

Javier Sánchez Marco

Generación y caracterización
metabólica del ratón carente de la
proteína 5 con dominios
tiorredoxina (TXNDC5) y su
interacción con el escualeno

Director/es

De La Osada García, Jesús
Rodríguez Yoldi, María Jesús

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

© Universidad de Zaragoza
Servicio de Publicaciones

ISSN 2254-7606

Tesis Doctoral

GENERACIÓN Y CARACTERIZACIÓN METABÓLICA DEL RATÓN CARENTE DE LA PROTEÍNA 5 CON DOMINIOS TIORREDOXINA (TXNDC5) Y SU INTERACCIÓN CON EL ESCUALENO

Autor

Javier Sánchez Marco

Director/es

De La Osada García, Jesús
Rodríguez Yoldi, María Jesús

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA
Escuela de Doctorado

Programa de Doctorado en Bioquímica y Biología Molecular

2022

Generación y caracterización metabólica del ratón carente de la proteína 5 con dominios tiorredoxina (TXNDC5) y su interacción con el escualeno.

Memoria presentada por
JAVIER SANCHEZ MARCO
para optar al grado de Doctor
por la Universidad de Zaragoza

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular
Universidad de Zaragoza



Universidad
Zaragoza

ciberobn iisf • Instituto de Investigación
Sanitaria Aragón



Los doctores **María Jesús Rodríguez Yoldi** y **Jesús de la Osada García**, Catedráticos de la Universidad de Zaragoza.

INFORMAN: que el graduado D. **Javier Sánchez Marco** ha realizado bajo nuestra dirección el trabajo que presenta como memoria de doctorado con el título: “Generación y caracterización metabólica del ratón carente de la proteína 5 con dominios tiorredoxina (TXNDC5) y su interacción con el escualeno”.

Este trabajo se ha llevado a cabo durante los años 2018 al 2022 en esta Universidad.

Zaragoza, 28 de junio de 2022

Fdo: María Jesús Rodríguez Yoldi

Jesús de la Osada García

Este trabajo ha sido financiado por la ayuda para la contratación del personal predoctoral de la Fundación Cuenca Villorro, la red CIBER de Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición, como iniciativa FEDER-ISCIII, la Agencia Estatal de Investigación (SAF2016-75441-R), el Ministerio de Ciencia e Innovación-Fondo Europeo de Desarrollo Regional (PID2019-104915RB-I00, y el Gobierno de Aragón, grupo de Referencia B16_20R.

Agradecimientos:

La ciencia, como todo en esta vida, es un área que requiere trabajo en equipo, y esta tesis es un buen ejemplo de ello. Ha habido muchos errores en estos cuatro años y medio y no creo que estos agradecimientos salgan impunes, ya que no hay palabras para describir la increíble ayuda que he recibido en este tiempo.

En primer lugar, tengo que agradecer la oportunidad que me otorgaron mis directores, Jesús de La Osada García y Mª Jesús Rodríguez Yoldi. Creo que empiezo a comprender la cantidad de tiempo que mantener un grupo de investigación exige y no valoramos la cantidad de tiempo que habéis invertido resolviendo dudas y discutiendo acerca de los posibles pasos en la investigación, en especial tú Jesus. Hablar con vosotros y ver la dedicación e ilusión con la que seguís investigando tras tantos años ha sido una gran fuente de motivación durante estos años. Muchísimas gracias por estos años, por la confianza que me concedisteis y lo mucho que he crecido bajo vuestro cobijo.

A parte de Jesús y MJ hay muchas otras personas que me han acompañado, ayudado y aguantado en este trabajo. Empezando por mis dos brillantes compañeros de despacho Angie y Roberto, por compartir vuestra experiencia, por los consejos y sin olvidar, por las incontables horas en el estabulario en las que me habéis transmitido como trabajar y tratar de la mejor forma a los ratoncillos que han dado vida a esta tesis. Me gustaría seguir dando las gracias a Mamen y a Joaquín por todo el tiempo que han invertido ayudándome, por su generosidad y humildad. Para terminar el bloque de los doctores, agradecer a mi falso director Luis no sólo por la cantidad de cosas que me ha enseñaste y el apadrinamiento sino por la dedicación, motivación y el esfuerzo que me inculcaste desde el principio.

Sería injusto no agradecer a quienes han estado conmigo mano a mano en laboratorio, aguantando mis quejas y desatinos. A Tania, por estar siempre dispuesta a echar una mano con esa vitalidad, apurando cada gota de tiempo y apuntando lo que sabe que me voy a olvidar. A Seyed y Roubi, por vuestra calidez y amabilidad, he aprendido mucho de vosotros y espero que vosotros hayáis aprendido algo de mí, aunque no sea mi pronunciación del castellano. A Javi, por esos ratos en los que nos hemos contado los problemas, por la alegría que transmites y por mantener el orden “abajo”. A Marta, gracias por esos largos ratos en cultivos rezando a ver “si tiran” y la dedicación en tu trabajo.

A Cris, que me ha ayudado, enseñado y soportado tantas veces que ni recuerdo cuando le dije que se merecía un párrafo entero en agradecimientos. Porque mantener el orden es mas complicado de lo que parece, y hacerlo siempre con una sonrisa le da más mérito. Echare de menos esa conversaciones, esperando “a ver si sale” las veces necesarias y cómo te obliga a no hablar del trabajo el granuja de Martin.

También tengo que agradecer este trabajo al resto de compañeros de departamento, a Santi, Sofía, Marta, Puri, dando vida al departamento y ayudándonos en lo que necesitamos. A todas mis mito chicas, por la cantidad de veces que os he ido a “robar”, y la infinidad de risas que hemos compartido en esos cafés eternos. No me olvidare, del parte metereológico de Carmen, del entusiasmo de Alba, de la filosofía de Sonia, de la temperatura correcta de Eldris, de las discusiones de Esther, de los juegos de mesa de Mouna, de las rarezas de Irene ni de las ideas de Ana. A los pepines, por endulzar gastronómicamente y la alegría que desprendéis al departamento. Muchas gracias a todos por hacer de ese largo pasillo en “L” flanqueado por congeladores un lugar en el que tantísimas horas he pasado y del que nunca me olvidare.

Sin embargo, aunque a muchos os sorprenda, he tenido algún rato libre fuera del laboratorio en el que me he rodeado de unas grandes amistades. Empezar por mis cerbunos, aunque vayamos siendo menos cada vez, y nos juntemos 2 o 3 en vez de los 10 que éramos, sigo disfrutando cada momento como hace 10 años, por todas las risas y la tranquilidad que me obligáis a llevar con vosotros, gracias. A mis “Aerohelpers”, aunque estemos cada uno en una parte de Europa, me habéis ayudado con mil dudas tanto científicas como vitales. A Cristina y Silvia, por esas cervezas y risas en los tiempos de COVID acompañados de Miso y Tarzán, os estaré siempre agradecido. A todos mis compañeros de balonmano en Zaragoza como Charly, Jose Mari, Carlos, Sesi, ayudándome a descargar las frustraciones a base de pelotazos y alguna cerveza. Por último, no sé cómo agradecer a la gente de los Mallos que se han terminado convirtiendo en una segunda casa: Fer, Raquel, Alodia, Nerea, me acuerdo al principio cuando nos “quitamos la máscara” y vimos nuestras caras por primera vez tras meses de risas en el roco. A Maik y a Manolo por su hospitalidad y “titanismo”, a Irene y a Paula por todos los findes, vuestra naturalidad e “inteligencia”, a Jorge y Susana por esa motivación que nunca os falta y a Paco y Pat, por enseñarme tanto, por vuestra humildad y calma.

No puedo no agradecer a la gente de mi ciudad, Soria, que sin entender muy bien que he hecho este tiempo me preguntan, “¿qué tal están tus ratones?”. Gracias a mis dos amigos inseparables, Fran y Guille, por estar siempre ahí aguantando las quejas, por muchos años mas a vuestro lado. A “Lore” por estar siempre con un meme y un hombro sobre el que “escuchar”. A Diana y Álvaro, por las veces que robo vuestra tranquilidad, por esa naturalidad y compañía, gracias. A mis visontinos, mención especial a Jesús por aguantar a tus niños, por todas esas comidas que me habéis regalado y esas noches largas de “balonmano”, espero que cuando vuelva sigáis igual o incluso más auténticos (alopélicos) y con una pelota para vuestro “chupón” favorito.

Por último y no por menos importante, tengo que dar muchas gracias por la maravillosa familia que tengo, acompañándome en cada paso de este camino. A mi hermano y compañero de piso, por todas esas cenas viendo las mejores series, por las risas absurdas, las fiestas innecesarias y esos meses encerrados que ya los recuerdo hasta con cariño (en parte a la alegría de “Genial” que nunca olvidare). A mi abuela Vicenta, por esa calma y esa serenidad que nos transmites a todos con un café y un bizcocho, siempre velando por nosotros. A mi padre, gracias por estar en todas las situaciones, arreglar lo que haga falta e incluso venir a hacer una mudanza en pleno junio a tu ciudad favorita. A mi madre, por preocuparse por cosas que desconozco, porque si no hubieras mirado el BOA ese día quizás no estaría aquí, muchas gracias por aguantarme y confiar en mi todo este tiempo. Al resto de mi familia, muchas gracias por estar allí en cada celebración, alegrándome con vuestra compañía y vitalidad.

“Caminante, son tus huellas
el camino y nada más;
Caminante, no hay camino,
se hace camino al andar.”

Antonio Machado

Abreviaturas

ABHD5	1-acilglicerol-3-fosfato O-aciltransferasa
ACACB	Acetyl CoA carboxilasa 2 o Beta
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
AdipoR1	Receptor de la adiponectina 1
ADP	Adenosina difosfato
ADK	Adenosina quinasa
AGMAT	Agmatinasa
AKT	Proteína quinasa B
ALDH1	Aldehído deshidrogenasa 1
AML12	Línea celular " <i>alpha mouse liver 12</i> " de hepatocitos de ratón
AMP	Adenosina monofosfato
AMPc	AMP cíclico
AMPK	Proteína quinasa activada por AMP
AP-1	Proteína activadora 1
APO	Apolipoproteína
ApoB	Apolipoproteína B
ApoE	Apolipoproteína E
APS	Persulfato amónico
AR	Receptor de andrógenos
ARF1	Factor de ribosilación de ADP 1
ASK1	Quinasa reguladora de señal apoptótica 1
ATF	Factor activador de transcripción
ATLG	Lipasa de triglicéridos adipocitaria
ATP	Adenosina trifosfato
AUC	Área debajo de la curva
C/EBP	Proteínas de unión al <i>enhancer CCAAT</i>
CALR	Calreticulina
CBP	Proteína de unión a CREB
CCT	CTP: Fosfocolina citidiltransferasa
CETP	Proteína transportadora de esteres de colesterol
CHO	Carbohidratos
CHOP	Proteína homologa a C/EBP
ChREBP	Proteína de unión al elemento de respuesta a los carbohidratos
CIDE	Efector parecido al factor de fragmentación del DNA que induce la muerte celular.
CPT1A	Carnitina palmitoil transferasa 1 tipo A
CREB	Elemento de unión en respuesta a cAMP

CREBH	Proteína H de unión a los elementos de respuesta al AMP cíclico
CRISPR	Cortas repeticiones palindrómicas agrupadas y regularmente interespaciadas
crRNA	CRISPR RNA
CRTCs	Coactivadores de reguladores de transcripción CREB
CYP	Citocromo
CXCL10	Ligando 10 del motivo quimioquina C-X-C
DAG	Diacilglicerol
DGAT	Diacilglicerol aciltransferasa
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNL	Lipogénesis <i>de novo</i>
DEPC	Dietilpirocárbonato
DSB	Corte de doble hebra
ECM	Componentes de matriz extracelular
EC	Célula endotelial
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
EIF2α	Factor de iniciación eucariótico 2α
ELISA	Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas
eNOS	Sintasa endotelial de óxido nítrico
ER	Retículo endoplásmico
ERAD	Degrado asociado a ER
ERdj5	Proteína 5 del ER con dominios J de DNA
ERK	Quinasa de regulación extracelular
ERRγ	Receptor gamma relacionado de estrógenos
ERp	Proteína del retículo endoplasmático
F26BP	Fructosa 2,6-bifosfato
FA	Ácido graso
FABP	Proteína de unión a los ácidos grasos
FADH₂	Flavín adenín dinucleótido reducido
FAO	Oxidación de ácidos grasos
ERO1	Oxidorreductina de RE-1
FAT/CD36	Translocasa de ácidos grasos
FATP	Proteína transportadora de ácidos grasos
FAS/Fasn	Ácido graso sintasa
Fbpase1	Fructosa 1,6 bifosfatasa
FH	Fumarato hidratasa
FIT	Proteína transmembrana inductora del almacenamiento de grasa
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

G6P	Glucosa 6 fosfato
G6PC	Fosfatasa de glucosa 6 fosfato
GEO	Base de datos de expresión génica Omnibus
GPAT4	Glicerol 3 fosfato aciltransferasa 4
GK	Glucoquinasa
GKRP	Proteína reguladora de la glucoquinasa
GLUT	Transportador de glucosa
GR	Glucocorticoides
GS	Glucógeno sintasa
GSK	Glucógeno sintasa quinasa 3
GTT	Test de tolerancia a la glucosa
HAT	Histona acetiltransferasa
HCC	Hepatocarcinoma
HDL	Lipoproteína de alta densidad
HDR	Recombinación directa por homología
HFS	Factor de choque térmico
HIF-1α	Factor inducible por hipoxia-1 α
HMGCoA	Hidroximetil glutaril CoA
HPR	Peroxidasa de rábano picante
HSC70	Proteína de choque térmico 70
HSC	Células hepáticas estrelladas
HSL	Lipasa sensible a hormona
HSC70	Proteína de choque térmico 70
IDL	Lipoproteínas de densidad intermedia
IGF	Factor de crecimiento similar a la insulina
IGFBP1	Proteína 1 de unión al factor de crecimiento similar a la insulina
IL	Interleuquina
INSIG	Gen inducido por la insulina
INSR	Receptor de la insulina
iPLA₂β	Fosfolipasa independiente de calcio 2 β
IRE1α	Enzima 1 α que requiere de inositol
IRS	Sustrato del receptor de la insulina
ITT	Test de tolerancia a la insulina
JNK	Quinasa c-Jun N-terminal
KO	<i>Knock out</i> o carente de un gen
LC	Cromatografía líquida
LCAT	Lecitina colesterol acil transferasa
LCN2	Lipocalina 2
L-CGK	Glucoquinasa hepática
LDL	Lipoproteína de baja densidad
LDLR	Receptor de LDL
L-PK	Piruvato quinasa hepática

LPL	Lipoproteína lipasa
LPS	Polisacárido
LXR	Receptor hepático X
MAPK	Proteína quinasa activada por mitógeno
MCP-1	Proteína de monocito quimioatrayente 1
MDA	Malonildialehído
MGLL	Lipasa de monoacilgliceroles
MLX	Proteína X como Max
MMP	Matrix metaloproteasa
mRNA	RNA mensajero
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
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-κβ	Factor nuclear κβ
NHEJ	Unión de extremos no homóloga
PAF-AH	Factor activador de plaquetas acetil hidrolasa
PAM	Motivo adyacente de protoespaciador
PBS	Tampón fosfato salino
PC	Piruvato carboxilasa
PC	Fosfatidil colina
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDI	Proteína disulfuro isomerasa
PGC1a	Coactivador 1 ^a de PPAR
PERK	Quinasa de RE similar a proteína quinasa de RNA
PEP	Fosfoenolpiruvato
PEPCK	Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa
PFK-1	Fosfofructoquinasa-1
PKA	Proteína quinasa A
PKB	Proteína quinasa B
PI3k	Fosfoinositol 3-quinasa
PLA₂	Fosfolipasa A2
PLIN	Perilipina
POMC	Proopiomelanocortina
PP1	Proteína fosfatasa 1
PPAR	Receptor activado de proliferación peroxisomal

