De manera interesante, la expresión de *Cidec/Fsp27* se asoció con los triglicéridos hepáticos (Figura 3 y 4, manuscrito 1) o con el contenido en colesterol (Figura 1 y 2, manuscrito 1). Dos diferencias principales existen entre estos dos trabajos: el fondo genético y la composición de la dieta. En el estudio presentado como primer resultado de esta tesis se han utilizado ratones C57/BL6J mientras que en el trabajo anterior se habían utilizado un fondo genómico mixto Ola129xC57BL/6J. Esas cepas muestran importantes diferencias en el contenido graso hepático (502) que podrían haber afectado a los resultados. La segunda diferencia importante es el uso de una dieta purificada AIN-93 (503) en el estudio presente comparado con las dietas comerciales del estudio previo. Esta elección fue forzada por la gran variabilidad observada en nuestro laboratorio entre los grupos controles a lo largo de los años en cuanto a la lesión aterosclerótica cuando se han utilizado dietas controles comerciales y la ausencia de repetición de resultados a través de los años. De hecho, la fuente de proteína también ha mostrado mostrar cambios en la expresión de *Cidec/Fsp27* (504, 505). Indudablemente, los componentes de la dieta son una importante fuente de variación de su expresión génica (506), y este estudio, en unas condiciones bien definidas del fondo genómico de los ratones y con dietas purificadas añaden pruebas que refuerzan esta afirmación.

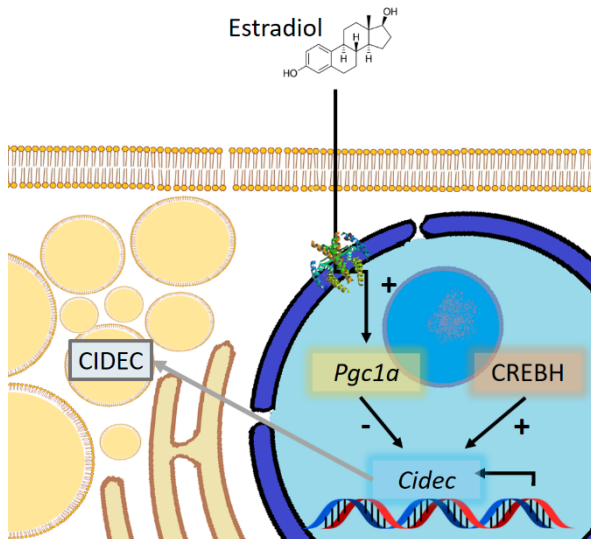


Figura 14. Posible mecanismo de regulación de la expresión de *Cidec* durante la esteatosis en hembras

Un resultado sorprendente observado en este trabajo fue la disminución de la expresión hepática *Cidec/Fsp27* en ratones hembras consumiendo HFD tanto en ratones deficientes en *Apoe* y en ratones deficientes en *Ldlr*. Un efecto que desapareció tras la ovariectomía tanto en ratones deficientes de *Apoe* como en ratas Wistar. Interesantemente, las hembras de ratones carentes del coactivador 2

del receptor de esteroides muestran un aumento en la expresión hepática de este gen (Tabla S4, manuscrito 1). El coactivador 2 del receptor de esteroides promueve la activación transcripcional del receptor de estrógenos en algunos tejidos (507). Esos resultados indican una regulación negativa de la influencia de las hormonas femeninas. Esto podría estar siendo realizado mediante una asociación inversa significativa observada entre *Pgc1a* y *Cidec/Fsp27*, la unión de PGC1a a este gen, ya descrita en ENCODE (496), y la supresión de este efecto mediante ovariectomía. El experimento realizado en ratones deficientes de *Pgc1a* está acorde con este rol de *Pgc1a* en el dimorfismo sexual en la respuesta a la esteatosis hepática *in vivo*.

En conclusión, este trabajo evidencia dos ejes de regulación de la expresión hepática de *Cidec/Fsp27* definidos por la dieta y el sexo. Respecto a la primera, el colesterol y la naturaleza de los ácidos grasos son un componente clave. Y respecto al sexo, el hecho de que la disminución en la hembra de la expresión de este gen en el hígado no se observó en las hembras ovariectomizadas sugiere de manera clara que las hormonas ováricas están relacionadas con el control de la expresión hepática de *Cidec/Fsp27* y que esto está modulado por *Pgc1a*.

VII. 2. Transcriptomic and proteomic analyses identify potential biomarkers of hepatic steatosis in a cross-bred porcine model

El modelo de ratón ofrece grandes posibilidades dado la gran cantidad de información que ya tenemos sobre él y la diversidad genética, tanto mediante la generación de transgénicos como la variedad de cepas que existen. Pero presenta una serie de limitaciones, la cantidad de muestra es reducida y el salto de especie entre ratón y humano se puede acortar. Por ello nos planteamos producir un modelo de esteatosis hepática inducido dietéticamente en un animal más cercano al hombre, como es el cerdo. Varios trabajos ya han sido publicados anteriormente en este aspecto, la mayoría de ellos utilizando razas genéticamente predisuestas y/o largos periodos experimentales.

A través de este segundo trabajo hemos mostrado un modelo experimental de NAFLD mediante alteración de la dieta en un corto periodo de tiempo en cerdos pertenecientes al cruce de razas comercial. La manipulación dietética llevada a cabo involucra una combinación de grasa altamente saturada y colesterol, colato y un contenido bajo en colina y metionina. Esta dieta fue capaz de desarrollar un modelo reproducible de esteatosis hepática en dos meses. Nuestra caracterización bioquímica ha mostrado que este modelo muestra hipercolesterolemia, un nivel bajo de inflamación, ausencia de resistencia a la insulina y una leptinemia variable (Figure 2 y Tabla S2, manuscrito 2). La acumulación de lípidos hepática regresó cuando se eliminó la dieta esteatósica por un mes, no así la extensión de la fibrosis (Figura 2 y 5, manuscrito 2). Mediante el uso de RNAseq para interrogar el transcriptoma hepático, diversos cambios en la expresión génica se identificaron y fueron confirmados mediante qPCR (*APC5*, *CYP51*, *FDPS*, *ISG15*, *LGALS3*, *PAQR7*, *SMPDL3*, *SPP1*, *SRGN*, y un *RNA desconocido*). La mayoría de los genes mantenían su patrón de expresión en ambos experimentos (Figura 6, manuscrito 2). Finalmente, verificamos la expresión de la proteína hepática durante la esteatosis de dos genes cuyas proteínas podían ser secretadas al torrente circulatorio (*ISG15*, *LGALS3*), mediante tres métodos diferentes (Figura 7 del manuscrito 2) y fuimos capaces de detectar su presencia en el plasma de los cerdos (Figura 8, manuscrito 2) el cual podría tener una regulación muy compleja requiriendo la interacción de diversos tejidos.

La disponibilidad de modelos de NAFLD en cortos periodos de tiempo en grandes animales puede ser de particular interés para explorar nuevos tratamientos para esta patología y caracterizar mejor este tipo de hígados para los procedimientos de trasplante. Además, el uso de animales procedente del cruce de razas refleja la diversidad genética que concurre en cualquier experimento realizado en poblaciones humanas donde cada sujeto tiene un genoma único surgido de la combinación de dos opciones diferentes para miles de genes lo que lleva a respuestas muy variables a los tratamientos (508). El hecho de que esos niveles de expresión genética fueran tan evidentes incluso con un fondo genético tan variable refuerza el rol clave de los genes detectados en la esteatosis temprana.

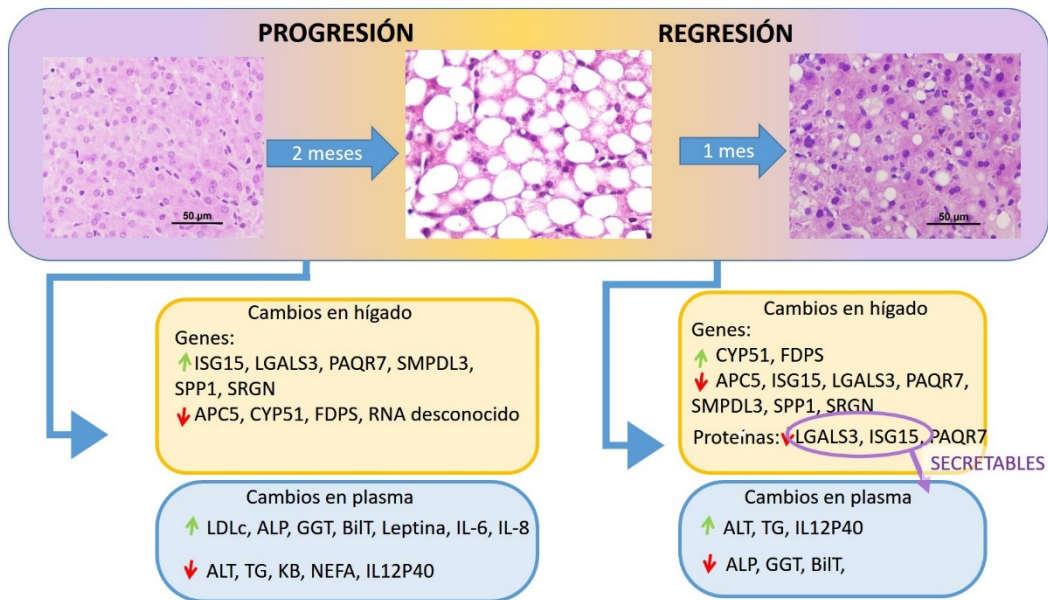


Figura 15. Resumen de los cambios observados tras la progresión y regresión de la esteatosis hepática en un modelo de esteatosis con cerdos procedentes del cruce comercial.

Los niveles plasmáticos de triglicéridos (TG), cuerpos cetónicos (KB) y ácidos grasos no esterificados (NEFA) estaban significativamente disminuidos con la esteatosis (Tabla S2, manuscrito 2), lo que podría ser debido a una movilización deficiente de la grasa almacenada, a una disminución del uso de grasa como fuente de energía y a un impedimento de los TG para ser cargados en las VLDL debido a la deficiencia de metionina en la dieta. Sin embargo, la hipercolesterolemia, en particular debido a las LDL (Figura S1, manuscrito 2), estaba presente con la intervención dietética, al igual que un aumento en la

bilirrubina total, y las enzimas hepáticas ALP y GGT. Esos aumentos podrían indicar un bloqueo de la secreción de bilis y una mayor disponibilidad de colesterol para acumularse en el hígado y para ser secretado como VLDL.

El aumento de 10 veces observado en la leptinemia en el experimento de la progresión no fue observado en el experimento de la regresión. En relación a este fenómeno, varios aspectos se deberían de tener en cuenta. Primero el segundo experimento fue cuidadosamente diseñado mediante inseminación artificial con un único progenitor para disminuir la variabilidad genética, así pues, un efecto fundador no puede descartarse. En segundo lugar, en el segundo experimento el grupo esteatósico muestra un pico temprano en el perfil de colesterol del FPLC compatible con la presencia de VLDL o quilomicrones remanentes (Figura S1, manuscrito 2). Actualmente se conoce que los ácidos grasos inhiben la secreción adipocitaria de leptina (509) y este efecto podría estar sucediendo debido a las VLDL. Además, en nuestros diseños experimentales, los niveles séricos de IL12P40 mostraron una asombrosa asociación con la esteatosis, no habiéndose observado esto previamente ni en humanos (510) ni en ratones (511). Este fenómeno debería de ser abordado en futuras investigaciones para discernir si la asociación entre esta proteína antiinflamatoria y NAFLD se mantiene entre las especies.

Respecto a la expresión génica hepática, la ausencia de correlación entre el RNAseq y los resultados de la qPCR fue un resultado imprevisto (Figure 4B y Tabla S4, manuscrito 2). Sin embargo, cabe recordar que el genoma y el transcriptoma hepático porcino no están tan bien descritos como los transcriptomas murino y humano. Además, la ausencia de un fondo genómico uniforme debido al uso de animales procedentes del cruce de razas podría haber interferido con la respuesta del transcriptoma y el análisis por RNAseq posterior (508). La mayoría de los genes verificados mantuvieron su patrón de expresión tanto en la progresión como en la regresión de la esteatosis reflejando que un mes tras dos meses de dieta esteatósica son suficientes para revertir el proceso. Esta afirmación estaría de acuerdo con los resultados del análisis histológico.

La expresión del gen *LGALS3* aumento con la esteatosis hepática en ambos experimentos (Figura 4 y 6, manuscrito 2) así como su proteína (Figura

7, manuscrito 2) Pero su presencia sérica solo aumento con la esteatosis en el modelo de la progresión esteatótica (Figura 8, manuscrito 2). Este hecho, junto con su alta correlación con la leptinemia en ambos experimentos revela una regulación complicada para su presencia sérica (Figura 8 y tabla S7, manuscrito 2). Dos posibilidades podrían explicar este efecto: primero, puede que su presencia sérica sea debida a la secreción por otros tejidos (512), la segunda posibilidad implica un efecto de la leptina sobre la secreción de LGALS3 hepática. La leptina es capaz de regular el metabolismo hepático en un modo dependiente de la insulinemia (513). Este hecho, conjuntamente con la ausencia de hiperleptinemia en la condición esteatótica del segundo experimento podría implicar un rol regulatorio para la leptina en la secreción hepática de LGALS3, en la cual niveles bajos de leptinemia llevarían a la ausencia de secreción hepática de LGALS3.

LGALS3 ya ha sido relacionada a enfermedades cardiometabólicas (514) y a la esteatosis hepática (515). Se ha observado que la ausencia del gen codificante para LGALS3 provoca tanto esteatosis (516) como resistencia a la esteatosis (517) en ratones. Los últimos trabajos apuntan a una función

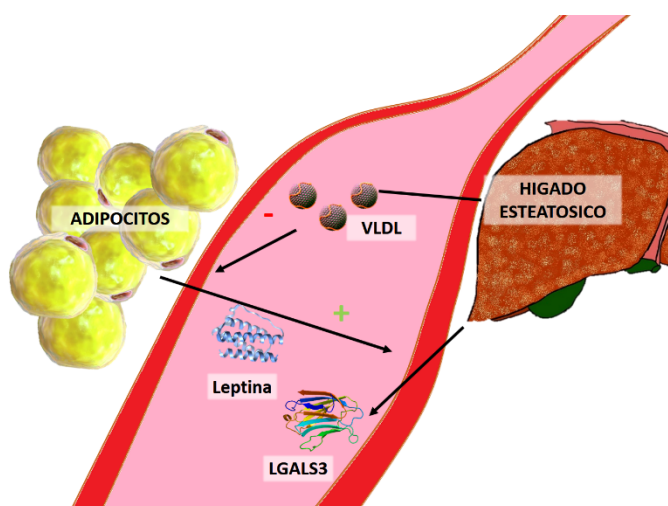


Figura 16. Posible mecanismo regulatorio de la secreción de LGALS3 al torrente circulatorio.

para LGALS3 en la promoción de la fibrosis y la inflamación en modelos de ratón (515, 518). La segunda proteína caracterizada, ISG15, ya ha sido relacionada previamente a la hepatitis por infección viral (519, 520) pero su relación con la esteatosis hepática aún no había sido descrita. De acuerdo a la base de datos GEO, existen varios trabajos en los que la expresión hepática de LGALS3 se ha relacionado con intervenciones dietéticas. Sin embargo, esta relación es mucho más débil para ISG15, quien podría tener un comportamiento mucho más complicado (Tabla S5 y Tabla S6, manuscrito 2). Mas experimentación hará falta

para discernir la relación entre leptinemia y la secreción de LGALS3 y las implicaciones de LGALS3 e ISG15 en esteatosis.

VII. 3 Short-term squalene supplementation decreases triglycerides accumulation in a new swine steatosis model

El estudio PREDIMED dejó patente que la adherencia a una dieta mediterránea es beneficioso para la salud al prevenir frente a enfermedades asociadas a las pautas alimenticias como enfermedades cardiovasculares y esteatosis (410). Teniendo esto en cuenta y una vez establecido el modelo porcino para el estudio de la esteatosis hepática nos planteamos estudiar la influencia del principal triterpeno del aceite de oliva el escualeno, en la progresión de la esteatosis.

El escualeno ya se ha explorado en ocasiones anteriores demostrándose como un potente antioxidante y antiinflamatorio tanto in vivo como in vitro (413). También se ha explorado ya su efecto en la esteatosis en los modelos conejo y murino donde ha logrado disminuir la gota lipídica(7, 484). Sin embargo, este enfoque aún estaba por explorar en un modelo más cercano al hombre como es el porcino.

A través de este tercer trabajo se ha explorado este nutrifármaco y se ha observado que una suplementación en la dieta del 0,5% ha sido capaz de cambiar el metabolismo hepático de la esteatosis, disminuyendo la proliferación de gotas lipídicas y de triglicéridos, y sin modificar la acumulación de colesterol, ni la infiltración fibrosa (Figura 2, manuscrito 3). La repercusión de este efecto se ha estudiado a dos niveles. Por un lado, se exploró la expresión genética hepática de 40 genes y solo se detectó cambios en la expresión de *PLIN2* y de un RNA desconocido (Tabla S3, manuscrito 3). Por otro lado, la composición de los lípidos hepáticos fue interrogada mediante LC-MS, conformando la disminución de triglicéridos y revelando un aumento de ceramidas y de PC, y una disminución de cardiolipinas (Figura 3 y Tabla S4, manuscrito 3). Dado que los cambios en la homeostasis hepática se suelen reflejar en los parámetros bioquímicos plasmáticos este se exploró y se detectó aumento en GGT y IL12P40 y una disminución en IL-1b (Tabla S5 del manuscrito 3). Además, también se estudió el lipidoma plasmático. Como consecuencia de esto mismo

se observó un aumento en las ceramidas totales tras el tratamiento con escualeno (Figura 5 y Tabla S6 del manuscrito 3) y 12 especies lipídicas que conservaron la dirección e intensidad de su cambio tanto en hígado como en plasma. Entre estas 12 especies lipídicas, Cer_36:2 y Cer_42:1 guardaban correlación con la mayoría de esos 12 parámetros en el hígado, mientras que TG_46:1 tenía el mayor impacto con esos 12 parámetros plasmáticos de acuerdo a sus correlaciones (Figura 7, manuscrito 3).

Como ya se ha comentado antes, el escualeno ya se ha demostrado capaz de reducir la cantidad de triglicéridos tanto en ratón como en conejo y con el presente trabajo este efecto se extiende a la especie porcina. Aparentemente en ratón y conejo este efecto reside en una serie de genes que varían su expresión (6, 421, 484), y esta respuesta parece no estar conservada en este experimento. Dos razones podrían explicar este hecho, por un lado, algún tipo de mecanismo específico de especie conservado entre ratón y conejo, pero no en cerdo. O, por otro lado, podría ser que para activar este efecto hiciesen falta tiempos mayores ya que en conejo y ratón los experimentos tomaron entre 8 y 11 semanas, mientras que la suplementación de escualeno en los cerdos de este trabajo ha sido únicamente de un mes (Figura 1, manuscrito 3). En cualquier caso, como resultado de los análisis de transcripción, se observa un aumento en *PLIN2* y una disminución en el *RNA desconocido* (Tabla S3, manuscrito 3). *PLIN2* es un miembro de las perilipinas, cuya proteína está relacionada en la formación, estabilidad y señalización de LD y de acuerdo a los resultados observados en ratones carentes de *PLIN2* específicamente en hígado, *PLIN2* estaría promocionando la progresión del NAFLD (521). Sin embargo, hay que recordar que *PLIN1*, el miembro mejor caracterizado de la familia de las perilipinas, tiene como principal forma de regulación la fosforilación (522). Este mecanismo de regulación podría ser importante en el funcionamiento de *PLIN2* debido a la presencia de 64 aminoácidos en su secuencia que podrían ser fosforilados (Figura S1, manuscrito 3). Se sabe que el efecto de *PLIN2* es a través de una inhibición de la autofagia en la que no implica a las lipasas neutras (523). Consecuentemente, podría ser que el escualeno esté modulando la manera en la que el hepatocito consume los TG llevando a un mecanismo independiente de la autofagia y que involucre a lipasas neutras. Respecto al RNA

desconocido, que de acuerdo a la base de datos ensembl podría codificar para la proteína ZBTB16, la única información previa es que disminuye su transcripción con la esteatosis hepática y tiende a continuar disminuyéndola al regresar a un estado no esteatósico (manuscrito 2 de la presente tesis). Parece ser que el escualeno emula este efecto.

Mientras que no se han observado grandes cambios en los análisis de los transcritos, el análisis del lipidoma se mostró más fructífero (Tabla S4 del manuscrito 3). La disminución de TG ha sido consistente con los ensayos colorimétricos. Además, también hemos sido capaces de detectar un aumento en ceramidas y de PC y una disminución de CL con la suplementación de escualeno respecto al control esteatósico (Figura 3 del manuscrito 3). De acuerdo a la literatura, el aumento de ceramidas es un efecto patológico de la esteatosis hepática (524), a pesar de que recientemente Turner et al hayan mostrado que la inhibición de la síntesis de ceramidas no protege frente a la resistencia a la insulina (525). Probablemente la clave a la homeostasis de las ceramidas es que esta haya de valorarse conjuntamente con la S1P, ya que es una molecular con la que se puede intercambiar rápidamente, que tiene efectos opuestos a las ceramidas y cuya influencia en la esteatosis hepática está pobremente caracterizada (59). Asimismo, en este trabajo hemos observado que la cantidad de ceramidas en los hígados en regresión a un estado no esteatósico es mayor que la del esteatósico, y el escualeno está convergiendo a este estado. En futuros trabajos relativos a las ceramidas hepáticas, habrá que considerar el papel del reóstato de esfingolipidos en la esteatosis hepática o si la localización de las ceramidas es relevante para sus efectos al igual que para la S1P lo es. Respecto al aumento en PC, realmente lo que se observa es que el escualeno está impidiendo que disminuya como ocurre en el grupo control, y esto podría colaborar en el retraso de la progresión a esteatohepatitis (59, 77). En cuanto a la disminución de cardiolipinas, previamente se ha descrito en análisis de lipidómica que la esteatosis lleva a un aumento de CL(526) e incluso mediante un experimento intervencional se ha observado que el impedimento de su biosíntesis previene de la esteatosis hepática con una mejora en el flujo de electrones entre los complejos de respiración mitocondriales (527) y nuestros resultados tras la suplementación con escualeno apuntan a esta dirección. Este

experimento no es el primer indicio de la capacidad del escualeno para modificar el metabolismo mitocondrial, en 2012 Ramírez-Torres et al mostraron una compleja regulación de la actividad mitocondrial mediante suplementación con escualeno (6, 421). Los cambios observados en el lipidoma hepático muestran nuevas posibilidades para el escualeno independientemente de las modificaciones en la expresión génica.

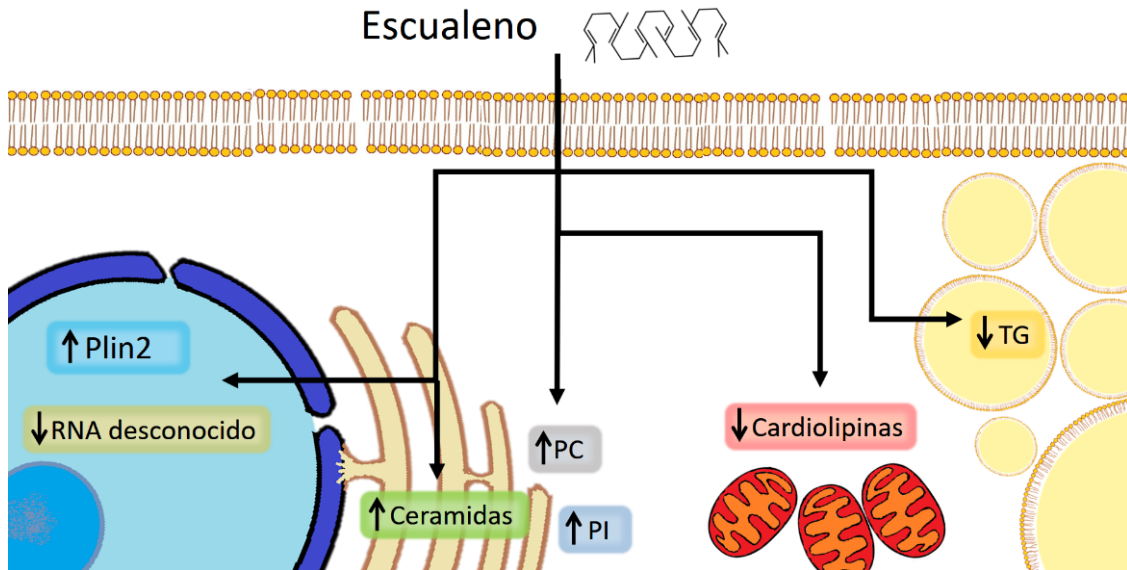


Figura 17. Efectos de la administración de escualeno a corto plazo en el lipidoma hepático de cerdos esteatóticos.

Los resultados del plasma (Tabla S5, manuscrito 3) muestran un aumento en IL12P40 en el grupo escualeno. IL12P40 es un antagonista de la proteína proinflamatorio IL12 (528). Consecuentemente, este efecto refuerza el rol antiinflamatorio del escualeno. En cualquier caso, hay que tener en cuenta que IL12P40 es una subunidad de IL12, y análisis detallados para discernir si el aumento es solo en la subunidad o en IL12 deberían de llevarse a cabo.

Respecto a los resultados de lipidómica del plasma, la tendencia a disminuir los triglicéridos observada en el hígado, se mantienen en el plasma, especialmente en los triglicéridos de cadena corta (Figura 5 y tabla S6, manuscrito 3). En cambio, se observa un inesperado aumento de ceramidas en el suero en el grupo suplementado con escualeno aparentemente patológico ya que las muestras procedentes de animales no esteatóticos tienen concentraciones bajas de ceramidas. En este aspecto, un trabajo previo muestra también un aumento en las ceramidas tras una suplementación dietética con

fitosteroles (529), esto apunta a la idea de que podría haber diversas maneras para recuperarse de una esteatosis y no simplemente una mera disminución equitativa de todas las clases lipídicas del mismo modo que hay varios mecanismos descritos para su desarrollo (450). Puede que la respuesta a esta incongruencia resida en las lipoproteínas. En este aspecto, un trabajo basado en el modelo porcino donde se efectuó un estudio lipídico sobre la influencia de una dieta hipercolesterolemica en las HDL reveló una disminución en su contenido de PC (530).

Este no es el único trabajo que ya se ha realizado sobre lipídica en cerdos, ya que existe otro de lipídica sobre esteatosis en cerdos. En este trabajo alimentaron a hembras de la raza Ossabaw (predispuesta a esteatosis de manera natural) a dieta esteatósica (n=5) o a dieta basal (n=5) durante 16 semanas. Tras ello, observaron pocos cambios en la bioquímica plasmática pero varias modificaciones en el lipídico hepático y plasmático, como una disminución en PC en el grupo esteatósico. Sin embargo, no describieron cambios ni en las ceramidas ni en las cardiolipinas (451).

Respecto a las doce especies lipídicas conservaron sus cambios significativos entre hígado y plasma (Figure 7, manuscrito 3). Es sorprendente que presencia plasmática no correlaciona principalmente con sus semejantes hepáticos, siendo más importante sus correlaciones con otros lípidos hepáticos. Este hecho indica la existencia de un rol para el escualeno en la modulación de la secreción lipídica del hígado, en la que sus lípidos dianas siguen unas conversiones metabólicas en su secreción. Este fenómeno es altamente interesante y los mecanismos por los que el escualeno estimula esta secreción lipídica durante la esteatosis hepática deberían de ser explorados.

VIII. Conclusiones

De los resultados anteriormente expuestos pueden deducirse las siguientes conclusiones generales:

1. La expresión del gen *Cidec* hepático como respuesta a la dieta es altamente compleja variando en función de la composición lipídica de la misma. Dicha expresión está estimulada por el colesterol cuando se administra como único aditivo en la dieta y suprimida cuando se añade tanto colesterol como aceite de palma como fuente grasa en la dieta. Por otro lado, la adición de escualeno o oleanólico no varió su expresión en las condiciones exploradas, quedando por conocer si dicha adición en una dieta enriquecida con colesterol sería capaz de suprimir la expresión de *Cidec*.
2. Los mecanismos por los cuales se regula el metabolismo de la gota lipídica difieren entre sexos y parece ser que la supresión de la expresión de *Cidec* a través del efecto del estradiol sobre *Pgc1a* justifica parte de estas diferencias ya que tanto las diferencias entre hembras y machos en la expresión de *Cidec* y en el porcentaje de gotas lipídicas desaparecen tanto con la castración de las hembras como con la inactivación del gen *Pgc1a*.
3. Los cerdos de razas comerciales pueden reproducir una esteatosis hepática en solamente 2 meses mediante suplementación dietética y pueden ser utilizados como modelo de esteatosis para caracterizar dicha patología en un estadio temprano previo a la inflamación sistémica, a la resistencia a la insulina y al desarrollo de fibrosis en los hígados de grandes mamíferos. Proponemos ALT, ALP, GGT, bilirrubina total, colesterol y cLDL como los mejores parámetros plasmáticos para estudiar la esteatosis entre los parámetros estudiados.
4. Los análisis de secuenciación masiva aún son una técnica a optimizar requiriendo una verificación posterior con técnicas consolidadas especialmente cuando se trabaja con especies poco frecuentes y/o con animales con niveles altos de heterosis.

5. El uso del modelo de esteatosis hepática en cerdos de razas comerciales ha revelado que la expresión de *LGALS3*, *ISG15*, *SMPDL3A*, *CYP51* y *FDPS* podría interpretar un papel importante y desconocido en la esteatosis hepática temprana, pudiendo *LGALS3* interpretar un rol clave en la interacción del hígado con el resto del cuerpo cuya secreción al torrente circulatorio parece depender de la leptinemia.
6. La suplementación con escualeno ha demostrado ser capaz de reducir la esteatosis hepática tanto a largo como a corto plazo en diversos modelos animales. Los mecanismos por los cuales logra este efecto pueden implicar regulaciones a nivel postranscripcional a corto plazo mientras que sus beneficios a largo plazo implican cambios a nivel transcripcional. Los cambios a corto plazo en el metabolismo lipídico que implica la suplementación con escualeno no reproducen exactamente el efecto de un cambio a una dieta control dando pie a entender que utiliza vías distintas para lograr la reversión de la esteatosis hepática.
7. Los análisis de lipidómica del plasma reflejan ser un parámetro más sensible al metabolismo lipídico hepático que los parámetros clínicos bioquímicos clásicos. Sin embargo, aún no hay consenso sobre el uso de dicha información para establecer biomarcadores sensibles y específicos de esteatosis hepática.
8. El comportamiento de la proteína sérica IL12P40 y de la expresión hepática del *RNA desconocido* que varían su expresión tanto con la esteatosis hepática como con la suplementación con escualeno dan pie a pensar que ambos están relacionados con las capacidades hepatoprotectoras del segundo pudiendo interpretar pasos claves en su farmacodinamia. En el futuro habrá que caracterizar dicho RNA desconocido y prestar más atención al comportamiento de ambos y su implicación con la esteatosis hepática.

VIII. Conclusions

From the previous results, the following general conclusions can be drawn:

1. The expression of the hepatic gene *Cidec* as a response to the diet is highly complex, depending on its lipid composition. This expression is stimulated by cholesterol when administered as the only additive in the diet and suppressed when both cholesterol and palm oil are added as a source of dietary fat. On the other hand, the addition of squalene or oleanolic did not change its expression under the conditions explored, it remains to be known whether said addition in a diet enriched with cholesterol is capable of suppressing *Cidec* expression.
2. The mechanisms of lipid droplets metabolism regulation differ between sexes and it seems that the suppression of *Cidec* expression through the effect of estradiol on *Pgc1a* justifies part of these differences since the differences between females and males both in the expression of *Cidec* and in the percentage of lipid droplets disappear with either the castration of the females or the inactivation of the *Pgc1a* gene.
3. Commercial breed swine can reproduce hepatic steatosis in only 2 months by dietary supplementation and can be used as a steatosis model to characterize this pathology at an early stage prior to systemic inflammation, insulin resistance and development of fibrosis in the livers of large mammals. We propose ALT, ALP, GGT, total bilirubin, cholesterol and LDLc as the best plasma parameters to study steatosis among the studied parameters.
4. High throughput sequencing analysis is still a technique to optimize requiring further verification with consolidated techniques especially when working with rare species and/or with animals with high levels of heterosis.
5. The use of commercial cross breed swine for a fast development steatosis has revealed that the expression of *LGALS3*, *ISG15*, *SMPDL3A*, *CYP51* and *FDPS* could play an important and unknown role in early hepatic steatosis, being *LGALS3* able to play a key role in liver's interactions with the rest of the body and whose secretion into the bloodstream seems to depend on leptinemia.

6. Long and short term squalene supplementation has been shown to be able to reduce liver steatosis in various animal models. The mechanisms behind this effect may involve post-transcriptional regulations at short-term while his long-term benefits may involve changes at the transcriptional level. The short-term squalene supplementation changes in lipid metabolism do not exactly reproduce the effect of a change to a control diet, giving the impression that it uses different ways to achieve the reversal of hepatic steatosis.
7. Plasma lipidomic analyses reflect a more sensitive parameter to hepatic lipid metabolism than classical biochemical clinical parameters. However, there is still no consensus on the use of such information to establish sensitive and specific biomarkers of hepatic steatosis.
8. The behaviour of IL12P40 serum protein and the hepatic expression of the *unknown RNA* that modified its expression with both hepatic steatosis intervention and with the squalene supplementation suggest that both are related to the squalene hepatoprotective abilities and can interpret important steps in its pharmacodynamics. In the future it will be necessary to characterize said *unknown RNA* and pay more attention to the behaviour of both and its implication with hepatic steatosis.

IX. Bibliografía

1. Charlton MR, Burns JM, Pedersen RA, Watt KD, Heimbach JK, Dierkhising RA. Frequency and outcomes of liver transplantation for nonalcoholic steatohepatitis in the United States. *Gastroenterology* 2011;141:1249-1253.
2. Younossi ZM, Koenig AB, Abdelatif D, Fazel Y, Henry L, Wymer M. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease-Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology* 2016;64:73-84.
3. Oh H, Jun DW, Saeed WK, Nguyen MH. Non-alcoholic fatty liver diseases: update on the challenge of diagnosis and treatment. *Clin Mol Hepatol* 2016;22:327-335.
4. Hardy T, Oakley F, Anstee QM, Day CP. Nonalcoholic fatty liver disease: Pathogenesis and disease spectrum. *Annu Rev Pathol* 2016;11:451-496.
5. Bendixen E, Danielsen M, Larsen K, Bendixen C. Advances in porcine genomics and proteomics--a toolbox for developing the pig as a model organism for molecular biomedical research. *Brief Funct Genomics* 2010;9:208-219.
6. Ramirez-Torres A, Barcelo-Batllori S, Martinez-Beamonte R, Navarro MA, Surra JC, Arnal C, Guillen N, et al. Proteomics and gene expression analyses of squalene-supplemented mice identify microsomal thioredoxin domain-containing protein 5 changes associated with hepatic steatosis. *J Proteomics* 2012;77:27-39.
7. Martinez-Beamonte R, Alda O, Sanclemente T, Felices MJ, Escusol S, Arnal C, Herrera-Marcos LV, et al. Hepatic subcellular distribution of squalene changes according to the experimental setting. *J Physiol Biochem* 2018;74:531-538.
8. Evans HM. "The liver in antiquity and the beginnings of anatomy," by Prof. Morris Jastrow. *University of Pennsylvania Medical Bulletin*, Vol. XX, No. 11, January, 1908. "An omen school text;" *Old testament and semitic studies in memory of William Rainey Harper*, vol. II, Chicago, 1908. *Anat. Rec. The Anatomical Record* 1908;2:123-127.
9. Tortora GJ, Derrickson B, Tzal K, Gutiérrez MadlAn, Klajn D. *Principios de anatomía y fisiología*. México: Editorial Médica Panamericana, 2013.
10. Ross MH, Pawlina W. *Histología : texto y atlas color con biología celular y molecular : 6a edición*. Buenos Aires: Médica Panamericana, 2013.
11. Fujita T, Narumiya S. Roles of hepatic stellate cells in liver inflammation: a new perspective. *Inflamm Regen* 2016;36:1.
12. Hall JE, Guyton AC, Gasull Casanova X, Elsevier E. *Guyton y Hall tratado de fisiología médica*, 2016.
13. Junqueira LCU, Carneiro J, González M, Mezzano G, Abrahamsohn PA, Tenório Zorn TM, Fagundes dos Santo M, et al. *Histología básica : texto y atlas*. Mexico, D.F.: Médica Panamericana, 2016.
14. Stryer L, Tymoczko JL, Berg JM, Gatto GJ. *Bioquímica con aplicaciones clínicas*. Barcelona: Reverté, 2013.
15. RAE. . In <https://dle.rae.es/?id=KNFAtBx>; 2018. Access Date: 19 April 2019
16. Lopez A. La curiosa procedencia de la palabra 'hígado'. In <https://blogs.20minutos.es/yaestaellistoquetodosabe/la-curiosa-procedencia-de-la-palabra-higado/>; 2014. Access Date: 19 April 2019
17. Caballeria L, Pera G, Auladell MA, Toran P, Munoz L, Miranda D, Aluma A, et al. Prevalence and factors associated with the presence of nonalcoholic fatty liver disease in an adult population in Spain. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2010;22:24-32.
18. Obika M, Noguchi H. Diagnosis and evaluation of nonalcoholic fatty liver disease. *Exp Diabetes Res* 2012;2012:145754.
19. Wieckowska A, Feldstein AE. Diagnosis of nonalcoholic fatty liver disease: invasive versus noninvasive. *Semin Liver Dis* 2008;28:386-395.