PRM	Análisis de proteómica dirigida
PON1	Paraoxonasa 1
PTLP	Proteína transferidora de fosfolípidos
PTT	Test de tolerancia al piruvato
Prx	Peroxirredoxina
qPCR	PCR cuantitativa a tiempo real
RAB	Proteínas similares a Ras
RCC	Células de carcinoma renal
RESF1	Factor 1 de silenciamiento de retroelemento
RIDD	Respuesta dependiente de la regulación de IRE1
RNA	Ácido ribonucleico
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SAA	Amiloide sérico A
SCAP	Proteína activadora de corte de SREBP
SCD-1	Estearoil CoA desaturasa 1
SD	Desviación estándar
SDS	Sodio dodecil sulfato
SF	Fibroblastos sinoviales
SFB	Suero fetal bovino
SIK1	Quinasa inducible por sales 1
SIRT1	Sirtuína 1
SR-B1	Receptor <i>scavenger</i> tipo B1
SREBP1c	Proteína de unión al elemento regulador de esteroles 1c
SRP	Partícula de señal de reconocimiento
STAT3	Traductor de señal y activador de la transcripción 3
SETDB1	Dominio bifurcado de SET 1
T2dm	Diabetes mellitus tipo 2
TALEN	Proteínas efectoras de tipo activador transcripcional fusionadas a nucleasas
TEMED	Tetrametiletilendiamina
TGF-β1	Factor de crecimiento transformante
TG	Triglicéridos
TGF	Factor de crecimiento tumoral
TLR4	Receptor tipo toll 4
TNFα	Factor de necrosis tumoral alfa
TORC2	Complejo de diana de rapamicina 2
tracrRNA	CRISPR RNA trans activador
TRAF2	Factor de necrosis tumoral asociado al receptor 2
TRAIL	Ligando inductor de apoptosis asociado a TNF
TRL	Lipoproteínas ricas en triglicéridos
TRX	Tiorredoxina
TXNDC5	Proteína 5 con dominios tiorredoxina

UV	Ultravioleta
UPR	Respuesta a proteínas mal plegadas
VLDL	Lipoproteína de muy baja densidad
XBP1	Proteína de unión X-box 1
X5P	Xilulosa 5-fosfato
WT	<i>Wildtype</i> o locus original

Índice

I. Introducción	1
II. Revisión bibliográfica	2
II.1 Hígado, el órgano central del metabolismo:.....	2
II.1.1 Fisiología y bioquímica del hígado (metabolismo energético).....	2
II.1.2 Patogénesis y metabolismo.....	4
II.1.3 Metabolismo lipídico hepático.....	5
II.1.4 Metabolismo de glucosa y carbohidratos	10
II.1.5 Retículo endoplasmático (RE) y estrés del retículo.....	15
II.1.6 Gotas lipídicas	19
II.2 TXNCD5.....	22
II.2.1 Familia de proteínas disulfuro isomerasas (PDI).....	23
II.2.2 Gen TXNDC5	23
II.2.3 Funciones celulares de la TXNDC5	25
II.2.4 Mecanismos de TXNDC5 en cáncer.....	28
II.2.5 TXNDC5 y fibrosis	30
II.2.6 TXNDC5, inflamación e hipoxia	31
II.2.7 TXNDC5 y ateroesclerosis.....	32
II.3 Escualeno	33
II.4 Sistema de edición genética CRISPR/cas9.....	34
II.5 Modelo celular: AML12	35
II.6 Modelo animal: Ratón.....	35
III. Objetivos	37
IV. Materiales y métodos	38
IV.1 -Material biológico.....	38
IV.1.1 Estudios con ratones.....	38
IV.1.1.2 Diseño guías CRISPR/cas9	38
IV.1.1.3 Preparación de los complejos de corte y electroporación.	39
IV.1.2 Cultivo celular.	46
IV.2 Estudio de la expresión génica.....	52
IV.2.1 Extracción de RNA.....	52
IV.2.2 Secuenciación masiva del RNA (RNAseq).....	53
IV.2.3 Retrotranscripción del RNA.....	54
IV.2.4 PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR).....	54
IV.2.5 Diseño de cebadores y optimización.	54

IV.2.6 Elección del gen de referencia.....	55
IV.3 Determinaciones plasmáticas.....	55
IV.3.1 Determinación colorimétrica de glucosa.....	55
IV.3.2 Determinación colorimétrica de colesterol total.....	55
IV.3.3 Determinación colorimétrica de triglicéridos.....	55
IV.3.4 Determinación colorimétrica de cuerpos cetónicos.....	56
IV.3.5 Determinación colorimétrica de ácidos grasos no esterificados (NEFA).....	56
IV.3.6 Separación de lipoproteínas mediante cromatografía en fase líquida.....	56
IV.3.6.1 Determinación del colesterol total y no esterificado.....	57
IV.3.7 Determinación de la actividad PAF-AH.....	59
IV.3.7 Determinación del malonildialdehído (MDA).....	60
IV.4 Estudio histológico y determinaciones analíticas del hígado.....	60
IV.4.1 Tinción de hematoxilina-eosina.....	61
IV.4.2 Extracción de lípidos hepáticos.....	61
IV.4.3 Determinación de escualeno hepático por CG-MS.....	61
IV.4.4 Determinación de las gotas lipídicas en cultivo celular.....	62
IV.5 Detección de proteínas.....	63
IV.5.1 Extracción y cuantificación de proteínas.....	63
IV.5.2 Fraccionamiento de gotas lipídicas.....	63
IV.5.3 Proteómica por espectrometría de masas.....	64
IV.5.4 Detección inmunoespecífica.....	65
IV.6 Análisis estadístico.....	70
V. Resultados.....	71
V.I-Thioredoxin domain containing 5 suppression elicits serum amyloid A-containing high-density lipoproteins.....	72
V.2 Absence of thioredoxin domain containing 5 improves glucose tolerance and insulin sensitivity in males	97
V.3 Thioredoxin domain containing 5 is involved in the hepatic storage of squalene into lipid droplets in a sex-specific way.....	118
VI. Discusión	146
VII. 1 La supresión de la proteína 5 que contiene dominios tiorredoxina libera amiloide sérico A localizado en las lipoproteínas de alta densidad	146
VII.2 La ausencia de la proteína 5 con dominios de tiorredoxina mejora la tolerancia a la glucosa y la sensibilidad a la insulina en machos.....	150
VI.3 La proteína 5 que contiene dominios de tiorredoxina está implicada en el almacenamiento hepático de escualeno en las gotas lipídicas de forma dependiente del sexo	154
VII. Conclusiones	158

VIII. Bibliografía	160
--------------------------	-----

I. Introducción

La enfermedad del hígado graso no alcohólico es la patología hepática más común, teniendo una prevalencia superior al 25% en alguna población occidental [1]. Esta enfermedad, causada por la sobrealimentación, la baja actividad física, la resistencia a la insulina y factores genéticos [2], está aumentando sin que los mecanismos moleculares causantes del desarrollo de la esteatosis se hayan aclarado completamente [3].

La dieta mediterránea se ha asociado con una numerosa lista de beneficios para la salud, como obesidad y enfermedades cardiovasculares [4,5]. Siendo el aceite de oliva virgen la principal fuente de grasa, también se la ha asociado con una mayor esperanza de vida [6]. Sin embargo, el aceite de oliva virgen contiene además de ácidos grasos, compuestos minoritarios sobre los cuales se han realizado múltiples estudios. Utilizando modelos animales para el estudio de la esteatosis y la aterosclerosis (ratones carentes de *Apoe*), nuestro grupo encontró que el hidrocarburo escualeno, presente en el aceite de oliva virgen, tenía propiedades anti-aterogénicas así como redujo el contenido de grasa hepática [7].

Para caracterizar los mecanismos moleculares implicados en el metabolismo del escualeno, se identificaron las proteínas presentes en los microsomas, verificando sus cambios a nivel transcripcional. Se identificó que la proteína 5 con dominios tiorredoxina (TXNDC5) experimentaba cambios en los ratones que recibieron escualeno [8]. Esta proteína es una proteína disulfuro isomerasa encargada de controlar el correcto plegamiento en el retículo endoplasmático, cuyo mecanismo molecular de acción, así como sus dianas aún se encontraban prácticamente desconocidas [9].

En el presente trabajo se pretende esclarecer el papel de TXNDC5, así como su implicación con la administración del escualeno. El uso de modelos animales para descifrar los mecanismos moleculares de enfermedades multisistémicas es fundamental. Por ello, y gracias a los nuevos avances en los sistemas de edición genética, se decidió generar un modelo animal de ratón que careciese de TXNDC5. Puesto que se ha observado que la dieta es uno de los reguladores metabólicos más determinantes, en esta tesis doctoral se ha estudiado el efecto de la proteína TXNDC5 en el metabolismo del ratón, el desarrollo de esteatosis, la resistencia a la insulina, así como la influencia del sexo y dietas con el escualeno.

II. Revisión bibliográfica

II.1 Hígado, el órgano central del metabolismo:

El hígado es el centro regulador del procesamiento de los nutrientes, producción de proteínas, homeostasis de la energía y destoxicificación. Los nutrientes recogidos por la sangre llegan desde el tracto gastrointestinal vía la vena portal, donde las toxinas procedentes de las bacterias intestinales junto con otras sustancias son procesadas. El hígado es el órgano más grande del cuerpo, representando el 2% del cuerpo humano y aproximadamente el 6% del peso del ratón. El hígado humano ocupa el cuadrante superior derecho del abdomen mientras que el hígado murino ocupa el espacio subdiafragmático. En ambas especies se encuentra divididos en lóbulos, aunque haya dos lóbulos humanos y 4 murinos, los patrones lobulares se encuentran altamente conservados en estructura y función [10].

La unidad funcional del hígado se denomina lobulillo hepático, una estructura poligonal organizada alrededor de una vena central que distribuye la sangre a varias venas en la periferia y posteriormente a la vena cava. Los hepatocitos constituyen la estructura y se disponen como radio de una rueda, formando una placa celular de un grosor de dos células. En el interior de estas placas se localizan los canalículos biliares que recogen la bilis producida por los hepatocitos, llevándola al conducto biliar; en la otra cara de estos hepatocitos se encuentra el espacio de Disse, un estrecho espacio que separa los hepatocitos de las células endoteliales en el que transcurren desde nutrientes hasta proteínas plasmáticas y es drenado por el sistema linfático. Las células de Ito o células estrelladas se localizan en este espacio, almacenan vitamina A y en caso de lesión hepática se transdiferencian a miofibroblastos fibrogénicos y proliferativos, produciendo matriz extracelular. La vena central del lobulillo se conecta por los sinusoides hepáticos, formados por células endoteliales discontinuas entre las que se pueden intercalar células de Kuffer, macrófagos hepáticos se encargan de depurar la sangre de partículas como eritrocitos o bacterias procedentes del colon. En estos sinusoides se recoge la sangre procedente de las arteriolas hepáticas y de la vena porta, la cual tras exponerse para un intercambio de nutrientes y metabolitos es drenada por la vena central. Este sistema de irrigación es único para el organismo en el que dos vasos aportan sangre a un órgano, siendo un único conducto, la vena hepática, el que lo drena [10,11] como se resume en la Figura 1.

II.1.1 Fisiología y bioquímica del hígado (metabolismo energético)

Dentro de esta organización microscópica tan precisa, en el hígado y más concretamente los hepatocitos, se llevan a cabo una gran cantidad de reacciones bioquímicas, interviniendo en multitud de rutas metabólicas.

En el metabolismo lipídico, el hígado es el encargado de sintetizar casi todos los lípidos del organismo, secretándolos al resto del cuerpo para su consumo o almacenamiento. Las células de tejidos periféricos los utilizarán para la síntesis de membranas, estructuras intracelulares y sustancias químicas, por ejemplo, hormonas esteroideas. El hígado lleva a cabo funciones específicas del metabolismo lipídico como: síntesis y oxidación de ácidos grasos, la síntesis de fosfolípidos y la mayoría de las lipoproteínas, y la síntesis de grandes cantidades de colesterol, la mayor parte de los cuales será secretado con la bilis, siendo solo un 20% el colesterol que se transportará junto con los fosfolípidos en las lipoproteínas [11].

Revisión bibliográfica

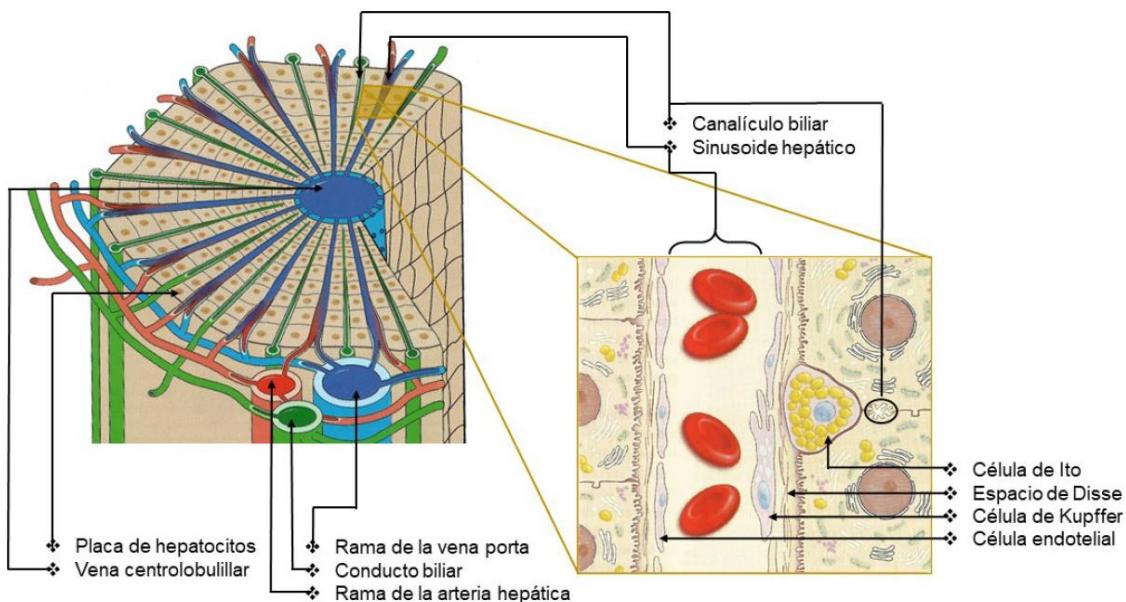


Figura 1: Histología hepática. Adaptada de [10,12]

Dentro del metabolismo proteico, el hígado tiene un papel importante en la degradación de las proteínas a través de la desaminación de los aminoácidos y de la formación de la urea para la eliminación del amoniaco como para la formación de proteínas plasmáticas, también interviene en la síntesis e interconexión de los diferentes aminoácidos y compuestos derivados de ellos [13].

Con respecto al metabolismo de los carbohidratos, los hepatocitos son capaces de realizar la gluconeogénesis, de almacenar grandes cantidades de glucosa a través de la formación de glucógeno, de convertir la galactosa y la fructosa en glucosa y de emplear los hidrocarburos para la modificación de lípidos y proteínas. Por todas estas funciones, el hígado es el encargado del mantenimiento de la glucemia, almacenando el exceso de glucosa postprandial en forma de glucógeno, llegando a suponer entre un 5-10% del volumen del hígado. Por consiguiente, en situaciones de hipoglucemia, es el encargado de liberar la glucosa del glucógeno e incluso producirla, si fuera necesario, a partir de glicerol o aminoácidos para cedérsela al resto del organismo, fenómeno conocido como función amortiguadora de la glucosa del hígado [13].

Esta función hepática es regulada por las hormonas insulina y glucagón. La primera es sintetizada por el páncreas, inhibiendo la gluconeogénesis en el hígado e inactivando la fosforilasa hepática, impidiendo el catabolismo del glucógeno mientras se estimula la actividad glucógeno sintasa. Debido a que la glucosa solo puede entrar libre por los transportadores GLUT2, independientes de la insulina, la captación de la glucosa sanguínea por el hepatocito se aumenta al incrementar la actividad de fosforilación de glucosa a glucosa 6-P por parte de la enzima glucoquinasa, reteniéndola en el hepatocito. Además, la insulina no solo actúa en el metabolismo glucídico, sino que juega un papel importante en el metabolismo lipídico. Cuando el hígado no es capaz de sintetizar más glucógeno, la glucosa se deriva para sintetizar ácidos grasos que serán distribuidos al resto de tejidos mediante lipoproteínas, aunque en el caso de una saturación se podrán almacenar en este [14].