20. Cusi K, Chang Z, Harrison S, Lomonaco R, Bril F, Orsak B, Ortiz-Lopez C, et al. Limited value of plasma cytokeratin-18 as a biomarker for NASH and fibrosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol* 2014;60:167-174.
21. Ratziu V, Charlotte F, Heurtier A, Gombert S, Giral P, Bruckert E, Grimaldi A, et al. Sampling variability of liver biopsy in nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 2005;128:1898-1906.
22. Bonekamp S, Tang A, Mashhood A, Wolfson T, Changchien C, Middleton MS, Clark L, et al. Spatial distribution of MRI-Determined hepatic proton density fat fraction in adults with nonalcoholic fatty liver disease. *J Magn Reson Imaging* 2014;39:1525-1532.
23. Ipsen DH, Lykkesfeldt J, Tveden-Nyborg P. Molecular mechanisms of hepatic lipid accumulation in non-alcoholic fatty liver disease. *Cell Mol Life Sci* 2018;75:3313-3327.
24. Feldstein AE, Canbay A, Guicciardi ME, Higuchi H, Bronk SF, Gores GJ. Diet associated hepatic steatosis sensitizes to Fas mediated liver injury in mice. *J Hepatol* 2003;39:978-983.
25. Bechmann LP, Gieseler RK, Sowa JP, Kahraman A, Erhard J, Wedemeyer I, Emons B, et al. Apoptosis is associated with CD36/fatty acid translocase upregulation in non-alcoholic steatohepatitis. *Liver Int* 2010;30:850-859.
26. Donnelly KL, Smith CI, Schwarzenberg SJ, Jessurun J, Boldt MD, Parks EJ. Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Invest* 2005;115:1343-1351.
27. Bechmann LP, Hannivoort RA, Gerken G, Hotamisligil GS, Trauner M, Canbay A. The interaction of hepatic lipid and glucose metabolism in liver diseases. *J Hepatol* 2012;56:952-964.
28. Mashek DG. Hepatic fatty acid trafficking: multiple forks in the road. *Adv Nutr* 2013;4:697-710.
29. Doege H, Baillie RA, Ortegon AM, Tsang B, Wu Q, Punreddy S, Hirsch D, et al. Targeted deletion of FATP5 reveals multiple functions in liver metabolism: alterations in hepatic lipid homeostasis. *Gastroenterology* 2006;130:1245-1258.
30. Doege H, Grimm D, Falcon A, Tsang B, Storm TA, Xu H, Ortegon AM, et al. Silencing of hepatic fatty acid transporter protein 5 in vivo reverses diet-induced non-alcoholic fatty liver disease and improves hyperglycemia. *J Biol Chem* 2008;283:22186-22192.
31. Stremmel W, Staffer S, Wannhoff A, Pathil A, Chamulitrat W. Plasma membrane phospholipase A2 controls hepatocellular fatty acid uptake and is responsive to pharmacological modulation: implications for nonalcoholic steatohepatitis. *FASEB J* 2014;28:3159-3170.
32. Ge F, Zhou S, Hu C, Lobdell Ht, Berk PD. Insulin- and leptin-regulated fatty acid uptake plays a key causal role in hepatic steatosis in mice with intact leptin signaling but not in ob/ob or db/db mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2010;299:G855-866.
33. Wierzbicki M, Chabowski A, Zendzian-Piotrowska M, Gorski J. Differential effects of in vivo PPAR alpha and gamma activation on fatty acid transport proteins expression and lipid content in rat liver. *J Physiol Pharmacol* 2009;60:99-106.
34. Bieghs V, Wouters K, van Gorp PJ, Gijbels MJ, de Winther MP, Binder CJ, Lutjohann D, et al. Role of scavenger receptor A and CD36 in diet-induced nonalcoholic steatohepatitis in hyperlipidemic mice. *Gastroenterology* 2010;138:2477-2486, 2486 e2471-2473.
35. Berk PD, Zhou S, Bradbury MW. Increased hepatocellular uptake of long chain fatty acids occurs by different mechanisms in fatty livers due to obesity or excess ethanol use, contributing to development of steatohepatitis in both settings. *Trans Am Clin Climatol Assoc* 2005;116:335-344; discussion 345.
36. Wang G, Bonkovsky HL, de Lemos A, Burczynski FJ. Recent insights into the biological functions of liver fatty acid binding protein 1. *J Lipid Res* 2015;56:2238-2247.
37. Wolfrum C, Borrmann CM, Borchers T, Spener F. Fatty acids and hypolipidemic drugs regulate peroxisome proliferator-activated receptors alpha - and gamma-mediated gene

- expression via liver fatty acid binding protein: a signaling path to the nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:2323-2328.
38. Silverstein RL, Febbraio M. CD36, a scavenger receptor involved in immunity, metabolism, angiogenesis, and behavior. *Sci Signal* 2009;2:re3.
 39. Koonen DP, Jacobs RL, Febbraio M, Young ME, Soltys CL, Ong H, Vance DE, et al. Increased hepatic CD36 expression contributes to dyslipidemia associated with diet-induced obesity. *Diabetes* 2007;56:2863-2871.
 40. Wilson CG, Tran JL, Erion DM, Vera NB, Febbraio M, Weiss EJ. Hepatocyte-specific disruption of cd36 attenuates fatty liver and improves insulin sensitivity in HFD-fed mice. *Endocrinology* 2016;157:570-585.
 41. Miquilena-Colina ME, Lima-Cabello E, Sanchez-Campos S, Garcia-Mediavilla MV, Fernandez-Bermejo M, Lozano-Rodriguez T, Vargas-Castrillon J, et al. Hepatic fatty acid translocase CD36 upregulation is associated with insulin resistance, hyperinsulinaemia and increased steatosis in non-alcoholic steatohepatitis and chronic hepatitis C. *Gut* 2011;60:1394-1402.
 42. Koo SH. Nonalcoholic fatty liver disease: molecular mechanisms for the hepatic steatosis. *Clin Mol Hepatol* 2013;19:210-215.
 43. Han MS, Park SY, Shinzawa K, Kim S, Chung KW, Lee JH, Kwon CH, et al. Lysophosphatidylcholine as a death effector in the lipoapoptosis of hepatocytes. *J Lipid Res* 2008;49:84-97.
 44. Fessler MB, Rudel LL, Brown JM. Toll-like receptor signaling links dietary fatty acids to the metabolic syndrome. *Curr Opin Lipidol* 2009;20:379-385.
 45. Feldstein AE, Werneburg NW, Canbay A, Guicciardi ME, Bronk SF, Rydzewski R, Burgart LJ, et al. Free fatty acids promote hepatic lipotoxicity by stimulating TNF-alpha expression via a lysosomal pathway. *Hepatology* 2004;40:185-194.
 46. Feldstein AE, Canbay A, Angulo P, Taniai M, Burgart LJ, Lindor KD, Gores GJ. Hepatocyte apoptosis and fas expression are prominent features of human nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology* 2003;125:437-443.
 47. Feldstein AE, Wieckowska A, Lopez AR, Liu YC, Zein NN, McCullough AJ. Cytokeratin-18 fragment levels as noninvasive biomarkers for nonalcoholic steatohepatitis: a multicenter validation study. *Hepatology* 2009;50:1072-1078.
 48. Nolan CJ, Larter CZ. Lipotoxicity: why do saturated fatty acids cause and monounsaturates protect against it? *J Gastroenterol Hepatol* 2009;24:703-706.
 49. Erbay E, Babaev VR, Mayers JR, Makowski L, Charles KN, Snitow ME, Fazio S, et al. Reducing endoplasmic reticulum stress through a macrophage lipid chaperone alleviates atherosclerosis. *Nat Med* 2009;15:1383-1391.
 50. Crespo J, Cayon A, Fernandez-Gil P, Hernandez-Guerra M, Mayorga M, Dominguez-Diez A, Fernandez-Escalante JC, et al. Gene expression of tumor necrosis factor alpha and TNF-receptors, p55 and p75, in nonalcoholic steatohepatitis patients. *Hepatology* 2001;34:1158-1163.
 51. Endo M, Masaki T, Seike M, Yoshimatsu H. TNF-alpha induces hepatic steatosis in mice by enhancing gene expression of sterol regulatory element binding protein-1c (SREBP-1c). *Exp Biol Med (Maywood)* 2007;232:614-621.
 52. Kaser S, Moschen A, Cayon A, Kaser A, Crespo J, Pons-Romero F, Ebenbichler CF, et al. Adiponectin and its receptors in non-alcoholic steatohepatitis. *Gut* 2005;54:117-121.
 53. Ricchi M, Odoardi MR, Carulli L, Anzivino C, Ballestri S, Pinetti A, Fantoni LI, et al. Differential effect of oleic and palmitic acid on lipid accumulation and apoptosis in cultured hepatocytes. *J Gastroenterol Hepatol* 2009;24:830-840.
 54. Neuschwander-Tetri BA. Hepatic lipotoxicity and the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis: the central role of nontriglyceride fatty acid metabolites. *Hepatology* 2010;52:774-788.

55. Irshad Z, Dimitri F, Christian M, Zammit VA. Diacylglycerol acyltransferase 2 links glucose utilization to fatty acid oxidation in the brown adipocytes. *J Lipid Res* 2017;58:15-30.
56. Postic C, Girard J. The role of the lipogenic pathway in the development of hepatic steatosis. *Diabetes Metab* 2008;34:643-648.
57. Yamaguchi K, Yang L, McCall S, Huang J, Yu XX, Pandey SK, Bhanot S, et al. Inhibiting triglyceride synthesis improves hepatic steatosis but exacerbates liver damage and fibrosis in obese mice with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2007;45:1366-1374.
58. Stone SJ, Myers HM, Watkins SM, Brown BE, Feingold KR, Elias PM, Farese RV, Jr. Lipopenia and skin barrier abnormalities in DGAT2-deficient mice. *J Biol Chem* 2004;279:11767-11776.
59. Musso G, Cassader M, Paschetta E, Gambino R. Bioactive lipid species and metabolic pathways in progression and resolution of nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology* 2018;155:282-302 e288.
60. Zhou Y, Oresic M, Leivonen M, Gopalacharyulu P, Hyysalo J, Arola J, Verrijken A, et al. Noninvasive detection of nonalcoholic steatohepatitis using clinical markers and circulating levels of lipids and metabolites. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2016;14:1463-1472 e1466.
61. Chiappini F, Desterke C, Bertrand-Michel J, Guettier C, Le Naour F. Hepatic and serum lipid signatures specific to nonalcoholic steatohepatitis in murine models. *Sci Rep* 2016;6:31587.
62. Chiappini F, Coilly A, Kadar H, Gual P, Tran A, Desterke C, Samuel D, et al. Metabolism dysregulation induces a specific lipid signature of nonalcoholic steatohepatitis in patients. *Sci Rep* 2017;7:46658.
63. Musso G, Cassader M, Gambino R. Non-alcoholic steatohepatitis: emerging molecular targets and therapeutic strategies. *Nat Rev Drug Discov* 2016;15:249-274.
64. Cazanave SC, Wang X, Zhou H, Rahmani M, Grant S, Durrant DE, Klaassen CD, et al. Degradation of Keap1 activates BH3-only proteins Bim and PUMA during hepatocyte lipoapoptosis. *Cell Death Differ* 2014;21:1303-1312.
65. Win S, Than TA, Zhang J, Oo C, Min RWM, Kaplowitz N. New insights into the role and mechanism of c-Jun-N-terminal kinase signaling in the pathobiology of liver diseases. *Hepatology* 2018;67:2013-2024.
66. Luo W, Xu Q, Wang Q, Wu H, Hua J. Effect of modulation of PPAR-gamma activity on Kupffer cells M1/M2 polarization in the development of non-alcoholic fatty liver disease. *Sci Rep* 2017;7:44612.
67. Musso G, Gambino R, Cassader M. Recent insights into hepatic lipid metabolism in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Prog Lipid Res* 2009;48:1-26.
68. Benhamed F, Denechaud PD, Lemoine M, Robichon C, Moldes M, Bertrand-Michel J, Ratziu V, et al. The lipogenic transcription factor ChREBP dissociates hepatic steatosis from insulin resistance in mice and humans. *J Clin Invest* 2012;122:2176-2194.
69. Akazawa Y, Cazanave S, Mott JL, Elmi N, Bronk SF, Kohno S, Charlton MR, et al. Palmitoleate attenuates palmitate-induced Bim and PUMA up-regulation and hepatocyte lipoapoptosis. *J Hepatol* 2010;52:586-593.
70. Listenberger LL, Han X, Lewis SE, Cases S, Farese RV, Jr., Ory DS, Schaffer JE. Triglyceride accumulation protects against fatty acid-induced lipotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:3077-3082.
71. Li L, Lu DZ, Li YM, Zhang XQ, Zhou XX, Jin X. Proteomic analysis of liver mitochondria from rats with nonalcoholic steatohepatitis. *World J Gastroenterol* 2014;20:4778-4786.
72. Li ZZ, Berk M, McIntyre TM, Feldstein AE. Hepatic lipid partitioning and liver damage in nonalcoholic fatty liver disease: role of stearoyl-CoA desaturase. *J Biol Chem* 2009;284:5637-5644.
73. Gormaz JG, Rodrigo R, Videla LA, Beems M. Biosynthesis and bioavailability of long-chain polyunsaturated fatty acids in non-alcoholic fatty liver disease. *Prog Lipid Res* 2010;49:407-419.

74. Nogueira MA, Oliveira CP, Ferreira Alves VA, Stefano JT, Rodrigues LS, Torrinhas RS, Cogliati B, et al. Omega-3 polyunsaturated fatty acids in treating non-alcoholic steatohepatitis: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Clin Nutr* 2016;35:578-586.
75. Tanaka N, Sano K, Horiuchi A, Tanaka E, Kiyosawa K, Aoyama T. Highly purified eicosapentaenoic acid treatment improves nonalcoholic steatohepatitis. *J Clin Gastroenterol* 2008;42:413-418.
76. Das UN. A defect in the activity of Delta6 and Delta5 desaturases may be a factor predisposing to the development of insulin resistance syndrome. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2005;72:343-350.
77. Puri P, Baillie RA, Wiest MM, Mirshahi F, Choudhury J, Cheung O, Sargeant C, et al. A lipidomic analysis of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2007;46:1081-1090.
78. Walle P, Takkunen M, Mannisto V, Vaittinen M, Lankinen M, Karja V, Kakela P, et al. Fatty acid metabolism is altered in non-alcoholic steatohepatitis independent of obesity. *Metabolism* 2016;65:655-666.
79. Okada L, Oliveira CP, Stefano JT, Nogueira MA, Silva I, Cordeiro FB, Alves VAF, et al. Omega-3 PUFA modulate lipogenesis, RE stress, and mitochondrial dysfunction markers in NASH - Proteomic and lipidomic insight. *Clin Nutr* 2018;37:1474-1484.
80. Lopez-Vicario C, Gonzalez-Periz A, Rius B, Moran-Salvador E, Garcia-Alonso V, Lozano JJ, Bataller R, et al. Molecular interplay between Delta5/Delta6 desaturases and long-chain fatty acids in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis. *Gut* 2014;63:344-355.
81. Depner CM, Philbrick KA, Jump DB. Docosahexaenoic acid attenuates hepatic inflammation, oxidative stress, and fibrosis without decreasing hepatosteatosis in a Ldlr(-/-) mouse model of western diet-induced nonalcoholic steatohepatitis. *J Nutr* 2013;143:315-323.
82. Lytle KA, Depner CM, Wong CP, Jump DB. Docosahexaenoic acid attenuates Western diet-induced hepatic fibrosis in Ldlr-/- mice by targeting the TGFbeta-Smad3 pathway. *J Lipid Res* 2015;56:1936-1946.
83. Gromovsky AD, Schugar RC, Brown AL, Helsley RN, Burrows AC, Ferguson D, Zhang R, et al. Delta-5 fatty acid desaturase fads1 impacts metabolic disease by balancing proinflammatory and proresolving lipid mediators. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2018;38:218-231.
84. He XX, Wu XL, Chen RP, Chen C, Liu XG, Wu BJ, Huang ZM. Effectiveness of omega-3 polyunsaturated fatty acids in non-alcoholic fatty liver disease: a meta-analysis of randomized controlled trials. *PLoS One* 2016;11:e0162368.
85. Nobili V, Alisi A, Musso G, Scorletti E, Calder PC, Byrne CD. Omega-3 fatty acids: Mechanisms of benefit and therapeutic effects in pediatric and adult NAFLD. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2016;53:106-120.
86. Sanyal AJ, Abdelmalek MF, Suzuki A, Cummings OW, Chojkier M, Group E-AS. No significant effects of ethyl-eicosapentanoic acid on histologic features of nonalcoholic steatohepatitis in a phase 2 trial. *Gastroenterology* 2014;147:377-384 e371.
87. Zeng J, Yu W, Dong X, Zhao S, Wang Z, Liu Y, Wong MS, et al. A nanoencapsulation suspension biomimetic of milk structure for enhanced maternal and fetal absorptions of DHA to improve early brain development. *Nanomedicine* 2019;15:119-128.
88. Bannenberg G, Serhan CN. Specialized pro-resolving lipid mediators in the inflammatory response: An update. *Biochim Biophys Acta* 2010;1801:1260-1273.
89. Serhan CN. Treating inflammation and infection in the 21st century: new hints from decoding resolution mediators and mechanisms. *FASEB J* 2017;31:1273-1288.
90. Shimano H, Horton JD, Shimomura I, Hammer RE, Brown MS, Goldstein JL. Isoform 1c of sterol regulatory element binding protein is less active than isoform 1a in livers of transgenic mice and in cultured cells. *J Clin Invest* 1997;99:846-854.

91. Kohjima M, Enjoji M, Higuchi N, Kato M, Kotoh K, Yoshimoto T, Fujino T, et al. Re-evaluation of fatty acid metabolism-related gene expression in nonalcoholic fatty liver disease. *Int J Mol Med* 2007;20:351-358.
92. Xie Z, Li H, Wang K, Lin J, Wang Q, Zhao G, Jia W, et al. Analysis of transcriptome and metabolome profiles alterations in fatty liver induced by high-fat diet in rat. *Metabolism* 2010;59:554-560.
93. Higuchi N, Kato M, Shundo Y, Tajiri H, Tanaka M, Yamashita N, Kohjima M, et al. Liver X receptor in cooperation with SREBP-1c is a major lipid synthesis regulator in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatol Res* 2008;38:1122-1129.
94. Dorn C, Riener MO, Kirovski G, Saugspier M, Steib K, Weiss TS, Gabele E, et al. Expression of fatty acid synthase in nonalcoholic fatty liver disease. *Int J Clin Exp Pathol* 2010;3:505-514.
95. Lambert JE, Ramos-Roman MA, Browning JD, Parks EJ. Increased de novo lipogenesis is a distinct characteristic of individuals with nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 2014;146:726-735.
96. Diraison F, Moulin P, Beylot M. Contribution of hepatic de novo lipogenesis and reesterification of plasma non esterified fatty acids to plasma triglyceride synthesis during non-alcoholic fatty liver disease. *Diabetes Metab* 2003;29:478-485.
97. Chakravarthy MV, Pan Z, Zhu Y, Tordjman K, Schneider JG, Coleman T, Turk J, et al. "New" hepatic fat activates PPARalpha to maintain glucose, lipid, and cholesterol homeostasis. *Cell Metab* 2005;1:309-322.
98. Cha JY, Repa JJ. The liver X receptor (LXR) and hepatic lipogenesis. The carbohydrate-response element-binding protein is a target gene of LXR. *J Biol Chem* 2007;282:743-751.
99. Sanders FW, Griffin JL. De novo lipogenesis in the liver in health and disease: more than just a shunting yard for glucose. *Biol Rev Camb Philos Soc* 2016;91:452-468.
100. Yamashita H, Takenoshita M, Sakurai M, Bruick RK, Henzel WJ, Shillinglaw W, Arnot D, et al. A glucose-responsive transcription factor that regulates carbohydrate metabolism in the liver. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:9116-9121.
101. Eberle D, Hegarty B, Bossard P, Ferre P, Foufelle F. SREBP transcription factors: master regulators of lipid homeostasis. *Biochimie* 2004;86:839-848.
102. Liang G, Yang J, Horton JD, Hammer RE, Goldstein JL, Brown MS. Diminished hepatic response to fasting/refeeding and liver X receptor agonists in mice with selective deficiency of sterol regulatory element-binding protein-1c. *J Biol Chem* 2002;277:9520-9528.
103. Uyeda K, Repa JJ. Carbohydrate response element binding protein, ChREBP, a transcription factor coupling hepatic glucose utilization and lipid synthesis. *Cell Metab* 2006;4:107-110.
104. Iizuka K, Miller B, Uyeda K. Deficiency of carbohydrate-activated transcription factor ChREBP prevents obesity and improves plasma glucose control in leptin-deficient (ob/ob) mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2006;291:E358-364.
105. Zhang D, Tong X, VanDommelen K, Gupta N, Stamper K, Brady GF, Meng Z, et al. Lipogenic transcription factor ChREBP mediates fructose-induced metabolic adaptations to prevent hepatotoxicity. *J Clin Invest* 2017;127:2855-2867.
106. Mitro N, Mak PA, Vargas L, Godio C, Hampton E, Molteni V, Kreuzsch A, et al. The nuclear receptor LXR is a glucose sensor. *Nature* 2007;445:219-223.
107. Vacca M, Degirolamo C, Mariani-Costantini R, Palasciano G, Moschetta A. Lipid-sensing nuclear receptors in the pathophysiology and treatment of the metabolic syndrome. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med* 2011;3:562-587.
108. Rao MS, Reddy JK. Peroxisomal beta-oxidation and steatohepatitis. *Semin Liver Dis* 2001;21:43-55.
109. Begriche K, Massart J, Robin MA, Bonnet F, Fromenty B. Mitochondrial adaptations and dysfunctions in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2013;58:1497-1507.