Al contrario de la insulina que actúa en una situación postprandial, la hormona glucagón ejerce su efecto en la situación opuesta, cuando la glucemia empieza a disminuir como en un ayuno prolongado, causando un efecto antagónico a la insulina. El glucagón promueve la liberación de

Revisión bibliográfica

glucosa del glucógeno o glucogenolisis a través del aumento del AMP cíclico (AMPc) en el hepatocito, estimulando una mayor concentración de glucosa libre que será secretada al torrente sanguíneo. Por último, si la glucemia no se hubiese restablecido con las reservas de glucógeno, el glucagón promovería la activación de la producción de glucosa a través de la gluconeogénesis [10,14].

Otra de las funciones del hígado es la producción y secreción de bilis, cuya función como detergente será la emulsión de los lípidos de la ingesta en micelas más fácilmente accesibles para la acción de las lipasas y así favorecer la absorción de los lípidos. La bilis también constituye un medio para la excreción de productos de desecho procedentes del torrente sanguíneo como el exceso colesterol o la bilirrubina. Las sales biliares se producen a partir de colesterol, en una ruta que los transforma en ácido cólico y junto con la glicina o la taurina en ácidos biliares glicoo tauroconjugados, siendo estos junto con sus sales sódicas los secretados a través de la bilis. Es tan crucial su papel, que, en ausencia de sales biliares, encontraríamos cerca de un 40% de las grasas ingeridas en las heces, con el consiguiente déficit nutricional y energético [13].

Por último, entre sus funciones se encuentra también la síntesis de moléculas para la coagulación (fibrinógeno, factor VII, protombina, etc..), el almacenamiento de vitaminas y de hierro (en forma de ferritina) así como el procesamiento y eliminación de drogas, tóxicos y hormonas entre otras moléculas. El hígado, como hemos resumido, ejerce un papel metabólico muy importante, no solo debido a las múltiples rutas metabólicas que se llevan a cabo, sino porque controla la homeostasis energética del cuerpo, almacenando energía en forma de glucógeno y lípidos y liberándola cuando baja la glucemia [10,13]

II.1.2 Patogénesis y metabolismo

II.1.2.1 Esteatosis hepática no alcohólica

Esta enfermedad es actualmente la patología hepática más común en los países occidentales y se postula como la causa mayoritaria de trasplantes hepáticos en los años venideros. La esteatosis hepática no alcohólica (NAFLD o “*non alcoholic fatty liver disease*”) abarca el primer estadio, en el que hay una acumulo de grasa superior al 5% del volumen de hígado en ausencia de inflamación. Cuando la enfermedad evoluciona en presencia del componente inflamatorio, se denomina esteatohepatitis (NASH o “*non-alcoholic steatohepatitis*”). En el tercer estadio de la enfermedad se caracteriza por la aparición de depósitos de tejido cicatrizado en el hígado, conocido por fibrosis hepática. Un tratamiento llegado a este punto no podría volver al estadio previo, ya que es irreversible, pero impediría un avance al siguiente estadio o cirrosis. La cirrosis hepática se caracteriza por presentar focos de necrosis y proliferación celular junto con la fibrosis e inflamación previamente observados. Por último, la patología podría empeorar en el momento en el que estos focos de células proliferativas se desdiferencian a células cancerígenas, denominándose como hepatocarcinoma (HCC) [15].

Debido al rol metabólico del hígado en la síntesis, almacenamiento y distribución de glúcidos, proteínas y ácidos grasos en coordinación con una compleja red de señalización hormonal, es sencillo que una desregulación pueda ocasionar un mayor acumulo o síntesis de lípidos que sea superior a la secreción. Este estado puede ocasionar un aumento del estrés oxidativo o en el retículo así como alterar la funcionalidad mitocondrial y aumentar la oxidación peroxisomal entre otros, agravando el estado de la patología [16].

Revisión bibliográfica

II.1.2.2 Diabetes mellitus 2 y resistencia a la insulina

El hígado al ser el control de la homeostasis metabólica no es sorprendente que sus fallos causen enfermedades metabólicas como el hígado graso, resistencia a la insulina, diabetes mellitus tipo 2 (T2DM) se encuentran relacionadas molecularmente. De hecho, pacientes con NAFLD tienen el doble de posibilidades de desarrollar T2DM, así como diversas patologías, en especial si se combinan. Actualmente T2DM afecta a 1 de cada 11 adultos, aumentando su incidencia y prevalencia entre la población pediátrica siendo asociado con dietas de alto contenido graso, sedentarismo, obesidad y patologías hepáticas. Se define T2DM por una glucemia alta, resistencia a la insulina y una función incorrecta de los islotes pancreáticos, siendo que en NAFLD los niveles de glucosa son elevados no es de extrañar la asociación entre estas patologías [17].

Después de la ingesta, los niveles de glucosa plasmática aumentan y la insulina se libera por las células β pancreáticas para su regulación, cuando los niveles de insulina circulante para mantener la homeostasis de glucosa son superiores, se denomina resistencia a la insulina (IR). Esta sobrecarga de trabajo para el páncreas puede deteriorar la función y consecuentemente empeorar la patología. La acción de la insulina sirve diferentes funciones que en caso de IR puede causar estrés en el retículo endoplasmático, estrés oxidativo y una competición de sustrato entre los ácidos grasos y la glucosa, causando desajustes metabólicos [17,18].

II.1.3 Metabolismo lipídico hepático

El hígado es el órgano central que controla la homeostasis lipídica a través de varias rutas bioquímicas altamente reguladas que comentaremos en detalle a continuación. El hígado es el encargado de regular la secreción de triglicéridos y colesterol mediante el metabolismo de las lipoproteínas, utilizando tanto los ácidos grasos procedentes de la ingesta, o en situaciones de ayuno, de los adipocitos o sintetizarlos. Por último, regula también el metabolismo del colesterol, al controlar tanto la síntesis como el excedente plasmático a través de la secreción y reciclamiento de lipoproteínas [16,19].

II.1.3.1 Absorción de ácidos grasos no esterificados (NEFA) plasmáticos.

Se ha demostrado que los niveles plasmáticos de NEFA (*"non-esterified fatty acid"*) correlacionan con la apoptosis en hepatocitos y pueden activarla. Estos ácidos grasos provienen mayoritariamente de la lipólisis en los adipocitos (80%), aunque pueden derivar de triglicéridos de la ingesta (20%). En un estado de ayuno, lipólisis ocurre en el tejido adiposo estimulada por catecolaminas, el glucagón y es bloqueada por la insulina, de forma que, en un estado de resistencia a la insulina, la lipólisis se dispararía, aumentando los ácidos grasos en el plasma independientemente de la situación nutricional [20–22].

Sin estar completamente esclarecidos los mecanismos de captación de NEFA, parece que la difusión pasiva de estos hacia el hígado es residual y su entrada depende de transportadores de ácidos grasos (FAT o *"fatty acid transporter"*). Cuando llegan a la membrana, se forma un complejo transmembrana formado por una proteína de unión a ácidos grasos (FABP o *"fatty acid binding protein"*), la caveolina, una ácido graso translocasa (FAT/CD36) y una fosfolipasa calcio independiente (iPLA_{2 β}) que permite el flujo de ácidos grasos hacia el hepatocito uniéndose mediante receptores específicos de membrana. Este mecanismo puede estar regulado por receptor activado de proliferación peroxisomal alfa (PPAR α) junto con la leptina y la insulina. Las proteínas que forman este complejo han sido fruto de varios estudios por su posible papel en el desarrollo de NAFLD, encontrándose altas concentraciones de estos transportadores de ácidos grasos en pacientes con NAFLD [21,23–27].

Revisión bibliográfica

Dentro de las FABP, la FABP1 es la isoforma hepática principal, encargada del transporte para su almacenamiento en forma de TG y así ejerce un efecto protector frente a la citotoxicidad de los NEFA. También es capaz de mediar el transporte de ligandos de PPAR al núcleo de los hepatocitos. La lipotoxicidad de NEFA al hígado causa la activación de los receptores Toll like e inicia la cascada extrínseca de apoptosis, forma predominante del daño hepático en NASH. Los ácidos grasos interfieren con la señalización de los receptores nucleares, promoviendo la resistencia a la insulina, el estrés del retículo, así como la estimulación de la producción de TNF α y su receptor. La activación del receptor del TNF α aumenta la expresión de SREBP1c (*"sterol regulatory element binding protein 1 c"*), un factor de transcripción que induce la lipogénesis hepática y acumulación de lípidos. Los efectos mediados por TNF α son antagónicos a la adiponectina, estando disminuidos en la esteatohepatitis [16,28–30].

La conversión de NEFA en TG y su acumulación en gotas lipídicas parece ser hepatoprotectora, aunque sea típica de la esteatosis hepática. Esta conversión se produce por la acción de las enzimas glicerol-3-fosfato aciltransferasa mitocondrial (mtGPAT) y de la diacilglicerol aciltransferasa 2 (DGAT2). Estos procesos están controlados por los factores de transcripción SREBP-1c, LXR, FXR (*"Liver/Farnesoid X receptor"*) y ChREBP (*"Carbohydrate responsive element-binding protein"*), el cual relaciona tanto el metabolismo lipídico y glucídico [31,32].

II.1.3.2 Lipogénesis de novo (DNL) hepática

DNL consiste en la síntesis de ácidos grasos a partir de los carbohidratos que en situaciones de exceso energético ocurre en el hígado. Este proceso es una ruta fundamental y compleja que emplea productos de la glucólisis para la biosíntesis de lípidos [33].

Las dos enzimas principales son la acetil CoA carboxilasa (ACC) y la ácido graso sintasa (FAS, *"fatty acid synthase"*) que en conjunto se encargan de convertir el acetil CoA y el malonil CoA en FA. La función de ACC es la adición de un carboxilo al acetil CoA para formar malonil CoA. Posteriormente se genera una cadena hidrocarbonada añadiendo dos grupos de carbono, hasta llegar a 16-18. Para la síntesis de triglicéridos, los ácidos grasos unidos al CoA se unen al glicerol, generando ácido lisofosfatídico, por el cual capta un nuevo ácido graso produciendo ácido fosfatídico, tras una defosforilación el ácido diacilglicerol resultante es convertido en un TG por la enzima de la diacilglicerol transferasa (DGAT). La regulación transcripcional de DNL tiene dos principales vías: SREBP1c y ChREBP, ambas inducidas por la acción de la insulina y las altas concentraciones de glucosa [31,33].

Va a ser en este contexto cuando se produce la liberación proteolítica de SREBP1c de la membrana de Golgi, donde se encuentra inactivo, y su translocación al núcleo. Esta liberación ocurre como el resultado de la interacción con dos proteínas de membrana del RE, SCAP (*"SREBP cleavage-activated protein"*) e INSIG (*"insulin-induced gene"*). Cuando SCAP cambia su conformación, debido a eventos fosforilativos o la unión de esteroles, INSIG se disocia del complejo, quedando la secuencia de aminoácidos MEDADL de SREBP1c expuesta y por tanto cortada por dos proteasas S1P y S2P. Así se libera la forma activa que se transloca al núcleo [34,35].

Esta activación puede ocurrir por dos vías controladas por el receptor de la insulina, ambas comienzan con la vía PI3k (*"phosphoinositide-3 kinase"*) /PKB (*"protein kinase B"*), una resulta en la fosforilación del naciente SREBP1c y la otra con la activación de LXR α . Por otro lado, se encuentra la vía del mTORC1 (*"mammalian target of rapamycin complex"*), que se encuentra activada cuando PKB está constitutivamente activada, causando un aumento de la forma madura de SREBP1c y un aumento de DNL. De esta forma, la acción de la insulina vía PI3K/PKB

Revisión bibliográfica

promueve el procesamiento de SREBP1c, activando la DNL, con la expresión transcripcional de muchos genes implicados en la síntesis de ácidos grasos como *FAS*, *ACC* o *DGAT* previamente comentados [36,37].

ChREBP, en contraste a SREBP1c, es activado por el aumento postprandial de glucosa en los hepatocitos. Brevemente, la ratio de glucólisis se incrementa para compensar la glucosa citosólica con la entrada de glucosa sanguínea a través de los transportadores independientes de insulina GLUT2. La activación de ChREBP parece ser modulada por el gran número de metabolitos generados durante la glucólisis, aunque el mecanismo es desconocido, se postula que la glucosa 6-fosfato (G6P) puede tener un papel global, aunque en hepatocitos se propone la fructosa-2,6-bifosfato. El resultado aún es incierto, pero promueve la expresión de genes centrales del DNL como *FAS*, *ACC* o piruvato kinasa (PK1, "pyruvate kinase 1") [33,38,39].

Por último, ACC1, la principal isoforma hepática es regulada a varios niveles. Primero, se encuentra en dímeros de baja actividad que cuando polimerizan aumentan su actividad en respuesta a la insulina. Segundo, tiene reguladores alostéricos como el citrato y el glutamato, promoviendo su polimerización y consecuente aumento de actividad, mientras que moléculas como malonil-CoA actúan como represores alostéricos inhibiendo su actividad. Por último, ACC1 es fosforilada en células debido a hormonas como el glucagón o la adrenalina, inactivándola. Esta fosforilación parece estar llevada a cabo por la vía de la proteína quinasa dependiente de AMP (cAMP-AMPK) en vez de por la PKA. En adición, el glutamato parece promover la actividad de una fosfatasa de la ACC, regulando por otra vía la actividad de esta enzima [33,40]. Todos estos mecanismos se resumen en la figura 2.

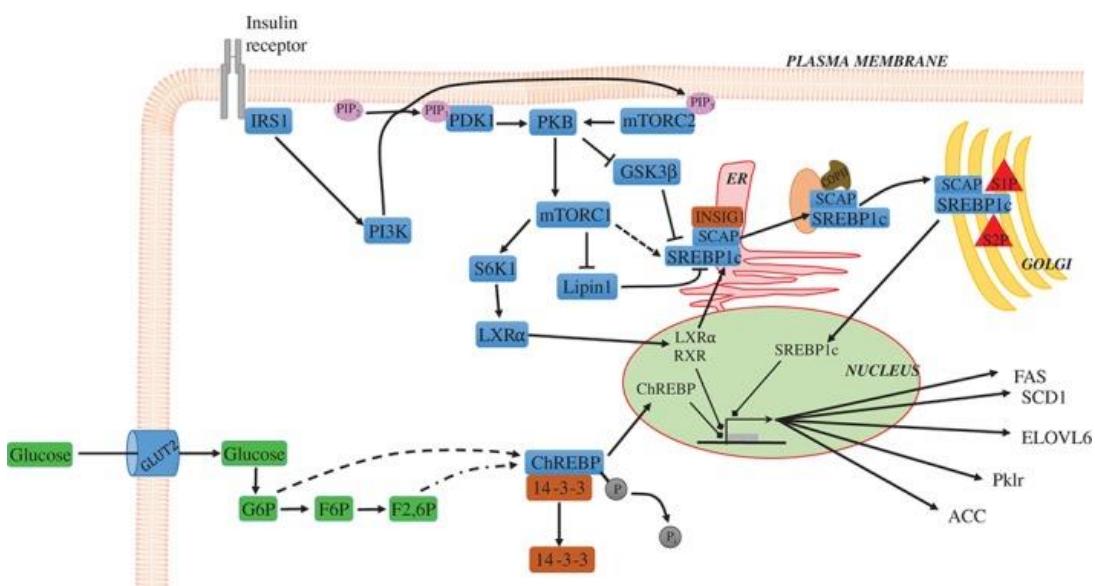


Figura 2: Resumen de la regulación de la lipogénesis de novo mediada por SREBP1c y ChREBP.
Adaptado de [33].