110. Nassir F, Ibdah JA. Role of mitochondria in nonalcoholic fatty liver disease. *Int J Mol Sci* 2014;15:8713-8742.
111. Reddy JK, Rao MS. Lipid metabolism and liver inflammation. II. Fatty liver disease and fatty acid oxidation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006;290:G852-858.
112. Dirkx R, Vanhorebeek I, Martens K, Schad A, Grabenbauer M, Fahimi D, Declercq P, et al. Absence of peroxisomes in mouse hepatocytes causes mitochondrial and RE abnormalities. *Hepatology* 2005;41:868-878.
113. McGarry JD, Brown NF. The mitochondrial carnitine palmitoyltransferase system. From concept to molecular analysis. *Eur J Biochem* 1997;244:1-14.
114. Akkaoui M, Cohen I, Esnous C, Lenoir V, Sournac M, Girard J, Prip-Buus C. Modulation of the hepatic malonyl-CoA-carnitine palmitoyltransferase 1A partnership creates a metabolic switch allowing oxidation of de novo fatty acids. *Biochem J* 2009;420:429-438.
115. Nguyen P, Leray V, Diez M, Serisier S, Le Bloc'h J, Siliart B, Dumon H. Liver lipid metabolism. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)* 2008;92:272-283.
116. Nakamuta M, Kohjima M, Higuchi N, Kato M, Kotoh K, Yoshimoto T, Yada M, et al. The significance of differences in fatty acid metabolism between obese and non-obese patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Int J Mol Med* 2008;22:663-667.
117. Reddy JK. Nonalcoholic steatosis and steatohepatitis. III. Peroxisomal beta-oxidation, PPAR alpha, and steatohepatitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001;281:G1333-1339.
118. Ibdah JA, Perlegas P, Zhao Y, Angdisen J, Borgerink H, Shadoan MK, Wagner JD, et al. Mice heterozygous for a defect in mitochondrial trifunctional protein develop hepatic steatosis and insulin resistance. *Gastroenterology* 2005;128:1381-1390.
119. Rector RS, Morris EM, Ridenhour S, Meers GM, Hsu FF, Turk J, Ibdah JA. Selective hepatic insulin resistance in a murine model heterozygous for a mitochondrial trifunctional protein defect. *Hepatology* 2013;57:2213-2223.
120. Chtioui H, Semela D, Ledermann M, Zimmermann A, Dufour JF. Expression and activity of the cytochrome P450 2E1 in patients with nonalcoholic steatosis and steatohepatitis. *Liver Int* 2007;27:764-771.
121. Reddy JK, Hashimoto T. Peroxisomal beta-oxidation and peroxisome proliferator-activated receptor alpha: an adaptive metabolic system. *Annu Rev Nutr* 2001;21:193-230.
122. Kersten S, Stienstra R. The role and regulation of the peroxisome proliferator activated receptor alpha in human liver. *Biochimie* 2017;136:75-84.
123. Koek GH, Liedorp PR, Bast A. The role of oxidative stress in non-alcoholic steatohepatitis. *Clin Chim Acta* 2011;412:1297-1305.
124. Robertson G, Leclercq I, Farrell GC. Nonalcoholic steatosis and steatohepatitis. II. Cytochrome P-450 enzymes and oxidative stress. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001;281:G1135-1139.
125. Dentin R, Benhamed F, Hainault I, Fauveau V, Fougelle F, Dyck JR, Girard J, et al. Liver-specific inhibition of ChREBP improves hepatic steatosis and insulin resistance in ob/ob mice. *Diabetes* 2006;55:2159-2170.
126. Tamura S, Shimomura I. Contribution of adipose tissue and de novo lipogenesis to nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Invest* 2005;115:1139-1142.
127. Hegardt FG. Mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase: a control enzyme in ketogenesis. *Biochem J* 1999;338 (Pt 3):569-582.
128. Rogue A, Lambert C, Josse R, Antherieu S, Spire C, Claude N, Guillouzo A. Comparative gene expression profiles induced by PPARgamma and PPARalpha/gamma agonists in human hepatocytes. *PLoS One* 2011;6:e18816.
129. Videla LA, Pettinelli P. Misregulation of PPAR functioning and its pathogenic consequences associated with nonalcoholic fatty liver disease in human obesity. *PPAR Res* 2012;2012:107434.

130. Dasarathy S, Yang Y, McCullough AJ, Marczewski S, Bennett C, Kalhan SC. Elevated hepatic fatty acid oxidation, high plasma fibroblast growth factor 21, and fasting bile acids in nonalcoholic steatohepatitis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2011;23:382-388.
131. Sanyal AJ, Campbell-Sargent C, Mirshahi F, Rizzo WB, Contos MJ, Sterling RK, Luketic VA, et al. Nonalcoholic steatohepatitis: association of insulin resistance and mitochondrial abnormalities. *Gastroenterology* 2001;120:1183-1192.
132. Bugianesi E, Gastaldelli A, Vanni E, Gambino R, Cassader M, Baldi S, Ponti V, et al. Insulin resistance in non-diabetic patients with non-alcoholic fatty liver disease: sites and mechanisms. *Diabetologia* 2005;48:634-642.
133. Miele L, Grieco A, Armuzzi A, Candelli M, Forgione A, Gasbarrini A, Gasbarrini G. Hepatic mitochondrial beta-oxidation in patients with nonalcoholic steatohepatitis assessed by ¹³C-octanoate breath test. *Am J Gastroenterol* 2003;98:2335-2336.
134. Croci I, Byrne NM, Choquette S, Hills AP, Chachay VS, Clouston AD, O'Moore-Sullivan TM, et al. Whole-body substrate metabolism is associated with disease severity in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Gut* 2013;62:1625-1633.
135. Kotronen A, Seppala-Lindroos A, Vehkavaara S, Bergholm R, Frayn KN, Fielding BA, Yki-Jarvinen H. Liver fat and lipid oxidation in humans. *Liver Int* 2009;29:1439-1446.
136. Perry RJ, Samuel VT, Petersen KF, Shulman GI. The role of hepatic lipids in hepatic insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature* 2014;510:84-91.
137. Fabbrini E, Mohammed BS, Magkos F, Korenblat KM, Patterson BW, Klein S. Alterations in adipose tissue and hepatic lipid kinetics in obese men and women with nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 2008;134:424-431.
138. Kawano Y, Cohen DE. Mechanisms of hepatic triglyceride accumulation in non-alcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol* 2013;48:434-441.
139. Fabbrini E, Magkos F. Hepatic steatosis as a marker of metabolic dysfunction. *Nutrients* 2015;7:4995-5019.
140. Tanoli T, Yue P, Yablonskiy D, Schonfeld G. Fatty liver in familial hypobetalipoproteinemia: roles of the APOB defects, intra-abdominal adipose tissue, and insulin sensitivity. *J Lipid Res* 2004;45:941-947.
141. Berriot-Varoqueaux N, Aggerbeck LP, Samson-Bouma M, Wetterau JR. The role of the microsomal triglyceride transfer protein in abetalipoproteinemia. *Annu Rev Nutr* 2000;20:663-697.
142. Horton JD, Shimano H, Hamilton RL, Brown MS, Goldstein JL. Disruption of LDL receptor gene in transgenic SREBP-1a mice unmasks hyperlipidemia resulting from production of lipid-rich VLDL. *J Clin Invest* 1999;103:1067-1076.
143. Zhang XQ, Xu CF, Yu CH, Chen WX, Li YM. Role of endoplasmic reticulum stress in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol* 2014;20:1768-1776.
144. Ota T, Gayet C, Ginsberg HN. Inhibition of apolipoprotein B100 secretion by lipid-induced hepatic endoplasmic reticulum stress in rodents. *J Clin Invest* 2008;118:316-332.
145. Ameen C, Edvardsson U, Ljungberg A, Asp L, Akerblad P, Tuneld A, Olofsson SO, et al. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor alpha increases the expression and activity of microsomal triglyceride transfer protein in the liver. *J Biol Chem* 2005;280:1224-1229.
146. Sato R, Miyamoto W, Inoue J, Terada T, Imanaka T, Maeda M. Sterol regulatory element-binding protein negatively regulates microsomal triglyceride transfer protein gene transcription. *J Biol Chem* 1999;274:24714-24720.
147. Seol W, Choi HS, Moore DD. Isolation of proteins that interact specifically with the retinoid X receptor: two novel orphan receptors. *Mol Endocrinol* 1995;9:72-85.
148. Forman BM, Goode E, Chen J, Oro AE, Bradley DJ, Perlmann T, Noonan DJ, et al. Identification of a nuclear receptor that is activated by farnesol metabolites. *Cell* 1995;81:687-693.

149. Caron S, Huaman Samanez C, Dehondt H, Ploton M, Briand O, Lien F, Dorchie E, et al. Farnesoid X receptor inhibits the transcriptional activity of carbohydrate response element binding protein in human hepatocytes. *Mol Cell Biol* 2013;33:2202-2211.
150. Lefebvre P, Cariou B, Lien F, Kuipers F, Staels B. Role of bile acids and bile acid receptors in metabolic regulation. *Physiol Rev* 2009;89:147-191.
151. Pineda Torra I, Claudel T, Duval C, Kosykh V, Fruchart JC, Staels B. Bile acids induce the expression of the human peroxisome proliferator-activated receptor alpha gene via activation of the farnesoid X receptor. *Mol Endocrinol* 2003;17:259-272.
152. Claudel T, Inoue Y, Barbier O, Duran-Sandoval D, Kosykh V, Fruchart J, Fruchart JC, et al. Farnesoid X receptor agonists suppress hepatic apolipoprotein CIII expression. *Gastroenterology* 2003;125:544-555.
153. Mota M, Banini BA, Cazanave SC, Sanyal AJ. Molecular mechanisms of lipotoxicity and glucotoxicity in nonalcoholic fatty liver disease. *Metabolism* 2016;65:1049-1061.
154. Caballero F, Fernandez A, De Lacy AM, Fernandez-Checa JC, Caballeria J, Garcia-Ruiz C. Enhanced free cholesterol, SREBP-2 and StAR expression in human NASH. *J Hepatol* 2009;50:789-796.
155. Bellanti F, Mitarotonda D, Tamborra R, Blonda M, Iannelli G, Petrella A, Sanginario V, et al. Oxysterols induce mitochondrial impairment and hepatocellular toxicity in non-alcoholic fatty liver disease. *Free Radic Biol Med* 2014;75 Suppl 1:S16-17.
156. Liang T, Alloosh M, Bell LN, Fullenkamp A, Saxena R, Van Alstine W, Bybee P, et al. Liver injury and fibrosis induced by dietary challenge in the Ossabaw miniature Swine. *PLoS One* 2015;10:e0124173.
157. Gan LT, Van Rooyen DM, Koina ME, McCuskey RS, Teoh NC, Farrell GC. Hepatocyte free cholesterol lipotoxicity results from JNK1-mediated mitochondrial injury and is HMGB1 and TLR4-dependent. *J Hepatol* 2014;61:1376-1384.
158. Arguello G, Balboa E, Arrese M, Zanlungo S. Recent insights on the role of cholesterol in non-alcoholic fatty liver disease. *Biochim Biophys Acta* 2015;1852:1765-1778.
159. Dongiovanni P, Petta S, Mannisto V, Mancina RM, Pipitone R, Karja V, Maggioni M, et al. Statin use and non-alcoholic steatohepatitis in at risk individuals. *J Hepatol* 2015;63:705-712.
160. Chong LW, Hsu YC, Lee TF, Lin Y, Chiu YT, Yang KC, Wu JC, et al. Fluvastatin attenuates hepatic steatosis-induced fibrogenesis in rats through inhibiting paracrine effect of hepatocyte on hepatic stellate cells. *BMC Gastroenterol* 2015;15:22.
161. Rodriguez-Cuenca S, Pellegrinelli V, Campbell M, Oresic M, Vidal-Puig A. Sphingolipids and glycerophospholipids - The "ying and yang" of lipotoxicity in metabolic diseases. *Prog Lipid Res* 2017;66:14-29.
162. Anjani K, Lhomme M, Sokolovska N, Poitou C, Aron-Wisnewsky J, Bouillot JL, Lesnik P, et al. Circulating phospholipid profiling identifies portal contribution to NASH signature in obesity. *J Hepatol* 2015;62:905-912.
163. Chavez JA, Siddique MM, Wang ST, Ching J, Shayman JA, Summers SA. Ceramides and glucosylceramides are independent antagonists of insulin signaling. *J Biol Chem* 2014;289:723-734.
164. Liu Z, Xia Y, Li B, Xu H, Wang C, Liu Y, Li Y, et al. Induction of RE stress-mediated apoptosis by ceramide via disruption of RE Ca(2+) homeostasis in human adenoid cystic carcinoma cells. *Cell Biosci* 2014;4:71.
165. Fucho R, Martinez L, Baulies A, Torres S, Tarrats N, Fernandez A, Ribas V, et al. ASMase regulates autophagy and lysosomal membrane permeabilization and its inhibition prevents early stage non-alcoholic steatohepatitis. *J Hepatol* 2014;61:1126-1134.
166. Harvald EB, Olsen AS, Faergeman NJ. Autophagy in the light of sphingolipid metabolism. *Apoptosis* 2015;20:658-670.

167. Lu S, Natarajan SK, Mott JL, Kharbanda KK, Harrison-Findik DD. Ceramide induces human hepcidin gene transcription through JAK/STAT3 pathway. *PLoS One* 2016;11:e0147474.
168. Raichur S, Wang ST, Chan PW, Li Y, Ching J, Chaurasia B, Dogra S, et al. CerS2 Haploinsufficiency inhibits beta-oxidation and confers susceptibility to diet-induced steatohepatitis and insulin resistance. *Cell Metab* 2014;20:919.
169. Turpin SM, Nicholls HT, Willmes DM, Mourier A, Brodesser S, Wunderlich CM, Mauer J, et al. Obesity-induced CerS6-dependent C16:0 ceramide production promotes weight gain and glucose intolerance. *Cell Metab* 2014;20:678-686.
170. Pagadala M, Kasumov T, McCullough AJ, Zein NN, Kirwan JP. Role of ceramides in nonalcoholic fatty liver disease. *Trends Endocrinol Metab* 2012;23:365-371.
171. Schwabe RF, Brenner DA. Mechanisms of Liver Injury. I. TNF-alpha-induced liver injury: role of IKK, JNK, and ROS pathways. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006;290:G583-589.
172. Kurek K, Piotrowska DM, Wiesiolek-Kurek P, Lukaszuk B, Chabowski A, Gorski J, Zenzian-Piotrowska M. Inhibition of ceramide de novo synthesis reduces liver lipid accumulation in rats with nonalcoholic fatty liver disease. *Liver Int* 2014;34:1074-1083.
173. Babenko NA, Kharchenko VS. Effects of inhibitors of key enzymes of sphingolipid metabolism on insulin-induced glucose uptake and glycogen synthesis in liver cells of old rats. *Biochemistry (Mosc)* 2015;80:104-112.
174. Beckmann N, Sharma D, Gulbins E, Becker KA, Edelman B. Inhibition of acid sphingomyelinase by tricyclic antidepressants and analogs. *Front Physiol* 2014;5:331.
175. Moles A, Tarrats N, Morales A, Dominguez M, Bataller R, Caballeria J, Garcia-Ruiz C, et al. Acidic sphingomyelinase controls hepatic stellate cell activation and in vivo liver fibrogenesis. *Am J Pathol* 2010;177:1214-1224.
176. Alvarez SE, Harikumar KB, Hait NC, Allegood J, Strub GM, Kim EY, Maceyka M, et al. Sphingosine-1-phosphate is a missing cofactor for the E3 ubiquitin ligase TRAF2. *Nature* 2010;465:1084-1088.
177. Rohrbach T, Maceyka M, Spiegel S. Sphingosine kinase and sphingosine-1-phosphate in liver pathobiology. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2017;52:543-553.
178. Wang J, Badeanlou L, Bielawski J, Ciaraldi TP, Samad F. Sphingosine kinase 1 regulates adipose proinflammatory responses and insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2014;306:E756-768.
179. Lee SY, Hong IK, Kim BR, Shim SM, Sung Lee J, Lee HY, Soo Choi C, et al. Activation of sphingosine kinase 2 by endoplasmic reticulum stress ameliorates hepatic steatosis and insulin resistance in mice. *Hepatology* 2015;62:135-146.
180. Wei Y, Wang D, Topczewski F, Pagliassotti MJ. Saturated fatty acids induce endoplasmic reticulum stress and apoptosis independently of ceramide in liver cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2006;291:E275-281.
181. Feldstein AE, Werneburg NW, Li Z, Bronk SF, Gores GJ. Bax inhibition protects against free fatty acid-induced lysosomal permeabilization. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006;290:G1339-1346.
182. Kakisaka K, Cazanave SC, Fingas CD, Guicciardi ME, Bronk SF, Werneburg NW, Mott JL, et al. Mechanisms of lysophosphatidylcholine-induced hepatocyte lipoapoptosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2012;302:G77-84.
183. Hollie NI, Cash JG, Matlib MA, Wortman M, Basford JE, Abplanalp W, Hui DY. Micromolar changes in lysophosphatidylcholine concentration cause minor effects on mitochondrial permeability but major alterations in function. *Biochim Biophys Acta* 2014;1841:888-895.
184. Hirsova P, Ibrahim SH, Krishnan A, Verma VK, Bronk SF, Werneburg NW, Charlton MR, et al. Lipid-induced signaling causes release of inflammatory extracellular vesicles from hepatocytes. *Gastroenterology* 2016;150:956-967.