El aumento de DNL se ha asociado con varias enfermedades metabólicas, siendo la más prevalente la NAFLD. Aunque la acumulación hepática de TG es el resultado de la captación de los ácidos grasos no esterificados liberados por la lipólisis en los adipocitos (56%), DNL (26%) y la dieta (15%), la ruta lipogénica tiene un papel importante. En pacientes con NAFLD, los ácidos grasos de los TG tenían un nivel de saturación mayor, indicando hacia la vía DNL. Esto último coincide con la inclusión de un 15% de los TG de las VLDL procedente de DNL en pacientes con NAFLD frente al 2-5% en pacientes sanos [33].

Revisión bibliográfica

II.1.3.3 Oxidación de ácidos grasos

La oxidación de los ácidos grasos (FAO) es la forma más energéticamente eficiente para la homeostasis en comparación con otros subtipos de macronutrientes. En el citoplasma empieza la FAO, donde la acil CoA sintasa une los ácidos grasos a la coenzima A, formando el acil CoA. Desde este punto, la oxidación se da principalmente en la mitocondria, aunque puede ocurrir en peroxisomas o a través de la acción de citocromos en el RE [19,41].

La entrada en la mitocondria de los acil coA suele suceder a través de la enzima carnitina palmitoiltransferasa 1A (CPT1A) situada en la membrana mitocondrial externa, siendo el transporte por difusión pasiva minoritario. CPT1A solo puede transportar acil CoA de 16 C o menor, implicando un paso por el peroxisoma para reducir su longitud si el ácido graso proveniente es mayor o igual a 18 C. La oxidación de esos ácidos grasos en el peroxisoma ocurre a partir de acil CoA oxidasa peroxisomal (ACOX1). Su ausencia causa acumulación de ácidos de cadena larga, fibrosis, estrés oxidativo e inflamación, enfatizando el rol de FAO de cadena larga en NAFLD [19,41,42].

En la mitocondria, el malonil CoA, un precursor de la síntesis de lípidos, regula alostéricamente a CPT1A, acumulándose tras la activación del receptor de la insulina. En estado postprandial, la oxidación de ácidos grasos se reduce, estimulándose la síntesis de estos, su almacenamiento y distribución periférica. La oxidación en la mitocondria o β -oxidación produce electrones en forma de NADH y FADH₂, que son llevados a la cadena de transporte de electrones para generar ATP y acetil CoA que será degradado en el ciclo de Krebs o en el caso de ausencia de glucosa y un alto contenido lipídico, transformado en cuerpos cetónicos [19,43].

Cuando hay un exceso lipídico, los mecanismos mitocondriales de protección frente al daño oxidativo se ven desbordados, produciéndose daño al DNA mitocondrial y reduciendo la actividad mitocondrial. De esta forma, se establece un círculo vicioso que fuerza la disfunción mitocondrial y el estrés oxidativo. Al disminuir la función mitocondrial se deriva a la utilización de una ruta alternativa de FAO, la ω oxidación en el RE [42].

Los citocromos CYP4A, CYP4A11, CYP2E1 y CYP2A1 son los encargados de la ω oxidación microsomal que, aunque reduce el contenido lipídico hepático, genera peroxidación lipídica, importantes niveles de ROS, estrés oxidativo y ácidos dicarboxílicos que causan inflamación. Por otro lado, la inhibición de CPT1A debido a un exceso de malonil CoA puede a su vez bloquear la β -oxidación, activando la ω oxidación sin necesidad de una disfunción mitocondrial [19,44–46].

La oxidación de los ácidos grasos está controlada por la insulina y el PPAR α . Este factor estimula también la formación de cuerpos cetónicos a través de la regulación transcripcional de la enzima mitocondrial HMGCoA. La expresión de PPAR α está relacionada con la homeostasis lipídica, así como con la inflamación, estimulando por un lado las proteínas transportadoras de ácidos grasos, así como enzimas relacionadas con la apolipoproteína B y por otro lado promueve la capacidad de JNK1 y NF-KB de unirse al DNA, causando inflamación hepática. Sin embargo, disminuye durante la esteatohepatitis [45,47–49].

II.1.3.4 Secreción de lípidos y metabolismo lipoproteico

Los lípidos plasmáticos son transportados en lipoproteínas, un grupo heterogéneo de micelas de diferentes tamaños, composición lipídica y de apolipoproteínas (APO), función y tejido de origen. La APO confiere a la lipoproteína diferentes funciones metabólicas. Estas partículas se caracterizan por tener una monocapa de lípidos en la superficie, predominantemente fosfatidil

Revisión bibliográfica

colina y colesterol no esterificado, mientras que el interior hidrófobo está compuesto por TG, ésteres de colesterol y vitaminas lipofílicas A, D, E y K [50].

II.1.3.4.1 Metabolismo de lipoproteínas formadas por APOB

Cabe mencionar que las lipoproteínas de mayor tamaño son sintetizadas por los enterocitos con un esqueleto formado por la APOB48, transportando los lípidos obtenidos en la ingesta. El hígado sintetiza una versión de menor tamaño, denominada lipoproteína de muy baja densidad (VLDL, “*very low density lipoprotein*”) que contiene la versión completa, APOB100, de la apolipoproteína B. Ambos tipos de lipoproteínas ricas en triglicéridos (TRL) cumplen la función de transportar ácidos grasos a los tejidos periféricos, principalmente tejido adiposo, esquelético muscular y corazón [50,51].

Las partículas VLDL se sintetizan en el retículo, en el cual APOB100 se carga con lípidos en un proceso que cataliza la enzima MTTP (microsomal triglyceride transfer protein). Las VLDL nacientes son transferidas al aparato de Golgi, cargándose con más lípidos en el proceso hasta formar la lipoproteína VLDL madura, formada por una única APOB100 y un contenido variable de TG. Estas dos proteínas son fundamentales en el proceso de secreción de VLDL y en la homeostasis lipídica, de forma que un defecto en alguno de estos genes causa esteatosis hepática al no poderse secretar triglicéridos de forma correcta. Ambos genes son regulados negativamente por la acción de la insulina, reduciendo la secreción de lípidos hepáticos, induciendo la degradación de APOB100 y bloqueando la síntesis de MTTP. Por otro lado, SREBP1c regula negativamente la exportación de VLDL mediante la inhibición de la expresión de MTTP [50,52,53].

Brevemente, en el lumen de los capilares sanguíneos los triglicéridos son hidrolizados por la enzima lipoproteína lipasa (LPL), requiriendo APOC2 como un cofactor esencial para la liberación de los ácidos grasos y su posterior uso para energía o almacenamiento. Según los triglicéridos se van degradando, las partículas se transforman en lipoproteínas remanentes de menor tamaño con un contenido mayor de colesterol que terminaran siendo endocitadas por los hepatocitos. Sin embargo, una parte de estas lipoproteínas remanentes, conocidas como lipoproteínas de densidad intermedia (IDL), no son degradadas, sino que pierden los triglicéridos por las enzimas intravasculares, incluyendo la lipasa hepática (HL), la proteína transportadora de ésteres de colesterol (CETP) y fosfolípidos (PLTP) para convertirse en lipoproteínas de baja densidad (LDL). Estas partículas están muy cargadas de colesterol y se encargan de llevarlo a tejidos periféricos y recoger el excedente de vuelta al hígado, asegurándose un eficiente control del metabolismo sistémico de colesterol por diferentes vías. Sin embargo, estas partículas junto con las lipoproteínas remanentes pueden acumularse de forma pasiva en las paredes de las arterias, causando ateroesclerosis. Acorde a esto, altas concentraciones de LDL y partículas remanentes se han asociado con riesgo cardiovascular [50,54].

II.1.3.4.2 Metabolismo de las lipoproteínas de alta densidad (HDL)

Las lipoproteínas de alta densidad son las lipoproteínas más pequeñas y contienen fundamentalmente APOA1 como su proteína estructural que les confiere varias funciones. La principal y más estudiada es el transporte reverso de colesterol. APOA1 estimula el eflujo de colesterol libre y fosfolípidos, a través del transportador ABCA1, provenientes de la superficie celular formando la HDL naciente. Después, APOA1 activa la enzima lecitina colesterol acil transferasa (LCAT) y con ella, la síntesis de ésteres de colesterol a partir de colesterol libre y fosfatidil colina. Mediante la formación de un interior hidrofóbico donde se localizarán los ésteres, le permite el crecimiento de la partícula y su forma madura de HDL [50,55].

Revisión bibliográfica

Finalmente, las HDL maduras llevan los ésteres de colesterol a los hepatocitos directamente vía receptor *scavenger* tipo B1 (SR-B1) o liberándolos a las lipoproteínas con APOB a través de la acción de la CETP. Esta proteína plasmática es capaz de transferir ésteres de colesterol de las HDL o LDL hacia las TRL en intercambio por TG. En resumen, HDL son el principal vehículo para el colesterol desde tejidos periféricos para su excreción o catabolismo. Por ello, el colesterol HDL es comúnmente conocido como colesterol bueno ya que se ha asociado altos niveles de este colesterol con un bajo riesgo de tener una enfermedad cardiovascular [50,55].

Por esto último, el estudio de la composición de HDL se ha vuelto un objeto de estudio. Se ha visto que estas lipoproteínas son moléculas complejas, que, aparte de lípidos, son capaces de transportar proteínas, hormonas, vitaminas y miRNA a los tejidos. Se han identificado hasta 85 proteínas diferentes, involucradas en funciones como el transporte de lípidos o vitaminas, hemostasis, respuesta inmune y unión de metales, siendo las más frecuentes APOA1, APOA2, APOC3, APOL1, APOE [55,56].

Estas lipoproteínas tienen varias funciones a parte del transporte reverso beneficiosas para el sistema cardiovascular, siendo antioxidantes, antinflamatorias, vasodilatadoras, antitrombóticas, inmunomoduladores y reparadoras del endotelio reclutando células endoteliales progenitoras. La principal enzima antioxidante de las HDL es la paraoxonasa 1 (PON1). PON1 es necesaria para la activación de la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS), encargada de biosintetizar el óxido nítrico y evitando la producción de malonildialdehído (MDA), un marcador de la peroxidación lipídica [55,57].

Otra enzima implicada en este proceso es la PAF-AH (platelet-activating factor-acetylhydrolase), participando no solo en la degradación de fragmentos de fosfolípidos oxidados sino inhibiendo la habilidad de las células presentadoras de抗ígenos para estimular células T y bloquear la conversión de monocitos en células dendríticas. Siendo este uno de los papeles descritos de HDL en la respuesta inmune formando parte de ambos sistemas inmune, innato y adaptativo [55,58].

II.1.4 Metabolismo de glucosa y carbohidratos

Durante la ingesta, los carbohidratos son digeridos y procesados por varias glucosidasas del tracto digestivo en los monosacáridos resultantes, principalmente glucosa y transportados como energía para la producción de ATP al organismo. En la mayoría de los tejidos de los mamíferos, el catabolismo de la glucosa hacia el piruvato, denominado glucólisis, es la principal forma de producción de ATP. En tejidos con abundantes mitocondrias, el piruvato citóslico se transporta a la mitocondria y es convertido en acetil CoA, por la enzima piruvato deshidrogenasa, incorporarse al ciclo de Krebs junto con una molécula de oxalacetato para la generación de ATP en la cadena de fosforilación oxidativa. En casos particulares, como las células rojas que carecen de mitocondrias o en condiciones isquémicas, el piruvato es transformado en lactato para regenerar NAD⁺, necesario para continuar realizando la glucólisis [59].

Como hemos comentado, el hígado es el encargado de almacenar el exceso de glucosa en glucógeno, y llegado el caso, en forma de ácidos grasos a través de DNL. De forma que en situaciones de ayuno pueda liberar la glucosa almacenada o incluso sintetizarla por la vía de la gluconeogénesis, jugando un papel vital que comentaremos más en detalle a continuación.

II.1.4.1 Metabolismo y regulación del glucógeno en el hígado

La acumulación del glucógeno en el hígado durante estados postprandiales permite almacenar glucosa que se usará en momentos de ayuno. Hay muchas etapas de regulación necesarias para la activación de la glucógeno sintasa, enzima clave de la glucogenogénesis y para la inhibición

Revisión bibliográfica

de la glucógeno fosforilasa, enzima clave para la glucogenolisis. La glucógeno sintasa es la encargada de la elongación de las cadenas de glucógeno mediante la transferencia de un residuo de UDP-glucosa al final de una cadena existente de glucógeno, formando un enlace glicosido $\alpha 1\rightarrow 4$ [14].

La regulación de esta enzima ha sido estudiada en su isoforma muscular, la cual es inactivada vía fosforilación de múltiples dominios por la proteína quinasa A (PKA) y la glucógeno sintasa quinasa 3 (GSK-3). Durante situaciones de ayuno, la forma activa desfosforilada de GSK-3 fosforila la glucógeno sintasa, inactivándola y a su vez bloqueando la producción de glucógeno hepático. En cambio, después de la ingesta, la cascada de señalización de la insulina, activa AKT, fosforilando GSK-3 y activando la síntesis del glucógeno. Además, altas concentraciones de glucosa 6-P activa alostéricamente esta enzima y su actividad catalítica en estado postprandial. Se postula que la proteína fosfatasa 1 (PP1) es la responsable de la desfosforilación de la glucógeno sintasa, ya que tanto glucosa como insulina la activan mientras que el glucagón y la epinefrina se han asociado con su inhibición [14,60].

En el otro lado, la glucógeno fosforilasa es la principal enzima involucrada en la glucogenolisis, catalizando la reacción de retirar un residuo de glucosa de la cadena de glucógeno y liberando glucosa 1-P, que será transformada a glucosa 6-P por la fosfoglucomutasa para entrar en glucólisis o ser liberada al torrente sanguíneo como glucosa tras la desfosforilación por la glucosa 6 fosfatasa. La glucógeno fosforilasa se encuentra activa cuando su residuo serina 14 está fosforilado, para ello se requiere una cascada de señalización que comienza con el glucagón y la epinefrina. La unión de ambas hormonas a sus receptores de superficie activa la adenilato ciclase con el consiguiente aumento intracelular de AMP cíclico (cAMP) y la activación de la proteína quinasa A (PKA). La PKA es la responsable de la activación y fosforilación de glucógeno fosforilasa quinasa, que, al fosforilarse, fosforila a su vez a la glucógeno fosforilasa aumentando la liberación de glucosa. Sin embargo, en situación postprandial, la insulina promueve la acción de PP1, que desfosforila e inactiva la acción de la glucógeno fosforilasa, como resume la figura 3 [60,61].

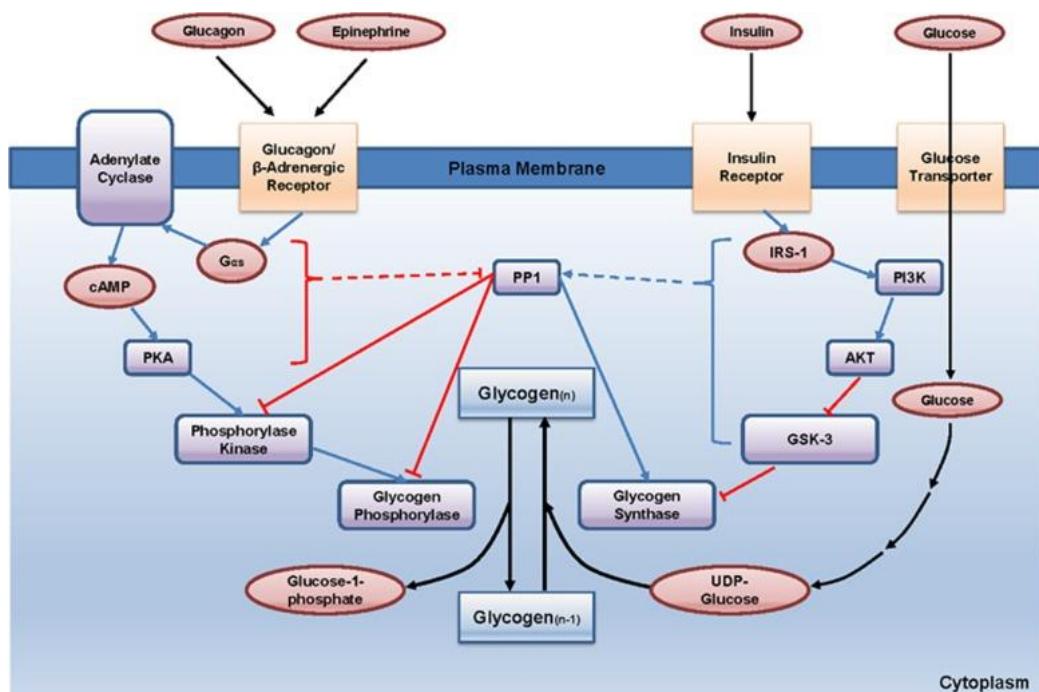


Figura 3: Resumen del metabolismo y regulación del glucógeno en el hígado. Adaptado de [14]

Revisión bibliográfica

II.1.4.2 Metabolismo y regulación de la glucólisis.