185. Ibrahim SH, Hirsova P, Tomita K, Bronk SF, Werneburg NW, Harrison SA, Goodfellow VS, et al. Mixed lineage kinase 3 mediates release of C-X-C motif ligand 10-bearing chemotactic extracellular vesicles from lipotoxic hepatocytes. *Hepatology* 2016;63:731-744.
186. Kaffe E, Katsifa A, Xylourgidis N, Ninou I, Zannikou M, Harokopos V, Foka P, et al. Hepatocyte autotaxin expression promotes liver fibrosis and cancer. *Hepatology* 2017;65:1369-1383.
187. Li Z, Agellon LB, Allen TM, Umeda M, Jewell L, Mason A, Vance DE. The ratio of phosphatidylcholine to phosphatidylethanolamine influences membrane integrity and steatohepatitis. *Cell Metab* 2006;3:321-331.
188. Walker AK, Jacobs RL, Watts JL, Rottiers V, Jiang K, Finnegan DM, Shioda T, et al. A conserved SREBP-1/phosphatidylcholine feedback circuit regulates lipogenesis in metazoans. *Cell* 2011;147:840-852.
189. Payne F, Lim K, Girousse A, Brown RJ, Kory N, Robbins A, Xue Y, et al. Mutations disrupting the Kennedy phosphatidylcholine pathway in humans with congenital lipodystrophy and fatty liver disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014;111:8901-8906.
190. Araujo AC, Wheelock CE, Haeggstrom JZ. The Eicosanoids, Redox-regulated lipid mediators in immunometabolic disorders. *Antioxid Redox Signal* 2018;29:275-296.
191. Jung TW, Hwang HJ, Hong HC, Choi HY, Yoo HJ, Baik SH, Choi KM. Resolvin D1 reduces RE stress-induced apoptosis and triglyceride accumulation through JNK pathway in HepG2 cells. *Mol Cell Endocrinol* 2014;391:30-40.
192. Borgeson E, Johnson AM, Lee YS, Till A, Syed GH, Ali-Shah ST, Guiry PJ, et al. Lipoxin a4 attenuates obesity-induced adipose inflammation and associated liver and kidney disease. *Cell Metab* 2015;22:125-137.
193. Laiglesia LM, Lorente-Cebrian S, Martinez-Fernandez L, Sainz N, Prieto-Hontoria PL, Burrell MA, Rodriguez-Ortigosa CM, et al. Maresin 1 mitigates liver steatosis in ob/ob and diet-induced obese mice. *Int J Obes (Lond)* 2018;42:572-579.
194. Martinez-Fernandez L, Gonzalez-Muniesa P, Laiglesia LM, Sainz N, Prieto-Hontoria PL, Escote X, Odriozola L, et al. Maresin 1 improves insulin sensitivity and attenuates adipose tissue inflammation in ob/ob and diet-induced obese mice. *FASEB J* 2017;31:2135-2145.
195. Han YH, Shin KO, Kim JY, Khadka DB, Kim HJ, Lee YM, Cho WJ, et al. A maresin 1/RORalpha/12-lipoxygenase autoregulatory circuit prevents inflammation and progression of nonalcoholic steatohepatitis. *J Clin Invest* 2019;130:1684-1698.
196. Horrillo R, Gonzalez-Periz A, Martinez-Clemente M, Lopez-Parra M, Ferre N, Titos E, Moran-Salvador E, et al. 5-lipoxygenase activating protein signals adipose tissue inflammation and lipid dysfunction in experimental obesity. *J Immunol* 2010;184:3978-3987.
197. Rius B, Duran-Guell M, Flores-Costa R, Lopez-Vicario C, Lopategi A, Alcaraz-Quiles J, Casulleras M, et al. The specialized proresolving lipid mediator maresin 1 protects hepatocytes from lipotoxic and hypoxia-induced endoplasmic reticulum stress. *FASEB J* 2017;31:5384-5398.
198. Du D, Shi YH, Le GW. Oxidative stress induced by high-glucose diet in liver of C57BL/6J mice and its underlying mechanism. *Mol Biol Rep* 2010;37:3833-3839.
199. Chandrasekaran K, Swaminathan K, Chatterjee S, Dey A. Apoptosis in HepG2 cells exposed to high glucose. *Toxicol In Vitro* 2010;24:387-396.
200. Civera M, Urios A, Garcia-Torres ML, Ortega J, Martinez-Valls J, Cassinello N, del Olmo JA, et al. Relationship between insulin resistance, inflammation and liver cell apoptosis in patients with severe obesity. *Diabetes Metab Res Rev* 2010;26:187-192.
201. Leturque A, Brot-Laroche E, Le Gall M. GLUT2 mutations, translocation, and receptor function in diet sugar managing. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2009;296:E985-992.
202. Miller SP, Anand GR, Karschnia EJ, Bell GI, LaPorte DC, Lange AJ. Characterization of glucokinase mutations associated with maturity-onset diabetes of the young type 2 (MODY-2): different glucokinase defects lead to a common phenotype. *Diabetes* 1999;48:1645-1651.

203. Cuesta-Munoz AL, Tuomi T, Cobo-Vuilleumier N, Koskela H, Odili S, Stride A, Buettger C, et al. Clinical heterogeneity in monogenic diabetes caused by mutations in the glucokinase gene (GCK-MODY). *Diabetes Care* 2010;33:290-292.
204. Dentin R, Girard J, Postic C. Carbohydrate responsive element binding protein (ChREBP) and sterol regulatory element binding protein-1c (SREBP-1c): two key regulators of glucose metabolism and lipid synthesis in liver. *Biochimie* 2005;87:81-86.
205. Amann T, Hellerbrand C. GLUT1 as a therapeutic target in hepatocellular carcinoma. *Expert Opin Ther Targets* 2009;13:1411-1427.
206. Roach PJ. Glycogen and its metabolism. *Curr Mol Med* 2002;2:101-120.
207. Kim YM, Seo YH, Park CB, Yoon SH, Yoon G. Roles of GSK3 in metabolic shift toward abnormal anabolism in cell senescence. *Ann N Y Acad Sci* 2010;1201:65-71.
208. Raddatz D, Ramadori G. Carbohydrate metabolism and the liver: actual aspects from physiology and disease. *Z Gastroenterol* 2007;45:51-62.
209. Cao R, Cronk ZX, Zha W, Sun L, Wang X, Fang Y, Studer E, et al. Bile acids regulate hepatic gluconeogenic genes and farnesoid X receptor via G(alpha)i-protein-coupled receptors and the AKT pathway. *J Lipid Res* 2010;51:2234-2244.
210. Puigserver P, Rhee J, Donovan J, Walkey CJ, Yoon JC, Oriente F, Kitamura Y, et al. Insulin-regulated hepatic gluconeogenesis through FOXO1-PGC-1alpha interaction. *Nature* 2003;423:550-555.
211. Valera A, Pujol A, Pelegrin M, Bosch F. Transgenic mice overexpressing phosphoenolpyruvate carboxykinase develop non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:9151-9154.
212. Hakimi P, Johnson MT, Yang J, Lepage DF, Conlon RA, Kalhan SC, Reshef L, et al. Phosphoenolpyruvate carboxykinase and the critical role of cataplerosis in the control of hepatic metabolism. *Nutr Metab (Lond)* 2005;2:33.
213. Conti R, Mannucci E, Pessotto P, Tassoni E, Carminati P, Giannessi F, Arduini A. Selective reversible inhibition of liver carnitine palmitoyl-transferase 1 by teglicar reduces gluconeogenesis and improves glucose homeostasis. *Diabetes* 2011;60:644-651.
214. Stayrook KR, Bramlett KS, Savkur RS, Ficorilli J, Cook T, Christe ME, Michael LF, et al. Regulation of carbohydrate metabolism by the farnesoid X receptor. *Endocrinology* 2005;146:984-991.
215. Oberkofler H, Pfeifenberger A, Soyal S, Felder T, Hahne P, Miller K, Krempler F, et al. Aberrant hepatic TRIB3 gene expression in insulin-resistant obese humans. *Diabetologia* 2010;53:1971-1975.
216. Lim JS, Mietus-Snyder M, Valente A, Schwarz JM, Lustig RH. The role of fructose in the pathogenesis of NAFLD and the metabolic syndrome. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2010;7:251-264.
217. Janevski M, Ratnayake S, Siljanovski S, McGlynn MA, Cameron-Smith D, Lewandowski P. Fructose containing sugars modulate mRNA of lipogenic genes ACC and FAS and protein levels of transcription factors ChREBP and SREBP1c with no effect on body weight or liver fat. *Food Funct* 2012;3:141-149.
218. Vasiljevic A, Bursac B, Djordjevic A, Milutinovic DV, Nikolic M, Matic G, Velickovic N. Hepatic inflammation induced by high-fructose diet is associated with altered 11betaHSD1 expression in the liver of Wistar rats. *Eur J Nutr* 2014;53:1393-1402.
219. Kanety H, Feinstein R, Papa MZ, Hemi R, Karasik A. Tumor necrosis factor alpha-induced phosphorylation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1). Possible mechanism for suppression of insulin-stimulated tyrosine phosphorylation of IRS-1. *J Biol Chem* 1995;270:23780-23784.
220. Vila L, Roglans N, Alegret M, Sanchez RM, Vazquez-Carrera M, Laguna JC. Suppressor of cytokine signaling-3 (SOCS-3) and a deficit of serine/threonine (Ser/Thr) phosphoproteins

- involved in leptin transduction mediate the effect of fructose on rat liver lipid metabolism. *Hepatology* 2008;48:1506-1516.
221. Basaranoglu M, Basaranoglu G, Sabuncu T, Senturk H. Fructose as a key player in the development of fatty liver disease. *World J Gastroenterol* 2013;19:1166-1172.
222. Ren LP, Chan SM, Zeng XY, Laybutt DR, Iseli TJ, Sun RQ, Kraegen EW, et al. Differing endoplasmic reticulum stress response to excess lipogenesis versus lipid oversupply in relation to hepatic steatosis and insulin resistance. *PLoS One* 2012;7:e30816.
223. Chan SM, Sun RQ, Zeng XY, Choong ZH, Wang H, Watt MJ, Ye JM. Activation of PPARalpha ameliorates hepatic insulin resistance and steatosis in high fructose-fed mice despite increased endoplasmic reticulum stress. *Diabetes* 2013;62:2095-2105.
224. Zhang Y, Yang X, Shi H, Dong L, Bai J. Effect of alpha-linolenic acid on endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis of palmitic acid lipotoxicity in primary rat hepatocytes. *Lipids Health Dis* 2011;10:122.
225. Zhang C, Chen X, Zhu RM, Zhang Y, Yu T, Wang H, Zhao H, et al. Endoplasmic reticulum stress is involved in hepatic SREBP-1c activation and lipid accumulation in fructose-fed mice. *Toxicol Lett* 2012;212:229-240.
226. Xu A, Wang Y, Keshaw H, Xu LY, Lam KS, Cooper GJ. The fat-derived hormone adiponectin alleviates alcoholic and nonalcoholic fatty liver diseases in mice. *J Clin Invest* 2003;112:91-100.
227. Matsubara M. Plasma adiponectin decrease in women with nonalcoholic Fatty liver. *Endocr J* 2004;51:587-593.
228. Yamauchi T, Hara K, Kubota N, Terauchi Y, Tobe K, Froguel P, Nagai R, et al. Dual roles of adiponectin/Acrp30 in vivo as an anti-diabetic and anti-atherogenic adipokine. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord* 2003;3:243-254.
229. Kadowaki T, Yamauchi T, Kubota N, Hara K, Ueki K, Tobe K. Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome. *J Clin Invest* 2006;116:1784-1792.
230. Dries DR, Gallegos LL, Newton AC. A single residue in the C1 domain sensitizes novel protein kinase C isoforms to cellular diacylglycerol production. *J Biol Chem* 2007;282:826-830.
231. Samuel VT, Liu ZX, Wang A, Beddow SA, Geisler JG, Kahn M, Zhang XM, et al. Inhibition of protein kinase Cepsilon prevents hepatic insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Invest* 2007;117:739-745.
232. Puri P, Mirshahi F, Cheung O, Natarajan R, Maher JW, Kellum JM, Sanyal AJ. Activation and dysregulation of the unfolded protein response in nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 2008;134:568-576.
233. Todd DJ, Lee AH, Glimcher LH. The endoplasmic reticulum stress response in immunity and autoimmunity. *Nat Rev Immunol* 2008;8:663-674.
234. Yang L, Li P, Fu S, Calay ES, Hotamisligil GS. Defective hepatic autophagy in obesity promotes ER stress and causes insulin resistance. *Cell Metab* 2010;11:467-478.
235. Tilg H, Moschen AR. Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: the multiple parallel hits hypothesis. *Hepatology* 2010;52:1836-1846.
236. Szegezdi E, Logue SE, Gorman AM, Samali A. Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *EMBO Rep* 2006;7:880-885.
237. Szegezdi E, Macdonald DC, Ni Chonghaile T, Gupta S, Samali A. Bcl-2 family on guard at the RE. *Am J Physiol Cell Physiol* 2009;296:C941-953.
238. Pfaffenbach KT, Gentile CL, Nivala AM, Wang D, Wei Y, Pagliassotti MJ. Linking endoplasmic reticulum stress to cell death in hepatocytes: roles of C/EBP homologous protein and chemical chaperones in palmitate-mediated cell death. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2010;298:E1027-1035.
239. Zhang J, Singh N, Robinson-Taylor KS, Dorsett-Martin WA, Morris MW, Jr., Earl TM, Anderson CD. Hepatocyte autophagy is linked to C/EBP-homologous protein, Bcl2-

- interacting mediator of cell death, and BH3-interacting domain death agonist gene expression. *J Surg Res* 2015;195:588-595.
240. Hotamisligil GS. Endoplasmic reticulum stress and the inflammatory basis of metabolic disease. *Cell* 2010;140:900-917.
241. Jiang HY, Wek SA, McGrath BC, Scheuner D, Kaufman RJ, Cavener DR, Wek RC. Phosphorylation of the alpha subunit of eukaryotic initiation factor 2 is required for activation of NF-kappaB in response to diverse cellular stresses. *Mol Cell Biol* 2003;23:5651-5663.
242. Seo J, Fortuno ES, 3rd, Suh JM, Stenesen D, Tang W, Parks EJ, Adams CM, et al. Atf4 regulates obesity, glucose homeostasis, and energy expenditure. *Diabetes* 2009;58:2565-2573.
243. Wei Y, Wang D, Pagliassotti MJ. Saturated fatty acid-mediated endoplasmic reticulum stress and apoptosis are augmented by trans-10, cis-12-conjugated linoleic acid in liver cells. *Mol Cell Biochem* 2007;303:105-113.
244. Egnatchik RA, Leamy AK, Noguchi Y, Shiota M, Young JD. Palmitate-induced activation of mitochondrial metabolism promotes oxidative stress and apoptosis in H4IIEC3 rat hepatocytes. *Metabolism* 2014;63:283-295.
245. Lake AD, Novak P, Hardwick RN, Flores-Keown B, Zhao F, Klimecki WT, Cherrington NJ. The adaptive endoplasmic reticulum stress response to lipotoxicity in progressive human nonalcoholic fatty liver disease. *Toxicol Sci* 2014;137:26-35.
246. Rautou PE, Mansouri A, Lebrec D, Durand F, Valla D, Moreau R. Autophagy in liver diseases. *J Hepatol* 2010;53:1123-1134.
247. Singh R, Kaushik S, Wang Y, Xiang Y, Novak I, Komatsu M, Tanaka K, et al. Autophagy regulates lipid metabolism. *Nature* 2009;458:1131-1135.
248. Jung CH, Ro SH, Cao J, Otto NM, Kim DH. mTOR regulation of autophagy. *FEBS Lett* 2010;584:1287-1295.
249. Porstmann T, Santos CR, Griffiths B, Cully M, Wu M, Leever S, Griffiths JR, et al. SREBP activity is regulated by mTORC1 and contributes to Akt-dependent cell growth. *Cell Metab* 2008;8:224-236.
250. Yang SQ, Lin HZ, Lane MD, Clemens M, Diehl AM. Obesity increases sensitivity to endotoxin liver injury: implications for the pathogenesis of steatohepatitis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:2557-2562.
251. Hritz I, Mandrekar P, Velayudham A, Catalano D, Dolganiuc A, Kodys K, Kurt-Jones E, et al. The critical role of toll-like receptor (TLR) 4 in alcoholic liver disease is independent of the common TLR adapter MyD88. *Hepatology* 2008;48:1224-1231.
252. Petrasek J, Dolganiuc A, Csak T, Kurt-Jones EA, Szabo G. Type I interferons protect from Toll-like receptor 9-associated liver injury and regulate IL-1 receptor antagonist in mice. *Gastroenterology* 2011;140:697-708 e694.
253. McClain CJ, Barve S, Deaciuc I. Good fat/bad fat. *Hepatology* 2007;45:1343-1346.
254. Gautheron J, Vucur M, Reisinger F, Cardenas DV, Roderburg C, Koppe C, Kreggenwinkel K, et al. A positive feedback loop between RIP3 and JNK controls non-alcoholic steatohepatitis. *EMBO Mol Med* 2014;6:1062-1074.
255. Petrasek J, Bala S, Csak T, Lippai D, Kodys K, Menashy V, Barrieau M, et al. IL-1 receptor antagonist ameliorates inflammasome-dependent alcoholic steatohepatitis in mice. *J Clin Invest* 2012;122:3476-3489.
256. Wree A, Eguchi A, McGeough MD, Pena CA, Johnson CD, Canbay A, Hoffman HM, et al. NLRP3 inflammasome activation results in hepatocyte pyroptosis, liver inflammation, and fibrosis in mice. *Hepatology* 2014;59:898-910.
257. Evans RM, Mangelsdorf DJ. Nuclear Receptors, RXR, and the Big Bang. *Cell* 2014;157:255-266.

258. Ducheix S, Montagner A, Theodorou V, Ferrier L, Guillou H. The liver X receptor: a master regulator of the gut-liver axis and a target for non alcoholic fatty liver disease. *Biochem Pharmacol* 2013;86:96-105.
259. Lopez-Velazquez JA, Carrillo-Cordova LD, Chavez-Tapia NC, Uribe M, Mendez-Sanchez N. Nuclear receptors in nonalcoholic fatty liver disease. *J Lipids* 2012;2012:139875.
260. Xu JY, Li ZP, Zhang L, Ji G. Recent insights into farnesoid X receptor in non-alcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol* 2014;20:13493-13500.
261. Wong J, Quinn CM, Gelissen IC, Brown AJ. Endogenous 24(S),25-epoxycholesterol fine-tunes acute control of cellular cholesterol homeostasis. *J Biol Chem* 2008;283:700-707.
262. Hong C, Tontonoz P. Liver X receptors in lipid metabolism: opportunities for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* 2014;13:433-444.
263. Ahn SB, Jang K, Jun DW, Lee BH, Shin KJ. Expression of liver X receptor correlates with intrahepatic inflammation and fibrosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Dig Dis Sci* 2014;59:2975-2982.
264. Ito A, Hong C, Rong X, Zhu X, Tarling EJ, Hedde PN, Gratton E, et al. LXRs link metabolism to inflammation through Abca1-dependent regulation of membrane composition and TLR signaling. *Elife* 2015;4:e08009.
265. Gill S, Chow R, Brown AJ. Sterol regulators of cholesterol homeostasis and beyond: the oxysterol hypothesis revisited and revised. *Prog Lipid Res* 2008;47:391-404.
266. Matsukuma KE, Bennett MK, Huang J, Wang L, Gil G, Osborne TF. Coordinated control of bile acids and lipogenesis through FXR-dependent regulation of fatty acid synthase. *J Lipid Res* 2006;47:2754-2761.
267. Costet P, Luo Y, Wang N, Tall AR. Sterol-dependent transactivation of the ABC1 promoter by the liver X receptor/retinoid X receptor. *J Biol Chem* 2000;275:28240-28245.
268. Kennedy MA, Venkateswaran A, Tarr PT, Xenarios I, Kudoh J, Shimizu N, Edwards PA. Characterization of the human ABCG1 gene: liver X receptor activates an internal promoter that produces a novel transcript encoding an alternative form of the protein. *J Biol Chem* 2001;276:39438-39447.
269. Ding L, Pang S, Sun Y, Tian Y, Yu L, Dang N. Coordinated actions of fxr and lxr in metabolism: from pathogenesis to pharmacological targets for type 2 diabetes. *Int J Endocrinol* 2014;2014:751859.
270. Tailleux A, Wouters K, Staels B. Roles of PPARs in NAFLD: potential therapeutic targets. *Biochim Biophys Acta* 2012;1821:809-818.
271. Francque S, Verrijken A, Caron S, Prawitt J, Paumelle R, Derudas B, Lefebvre P, et al. PPARalpha gene expression correlates with severity and histological treatment response in patients with non-alcoholic steatohepatitis. *J Hepatol* 2015;63:164-173.
272. Zhao W, Liu L, Wang Y, Mao T, Li J. Effects of a combination of puerarin, baicalin and berberine on the expression of proliferator-activated receptor-gamma and insulin receptor in a rat model of nonalcoholic fatty liver disease. *Exp Ther Med* 2016;11:183-190.
273. Tanaka N, Takahashi S, Zhang Y, Krausz KW, Smith PB, Patterson AD, Gonzalez FJ. Role of fibroblast growth factor 21 in the early stage of NASH induced by methionine- and choline-deficient diet. *Biochim Biophys Acta* 2015;1852:1242-1252.
274. Gervois P, Kleemann R, Pilon A, Percevault F, Koenig W, Staels B, Kooistra T. Global suppression of IL-6-induced acute phase response gene expression after chronic in vivo treatment with the peroxisome proliferator-activated receptor-alpha activator fenofibrate. *J Biol Chem* 2004;279:16154-16160.
275. Lalloyer F, Wouters K, Baron M, Caron S, Vallez E, Vanhoutte J, Bauge E, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha gene level differently affects lipid metabolism and inflammation in apolipoprotein E2 knock-in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2011;31:1573-1579.