Como hemos comentado, la glucólisis es la forma principal de catabolismo de la glucosa, usado por la mayoría de las células para generar energía. En este proceso, las enzimas limitantes son la glucoquinasa (GK) que convierte la glucosa en glucosa 6-P, la fosfofructoquinasa 1 (PFK-1), que convierte la fructosa 6-P en fructosa 1,6-bifosfato y la piruvato quinasa hepática (L-PK) que convierte el fosfoenolpiruvato (PEP) en piruvato. Estas tres enzimas están fuertemente reguladas alóstéricamente, controlando el catabolismo celular de la glucosa [14,59].

La enzima glucoquinasa es una hexoquinasa con una alta Km, baja afinidad por su sustrato, y se encuentra tanto el hígado como en las células β -pancreáticas, funcionando como un sensor de glucosa. Sin embargo, a diferencia de otras hexoquinasas, no se encuentra inhibida por su producto, glucosa 6-P, permitiendo su constante utilización para la glucólisis siempre que haya una gran cantidad de glucosa, como después de la ingesta. GK es regulada mediante interacción con la proteína reguladora de glucoquinasa (GKRP), de forma que, en bajas concentraciones de glucosa intracelular, la unión de GK y GKRP es promovida por la fructosa 6-P, moviendo este complejo al núcleo. Sin embargo, cuando las concentraciones de glucosa son altas, la glucosa compite con la fructosa 6-P para unirse al complejo, y promover la localización citosólica de GK y su liberación de GKRP, aumentando su actividad y producción de glucosa 6-P [14,62].

Fosfofructoquinasa-1 (PFK-1) cataliza un paso metabólicamente irreversible de la degradación de la glucosa a través de la ruta de la glucólisis. Esta enzima es alóstéricamente inhibida por ATP y citrato, dos metabolitos que indican abundancia energética y es activada tanto por ADP o AMP. Además, la actividad de PFK-1 está activada alóstéricamente por la fructosa 2,6-bifosfato (F26BP), un metabolito no glucolítico con un importante papel en la regulación de este metabolismo. La producción de F26BP es inducida por la acción de la insulina, e inhibida por el glucagón, controlando así la actividad de PFK-1 [59,63].

Como las otras enzimas, L-PK es regulada tanto alóstéricamente como mediante modificaciones postraduccionales. La fructosa 1,6 bifosfato, como indicador de glucólisis, activa la enzima mientras que ATP, acetil CoA y los ácidos grasos de cadena larga la inhiben. Por último, la cascada de señalización del glucagón, a través de PKA inhibe su acción junto con el aumento intracelular de cAMP en situaciones de ayuno y, por el contrario, es activada y desfosforilada por la insulina [14,63].

Además de esta fuerte regulación por parte de las principales enzimas, la glucólisis está regulada por los factores de transcripción SREBP-1c previamente comentado y ChREBP ("carbohydrate response element binding protein"). Estos elementos de regulación se activan para llevar a cabo la síntesis de ácidos grasos y triglicéridos en situaciones de una dieta rica en carbohidratos, activados durante la ingesta y bloqueados en situaciones de ayuno. SREBP1-c está regulado por las proteínas SCAP e INSIG y aunque es un modulado por bajas concentraciones de colesterol hepático, también es controlado por la acción de la insulina. Este proceso aún no está completamente dilucidado, pero se piensa que podría estar involucrado en un bucle de autorregulación. Curiosamente, el factor de transcripción sensible a oxisteroles LXR parece controlar SREBP1-c pero no SREBP-2, regulándose de forma diferente también a nivel de concentraciones de colesterol [31,35,37,64].

Se han visto en varios estudios que hay varias quinasas involucradas en la actividad de SREBP1-c. En la línea celular HepG2, se demostró que PKA reduce la afinidad de SREBP-1a a unirse al DNA al fosforilar la serina 338 (equivalente a la serina 265 de SREBP-1c). En otro estudio se demostró que GSK-3, involucrada en la reducción de la gluconeogénesis, reduce la actividad de

Revisión bibliográfica

SREBP-1 fosforilando su residuo C-terminal, promoviendo su ubiquitinación y degradación. Además, ambas AMPK y la quinasa inducible por sales 1 (SIK1) se encuentran involucradas en su regulación negativa a través de la fosforilación de la serina 372 por parte de AMPK, bloqueando su proteólisis y translocación al núcleo, así como de fosforilación de la serina 329 que directamente reduce su actividad transcripcional. Todos estos datos parecen indicar que el control de la actividad de SREBP-1c es crítico para el mantenimiento de la homeostasis tanto a nivel glucídico como lipídico en el hígado [31,65,66].

ChREBP, al igual que SREBP-1c, es activado como resultado a una dieta rica en carbohidratos teniendo una regulación similar. La activación de ChREBP ocurre gracias al aumento de la glucosa, causando la liberación del citosol de la proteína 14-3-3 de ChREBP, translocándose al núcleo y activando los genes que contienen el dominio de respuesta de carbohidratos (ChoRE). Un estudio indicó también un rol de LXR en la activación de ChREBP, aunque son necesarios más estudios para confirmarlo ya que el ratón carente de LXR no mostró cambios en la expresión de ChREBP. ChREBP tiene tres residuos de fosforilación, PKA controla dos de ellos, bloqueando su translocación al núcleo (Ser196) y su capacidad de unión al DNA (Thr666), también controlada por AMPK (Ser568). Estos sitios son fosforilados en ayunas y desfosforilados en situaciones posprandiales por la proteína fosfatasa 2A (PP2A) mediada por la concentración de xilulosa 5-fosfato (X5P) [31,67,68]. En la figura 4 se resumen como influyen los factores de transcripción SREBP-1c y ChREBP y la relación entre glucólisis y lipogénesis *de novo*.

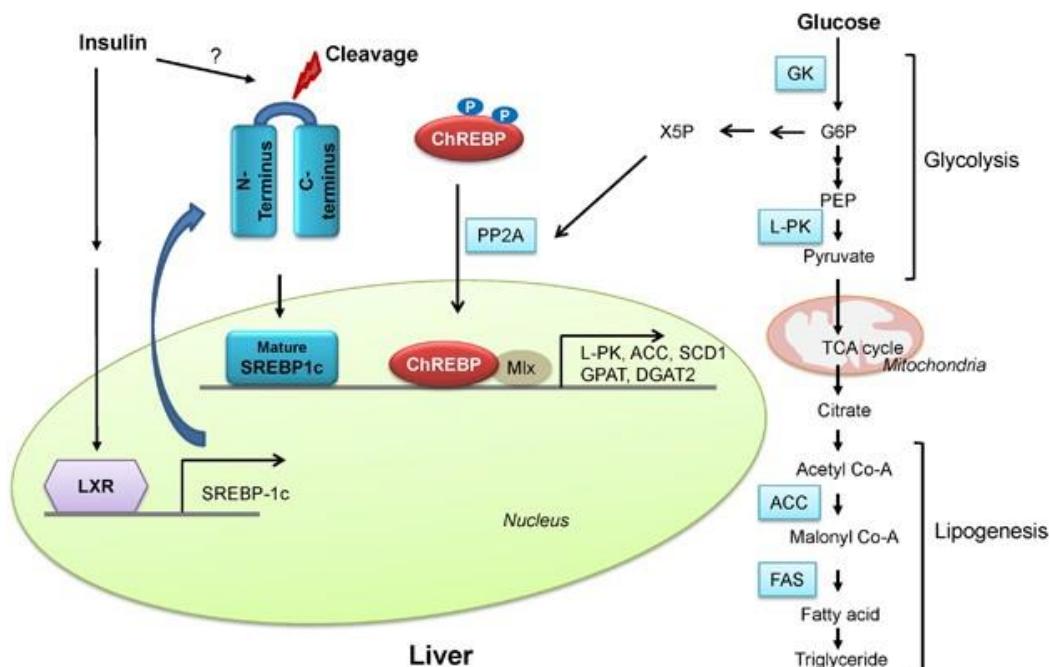


Figura 4: Resumen de las cascadas de regulación de la glucólisis hepática. Adaptada de [14].

II.1.4.3 Metabolismo y regulación de la gluconeogénesis.

Tiempos prolongados de ayuno inducen la síntesis de glucosa *de novo* a partir de precursores diferentes a los carbohidratos, término denominado como gluconeogénesis, activándose cuando las reservas de glucógeno escasean. Este proceso se inicia con la conversión del piruvato a oxalacetato catalizado por la piruvato carboxilasa (PC) en la mitocondria, y termina en el citosol en un proceso en el que se involucran varias enzimas. Dentro de los sustratos para la gluconeogénesis encontramos aminoácidos, que son convertidos a piruvato o intermediarios del ciclo de Krebs, lactato, que será transformado a piruvato por la lactato deshidrogenasa, glicerol,

Revisión bibliográfica

proveniente de la lipólisis del tejido adiposo blanco que ocurre en ayunas y que a través de dos procesos catalizados por la glicerol quinasa y la glicerol 3-fosfatasa deshidrogenasa se transforma en dihidroxiacetona fosfato, un precursor intermedio. Las enzimas claves en la regulación de esta ruta son la glucosa 6-fosfatasa (G6PC), la fructosa 1,6 bifosfatasa (Fbpase1), la PC, y la fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPCK) que se activan durante el ayuno para aumentar la gluconeogénesis [14,63].

El acetil-CoA mitocondrial proveniente de la oxidación de ácidos grasos durante el ayuno funciona como regulador alostérico de PC, promoviendo la conversión de piruvato a oxalacetato para la gluconeogénesis. Por otro lado, F26BP, como se ha indicado antes, es un regulador de la glucólisis al activar PFK-1 y tiene otro papel al inhibir la gluconeogénesis bloqueando alostéricamente a Fbpase1, regulando simultáneamente ambas rutas. Debido a que Fbpase2 es activada, pero PFK-2 es inhibida durante el ayuno, la falta de F26BP permite la activación de Fbpase1 y aumenta la producción de fructosa 6-fosfato. Sin embargo, pese a este control alostérico, la activación crónica de la gluconeogénesis se consigue mediante mecanismos transcripcionales, entre los que participan CREB, FoxO1 y varios receptores nucleares [14,69].

En situaciones de ayuno, la liberación de glucagón y epinefrina en el torrente sanguíneo activan la cascada de señalización en el hígado, aumentando los niveles de cAMP mediante la activación de la adenilato ciclase, llevando a la activación de PKA y la consiguiente inducción de CREB vía fosforilación. Este evento es crucial para el reclutamiento de histona acetiltransferasas (HAT) CBP/p300, acetilando las histonas H3 y H4, activando la transcripción de varios genes dianas. La transcripción dependiente de CREB aumenta por la asociación con varios coactivadores transcripcionales (CRTCs “*CREB regulated transcription coactivators*”), que son dianas de CBP/p300 y promueven una interacción más fuerte entre ellos en su unión a los promotores de los genes diana. Este papel de CREB se confirmó en ratones carentes de la proteína, teniendo un nivel de glucosa en sangre inferior, así como una reducción de expresión de los genes gluconeogénicos. Sin embargo, el papel de CBP no se ha podido confirmar, ya que la disruptión de la interacción CREB-CBP no parece afectar a la glucemia [70–73].

La actividad de los cofactores CRTC es regulada por su localización celular y por quinasas como AMPK, SIK1 o SIK2. El estatus de fosforilación de estos cofactores parece estar regulado en respuesta a la señalización por cAMP o por la concentración de calcio intracelular. Dentro de la familia de CRTC, CRTC2 es la isoforma dominante en el hígado, con un papel en la regulación de la gluconeogénesis ya que al reducir su expresión *in vivo* los ratones mostraron una menor glucemia y una mejor tolerancia a la glucosa [73–75].

Los factores de transcripción FoxOs (“*Forkhead box O*”) reconocen los elementos de respuesta a insulina ricos en AT de los promotores. La isoforma predominante en el hígado es FoxO1 y su actividad está regulada por la fosforilación dependiente de su localización celular siendo diana de la vía de la insulina/Akt. Después de su fosforilación, FoxO1 se mueve al citosol en asociación con la proteína 14-3-3, donde es degradado. Además de su fosforilación, es regulado por la acetilación de sus residuos lisinas por HAT, inhibiendo su actividad transcripcional. FoxO1 en el hígado regula la gluconeogénesis activando la transcripción de genes involucrados como PEPCK o G6PC y se le considera como el mayor punto de regulación en la inhibición de la gluconeogénesis causada por la insulina. En un estudio con ratones carentes de FoxO1 hepática, éstos mostraron un nivel de glucosa más bajos asociados con una liberación de glucosa hepática, remarcando su papel en el control de la homeostasis de la glucosa *in vivo* [76–78].

Revisión bibliográfica

El coactivador 1 alfa del receptor activado de proliferación peroxisomal (PGC1 α) es un conocido activador de receptores nucleares, funcionando como coactivador transcripcional de FoxO1 en la gluconeogénesis hepática. En el hígado, PGC-1 α es aumentada durante ayunas vía CRTC2-CREB y es crítico para el mantenimiento de la gluconeogénesis durante tiempos de ayuno prolongado, aumentando la actividad transcripcional de FoxO1 [73,79].

Otra familia de factores de transcripción son los receptores nucleares, como el receptor de glucocorticoides (GR). GR es activado por el cortisol, que es liberado por el cortex adrenal en situaciones de estrés crónico como un ayuno prolongado. Se ha visto que GR se une directamente a sitios de activación de genes gluconeogénicos como PEPCK y G6PC. El factor nuclear de hepatocitos 4 (HNF4) tiene el mismo motivo de unión y se cree que podría coordinar también el control de la gluconeogénesis hepática. Por otro lado, ERRy ("estrogen-related receptor gamma") se ha visto también involucrado en la regulación de la gluconeogénesis siendo activado en situaciones de ayuno o de resistencia a la insulina mediante CRTC2-CREB. Este factor regula la gluconeogénesis mediante la unión a motivos diferentes a los previamente comentados y su inhibición *in vivo* causa una reducción de la hiperglucemia en ratones diabéticos. La actividad de ERRy aumenta por la interacción con PGC1 α , siendo este coactivador un importante regulador dentro del metabolismo hepático de la glucosa [80,81].

Por último, tres miembros de la familia de receptores nucleares huérfanos, denominados así por no tener un ligando endógeno: SHP, DAX-1 y SMILE se han encontrado implicados en la represión transcripcional de la gluconeogénesis. Curiosamente, la metformina, una droga utilizada para rebajar la glucemia, activa la transcripción de SHP vía AMPK, que a su vez inhibe la transcripción dependiente de cAMP al unirse a CREB e impedir su unión con CRTC2. La sobreexpresión de SHP en ratones diabéticos redujeron la glucemia, comprobando la función de este receptor. Estos resultados nos muestran un mecanismo dual de la ruta metformina-AMPK dependiente para inhibir la gluconeogénesis hepática a nivel transcripcional, una fuerte regulación de CRTC2 mediante fosforilación y una regulación a largo plazo mediante la expresión de SHP [82–85].

Los dos receptores restantes, DAX-1 y SMILE se ha visto que inhiben la gluconeogénesis al inhibir los eventos transcripcionales ocasionados por HNF-4. Se ha observado que la quinasa SIK1 aumenta la expresión de DAX-1 en el hígado, mientras AKT activa la transcripción de SMILE en situación postprandial. En particular, SMILE sustituye a PGC-1 α de HNF4 y de los promotores gluconeogénicos en respuesta a la insulina, proponiendo este factor como un posible represor de la gluconeogénesis [84,85].

II.1.5 Retículo endoplasmático (RE) y estrés del retículo

El retículo endoplasmático (RE) es un orgánulo central de la célula eucariota, teniendo múltiples funciones como transporte celular, síntesis y plegamiento de proteínas, entre otras. El RE está compuesto por una un conjunto de sacos de membranas llamados cisternae, constituyendo más de la mitad del contenido membranoso de la célula animal. La parte interna o lumen de la membrana es una continuación del espacio perinuclear, separándolo de la parte externa, el citosol [86].

Hay dos tipos de RE: retículo endoplasmático rugoso (RER) y retículo endoplasmático liso (REL) cuyas proporciones varían según la función de la célula, compartiendo numerosas proteínas en común, así como la síntesis de colesterol y múltiples lípidos. La principal diferencia son los ribosomas localizados en la membrana citosólica del RER, que le hacen especializarse en la síntesis y plegamiento de las proteínas, siendo especialmente prominente en células como los

Revisión bibliográfica

hepatocitos. El REL carece de ribosomas y está involucrado en la síntesis de lípidos, fosfolípidos y esteroides, siendo especialmente abundante en hígado y células gonadales [86].

La superficie del RER está tachonada con complejos de síntesis de proteínas o ribosomas, los cuales le confieren ese aspecto rugoso que les da nombre. El sitio de unión del ribosoma se denomina translocón, sin embargo, los ribosomas no son un componente estable del ribosoma ya que están continuamente siendo liberados y retenidos [87]. Un ribosoma se une solamente al RER cuando un complejo ácido nucleico-proteína se forma en el citosol. Este complejo especial se forma cuando el ribosoma empieza a codificar un péptido señal que redirige a esta nueva proteína hacia la ruta de secreción, que es reconocido y unido por una partícula de señal de reconocimiento (SRP). La translocación pausa la síntesis mientras el ribosoma se ancla a la membrana formando el complejo por el cual la traducción continua con la síntesis de la proteína naciente dentro del lumen o membrana del retículo. La proteína es procesada en el RE por una peptidasa que remueve el péptido señal, siendo los ribosomas liberados de vuelta al citosol [88].

En muchos tipos celulares el retículo endoplasmático liso es escaso, habiendo áreas donde el retículo es parte liso, parte rugoso, llamado RE transicional porque contiene dominios de salida. Estas son las áreas donde el transporte de vesículas que contienen lípidos y proteínas procedentes del ER se dirigen al aparato de Golgi. También se llevan a cabo el metabolismo de carbohidratos, la detoxificación de productos metabólicos, así como del alcohol y drogas, la unión de receptores de membrana celular, el metabolismo de esteroides y en células musculares regula la concentración de calcio. En el retículo se encuentra la enzima glucosa-6-fosfatasa, que convierte la glucosa-6-fosfato en glucosa, crucial en la gluconeogénesis [89–91].

Las proteínas secretadas son marcadas por el retículo con un péptido señal localizado en el extremo N-terminal de la cadena polipeptídica que consta de unos pocos aminoácidos que son removidos una vez llega a su destino. Las proteínas con destino a otros orgánulos son empaquetadas y transportadas por un sistema de vesículas que se mueven por el citoesqueleto hacia su destino final [89].

II.1.5.1 Síntesis de proteínas y modulación del estrés

El retículo endoplasmático funciona como el sistema de transporte y distribución celular. La mayoría de las proteínas residentes del retículo son retenidas debido a un motivo de cuatro aminoácidos al final de la secuencia de proteína. El motivo más común de retención es KDEL para proteínas del lumen y KKXX para proteínas transmembrana. Una de las principales funciones del retículo es el correcto plegamiento de proteínas, incluyéndose N-glicosilación, formación de puentes disulfuro y oligomerización. En estos procesos están implicados las proteínas chaperonas, incluyendo las proteínas disulfuro isomerasas, la familia Hsp70, calnexina, calreticulina (CALR), entre otras. Solo las proteínas plegadas correctamente pueden ser transportadas del RE al aparato de Golgi [89,92,93].

Cuando el número de proteínas no plegadas en el lumen del retículo es alto se activa la señal adaptativa de estrés conocida como respuesta ante proteínas no plegadas (UPR). Ante situaciones patológicas, como un exceso de NEFA, alteraciones en la regulación redox, privación de glucosa, infección viral o sobre expresión de proteínas, entre otras, pueden inducir este estrés y la consiguiente señal UPR durante la cual el plegamiento de proteínas es ralentizado, aumentando el número de proteínas sin plegar, lo que puede llegar a causar daño por hipoxia o isquemia, así como resistencia a la insulina. Cuando ocurre la UPR como respuesta celular, se activan cascadas de señalización para aumentar la producción de chaperonas implicadas en el plegamiento celular [94–97].

Revisión bibliográfica

Fisiológicamente, UPR es fundamental para mantener la homeostasis en los hepatocitos durante el metabolismo y la secreción de proteínas, sin embargo, esta señal puede derivar en patogénesis hepática causando respuestas inflamatorias, esteatosis, apoptosis hepática y fibrosis vía activación HSC. La señalización de UPR es llevada a cabo a través de tres rutas principales llevadas por las proteínas transmembrana: IRE1 α ("*inositol requiring enzyme 1 α* "), PERK ("*protein kinase RNA-like ER kinase*") y ATF6 α ("*activating transcription factor 6 α* ") [96].

La señalización a través de IRE1 α es la más conservada de las tres vías, en condiciones normales esta proteína se encuentra unida a las chaperonas del lumen del RE, previniendo su señalización. Cuando la capacidad de las chaperonas se ve sobrepasada, IRE1 α se oligomeriza y autofosforila, activando su cascada de señalización que comienza con la activación de su dominio endorribonucleasa. IRE1 α actúa sobre el splicing de XBP1 ("*factor X-boxbinding protein 1*") liberando un fragmento de 26 nucleótidos del mRNA original que codificará su "versión splicing" denominada sXBP1. sXBP1 activa la transcripción de varias chaperonas y componentes de la ruta de secreción para aliviar la sobrecarga del retículo, así como la maquinaria de degradación asociada a ER (ERAD) para facilitar la exportación de proteínas mal plegadas hacia su degradación. Otra función de la endorribonucleasa es la limitación de la traducción de mRNA y algún microRNA no esenciales a través de un proceso denominado RIDD ("*regulated IRE1-dependent decay*"). Sin embargo, el dominio IRE1 α tiene una ruta de señalización diferente mediante el reclutamiento del factor de necrosis tumoral asociado al receptor 2 (TRAF2), que actúa como adaptador para activar la quinasa reguladora de señal apoptótica 1 (ASK1). ASK1 a su vez fosforila JNK que promueve la apoptosis e inflamación, la inhibición de señalización de NF- κ B y la producción de ROS [98–102].

PERK1 es activado a través del reclutamiento de chaperonas, su activación causa la fosforilación de varios sustratos entre ellos EIF2 α ("*eukaryotic initiation factor 2 α* ") causantes de una atenuación de la traducción global, pero permitiendo la traducción de varios factores de transcripción como ATF4 ("*activating transcription factor 4*"). ATF4 regula la transcripción de varios genes de la cascada UPR que median la supervivencia y apoptosis celular, así como de activar la proteína CHOP. ATF6 es el menos conocido, se cree que interacciona con proteínas plegadas y sin plegar en el aparato de Golgi, y cuando es procesado a su forma activa, ATF6 α p50, se transloca al núcleo para actuar como un factor de transcripción de varias chaperonas. También heterodimeriza con sXBP1 aumentando la expresión de la maquinaria de ERAD y CHOP [103–105].

II.1.5.1.2 Estrés del retículo y homeostasis lipídica

Los hepatocitos son células secretoras, encargadas de sintetizar la mayoría de las proteínas plasmáticas con excepción de las inmunoglobulinas, gracias a un ER muy abundante a través del cual regula el proceso de síntesis, control de calidad y secreción. Además, el retículo es también el lugar donde ocurre la biosíntesis de varios lípidos, como colesterol, fosfolípidos o ceramidas. Como se comentó, las VLDL empiezan aquí su biogénesis y la apolipoproteína B es cargada de lípidos por la proteína MTP mientras se va translocando a través del retículo [96,106,107].

La función correcta del RE es vital para el funcionamiento del hepatocito, por ejemplo, la deleción específica de hígado de la chaperona BiP/GRP78 en ratones causa la desorganización y dilatación del RE, causando estrés, esteatosis, apoptosis, lesión hepática y fibrosis. La pérdida de la función de Sec61 α 1, un componente del translocón del ER también causa hepatitis, hepatomegalia y activación de la respuesta de estrés del RE. La inducción farmacológica de estrés del retículo en modelos animales carentes de elementos UPR corroboró la esteatosis hepática con el factor común de la existencia de un estrés mantenido, excesivo o no resuelto.

Revisión bibliográfica

Todos estos datos indican que la esteatosis hepática es la respuesta más conservada a un estrés del retículo no resuelto y posiblemente las diferentes rutas de UPR previenen este acúmulo lipídico bajo condiciones fisiológicas [108–110].

El ratón carente de XBP1 hepático mostró una profunda hipocolesterolemia e hiperglucemia debido a una reducida síntesis *de novo* de ácidos grasos. En estos ratones, se encontró una hiperactividad de IRE1 α , cuyo silenciamiento restauró los niveles de lípidos plasmáticos, sugiriendo un posible papel para IRE1 α mediante RIDD en mantener la homeostasis lipídica en el hígado. Juntos, XBP1 y RIDD regulan el metabolismo lipídico a través de varios genes como *Dgat2*, *Acacb* y *Scd1* suprimidos en el ratón carente de XBP1 hepático y los genes *Ces1* y *Angptl3* fueron identificados como sustratos de RIDD. En ratones obesos, la delección de XBP1 causó la reducción de colesterol y triglicéridos tanto en plasma como en hígado, confirmando que en ausencia de XBP1, la respuesta de RIDD es la predominante y la causante de esta reducción lipídica. Contrario a estos resultados, la sobreexpresión de XBP1 tuvo un efecto anti-esteatósico, reduciendo la síntesis de ácidos grasos debido a una reducción de *Srebp1c* y sus genes dianas *Fasn* y *Scd1*. Sin embargo, esto es esperable debido a que una mayor respuesta de XBP1 no impide el efecto de IRE1 α mediante la respuesta RIDD [111–113].

Otros estudios han demostrado que IRE1 α regula otros aspectos de la homeostasis lipídica como la supresión de factores de transcripción lipogénicos (C/EBP β , C/EBP δ y PPAR γ) el correcto mantenimiento de la secreción de VLDL mediante la activación de PDIs, un componente vital para la correcta función de la actividad de MTP. Hay evidencias de que otros sensores de UPR están involucrados en la homeostasis lipídica. El factor procesado ATF6 α p50 regula el metabolismo lipídico a través de la unión con SREBP-2 activo, inhibiéndolo y bloqueando la actividad transcriptora de sus genes dianas [114,115].

II.5.1.2 Estrés del retículo, homeostasis glucídica y resistencia a la insulina

La gluconeogénesis está ligada al ER en muchos aspectos. En los hepatocitos se codifica la proteína 3 elemento de unión en respuesta de AMPc (CREBH) que comparte similitudes con ATF6, activándose en situaciones de ayuno y liberando el factor de transcripción CREB, incrementando la gluconeogénesis. Por otra parte, el paso final de la gluconeogénesis se da en el lumen del retículo en el cual la G6PC1 desfosforila a la glucosa 6-fosfato para su liberación al torrente sanguíneo. Que este proceso ocurra en el ER tiene mucho sentido ya que los carbohidratos complejos no son solo nutrientes sino una parte importante en las modificaciones post- o co-traduccionales de las proteínas y lípidos. El plegamiento de glicoproteínas está regulado por chaperonas y enzimas para mantener la homeostasis celular. La glicosilación es un proceso de control de calidad crucial para la célula y la distribución de las proteínas y por ello, un desajuste de los niveles de glucosa está relacionado con estrés del retículo y la activación de UPR [116,117].

Las tres principales vías de UPR se han relacionado con el metabolismo de la glucosa. Por ejemplo, en ratones carentes PERK, cuando se elimina la fosforilación de EIF2 α , mostraron defectos en la gluconeogénesis. Los genes relacionados con la síntesis de glucosa, así como la glucógeno sintasa 1 son dianas de XBP1. ATF6 ha sido relacionado con el metabolismo a través de la interacción con CRTC2 o TORC2. El estrés del retículo causa la desfosforilación de CRTC2, interaccionando con ATF6 y moviéndose al núcleo donde ocupan el promotor de XBP1. De esta forma, la activación de ATF6 reduce la gluconeogénesis al romper la interacción CREB-CRTC2, impidiendo la activación transcripcional al unirse a promotores de genes gluconeogénicos. Esta interacción puede ser un componente de la disrupción de la gluconeogénesis en obesidad y

Revisión bibliográfica

diabetes tipo 2, donde la sobreexpresión de ATF6 en el hígado es beneficial, revirtiendo los efectos de CRTC2 [94,118–120].

La resistencia a la insulina y consiguiente aumento de glucosa sanguínea están asociadas con obesidad y diabetes tipo 2. La obesidad puede inducir estrés del retículo al fosforilar JNK vía IRE1 α , facilitando la alteración de la cascada de señalización de la insulina y, por ende, su disfunción. Esta relación se demostró cuando el estrés del retículo inhibió la absorción de glucosa estimulada por insulina, relacionando la activación de JNK y la expresión de TRIB3 (“tribble-like protein 3”) vía IRE1 y PERK. El retículo juega una función vital en el correcto funcionamiento de la insulina, sin embargo, no hay un mecanismo descrito acerca de cómo los efectos de activación del estrés en el ER afectan a la disfunción de la insulina para su comprensión [121–123].

II.1.6 Gotas lipídicas

Como hemos comentado, el hígado juega un papel clave en el mantenimiento y distribución de lípidos en el organismo, sintetizándolos y almacenándolos en situaciones de exceso energético para liberarlos en ayunas. En condiciones fisiológicas, solo una pequeña cantidad de lípidos son almacenados en el citosol de los hepatocitos, en unos orgánulos conocidos como gotas lipídicas (LD, “*lipid droplets*”). Tienen una composición similar a las lipoproteínas formada por un interior de triglicéridos y ésteres de colesterol y rodeadas de una monocapa de fosfolípidos y diversas proteínas que regulan el metabolismo lipídico y cambian en función de los tejidos. Las gotas lipídicas ofrecen una gran diversidad de funciones desde el almacenamiento y protección frente a la lipotoxicidad, la regulación del estrés oxidativo y el consiguiente mantenimiento de la homeostasis del RE y mitocondrias, además de estar implicadas en mecanismos de inflamación, autofagia y muerte celular [124].

II.1.6.1 Biogénesis de gotas lipídicas y síntesis de lípidos neutros

El hígado almacena ácidos grasos de diversas fuentes que varían según el estado metabólico del organismo, siendo procedentes en ayunas de ácidos grasos de la lipólisis del tejido adiposo mientras que en el estado postprandial son de la endocitosis de lipoproteínas remanentes, así como de lipogénesis *de novo* a partir de carbohidratos. Esto último, está muy regulado por todos los factores de transcripción previamente comentados como SREBP1c y ChREBP sin embargo, un nuevo mecanismo ha sido descubierto recientemente. Cuando las gotas lipídicas se acumulan en la célula, los factores de transcripción MLX, incluido ChREBP, se unen a éstas por las hélices anfipáticas de dominio altamente conservado C-terminal, reduciendo su disponibilidad nuclear como factor de transcripción [125].