276. Tanaka T, Yamamoto J, Iwasaki S, Asaba H, Hamura H, Ikeda Y, Watanabe M, et al. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor delta induces fatty acid beta-oxidation in skeletal muscle and attenuates metabolic syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:15924-15929.
277. Corton JC, Cunningham ML, Hummer BT, Lau C, Meek B, Peters JM, Popp JA, et al. Mode of action framework analysis for receptor-mediated toxicity: The peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) as a case study. *Crit Rev Toxicol* 2014;44:1-49.
278. Haczeyni F, Wang H, Barn V, Mridha AR, Yeh MM, Haigh WG, Ioannou GN, et al. The selective peroxisome proliferator-activated receptor-delta agonist seladelpar reverses nonalcoholic steatohepatitis pathology by abrogating lipotoxicity in diabetic obese mice. *Hepatol Commun* 2017;1:663-674.
279. Staels B, Rubenstrunk A, Noel B, Rigou G, Delataille P, Millatt LJ, Baron M, et al. Hepatoprotective effects of the dual peroxisome proliferator-activated receptor alpha/delta agonist, GFT505, in rodent models of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2013;58:1941-1952.
280. Tsukamoto H, She H, Hazra S, Cheng J, Miyahara T. Anti-adipogenic regulation underlies hepatic stellate cell transdifferentiation. *J Gastroenterol Hepatol* 2006;21 Suppl 3:S102-105.
281. Shan W, Nicol CJ, Ito S, Bility MT, Kennett MJ, Ward JM, Gonzalez FJ, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor-beta/delta protects against chemically induced liver toxicity in mice. *Hepatology* 2008;47:225-235.
282. Shan W, Palkar PS, Murray IA, McDevitt EI, Kennett MJ, Kang BH, Isom HC, et al. Ligand activation of peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta (PPARbeta/delta) attenuates carbon tetrachloride hepatotoxicity by downregulating proinflammatory gene expression. *Toxicol Sci* 2008;105:418-428.
283. Kawaguchi K, Sakaida I, Tsuchiya M, Omori K, Takami T, Okita K. Pioglitazone prevents hepatic steatosis, fibrosis, and enzyme-altered lesions in rat liver cirrhosis induced by a choline-deficient L-amino acid-defined diet. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;315:187-195.
284. Nagasawa T, Inada Y, Nakano S, Tamura T, Takahashi T, Maruyama K, Yamazaki Y, et al. Effects of bezafibrate, PPAR pan-agonist, and GW501516, PPARdelta agonist, on development of steatohepatitis in mice fed a methionine- and choline-deficient diet. *Eur J Pharmacol* 2006;536:182-191.
285. Stienstra R, Duval C, Muller M, Kersten S. PPARs, Obesity, and Inflammation. *PPAR Res* 2007;2007:95974.
286. Cave MC, Clair HB, Hardesty JE, Falkner KC, Feng W, Clark BJ, Sidey J, et al. Nuclear receptors and nonalcoholic fatty liver disease. *Biochim Biophys Acta* 2016;1859:1083-1099.
287. Fernandez-Miranda C, Perez-Carreras M, Colina F, Lopez-Alonso G, Vargas C, Solis-Herruzo JA. A pilot trial of fenofibrate for the treatment of non-alcoholic fatty liver disease. *Dig Liver Dis* 2008;40:200-205.
288. Haughton EL, Tucker SJ, Marek CJ, Durward E, Leel V, Bascal Z, Monaghan T, et al. Pregnane X receptor activators inhibit human hepatic stellate cell transdifferentiation in vitro. *Gastroenterology* 2006;131:194-209.
289. Wright MC. The impact of pregnane X receptor activation on liver fibrosis. *Biochem Soc Trans* 2006;34:1119-1123.
290. Sookoian S, Castano GO, Burgueno AL, Gianotti TF, Rosselli MS, Pirola CJ. The nuclear receptor PXR gene variants are associated with liver injury in nonalcoholic fatty liver disease. *Pharmacogenet Genomics* 2010;20:1-8.
291. Fromm MF, Kauffmann HM, Fritz P, Burk O, Kroemer HK, Warzok RW, Eichelbaum M, et al. The effect of rifampin treatment on intestinal expression of human MRP transporters. *Am J Pathol* 2000;157:1575-1580.

292. Zhou J, Zhai Y, Mu Y, Gong H, Uppal H, Toma D, Ren S, et al. A novel pregnane X receptor-mediated and sterol regulatory element-binding protein-independent lipogenic pathway. *J Biol Chem* 2006;281:15013-15020.
293. Maglich JM, Stoltz CM, Goodwin B, Hawkins-Brown D, Moore JT, Kliewer SA. Nuclear pregnane x receptor and constitutive androstane receptor regulate overlapping but distinct sets of genes involved in xenobiotic detoxification. *Mol Pharmacol* 2002;62:638-646.
294. Falkner KC, Pinaire JA, Xiao GH, Geoghegan TE, Prough RA. Regulation of the rat glutathione S-transferase A2 gene by glucocorticoids: involvement of both the glucocorticoid and pregnane X receptors. *Mol Pharmacol* 2001;60:611-619.
295. Zhou J, Febbraio M, Wada T, Zhai Y, Kuruba R, He J, Lee JH, et al. Hepatic fatty acid transporter Cd36 is a common target of LXR, PXR, and PPARgamma in promoting steatosis. *Gastroenterology* 2008;134:556-567.
296. Wada T, Gao J, Xie W. PXR and CAR in energy metabolism. *Trends Endocrinol Metab* 2009;20:273-279.
297. Li L, Li H, Garzel B, Yang H, Sueyoshi T, Li Q, Shu Y, et al. SLC13A5 is a novel transcriptional target of the pregnane X receptor and sensitizes drug-induced steatosis in human liver. *Mol Pharmacol* 2015;87:674-682.
298. Bitter A, Rummele P, Klein K, Kandel BA, Rieger JK, Nussler AK, Zanger UM, et al. Pregnane X receptor activation and silencing promote steatosis of human hepatic cells by distinct lipogenic mechanisms. *Arch Toxicol* 2015;89:2089-2103.
299. He J, Gao J, Xu M, Ren S, Stefanovic-Racic M, O'Doherty RM, Xie W. PXR ablation alleviates diet-induced and genetic obesity and insulin resistance in mice. *Diabetes* 2013;62:1876-1887.
300. Spruiell K, Richardson RM, Cullen JM, Awumey EM, Gonzalez FJ, Gyamfi MA. Role of pregnane X receptor in obesity and glucose homeostasis in male mice. *J Biol Chem* 2014;289:3244-3261.
301. Spruiell K, Jones DZ, Cullen JM, Awumey EM, Gonzalez FJ, Gyamfi MA. Role of human pregnane X receptor in high fat diet-induced obesity in pre-menopausal female mice. *Biochem Pharmacol* 2014;89:399-412.
302. Osabe M, Negishi M. Active ERK1/2 protein interacts with the phosphorylated nuclear constitutive active/androstane receptor (CAR; NR1H3), repressing dephosphorylation and sequestering CAR in the cytoplasm. *J Biol Chem* 2011;286:35763-35769.
303. Sidhu JS, Omiecinski CJ. An okadaic acid-sensitive pathway involved in the phenobarbital-mediated induction of CYP2B gene expression in primary rat hepatocyte cultures. *J Pharmacol Exp Ther* 1997;282:1122-1129.
304. Gachon F, Olela FF, Schaad O, Descombes P, Schibler U. The circadian PAR-domain basic leucine zipper transcription factors DBP, TEF, and HLF modulate basal and inducible xenobiotic detoxification. *Cell Metab* 2006;4:25-36.
305. Naik A, Belic A, Zanger UM, Rozman D. Molecular Interactions between NAFLD and Xenobiotic Metabolism. *Front Genet* 2013;4:2.
306. Dong B, Saha PK, Huang W, Chen W, Abu-Elheiga LA, Wakil SJ, Stevens RD, et al. Activation of nuclear receptor CAR ameliorates diabetes and fatty liver disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:18831-18836.
307. Gao J, He J, Zhai Y, Wada T, Xie W. The constitutive androstane receptor is an anti-obesity nuclear receptor that improves insulin sensitivity. *J Biol Chem* 2009;284:25984-25992.
308. Kodama S, Koike C, Negishi M, Yamamoto Y. Nuclear receptors CAR and PXR cross talk with FOXO1 to regulate genes that encode drug-metabolizing and gluconeogenic enzymes. *Mol Cell Biol* 2004;24:7931-7940.
309. Sberna AL, Assem M, Xiao R, Ayers S, Gautier T, Guiu B, Deckert V, et al. Constitutive androstane receptor activation decreases plasma apolipoprotein B-containing lipoproteins

- and atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2011;31:2232-2239.
310. Roth A, Looser R, Kaufmann M, Blattler SM, Rencurel F, Huang W, Moore DD, et al. Regulatory cross-talk between drug metabolism and lipid homeostasis: constitutive androstane receptor and pregnane X receptor increase Insig-1 expression. *Mol Pharmacol* 2008;73:1282-1289.
311. de Aguiar Vallim TQ, Tarling EJ, Edwards PA. Pleiotropic roles of bile acids in metabolism. *Cell Metab* 2013;17:657-669.
312. Inagaki T, Choi M, Moschetta A, Peng L, Cummins CL, McDonald JG, Luo G, et al. Fibroblast growth factor 15 functions as an enterohepatic signal to regulate bile acid homeostasis. *Cell Metab* 2005;2:217-225.
313. Jones SA. Physiology of FGF15/19. *Adv Exp Med Biol* 2012;728:171-182.
314. Xie MH, Holcomb I, Deuel B, Dowd P, Huang A, Vagts A, Foster J, et al. FGF-19, a novel fibroblast growth factor with unique specificity for FGFR4. *Cytokine* 1999;11:729-735.
315. Cyphert HA, Ge X, Kohan AB, Salati LM, Zhang Y, Hillgartner FB. Activation of the farnesoid X receptor induces hepatic expression and secretion of fibroblast growth factor 21. *J Biol Chem* 2012;287:25123-25138.
316. Lin Z, Tian H, Lam KS, Lin S, Hoo RC, Konishi M, Itoh N, et al. Adiponectin mediates the metabolic effects of FGF21 on glucose homeostasis and insulin sensitivity in mice. *Cell Metab* 2013;17:779-789.
317. Kunne C, Acco A, Duijst S, de Waart DR, Paulusma CC, Gaemers I, Oude Elferink RP. FXR-dependent reduction of hepatic steatosis in a bile salt deficient mouse model. *Biochim Biophys Acta* 2014;1842:739-746.
318. Shen LL, Liu H, Peng J, Gan L, Lu L, Zhang Q, Li L, et al. Effects of farnesoid X receptor on the expression of the fatty acid synthetase and hepatic lipase. *Mol Biol Rep* 2011;38:553-559.
319. Watanabe M, Houten SM, Wang L, Moschetta A, Mangelsdorf DJ, Heyman RA, Moore DD, et al. Bile acids lower triglyceride levels via a pathway involving FXR, SHP, and SREBP-1c. *J Clin Invest* 2004;113:1408-1418.
320. Ma Y, Huang Y, Yan L, Gao M, Liu D. Synthetic FXR agonist GW4064 prevents diet-induced hepatic steatosis and insulin resistance. *Pharm Res* 2013;30:1447-1457.
321. Urizar NL, Liverman AB, Dodds DT, Silva FV, Ordentlich P, Yan Y, Gonzalez FJ, et al. A natural product that lowers cholesterol as an antagonist ligand for FXR. *Science* 2002;296:1703-1706.
322. Huang H, Yu Y, Gao Z, Zhang Y, Li C, Xu X, Jin H, et al. Discovery and optimization of 1,3,4-trisubstituted-pyrazolone derivatives as novel, potent, and nonsteroidal farnesoid X receptor (FXR) selective antagonists. *J Med Chem* 2012;55:7037-7053.
323. Xu X, Xu X, Liu P, Zhu ZY, Chen J, Fu HA, Chen LL, et al. Structural Basis for Small Molecule NDB (N-Benzyl-N-(3-(tert-butyl)-4-hydroxyphenyl)-2,6-dichloro-4-(dimethylamino) Benzamide) as a Selective Antagonist of Farnesoid X Receptor alpha (FXRalpha) in Stabilizing the Homodimerization of the Receptor. *J Biol Chem* 2015;290:19888-19899.
324. Mudaliar S, Henry RR, Sanyal AJ, Morrow L, Marschall HU, Kipnes M, Adorini L, et al. Efficacy and safety of the farnesoid X receptor agonist obeticholic acid in patients with type 2 diabetes and nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 2013;145:574-582 e571.
325. Watanabe M, Horai Y, Houten SM, Morimoto K, Sugizaki T, Arita E, Mataka C, et al. Lowering bile acid pool size with a synthetic farnesoid X receptor (FXR) agonist induces obesity and diabetes through reduced energy expenditure. *J Biol Chem* 2011;286:26913-26920.
326. Zhang Y, Lee FY, Barrera G, Lee H, Vales C, Gonzalez FJ, Willson TM, et al. Activation of the nuclear receptor FXR improves hyperglycemia and hyperlipidemia in diabetic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:1006-1011.

327. Yamagata K, Daitoku H, Shimamoto Y, Matsuzaki H, Hirota K, Ishida J, Fukamizu A. Bile acids regulate gluconeogenic gene expression via small heterodimer partner-mediated repression of hepatocyte nuclear factor 4 and Foxo1. *J Biol Chem* 2004;279:23158-23165.
328. Kassam A, Winrow CJ, Fernandez-Rachubinski F, Capone JP, Rachubinski RA. The peroxisome proliferator response element of the gene encoding the peroxisomal beta-oxidation enzyme enoyl-CoA hydratase/3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase is a target for constitutive androstane receptor beta/9-cis-retinoic acid receptor-mediated transactivation. *J Biol Chem* 2000;275:4345-4350.
329. Zhai Y, Wada T, Zhang B, Khadem S, Ren S, Kuruba R, Li S, et al. A functional cross-talk between liver X receptor-alpha and constitutive androstane receptor links lipogenesis and xenobiotic responses. *Mol Pharmacol* 2010;78:666-674.
330. Kojetin DJ, Burris TP. REV-ERB and ROR nuclear receptors as drug targets. *Nat Rev Drug Discov* 2014;13:197-216.
331. Petan T, Jarc E, Jusovic M. Lipid droplets in cancer: Guardians of fat in a stressful world. *Molecules* 2018;23.
332. Bersuker K, Peterson CWH, To M, Sahl SJ, Savikhin V, Grossman EA, Nomura DK, et al. A Proximity labeling strategy provides insights into the composition and dynamics of lipid droplet proteomes. *Dev Cell* 2018;44:97-112 e117.
333. Kory N, Farese RV, Jr., Walther TC. Targeting Fat: Mechanisms of protein localization to lipid droplets. *Trends Cell Biol* 2016;26:535-546.
334. Zhang S, Wang Y, Cui L, Deng Y, Xu S, Yu J, Cichello S, et al. Morphologically and functionally distinct lipid droplet subpopulations. *Sci Rep* 2016;6:29539.
335. Kraemer N, Farese RV, Jr., Walther TC. Balancing the fat: lipid droplets and human disease. *EMBO Mol Med* 2013;5:973-983.
336. Greenberg AS, Coleman RA, Kraemer FB, McManaman JL, Obin MS, Puri V, Yan QW, et al. The role of lipid droplets in metabolic disease in rodents and humans. *J Clin Invest* 2011;121:2102-2110.
337. Thiam AR, Foret L. The physics of lipid droplet nucleation, growth and budding. *Biochim Biophys Acta* 2016;1861:715-722.
338. Olzmann JA, Carvalho P. Dynamics and functions of lipid droplets. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2019;20:137-155.
339. Gomez-Navarro N, Miller EA. COP-coated vesicles. *Curr Biol* 2016;26:R54-R57.
340. Ben M'barek K, Ajjaji D, Chorlay A, Vanni S, Foret L, Thiam AR. RE membrane phospholipids and surface tension control cellular lipid droplet formation. *Dev Cell* 2017;41:591-604 e597.
341. Fei W, Shui G, Zhang Y, Kraemer N, Ferguson C, Kapterian TS, Lin RC, et al. A role for phosphatidic acid in the formation of "supersized" lipid droplets. *PLoS Genet* 2011;7:e1002201.
342. Skinner JR, Shew TM, Schwartz DM, Tzekov A, Lepus CM, Abumrad NA, Wolins NE. Diacylglycerol enrichment of endoplasmic reticulum or lipid droplets recruits perilipin 3/TIP47 during lipid storage and mobilization. *J Biol Chem* 2009;284:30941-30948.
343. Choudhary V, Golani G, Joshi AS, Cottier S, Schneiter R, Prinz WA, Kozlov MM. Architecture of lipid droplets in endoplasmic reticulum is determined by phospholipid intrinsic curvature. *Curr Biol* 2018;28:915-926 e919.
344. Bulankina AV, Deggerich A, Wenzel D, Mutenda K, Wittmann JG, Rudolph MG, Burger KN, et al. TIP47 functions in the biogenesis of lipid droplets. *J Cell Biol* 2009;185:641-655.
345. Wang H, Becuwe M, Housden BE, Chitraju C, Porras AJ, Graham MM, Liu XN, et al. Seipin is required for converting nascent to mature lipid droplets. *Elife* 2016;5.
346. Salo VT, Belevich I, Li S, Karhinen L, Vihinen H, Vigouroux C, Magre J, et al. Seipin regulates RE-lipid droplet contacts and cargo delivery. *EMBO J* 2016;35:2699-2716.
347. Grippa A, Buxo L, Mora G, Funaya C, Idrissi FZ, Mancuso F, Gomez R, et al. The seipin complex Fld1/Ldb16 stabilizes RE-lipid droplet contact sites. *J Cell Biol* 2015;211:829-844.