El primer paso comienza en el RE, con la síntesis de lípidos neutros, que independientemente del origen de los ácidos grasos empieza con la formación de ésteres de colesterol por la acil CoA: colesterol O-aciltransferasa (ACAT1 y ACAT2), y triglicéridos por la diacilglicerol aciltransferasa (DGAT1 y DGAT2). Cuando las concentraciones de estos son bajas, se localizan entre la bicapa de RE, y según aumenta se van uniendo por coalescencia formando lentes grasas. Aunque se cree que esta formación es espontánea de las interacciones hidrofóbicas con el objetivo de reducir su contacto con moléculas polares, se desconoce si se produce en localizaciones al azar o si hay sitios preferentes para la formación de estas lentes de grasa. En estudios recientes se ha visto que existen diferencias en la composición de fosfolípidos de la membrana que pueden provocar asimetría de tensión, favoreciendo la aparición de lentes en estas zonas con menos tensión. Dos proteínas se han propuesto como partícipes en este proceso: FIT2 (“*Fat storage-inducing transmembrane protein 2*”), una proteína integral de RE que, aunque poco conocida

Revisión bibliográfica

parece inducir asimetría en las membranas del RE, favoreciendo la formación de lentes; y seipina, esta proteína forma oligómeros con forma de anillo que estabilizan las conexiones entre las crecientes LD y el RE. Esto se comprobó en individuos con falta de función de la seipina se observó que la capacidad de almacenar grasa en el tejido adiposo estaba parcial o totalmente impedida [126–128].

II.1.6.2 Gemación de las gotas lipídicas

El hígado está continuamente sintetizando fosfolípidos para la producción de las gotas lipídicas y de las VLDL, siendo la composición de la monocapa lipídica de estas partículas muy similar a la composición de la membrana del RE, compuesta por fosfatidil colina (50%), fosfatidil etanolamina (15-25%) y pequeñas cantidades de fosfatidil inositol, ácido fosfatídico y lisofosfatidil colina. La tensión de la superficie de la membrana y el coste energético de exponer los lípidos al ambiente acuoso juegan un papel muy importante en el crecimiento de las lentes de lípidos neutros desde brotes de LD en la membrana del retículo, siguiendo un proceso diferente al de las vesículas secretoras [124,129].

La tensión de la membrana dependerá de la composición fosfolipídica, las moléculas con forma de cono como el diacilglicerol y la fosfatidil etanolamina (PE) desfavorecen la formación de LD, mientras que moléculas de forma opuesta como la fosfatidil colina (PC) ofrecen una buena cobertura y ayudan a estabilizar la membrana. Los lípidos neutros se pueden intercalar entre los huecos de la membrana. Defectos de empaquetamiento, más habituales cuando la ratio PC/PE es bajo, dan como resultado unos brotes grandes e inestables. Por lo tanto, es comprensible que mutaciones en genes implicados en la síntesis de PC causen hígado graso, reforzando lo vital que es su metabolismo para la correcta formación de LD [124,126,130].

La enzima que limita la síntesis de PC es la CCT (“*CTP:phosphocholine cytidylyltransferase*”), que es regulada en una combinación de mecanismos transcripcionales, traduccionales y postraduccionales. La isoforma hepática CCT α tiene un dominio anfipático, que reconoce los efectos de empaquetamientos causados por una baja concentración de PC, produciendo cambios conformacionales que activan su actividad y síntesis de PC. Además, se ha visto que está regulada post-transcripcionalmente por la vía diana de rapamicina de mamíferos (mTOR). De esta forma, la síntesis de PC puede ser activada antes de la llegada de las hormonas implicadas en el metabolismo, ya que la percepción de la ingesta de comida por el hipotálamo activa la síntesis de la proopiomelanocortina (POMC), que activa la vía mTOR y la respuesta a estrés del retículo, activando la expresión de CCT α y la síntesis de PC [131–133].

II.1.6.3 Crecimiento y maduración de la gota lipídica

Después de brotar, en zonas donde varios brotes se concentran, las LD se expanden a través de su fusión mediante puentes de membrana con el RE, permitiendo la transferencia de lípidos neutros a las LD. El crecimiento de estas gotas también puede ser debido a la síntesis de triglicéridos en la superficie de la membrana de la LD debido a la relocalización de enzimas del retículo. De estos brotes cercanos, solo alguno de estos es capaz de liberarse del RE y este mecanismo aún no está elucidado. Sin embargo, se conoce un proceso reversible de reconversión de tamaño mediante el complejo coaptómero COPI, el cual es reclutado en la superficie de las LD por la GTPasa pequeña ARF1, induciendo la división de las LD grandes. Al unirse comienza la depleción de fosfolípidos de membrana de la gota original, causando defectos y una cobertura pobre que promueve la unión de estas gotas con la membrana del RE. Después de la fusión, proteínas integrantes de la membrana como DGAT2 y GPAT4 son capaces

Revisión bibliográfica

de difundir desde el RE a las gotas lipídicas, reconstituyendo los puentes entre los orgánulos [134–136].

II.1.6.4 Proteínas de las gotas lipídicas

Mediante la separación por gradientes se han podido aislar las proteínas que conforman y dan estabilidad a la superficie de las LD. Se han visto asociaciones diferentes tanto en función del tejido como del estado fisiológico de la célula, como hígado graso o resistencia a la insulina, remarcando la importancia del proteoma de LD en la modulación de la energía celular [137,138].

Las proteínas asociadas a las LD tienen una gran variedad de funciones. Muchas enzimas están implicadas en el crecimiento de las LD, como acil-CoA sintasa ACSL3, aciltransferasas GPAT4 y DGAT, o en la liberación de triglicéridos como la principal lipasa hepática ATLG y sus factores reguladores. La familia de proteínas perilipinas (PLIN) son constitutivas de las LD, aunque su principal función es mantener la integridad de la membrana al unirse con proteínas estructurales que les ha relacionado como integradores en rutas metabólicas y reguladores de la lipólisis. En algunas células, se ha encontrado la familia de proteínas CIDE (“*cell death-inducing DNA fragmentation factor 45-like effector*”) que actúan en la mediación de la fusión regulada de LD [138,139].

Además del metabolismo lipídico, hay muchas proteínas involucradas en el transporte, tanto proteínas motoras del citoesqueleto como varias Rab guanosinas trifosfatasas involucradas en la unión con el RE y su autofagia. Otras muchas proteínas se han encontrado formando interacciones con otros orgánulos, como veremos a continuación. Estos contactos son el principal desafío que afronta la caracterización del proteoma, la distinción de proteínas propias de gotas lipídicas de proteínas asociadas a estas pero pertenecientes a otros orgánulos [138].

II.1.6.5 Contacto de las gotas lipídicas con los orgánulos celulares.

La principal interacción de las gotas lipídicas es con el retículo endoplasmático, se estima que el 85% de las LD se encuentran en contacto con este, ya sea a través de los puentes de membrana establecidos durante su biogénesis o mediante unión entre proteínas de una forma independiente a la seipina. Varios complejos se han postulado como DGAT2 con la FATP1, RAB18 e ICE2 (“*Inheritance of cortical RE protein 2*”) o el complejo NAG-RINT1-ZW10 (NRZ) y SNARE (Syntaxin 18, USE1 y BNIP1) [140–142].

En el interior nuclear se han observado gotas lipídicas compartiendo membrana con la capa interna de la membrana nuclear, implicando a la seipina. Estas LD funcionan no solo proporcionando lípidos para el crecimiento de la membrana, sino que juegan un papel clave para la regulación de genes al contener factores de regulación. Se ha encontrado a PLIN5 en el núcleo celular actuando como parte de un complejo de regulación con PGC1α/SIRT1 que controla la expresión de genes mitocondriales de la vía de PKA. Se ha observado, en un artículo reciente, que durante estrés del retículo las gotas lipídicas crecen en el nucleoplasma, resultando en la activación de CCT α y la síntesis de PC. La perilipina 3 compite con CCT α , de forma que la carencia de perilipina 3 causa una mayor síntesis de PC y su sobreexpresión lo contrario, demostrando la importancia en la regulación transcripcional de las LD en el núcleo [143–145].

Durante la lipólisis, una de las principales fuentes de ácidos grasos proviene de la liberación de estos desde las LD. En estado de ayuno, la liberación de ácidos grasos es controlada por la interacción de la ATLG con sus reguladores, transfiriendo los ácidos grasos a la mitocondria de una forma controlada desde los sitios de contacto, reduciendo la lipotoxicidad de los NEFA en el

Revisión bibliográfica

citosol, así como la señalización de lípidos aberrantes. Es posible que estos contactos sirvan también para la realización de la lipogénesis. Las perilipinas regulan la lipólisis, formando una barrera que previene el acceso de ATLG a los triglicéridos de las LD. PLIN1 secuestra al activador de ATLG, ABHD5 (“*1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase*”) y a HSL (“*hormone sensitive lipase*”) en la superficie de LD, reduciendo la lipólisis. Cuando se produce la activación inducida por hormonas de PKA, se hiperfosforila PLIN1, liberando ABHD5 de interaccionar con ATLG, aumentando su actividad catalítica. PKA también fosforila a HSL, la cual se transloca a la superficie de la LD donde hidroliza DAG. Por otro lado, PLIN5 parece regular la lipólisis a nivel mitocondrial, induciendo el reclutamiento de las mitocondrias a las LD, así como interaccionando directamente con ATLG y ABHD5 [146–148].

En respuesta a la privación de nutrientes, se puede producir el reclutamiento de LD al lisosoma, mediado por la GTPasa RAB7 y que termina con la autofagia de las perilipinas 2 y 3. En esta situación, las proteínas que contienen un motivo pentapeptídico son reclutadas por la proteína 70 de choque térmico (HSC70), gracias a la cual son fosforiladas por AMPK y dirigidas a la superficie del lisosoma, donde son translocadas al interior por la acción del receptor LAMP2A (“*lysosome-associated membrane protein 2*”). Por último, los peroxisomas también participan en la oxidación de ácidos grasos a través de contactos con la proteína M1 espastatina. Esta proteína se asocia con el transportador peroxisomal ABCD1 en unión con las proteínas ESCRT-III (IST1 y CHMP1B) para crear puntos de transporte de ácidos grasos [149–151].

II.1.6.6 Contacto entre gotas lipídicas

El contacto entre gotas lipídicas precede la fusión entre ellas, reduciendo el área de expansión de la LD a las lipasas citosólicas, pero facilitando el almacenamiento de triglicéridos. En este proceso los lípidos neutros son transferidos a la gota de mayor tamaño por un proceso a diferencias de presión tanto interna como superficial. Este proceso es llevado a cabo por la familia de proteínas CIDE [152,153].

La unión entre las proteínas CIDE se debe a través de una hélice anfipática en su extremo carboxilo terminal y formar dímero que difundirán por la membrana hasta encontrar otra LD que contenga proteínas CIDE, formando un oligómero que conecte ambas LD. En condiciones normales, la isoforma hepática predominante es CIDEB, pero bajo dietas con alto contenido en grasas, CIDEA y CIDEC aumentan su expresión y control sobre el tamaño de las gotas. CIDEC o FSP27 promueve el crecimiento y la fusión de LD mediante la transferencia y agrupación de lípidos, siendo regulada por CREBH. Durante la fusión de gotas PLIN1 es posible que influya en la oligomerización de FSP27, interactuando con su dominio CIDEN, pero no con CIDEA o CIDEB, aumentando el intercambio de lípidos y la fusión de LD. La GTPasa RAB8a unida a GDP se concentra en los sitios de unión, uniéndose directamente sobre CIDEC y activando la fusión entre LD. Sobre CIDEC existe también varios mecanismos de regulación postraduccional como la acetilación llevada a cabo por la proteína CBP/p300, que comentamos en la regulación de la gluconeogénesis, aumentando su actividad y revertida por una desacetilasa de histonas sensible a ácidos grasos [153–158].

II.2 TXNDC5

La proteína 5 que contiene dominios tiorredoxina o en inglés, *thioredoxin domain containing protein 5*, (TXNDC5) también conocida como proteína residente del retículo endoplasmático 46 (Erp46), proteína disulfuro isomerasa de la familia A, miembro 15 (PDI15), proteína relacionada con tiorredoxina en plasma (PC-TRP) o endo PDI; es una tiorredoxina de la familia de las

Revisión bibliográfica

proteínas disulfuro isomerasas. De hecho, consta de tres dominios tiorredoxina los cuales catalizan su actividad tiorredoxina para desarrollar su función de chaperona en el retículo.

II.2.1 Familia de proteínas disulfuro isomerasas (PDI)

Estas proteínas se localizan en el retículo endoplasmático y son muy abundantes en varios tejidos, llegando a suponer hasta el 0,8% de la proteína celular. Aunque se les considera proteínas residentes del ER, se las han encontrado en otras localizaciones como superficie celular, citosol, mitocondria y en la matriz extracelular, donde facilitan el plegamiento de proteínas reduciendo su agresión. Se han encontrado funciones específicas de PDI en la membrana celular de hepatocitos, plaquetas y células endoteliales [159,160].

Las PDI son inducidas durante estrés del retículo, teniendo un rol en la defensa contra el plegamiento incorrecto de proteínas gracias a su actividad chaperona, siendo responsables de la isomerización, formación y reorganizamiento de los puentes disulfuro. Debido a que la mayoría de los compartimentos celulares tienen entornos reductores, se localizan en el lumen del RE, donde ayudan en el plegamiento proteico redox, en el que están involucrados oxidación, múltiples intercambios intramoleculares tiol-disulfuro, isomerización o reducción, siendo unas actividades altamente específicas con múltiples tipos de interacción entre los diferentes sustratos [159–161].

Todos los genes que engloban la familia PDI forman parte de la super familia de TRX, las tiorredoxinas son una clase de enzimas oxidorreductasas que contienen un sitio activo ditioldisulfuro, o dominio TRX, y están involucradas en la señalización redox. Este agrupamiento implica la presencia de al menos un dominio TRX pudiendo ser catalíticamente activo (*a* y *a'*) o inactivo (*b* o '*b'*). Estos dominios contienen una estructura de plegamiento con aminoácidos dispuestos en una conformación tridimensional conservada. Todas las PDI humanas poseen dominios TRX y difieren mucho en masa molecular y composición fuera del sitio activo [159,161].

Existen, al menos, 21 proteínas de la familia PDI, estas difieren entre ellas en su potencial redox, la especificidad de sustrato, la secuencia de su sitio activo y el pKa de sus cisteínas. Parece que dentro de la familia de las PDI comparten funciones y son capaces de compensarse entre ellas. Por ejemplo, ERp72 compensa la deficiencia de ERp57 asistiendo en el plegamiento de proteínas específicas. En el caso particular de la enzima PDI, la primera enzima identificada de la familia, aunque su actividad sea compensada por ERp57 o ERp72, su carencia demostró que tiene un papel importante en el control del plegamiento oxidativo y que no hay otra proteína capaz de compensar enteramente su pérdida de función [160–162].

II.2.2 Gen TXNDC5

TXNDC5 es un gen localizado en la cadena negativa del cromosoma 6 de *Homo Sapiens*, particularmente en la posición 6p24.3, con una longitud de 29.565 pb, conteniendo 10 exones y 9 intrones que codifican tres dominios tiorredoxina. *TXNDC5* se ha encontrado en otras muchas especies, conociéndose genes ortólogos en chimpancé, ratón, rata, vaca y perro entre otros (Tabla 1).

Txndc5 (ID 105245) se encuentra situado en la cadena negativa del cromosoma 13 de genoma de ratón, con una longitud de 28.558 pb (NC_000079.7: 38684242-38712800) y consta de 12 exones y 11 intrones que codifican también tres dominios tiorredoxina. *Txndc5* codifica 3 transcritos para las 3 isoformas de *Txndc5*, siendo la isoforma 1 más larga y anotada como un precursor de *TXNDC5*, los transcritos 2 y 3 tienen un inicio de traducción más próximo dando como resultado una isoforma con un N-terminal más corto que la primera con 323 y 344

Revisión bibliográfica

aminoácidos respectivamente, en comparación con los 417 aminoácidos de la isoforma 1 [163,164].