348. Kadereit B, Kumar P, Wang WJ, Miranda D, Snapp EL, Severina N, Torregroza I, et al. Evolutionarily conserved gene family important for fat storage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:94-99.
349. Gross DA, Zhan C, Silver DL. Direct binding of triglyceride to fat storage-inducing transmembrane proteins 1 and 2 is important for lipid droplet formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;108:19581-19586.
350. Wilfling F, Wang H, Haas JT, Krahmer N, Gould TJ, Uchida A, Cheng JX, et al. Triacylglycerol synthesis enzymes mediate lipid droplet growth by relocalizing from the RE to lipid droplets. *Dev Cell* 2013;24:384-399.
351. Wilfling F, Thiam AR, Olarte MJ, Wang J, Beck R, Gould TJ, Allgeyer ES, et al. Arf1/COPI machinery acts directly on lipid droplets and enables their connection to the RE for protein targeting. *Elife* 2014;3:e01607.
352. Thiam AR, Antonny B, Wang J, Delacotte J, Wilfling F, Walther TC, Beck R, et al. COPI buds 60-nm lipid droplets from reconstituted water-phospholipid-triacylglyceride interfaces, suggesting a tension clamp function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013;110:13244-13249.
353. Ingelmo-Torres M, Gonzalez-Moreno E, Kassan A, Hanzal-Bayer M, Tebar F, Herms A, Grewal T, et al. Hydrophobic and basic domains target proteins to lipid droplets. *Traffic* 2009;10:1785-1801.
354. Schrul B, Kopito RR. Peroxin-dependent targeting of a lipid-droplet-destined membrane protein to RE subdomains. *Nat Cell Biol* 2016;18:740-751.
355. Ruggiano A, Foresti O, Carvalho P. Quality control: RE-associated degradation: protein quality control and beyond. *J Cell Biol* 2014;204:869-879.
356. Stevenson J, Huang EY, Olzmann JA. Endoplasmic reticulum-associated degradation and lipid homeostasis. *Annu Rev Nutr* 2016;36:511-542.
357. Prevost C, Sharp ME, Kory N, Lin Q, Voth GA, Farese RV, Jr., Walther TC. Mechanism and determinants of amphipathic helix-containing protein targeting to lipid droplets. *Dev Cell* 2018;44:73-86 e74.
358. Copic A, Antoine-Bally S, Gimenez-Andres M, La Torre Garay C, Antonny B, Manni MM, Pagnotta S, et al. A giant amphipathic helix from a perilipin that is adapted for coating lipid droplets. *Nat Commun* 2018;9:1332.
359. Pataki CI, Rodrigues J, Zhang L, Qian J, Efron B, Hastie T, Elias JE, et al. Proteomic analysis of monolayer-integrated proteins on lipid droplets identifies amphipathic interfacial alpha-helical membrane anchors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2018;115:E8172-E8180.
360. Bacle A, Gautier R, Jackson CL, Fuchs PFJ, Vanni S. Interdigitation between triglycerides and lipids modulates surface properties of lipid droplets. *Biophys J* 2017;112:1417-1430.
361. Rowe RE, Mimmack ML, Barbosa AD, Haider A, Isaac I, Ouberai MM, Thiam AR, et al. Conserved amphipathic helices mediate lipid droplet targeting of perilipins 1-3. *J Biol Chem* 2016;291:6664-6678.
362. Valm AM, Cohen S, Legant WR, Melunis J, Hershberg U, Wait E, Cohen AR, et al. Applying systems-level spectral imaging and analysis to reveal the organelle interactome. *Nature* 2017;546:162-167.
363. Xu D, Li Y, Wu L, Li Y, Zhao D, Yu J, Huang T, et al. Rab18 promotes lipid droplet (LD) growth by tethering the RE to LDs through SNARE and NRZ interactions. *J Cell Biol* 2018;217:975-995.
364. Markgraf DF, Klemm RW, Junker M, Hannibal-Bach HK, Ejsing CS, Rapoport TA. An RE protein functionally couples neutral lipid metabolism on lipid droplets to membrane lipid synthesis in the RE. *Cell Rep* 2014;6:44-55.
365. Ohsaki Y, Kawai T, Yoshikawa Y, Cheng J, Jokitalo E, Fujimoto T. PML isoform II plays a critical role in nuclear lipid droplet formation. *J Cell Biol* 2016;212:29-38.
366. Romanauska A, Kohler A. The inner nuclear membrane is a metabolically active territory that generates nuclear lipid droplets. *Cell* 2018;174:700-715 e718.

367. Gallardo-Montejano VI, Saxena G, Kusminski CM, Yang C, McAfee JL, Hahner L, Hoch K, et al. Nuclear Perilipin 5 integrates lipid droplet lipolysis with PGC-1alpha/SIRT1-dependent transcriptional regulation of mitochondrial function. *Nat Commun* 2016;7:12723.
368. Schroeder B, Schulze RJ, Weller SG, Sletten AC, Casey CA, McNiven MA. The small GTPase Rab7 as a central regulator of hepatocellular lipophagy. *Hepatology* 2015;61:1896-1907.
369. Kaushik S, Cuervo AM. Degradation of lipid droplet-associated proteins by chaperone-mediated autophagy facilitates lipolysis. *Nat Cell Biol* 2015;17:759-770.
370. Kaushik S, Cuervo AM. The coming of age of chaperone-mediated autophagy. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2018;19:365-381.
371. Kaushik S, Cuervo AM. AMPK-dependent phosphorylation of lipid droplet protein PLIN2 triggers its degradation by CMA. *Autophagy* 2016;12:432-438.
372. Takahashi Y, Shinoda A, Kamada H, Shimizu M, Inoue J, Sato R. Perilipin2 plays a positive role in adipocytes during lipolysis by escaping proteasomal degradation. *Sci Rep* 2016;6:20975.
373. Xu G, Sztalryd C, Londos C. Degradation of perilipin is mediated through ubiquitination-proteasome pathway. *Biochim Biophys Acta* 2006;1761:83-90.
374. Masuda Y, Itabe H, Odaki M, Hama K, Fujimoto Y, Mori M, Sasabe N, et al. ADRP/adipophilin is degraded through the proteasome-dependent pathway during regression of lipid-storing cells. *J Lipid Res* 2006;47:87-98.
375. Eastman SW, Yassaee M, Bieniasz PD. A role for ubiquitin ligases and Spartin/SPG20 in lipid droplet turnover. *J Cell Biol* 2009;184:881-894.
376. Nguyen TB, Louie SM, Daniele JR, Tran Q, Dillin A, Zoncu R, Nomura DK, et al. DGAT1-dependent lipid droplet biogenesis protects mitochondrial function during starvation-induced autophagy. *Dev Cell* 2017;42:9-21 e25.
377. Rambold AS, Cohen S, Lippincott-Schwartz J. Fatty acid trafficking in starved cells: regulation by lipid droplet lipolysis, autophagy, and mitochondrial fusion dynamics. *Dev Cell* 2015;32:678-692.
378. Cerk IK, Wechselberger L, Oberer M. Adipose triglyceride lipase regulation: an overview. *Curr Protein Pept Sci* 2018;19:221-233.
379. Itabe H, Yamaguchi T, Nimura S, Sasabe N. Perilipins: a diversity of intracellular lipid droplet proteins. *Lipids Health Dis* 2017;16:83.
380. Sztalryd C, Brasaemle DL. The perilipin family of lipid droplet proteins: Gatekeepers of intracellular lipolysis. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids* 2017;1862:1221-1232.
381. Benador IY, Veliova M, Mahdavian K, Petcherski A, Wikstrom JD, Assali EA, Acin-Perez R, et al. Mitochondria bound to lipid droplets have unique bioenergetics, composition, and dynamics that support lipid droplet expansion. *Cell Metab* 2018;27:869-885 e866.
382. Wang H, Sreenivasan U, Hu H, Saladino A, Polster BM, Lund LM, Gong DW, et al. Perilipin 5, a lipid droplet-associated protein, provides physical and metabolic linkage to mitochondria. *J Lipid Res* 2011;52:2159-2168.
383. Granneman JG, Moore HP, Mottillo EP, Zhu Z, Zhou L. Interactions of perilipin-5 (Plin5) with adipose triglyceride lipase. *J Biol Chem* 2011;286:5126-5135.
384. Schreiber R, Xie H, Schweiger M. Of mice and men: The physiological role of adipose triglyceride lipase (ATGL). *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids* 2019;1864:880-899.
385. Cornaciu I, Boeszoermyenyi A, Lindermuth H, Nagy HM, Cerk IK, Ebner C, Salzburger B, et al. The minimal domain of adipose triglyceride lipase (ATGL) ranges until leucine 254 and can be activated and inhibited by CGI-58 and GOS2, respectively. *PLoS One* 2011;6:e26349.
386. Zhang X, Saarinen AM, Hitosugi T, Wang Z, Wang L, Ho TH, Liu J. Inhibition of intracellular lipolysis promotes human cancer cell adaptation to hypoxia. *Elife* 2017;6.
387. Huang KT, Lin CC, Tsai MC, Chen KD, Chiu KW. Pigment epithelium-derived factor in lipid metabolic disorders. *Biomed J* 2018;41:102-108.

388. Gong J, Sun Z, Wu L, Xu W, Schieber N, Xu D, Shui G, et al. Fsp27 promotes lipid droplet growth by lipid exchange and transfer at lipid droplet contact sites. *J Cell Biol* 2011;195:953-963.
389. Chapman AB, Knight DM, Dieckmann BS, Ringold GM. Analysis of gene expression during differentiation of adipogenic cells in culture and hormonal control of the developmental program. *J Biol Chem* 1984;259:15548-15555.
390. Gao G, Chen FJ, Zhou L, Su L, Xu D, Xu L, Li P. Control of lipid droplet fusion and growth by CIDE family proteins. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids* 2017;1862:1197-1204.
391. Guillen N, Navarro MA, Arnal C, Noone E, Arbones-Mainar JM, Acin S, Surra JC, et al. Microarray analysis of hepatic gene expression identifies new genes involved in steatotic liver. *Physiol Genomics* 2009;37:187-198.
392. Inohara N, Koseki T, Chen S, Wu X, Nunez G. CIDE, a novel family of cell death activators with homology to the 45 kDa subunit of the DNA fragmentation factor. *EMBO J* 1998;17:2526-2533.
393. Lugovskoy AA, Zhou P, Chou JJ, McCarty JS, Li P, Wagner G. Solution structure of the CIDE-N domain of CIDE-B and a model for CIDE-N/CIDE-N interactions in the DNA fragmentation pathway of apoptosis. *Cell* 1999;99:747-755.
394. Puri V, Konda S, Ranjit S, Aouadi M, Chawla A, Chouinard M, Chakladar A, et al. Fat-specific protein 27, a novel lipid droplet protein that enhances triglyceride storage. *J Biol Chem* 2007;282:34213-34218.
395. Puri V, Virbasius JV, Guilherme A, Czech MP. RNAi screens reveal novel metabolic regulators: RIP140, MAP4k4 and the lipid droplet associated fat specific protein (FSP) 27. *Acta Physiol (Oxf)* 2008;192:103-115.
396. Brasaemle DL, Dolios G, Shapiro L, Wang R. Proteomic analysis of proteins associated with lipid droplets of basal and lipolytically stimulated 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem* 2004;279:46835-46842.
397. Jambunathan S, Yin J, Khan W, Tamori Y, Puri V. FSP27 promotes lipid droplet clustering and then fusion to regulate triglyceride accumulation. *PLoS One* 2011;6:e28614.
398. Xu WY, Wu LZ, Yu M, Chen FJ, Arshad M, Xia XY, Ren H, et al. Differential roles of Cell death-inducing DNA fragmentation factor-alpha-like effector (CIDE) proteins in promoting lipid droplet fusion and growth in subpopulations of hepatocytes. *Journal of Biological Chemistry* 2016;291:4282-4293.
399. Xu X, Park JG, So JS, Lee AH. Transcriptional Activation of Fsp27 by the liver-enriched transcription factor CREBH promotes lipid droplet growth and hepatic steatosis. *Hepatology* 2015;61:857-869.
400. Yu S, Matsusue K, Kashireddy P, Cao WQ, Yeldandi V, Yeldandi AV, Rao MS, et al. Adipocyte-specific gene expression and adipogenic steatosis in the mouse liver due to peroxisome proliferator-activated receptor gamma1 (PPARgamma1) overexpression. *J Biol Chem* 2003;278:498-505.
401. Grahn TH, Zhang Y, Lee MJ, Sommer AG, Mostoslavsky G, Fried SK, Greenberg AS, et al. FSP27 and PLIN1 interaction promotes the formation of large lipid droplets in human adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2013;432:296-301.
402. Sun Z, Gong J, Wu H, Xu W, Wu L, Xu D, Gao J, et al. Perilipin1 promotes unilocular lipid droplet formation through the activation of Fsp27 in adipocytes. *Nat Commun* 2013;4:1594.
403. Liu P, Ying Y, Zhao Y, Mundy DI, Zhu M, Anderson RG. Chinese hamster ovary K2 cell lipid droplets appear to be metabolic organelles involved in membrane traffic. *J Biol Chem* 2004;279:3787-3792.
404. Wu L, Xu D, Zhou L, Xie B, Yu L, Yang H, Huang L, et al. Rab8a-AS160-MSS4 regulatory circuit controls lipid droplet fusion and growth. *Dev Cell* 2014;30:378-393.
405. Yonezawa T, Kurata R, Kimura M, Inoko H. Which CIDE are you on? Apoptosis and energy metabolism. *Mol Biosyst* 2011;7:91-100.

406. Qian H, Chen Y, Nian Z, Su L, Yu H, Chen FJ, Zhang X, et al. HDAC6-mediated acetylation of lipid droplet-binding protein CIDEA regulates fat-induced lipid storage. *J Clin Invest* 2017;127:1353-1369.
407. Klemm EJ, Spooner E, Ploegh HL. Dual role of ancient ubiquitous protein 1 (AUP1) in lipid droplet accumulation and endoplasmic reticulum (RE) protein quality control. *J Biol Chem* 2011;286:37602-37614.
408. Lohmann D, Spandl J, Stevanovic A, Schoene M, Philippou-Massier J, Thiele C. Monoubiquitination of ancient ubiquitous protein 1 promotes lipid droplet clustering. *PLoS One* 2013;8:e72453.
409. Cordain L, Eaton SB, Sebastian A, Mann N, Lindeberg S, Watkins BA, O'Keefe JH, et al. Origins and evolution of the Western diet: health implications for the 21st century. *Am J Clin Nutr* 2005;81:341-354.
410. Estruch R, Ros E, Salas-Salvado J, Covas MI, Corella D, Aros F, Gomez-Gracia E, et al. Primary prevention of cardiovascular disease with a Mediterranean diet. *N Engl J Med* 2013;368:1279-1290.
411. Lou-Bonafonte JM, Arnal C, Navarro MA, Osada J. Efficacy of bioactive compounds from extra virgin olive oil to modulate atherosclerosis development. *Mol Nutr Food Res* 2012;56:1043-1057.
412. Keys A, Menotti A, Karvonen MJ, Aravanis C, Blackburn H, Buzina R, Djordjevic BS, et al. The diet and 15-year death rate in the seven countries study. *Am J Epidemiol* 1986;124:903-915.
413. Lou-Bonafonte JM, Martinez-Beamonte R, Sanclemente T, Surra JC, Herrera-Marcos LV, Sanchez-Marco J, Arnal C, et al. Current insights into the biological action of squalene. *Mol Nutr Food Res* 2018:e1800136.
414. Garcia-Bermudez J, Baudrier L, Bayraktar EC, Shen Y, La K, Guarecuco R, Yucel B, et al. Squalene accumulation in cholesterol auxotrophic lymphomas prevents oxidative cell death. *Nature* 2019;567:118-122.
415. de Jong A, Cheng TY, Huang S, Gras S, Birkinshaw RW, Kasmar AG, Van Rhijn I, et al. CD1a-autoreactive T cells recognize natural skin oils that function as headless antigens. *Nat Immunol* 2014;15:177-185.
416. Ravi Kumar S, Narayan B, Kizawa Y, Hosokawa M, Miyashita K. Does squalene alter the antioxidant potential of astaxanthin and fucoxanthinol? In vitro evidence in RAW 264.7 cells, a murine macrophage. *J Food Sci Technol* 2016;53:2139-2143.
417. Gabas-Rivera C, Barranquero C, Martinez-Beamonte R, Navarro MA, Surra JC, Osada J. Dietary squalene increases high density lipoprotein-cholesterol and paraoxonase 1 and decreases oxidative stress in mice. *PLoS One* 2014;9:e104224.
418. Hoang TM, Nguyen CH, Le TT, Hoang TH, Ngo TH, Hoang TL, Dang DH. Squalene isolated from *Schizochytrium mangrovei* is a peroxisome proliferator-activated receptor- α agonist that regulates lipid metabolism in HepG2 cells. *Biotechnol Lett* 2016;38:1065-1071.
419. Sancho-Knapik S, Gabas-Rivera C, Gascon S, Romanos E, Martinez-Beamonte R, Navarro MA, Surra JC, et al. Diet and sexual hormones regulate hepatic synaptotagmin 1 mRNA in mice. *Front Biosci (Elite Ed)* 2016;8:129-142.
420. de Castro LI, Soares RA, Saldiva PH, Ferrari RA, Miguel AM, Almeida CA, Areas JA. Amaranth oil increased fecal excretion of bile acid but had no effect in reducing plasma cholesterol in hamsters. *Lipids* 2013;48:609-618.
421. Ramirez-Torres A, Barcelo-Batlloiri S, Fernandez-Vizarra E, Navarro MA, Arnal C, Guillen N, Acin S, et al. Proteomics and gene expression analyses of mitochondria from squalene-treated apoE-deficient mice identify short-chain specific acyl-CoA dehydrogenase changes associated with fatty liver amelioration. *J Proteomics* 2012;75:2563-2575.
422. Ramírez-Torres AG-R, C.; and Osada, J.: Products from olive tree. In: Boskou D, Clodoveo, M. L., ed. Rijeka: InTech, 2016,.

423. Petersen KF, Dufour S, Hariri A, Nelson-Williams C, Foo JN, Zhang XM, Dziura J, et al. Apolipoprotein C3 gene variants in nonalcoholic fatty liver disease. *N Engl J Med* 2010;362:1082-1089.
424. Speliotes EK, Yerges-Armstrong LM, Wu J, Hernaez R, Kim LJ, Palmer CD, Gudnason V, et al. Genome-wide association analysis identifies variants associated with nonalcoholic fatty liver disease that have distinct effects on metabolic traits. *PLoS Genet* 2011;7:e1001324.
425. Hasin Y, Seldin M, Lusis A. Multi-omics approaches to disease. *Genome Biol* 2017;18:83.
426. Dina C, Meyre D, Gallina S, Durand E, Korner A, Jacobson P, Carlsson LM, et al. Variation in FTO contributes to childhood obesity and severe adult obesity. *Nat Genet* 2007;39:724-726.
427. Frayling TM, Timpson NJ, Weedon MN, Zeggini E, Freathy RM, Lindgren CM, Perry JR, et al. A common variant in the FTO gene is associated with body mass index and predisposes to childhood and adult obesity. *Science* 2007;316:889-894.
428. Grunnet LG, Nilsson E, Ling C, Hansen T, Pedersen O, Groop L, Vaag A, et al. Regulation and function of FTO mRNA expression in human skeletal muscle and subcutaneous adipose tissue. *Diabetes* 2009;58:2402-2408.
429. Kloting N, Schleinitz D, Ruschke K, Berndt J, Fasshauer M, Tonjes A, Schon MR, et al. Inverse relationship between obesity and FTO gene expression in visceral adipose tissue in humans. *Diabetologia* 2008;51:641-647.
430. Smemo S, Tena JJ, Kim KH, Gamazon RE, Sakabe NJ, Gomez-Marin C, Aneas I, et al. Obesity-associated variants within FTO form long-range functional connections with IRX3. *Nature* 2014;507:371-375.
431. Piunti A, Shilatifard A. Epigenetic balance of gene expression by Polycomb and COMPASS families. *Science* 2016;352:aad9780.
432. Zhu J, Adli M, Zou JY, Verstappen G, Coyne M, Zhang X, Durham T, et al. Genome-wide chromatin state transitions associated with developmental and environmental cues. *Cell* 2013;152:642-654.
433. Aagaard-Tillery KM, Grove K, Bishop J, Ke X, Fu Q, McKnight R, Lane RH. Developmental origins of disease and determinants of chromatin structure: maternal diet modifies the primate fetal epigenome. *J Mol Endocrinol* 2008;41:91-102.
434. Hardy T, Mann DA. Epigenetics in liver disease: from biology to therapeutics. *Gut* 2016;65:1895-1905.
435. Zeybel M, Hardy T, Robinson SM, Fox C, Anstee QM, Ness T, Masson S, et al. Differential DNA methylation of genes involved in fibrosis progression in non-alcoholic fatty liver disease and alcoholic liver disease. *Clin Epigenetics* 2015;7:25.
436. Cazanave S, Podtelezhnikov A, Jensen K, Seneshaw M, Kumar DP, Min HK, Santhekadur PK, et al. The transcriptomic signature of disease development and progression of nonalcoholic fatty liver disease. *Sci Rep* 2017;7:17193.
437. Yang W, He Y, Liu S, Gan L, Zhang Z, Wang J, Liang J, et al. Integrative transcriptomic analysis of NAFLD animal model reveals dysregulated genes and pathways in metabolism. *Gene* 2016;595:99-108.
438. Eletto D, Leone A, Bifulco M, Tecce MF. Effect of unsaturated fat intake from Mediterranean diet on rat liver mRNA expression profile: selective modulation of genes involved in lipid metabolism. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2005;15:13-23.
439. Park JC, Kim SC, Lee SD, Jang HC, Kim NK, Lee SH, Jung HJ, et al. Effects of dietary fat types on growth performance, pork quality, and gene expression in growing-finishing pigs. *Asian-Australas J Anim Sci* 2012;25:1759-1767.
440. Deng X, Elam MB, Wilcox HG, Cagen LM, Park EA, Raghov R, Patel D, et al. Dietary olive oil and menhaden oil mitigate induction of lipogenesis in hyperinsulinemic corpulent JCR:LA-cp rats: microarray analysis of lipid-related gene expression. *Endocrinology* 2004;145:5847-5861.

441. Guillen N, Acin S, Surra JC, Arnal C, Godino J, Garcia-Granados A, Muniesa P, et al. Apolipoprotein E determines the hepatic transcriptional profile of dietary maslinic acid in mice. *J Nutr Biochem* 2009;20:882-893.
442. Gabas-Rivera C, Martinez-Beamonte R, Rios JL, Navarro MA, Surra JC, Arnal C, Rodriguez-Yoldi MJ, et al. Dietary oleanolic acid mediates circadian clock gene expression in liver independently of diet and animal model but requires apolipoprotein A1. *J Nutr Biochem* 2013;24:2100-2109.
443. Misra BB, Langefeld CD, Olivier M, Cox LA. Integrated omics: tools, advances, and future approaches. *J Mol Endocrinol* 2018.
444. te Pas MF, Koopmans SJ, Kruijt L, Calus MP, Smits MA. Plasma proteome profiles associated with diet-induced metabolic syndrome and the early onset of metabolic syndrome in a pig model. *PLoS One* 2013;8:e73087.
445. Bassols A, Costa C, Eckersall PD, Osada J, Sabria J, Tibau J. The pig as an animal model for human pathologies: A proteomics perspective. *Proteomics Clin Appl* 2014;8:715-731.
446. Bell LN, Lee L, Saxena R, Bemis KG, Wang M, Theodorakis JL, Vuppalanchi R, et al. Serum proteomic analysis of diet-induced steatohepatitis and metabolic syndrome in the Ossabaw miniature swine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2010;298:G746-754.
447. Beck HC, Nielsen EC, Matthiesen R, Jensen LH, Sehested M, Finn P, Grauslund M, et al. Quantitative proteomic analysis of post-translational modifications of human histones. *Mol Cell Proteomics* 2006;5:1314-1325.
448. Mann M, Jensen ON. Proteomic analysis of post-translational modifications. *Nat Biotechnol* 2003;21:255-261.
449. Deutsch EW, Orchard S, Binz PA, Bittremieux W, Eisenacher M, Hermjakob H, Kawano S, et al. Proteomics standards initiative: fifteen years of progress and future Work. *J Proteome Res* 2017;16:4288-4298.
450. Tu LN, Showalter MR, Cajka T, Fan S, Pillai VV, Fiehn O, Selvaraj V. Metabolomic characteristics of cholesterol-induced non-obese nonalcoholic fatty liver disease in mice. *Sci Rep* 2017;7:6120.
451. Hanhineva K, Barri T, Kolehmainen M, Pekkinen J, Pihlajamaki J, Vesterbacka A, Solano-Aguilar G, et al. Comparative nontargeted profiling of metabolic changes in tissues and biofluids in high-fat diet-fed Ossabaw pig. *J Proteome Res* 2013;12:3980-3992.
452. Papandreou C, Bullo M, Tinahones FJ, Martinez-Gonzalez MA, Corella D, Fragkiadakis GA, Lopez-Miranda J, et al. Serum metabolites in non-alcoholic fatty-liver disease development or reversion; a targeted metabolomic approach within the PREDIMED trial. *Nutr Metab (Lond)* 2017;14:58.
453. ATCC. AML12 (ATCC® CRL-2254™). In <https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CRL-2254.aspx#characteristics>; 2016. Access date: 20 may 2019
454. Ministerio de agricultura pya. Informe sobre usos de animales en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia en 2017. In. https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/produccion-y-mercados-ganaderos/20181107informedeusodeanimalesen2017_tcm30-485284.pdf; Ministerio de agricultura, pesca y alimentacion; 2018. Access date: 20 may 2019
455. von Scheidt M, Zhao Y, Kurt Z, Pan C, Zeng L, Yang X, Schunkert H, et al. Applications and limitations of mouse models for understanding human atherosclerosis. *Cell Metab* 2017;25:248-261.
456. Consortium I. INFRAFRONTIER--providing mutant mouse resources as research tools for the international scientific community. *Nucleic Acids Res* 2015;43:D1171-1175.
457. Infrafrontier. EMMA mouse resources. In; 2019.
458. Getz GS, Reardon CA. ApoE knockout and knockin mice: the history of their contribution to the understanding of atherogenesis. *J Lipid Res* 2016;57:758-766.

459. Goldstein JL, Brown MS. A century of cholesterol and coronaries: from plaques to genes to statins. *Cell* 2015;161:161-172.
460. Sugden MC, Caton PW, Holness MJ. PPAR control: it's SIRTainly as easy as PGC. *J Endocrinol* 2010;204:93-104.
461. Lunney JK. Advances in swine biomedical model genomics. *Int J Biol Sci* 2007;3:179-184.
462. Pracy JP, White A, Mustafa Y, Smith D, Perry ME. The comparative anatomy of the pig middle ear cavity: a model for middle ear inflammation in the human? *J Anat* 1998;192 (Pt 3):359-368.
463. Book SA, Bustad LK. The fetal and neonatal pig in biomedical research. *J Anim Sci* 1974;38:997-1002.
464. Miller RE, Ullrey DE. The pig as a model for human nutrition. *Annu Rev Nutr* 1987;7:361-382.
465. Xu R-J, Cranwell PD. The neonatal pig : gastrointestinal physiology and nutrition. Nottingham: Nottingham University Press, 2003.
466. Zhang N, Jing W, Cheng J, Cui W, Mu Y, Li K, Lei X. Molecular characterization and NF-kappaB-regulated transcription of selenoprotein S from the Bama mini-pig. *Mol Biol Rep* 2011;38:4281-4286.
467. Spurlock ME, Gabler NK. The development of porcine models of obesity and the metabolic syndrome. *J Nutr* 2008;138:397-402.
468. Vodicka P, Smetana K, Jr., Dvorankova B, Emerick T, Xu YZ, Ourednik J, Ourednik V, et al. The miniature pig as an animal model in biomedical research. *Ann N Y Acad Sci* 2005;1049:161-171.
469. Douglas WR. Of pigs and men and research: a review of applications and analogies of the pig, *sus scrofa*, in human medical research. *Space Life Sci* 1972;3:226-234.
470. Larsen MO, Rolin B. Use of the Gottingen minipig as a model of diabetes, with special focus on type 1 diabetes research. *ILAR J* 2004;45:303-313.
471. Walters EM, Wolf E, Whyte JJ, Mao J, Renner S, Nagashima H, Kobayashi E, et al. Completion of the swine genome will simplify the production of swine as a large animal biomedical model. *BMC Med Genomics* 2012;5:55.
472. Schook L, Beattie C, Beever J, Donovan S, Jamison R, Zuckermann F, Niemi S, et al. Swine in biomedical research: creating the building blocks of animal models. *Anim Biotechnol* 2005;16:183-190.
473. Patterson JK, Lei XG, Miller DD. The pig as an experimental model for elucidating the mechanisms governing dietary influence on mineral absorption. *Exp Biol Med (Maywood)* 2008;233:651-664.
474. Boullion RD, Mokolke EA, Wamhoff BR, Otis CR, Wenzel J, Dixon JL, Sturek M. Porcine model of diabetic dyslipidemia: insulin and feed algorithms for mimicking diabetes mellitus in humans. *Comp Med* 2003;53:42-52.
475. Verma N, Rettenmeier AW, Schmitz-Spanke S. Recent advances in the use of *Sus scrofa* (pig) as a model system for proteomic studies. *Proteomics* 2011;11:776-793.
476. Litten-Brown JC, Corson AM, Clarke L. Porcine models for the metabolic syndrome, digestive and bone disorders: a general overview. *Animal* 2010;4:899-920.
477. Ekser B, Ezzelarab M, Hara H, van der Windt DJ, Wijkstrom M, Bottino R, Trucco M, et al. Clinical xenotransplantation: the next medical revolution? *Lancet* 2012;379:672-683.
478. de Boer TA, Gietelink DA, Hendriks JC, Vierhout ME. Factors influencing success of pelvic organ prolapse repair using porcine dermal implant Pelvicol. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2010;149:112-116.
479. Chikwe J, Filsoufi F, Carpentier AF. Prosthetic valve selection for middle-aged patients with aortic stenosis. *Nat Rev Cardiol* 2010;7:711-719.
480. Niu D, Wei HJ, Lin L, George H, Wang T, Lee IH, Zhao HY, et al. Inactivation of porcine endogenous retrovirus in pigs using CRISPR-Cas9. *Science* 2017;357:1303-1307.

481. Lai L, Kolber-Simonds D, Park KW, Cheong HT, Greenstein JL, Im GS, Samuel M, et al. Production of alpha-1,3-galactosyltransferase knockout pigs by nuclear transfer cloning. *Science* 2002;295:1089-1092.
482. Acin S, Navarro MA, Carnicer R, Arbones-Mainar JM, Guzman MA, Arnal C, Beltran G, et al. Dietary cholesterol suppresses the ability of olive oil to delay the development of atherosclerotic lesions in apolipoprotein E knockout mice. *Atherosclerosis* 2005;182:17-28.
483. Arbones-Mainar JM, Navarro MA, Acin S, Guzman MA, Arnal C, Surra JC, Carnicer R, et al. Trans-10, cis-12- and cis-9, trans-11-conjugated linoleic acid isomers selectively modify HDL-apolipoprotein composition in apolipoprotein E knockout mice. *J Nutr* 2006;136:353-359.
484. Guillen N, Acin S, Navarro MA, Perona JS, Arbones-Mainar JM, Arnal C, Sarria AJ, et al. Squalene in a sex-dependent manner modulates atherosclerotic lesion which correlates with hepatic fat content in apoE-knockout male mice. *Atherosclerosis* 2008;197:72-83.
485. Berthois Y, Katzenellenbogen JA, Katzenellenbogen BS. Phenol red in tissue culture media is a weak estrogen: implications concerning the study of estrogen-responsive cells in culture. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986;83:2496-2500.
486. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001;25:402-408.
487. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem* 2009;55:611-622.
488. Bancroft JD, Suvarna KS, Lyton C. *Theory and practice of histological techniques*: Elsevier, 2012.
489. Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem* 1957;226:497-509.
490. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248-254.
491. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979;76:4350-4354.
492. Bullo M, Cozar-Torrell P, Salas-Salvado J. Dietary regulation of glucose metabolism in metabolic syndrome. *Curr Vasc Pharmacol* 2013;11:928-945.
493. Kim KS, Park SW, Kim YS. Regulation of fatty acid synthase at transcriptional and post-transcriptional levels in rat liver. *Yonsei Med J* 1992;33:199-208.
494. Dixon JL, Ginsberg HN. Hepatic synthesis of lipoproteins and apolipoproteins. *Semin Liver Dis* 1992;12:364-372.
495. Perez-Jimenez F. International conference on the healthy effect of virgin olive oil. *EUROPEAN JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION* 2005;35:421-424.
496. The EPC. An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature* 2012;489:57-74.
497. Chen A, Chen X, Cheng S, Shu L, Yan M, Yao L, Wang B, et al. FTO promotes SREBP1c maturation and enhances CIDEA transcription during lipid accumulation in HepG2 cells. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids* 2018;1863:538-548.
498. Matsuzawa N, Takamura T, Kurita S, Misu H, Ota T, Ando H, Yokoyama M, et al. Lipid-induced oxidative stress causes steatohepatitis in mice fed an atherogenic diet. *Hepatology* 2007;46:1392-1403.
499. Martinez-Beamonte R, Navarro MA, Acin S, Guillen N, Barranquero C, Arnal C, Surra J, et al. Postprandial changes in high density lipoproteins in rats subjected to gavage administration of virgin olive oil. *PLoS One* 2013;8:e55231.

500. Vila-Brau A, De Sousa-Coelho AL, Goncalves JF, Haro D, Marrero PF. Fsp27/CIDEc is a CREB target gene induced during early fasting in liver and regulated by FA oxidation rate. *J Lipid Res* 2013;54:592-601.
501. Kiela PR, Midura AJ, Kuscuoglu N, Jolad SD, Solyom AM, Besselsen DG, Timmermann BN, et al. Effects of *Boswellia serrata* in mouse models of chemically induced colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005;288:G798-808.
502. Li YH, Lei T, Chen XD, Xia T, Peng Y, Long QQ, Zhang J, et al. Molecular cloning, chromosomal location and expression pattern of porcine CIDEa and CIDEc. *Mol Biol Rep* 2009;36:575-582.
503. Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC, Jr. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr* 1993;123:1939-1951.
504. Xiao CW, Wood CM, Weber D, Aziz SA, Mehta R, Griffin P, Cockell KA. Dietary supplementation with soy isoflavones or replacement with soy proteins prevents hepatic lipid droplet accumulation and alters expression of genes involved in lipid metabolism in rats. *Genes Nutr* 2014;9:373.
505. Yamazaki T, Kishimoto K, Miura S, Ezaki O. Dietary beta-conglycinin prevents fatty liver induced by a high-fat diet by a decrease in peroxisome proliferator-activated receptor gamma2 protein. *J Nutr Biochem* 2012;23:123-132.
506. Sarria AJ, Surra JC, Acin S, Carnicer R, Navarro MA, Arbones-Mainar JM, Guillen N, et al. Understanding the role of dietary components on atherosclerosis using genetic engineered mouse models. *Front Biosci* 2006;11:955-967.
507. Xu J, Li Q. Review of the in vivo functions of the p160 steroid receptor coactivator family. *Mol Endocrinol* 2003;17:1681-1692.
508. Sevillano CA, Ten Napel J, Guimaraes SEF, Silva FF, Calus MPL. Effects of alleles in crossbred pigs estimated for genomic prediction depend on their breed-of-origin. *BMC Genomics* 2018;19:740.
509. Cammisotto PG, Gelinas Y, Deshaies Y, Bukowiecki LJ. Regulation of leptin secretion from white adipocytes by free fatty acids. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2003;285:E521-526.
510. Ajmera V, Perito RE, Bass NM, Terrault NA, Yates KP, Gill R, Loomba R, et al. Novel plasma biomarkers associated with liver disease severity in adults with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2017;65:65-77.
511. Hall D, Poussin C, Velagapudi VR, Empsen C, Joffraud M, Beckmann JS, Geerts AE, et al. Peroxisomal and microsomal lipid pathways associated with resistance to hepatic steatosis and reduced pro-inflammatory state. *J Biol Chem* 2010;285:31011-31023.
512. ProteinAtlas H. In. version 18.1 ed; 2019.
513. D'Souza A M, Neumann UH, Glavas MM, Kieffer TJ. The gluoregulatory actions of leptin. *Mol Metab* 2017;6:1052-1065.
514. Dong R, Zhang M, Hu Q, Zheng S, Soh A, Zheng Y, Yuan H. Galectin-3 as a novel biomarker for disease diagnosis and a target for therapy (Review). *Int J Mol Med* 2018;41:599-614.
515. Jeftic I, Jovicic N, Pantic J, Arsenijevic N, Lukic ML, Pejnovic N. Galectin-3 ablation enhances liver steatosis, but attenuates inflammation and il-33-dependent fibrosis in obesogenic mouse model of nonalcoholic steatohepatitis. *Mol Med* 2015;21:453-465.
516. Nakanishi Y, Tsuneyama K, Nomoto K, Fujimoto M, Salunga TL, Nakajima T, Miwa S, et al. Nonalcoholic steatohepatitis and hepatocellular carcinoma in galectin-3 knockout mice. *Hepatol Res* 2008;38:1241-1251.
517. Iacobini C, Menini S, Ricci C, Blasetti Fantauzzi C, Scipioni A, Salvi L, Cordone S, et al. Galectin-3 ablation protects mice from diet-induced NASH: a major scavenging role for galectin-3 in liver. *J Hepatol* 2011;54:975-983.
518. Tian J, Yang G, Chen HY, Hsu DK, Tomilov A, Olson KA, Dehnad A, et al. Galectin-3 regulates inflammasome activation in cholestatic liver injury. *FASEB J* 2016;30:4202-4213.

519. Sooryanarain H, Rogers AJ, Cao D, Haac MER, Karpe YA, Meng XJ. ISG15 modulates type I interferon signaling and the antiviral response during hepatitis E virus replication. *J Virol* 2017;91.
520. Hoan NX, Van Tong H, Giang DP, Toan NL, Meyer CG, Bock CT, Kremsner PG, et al. Interferon-stimulated gene 15 in hepatitis B-related liver diseases. *Oncotarget* 2016;7:67777-67787.
521. Orlicky DJ, Libby AE, Bales ES, McMahan RH, Monks J, La Rosa FG, McManaman JL. Perilipin-2 promotes obesity and progressive fatty liver disease in mice through mechanistically distinct hepatocyte and extra-hepatocyte actions. *J Physiol* 2019;597:1565-1584.
522. Hansen JS, de Mare S, Jones HA, Goransson O, Lindkvist-Petersson K. Visualization of lipid directed dynamics of perilipin 1 in human primary adipocytes. *Sci Rep* 2017;7:15011.
523. Tsai TH, Chen E, Li L, Saha P, Lee HJ, Huang LS, Shelness GS, et al. The constitutive lipid droplet protein PLIN2 regulates autophagy in liver. *Autophagy* 2017;13:1130-1144.
524. Chaurasia B, Tippetts TS, Mayoral Monibas R, Liu J, Li Y, Wang L, Wilkerson JL, et al. Targeting a ceramide double bond improves insulin resistance and hepatic steatosis. *Science* 2019;365:386-392.
525. Turner N, Lim XY, Toop HD, Osborne B, Brandon AE, Taylor EN, Fiveash CE, et al. A selective inhibitor of ceramide synthase 1 reveals a novel role in fat metabolism. *Nat Commun* 2018;9:3165.
526. Peng KY, Watt MJ, Rensen S, Greve JW, Huynh K, Jayawardana KS, Meikle PJ, et al. Mitochondrial dysfunction-related lipid changes occur in nonalcoholic fatty liver disease progression. *J Lipid Res* 2018;59:1977-1986.
527. Cole LK, Mejia EM, Vandel M, Sparagna GC, Claypool SM, Dyck-Chan L, Klein J, et al. Impaired Cardiolipin Biosynthesis Prevents Hepatic Steatosis and Diet-Induced Obesity. *Diabetes* 2016;65:3289-3300.
528. Gillessen S, Carvajal D, Ling P, Podlaski FJ, Stremlo DL, Familletti PC, Gubler U, et al. Mouse interleukin-12 (IL-12) p40 homodimer: a potent IL-12 antagonist. *Eur J Immunol* 1995;25:200-206.
529. Feng S, Dai Z, Liu AB, Huang J, Narsipur N, Guo G, Kong B, et al. Intake of stigmasterol and beta-sitosterol alters lipid metabolism and alleviates NAFLD in mice fed a high-fat western-style diet. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids* 2018;1863:1274-1284.
530. Padro T, Cubedo J, Camino S, Bejar MT, Ben-Aicha S, Mendieta G, Escola-Gil JC, et al. Detrimental effect of hypercholesterolemia on high-density lipoprotein particle remodeling in pigs. *J Am Coll Cardiol* 2017;70:165-178.