Tabla 1: Ortólogos del gen humano TXNDC5.

ORGANISM	CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA	GEN	SIMILARIDAD CON HUMANO
Chimpancé (<i>Pan troglodytes</i>)	Mammalia	TXNDC5	99.44 (n) 98.98 (a)
Ratón (<i>Mus musculus</i>)	Mammalia	Txndc5	86.81 (n) 89.57 (a)
Rata (<i>Rattus norvegicus</i>)	Mammalia	Txndc5	85.83 (n) 89.84 (a)
Vaca (<i>Bos taurus</i>)	Mammalia	TXNDC5	85.42 (n) 89.33 (a)
Perro (<i>Canis familiaris</i>)	Mammalia	TXNDC5	85.91 (n) 87.76 (a)
Zarigüeya (<i>Monodelphis domestica</i>)	Mammalia	TXNDC5	78 (a)
Ornítorrinco (<i>Ornithorhynchus anatinus</i>)	Mammalia	TXNDC5	69 (a)
Gallina (<i>Gallus gallus</i>)	Aves	TXNDC5	74.53 (n) 74.53 (a)
Lagarto (<i>Anolis carolinensis</i>)	Reptilia	TXNDC5	66 (a)
Rana de uñas africana (<i>Xenopus laevis</i>)	Amphibia	BC045245.1	76.01 (n)
Rana de uñas tropical (<i>Xenopus tropicalis</i>)	Amphibia	MGC75894	76.45 (n)
Pez cebra (<i>Danio rerio</i>)	Actinopterygii	Dr.25420	76.05 (n)
Trucha arcoíris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	Actinopterygii	BX307368.1	75.21 (n)
Ascidia (<i>Ciona intestinalis</i>)	Asciidae	Cin.2468	73.28 (n)
Ascidia (<i>Ciona savignyi</i>)	Asciidae	-	44 (a)
Mosca de la fruta (<i>Drosophila melanogaster</i>)	Insecta	Prtp	54.83 (n) 47.16 (a)
Mosquito (<i>Anopheles gambiae</i>)	Insecta	AgaP_AGAP000044	53.96 (n) 43.51 (a)

El porcentaje de identidad se muestra seguido de una n en su comparación con los nucleótidos y de una a en su comparación con los aminoácidos. Adaptado de [9].

Los grupos de genes en las diferentes localizaciones cromosómicas dentro del mismo organismo son los genes parálogos, nacidos de la duplicación. Su estructura es similar, ya que comparte un ancestro común a partir del cual han evolucionado. Hay varios genes parálogos a *Txndc5*, varios genes de la familia *Pdia*, *Tmx*, *Erp27* y *Erp44* entre otros, codificando proteínas disulfuro isomerasas del retículo endoplasmático como TXNDC5 [163].

II.2.2.1 Expresión y localización de TXNDC5.

Txndc5 es un gen que codifica en multitud de tejidos, localizándose principalmente en hígado, bazo, tejidos endoteliales y plasma sanguíneo, y minoritariamente en todo el tracto digestivo, tejido adiposo, riñón, pulmón, corazón y órganos reproductores sexuales [165].

La localización celular principal de TXNDC5 es el retículo, en el que como PDI realiza su función chaperona, sin embargo, se la ha encontrado en otros orgánulos como el aparato de Golgi, mitocondrias, lisosomas, citosol, membrana citoplasmática e incluso en el medio extracelular [9].

II.2.2.2 Estructura de la TXNDC5

Centrándonos en la primera isoforma, en el N-terminal se encuentra el péptido señal que como hemos comentado, deriva la traducción de la proteína al retículo y en el C-terminal encontramos el motivo KDEL que retiene a la proteína en el mismo. En la parte central se encuentran los tres

Revisión bibliográfica

dominios TRX, formados por el motivo catalítico CXXC (dos cisteínas separadas de otros dos aminoácidos) que ejercen la actividad sulfuro isomerasa (Figura 5). Las dos isoformas más pequeñas tienen conservados todos los dominios Trx y el péptido KDEL [163].



Figura 5: Estructura de la proteína TXNDC5: El diseño muestra un N-terminal del aminoácido 1-35, seguido de los tres dominios-Trx situados entre los aminoácidos 35-155, 156-281 y 289-417, terminando con la secuencia de retención endoplasmática KDEL. Adaptado de [9,163].

Como se muestra en la figura 6, la proteína TXNDC5 humana tiene una hélice hidrofóbica que le permite actuar como proteína transmembrana y como señal de translocación. El tercer dominio fue cristalizado y está formado por cinco hebras beta centrales que están flanqueadas por cuatro hélices alfa [163,167].

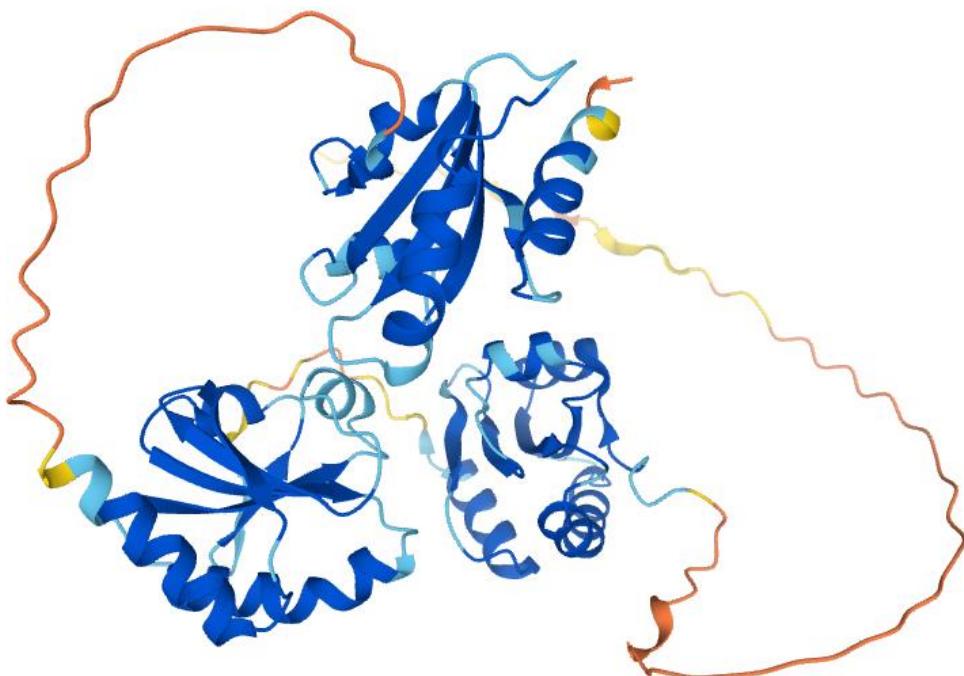


Figura 6. Predicción de la estructura de TXNDC5 humana realizada por alphafold [166].

II.2.3 Funciones celulares de la TXNDC5

II.2.3.1 Generación de puentes disulfuro e interacciones relacionadas

El correcto plegamiento de proteínas secretadas o de membrana es una de las principales funciones del RE en células sanas, este plegamiento ocurre cuando el transporte de electrones tiene lugar entre una proteína receptora de electrones (oxidante) y una proteína donora (reductor). La correcta formación o rotura de los enlaces disulfuro es una de las rutas más importantes del flujo entre electrones proteínas oxidantes y reductoras en la célula, garantizando la posterior síntesis de proteínas funcionales [168].

Además de su función chaperona, la familia PDI interviene activamente en la oxidación, reducción e isomerización de los péptidos nacientes en el RE. Para ello las PDI tiene que

Revisión bibliográfica

encontrarse en un estado oxidante, que se establece a través del grupo tiol de su sitio activo mediado por diferentes oxidorreductasas y moléculas derivadas de oxígeno. Para la formación de un puente disulfuro dos electrones y dos protones tienen que ser transferidos al oxidante. Esta reacción es lenta y requiere de otras enzimas que catalizan la formación del puente disulfuro entre las PDI, como oxidorreductina de RE-1 (ERO1), peroxirredoxina (Prx), vitamina K epóxido reducida, glutatión peroxidasa 4 y 8 así como la reductasa para la reducción del dihidroascorbato a ascorbato. En particular, se han encontrado interacciones de TXNDC5 con Ero1 y Prx2 y Prx4. Por otro lado, proteínas independientes como quiescina sulfhídrido oxidasa (QSOX) pueden también plegar la proteína hacia su forma nativa. (Figura 7).

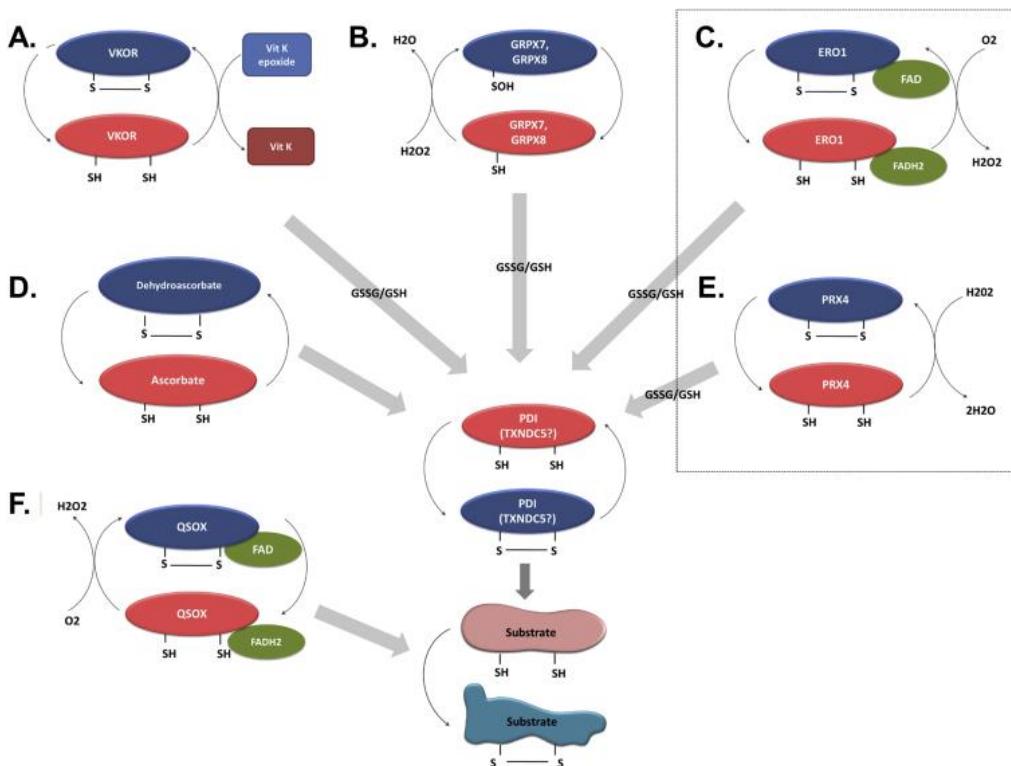


Figura 7: Resumen de los posibles sustratos del plegamiento oxidativo en el retículo endoplasmático por TXNDC5. Adaptada de [169].

Cuando el RE se encuentra en un entorno reductor, se estimulan flavin adenina dinucleótidos (FAD) para unirse a Ero1, actuando en el oxígeno molecular para generar peróxido de hidrógeno y en consecuencia lleva a la oxidación de las PDIs, en la que se incluye TXNDC5. Los dominios-Trx de TXNDC5 permiten su función enzimática, funcionando de forma independiente lo que permite acelerar el proceso de plegamiento de proteínas [170].

Las dos cisteínas de la familia Prx, en particular el homodecámero compuesto por 5 pares de 2-cys Prx4, están involucradas en la oxidación de las PDIs, con una afinidad mucho mayor por TXNDC5. Una de las cisteínas de Prx4 reacciona con el peróxido de hidrógeno siendo oxidada a cisteína sulfénico (SOH), y reaccionará con otras cisteínas para formar el puente de disulfuro que se pasará a otras proteínas substrato mediante reacciones de intercambio mediadas por TXNDC5 y PDIA6 u otras PDI [170,171].

Los dominios-Trx de TXNDC5 mantuvieron su actividad de forma independiente a través de la ratio de oxidación medida por Prx4. Sin embargo, un estudio reportó una mayor afinidad de Prx4 por el dominio central TRX. En células Jurkat, el extremo C-terminal de la TXNDC5 interacciona

Revisión bibliográfica

selectivamente con la cisteína activa de Prx2. De esta forma, TXNDC5 transmite la señal redox desde el peróxido de hidrógeno producido hasta el sustrato final a través de una serie de formación de puentes disulfuro en los cuales participa la reducción de Ero1 y las formas diméricas de Prx2 y Prx4 [170,171].

Cuando TXNDC5 pasa su enlace disulfuro a un sustrato, su grupo disulfuro queda reducido. En adición al plegamiento de péptidos nacientes, el glutatión puede reducir el dominio-Trx de PDI a pH 7,4 *in vitro*. Además, algunos miembros de la familia PDI tienen actividad reductasa, como ERdj5 que posee actividad reductasa y participa en la reducción de proteínas mal plegadas en el RE, tanto para corregir el plegamiento hacia su forma nativa como para iniciar la degradación de proteínas fuera del RE. En este contexto, la actividad reductasa se puede comparar con la actividad tiorredoxina reductasa que emplea NAD(P)H para reducir las cisteínas oxidadas de su dominio catalítico. De esta forma es posible que los puentes disulfuro de TXNDC5 sean reducidos a través de la interacción con glutatión o ERdj5 en el RE, aunque no hay evidencia experimental de cómo es el mecanismo exacto por el cual los dominios TXNDC5 oxidados son reducidos en células [170,171].

II.2.3.2 Mecanismo de intercambio TXNDC5-sustrato/tiol- disulfuro en células.

El estatus redox de los diferentes compartimentos celulares no es similar, siendo en resumen un medio reductor e hipóxico en el citosol, oxidante y normóxico en el medio extracelular y oxidante en el RE. Los potenciales intercambios redox entre TXNDC5 y su sustrato están determinados por el estatus redox del entorno [172].

Las PDIs son activadas cuando el grupo sulfidrilo (SH) de la cisteína del dominio-Trx es desprotonado al anión tiolato (S^-), que es dependiente del pKa del grupo tiol y de la carga de los aminoácidos de su entorno. En condiciones fisiológicas el pKa de un residuo de cisteína suele ser 8,5 y el grupo tiol está inactivo. Sin embargo, la presencia de un entorno cargado positivamente puede incrementar la posibilidad de SH para perder el ion hidrógeno y formar un más estable anión S^- , que al ser nucleofílico atacará el sulfuro del puente disulfuro a través del cual se producen los intercambios tiol-disulfuro. El glutatión y la glutatión reductasa están entre las proteínas que contribuyen a la activación de los grupos tiol de las PDIs. Mientras que el pH del retículo es 7,2, el pH citosólico es 7,4, de forma que, bajo condiciones fisiológicas, el pKa del grupo tiol N-terminal se sitúa sobre 4.5-6.7. Para la oxidación de péptidos nacientes en la que interviene TXNDC5 ocurre cuando el ion S^- ataca sobre el grupo sulfidrilo del substrato, resultando en un enlace disulfuro mixto que será resuelto cuando la segunda cisteína del centro catalítico ataque, liberando el sustrato de TXNDC5. Este substrato tendrá un ion S^- activo que a su vez atacará y desprotonará el grupo sulfidrilo cercano para formar el puente disulfuro [169,172].

Este proceso es crucial, la formación del puente disulfuro correcto puede estabilizar la estructura de la proteína e incrementar su vida media debido al aumento de la temperatura de desnaturización de la proteína. Por último, la formación de estos puentes disulfuros puede afectar de forma positiva o negativa la actividad de la proteína, así como previene la formación de enlaces no nativos que pueden llevar a agregación y precipitación de proteínas, con indeseables consecuencias para la célula [168,173].

Revisión bibliográfica

II.2.3.3 Otras posibles modificaciones de TXNDC5

Además de la formación de los puentes disulfuro, los grupos tiol también están sujetos a otras modificaciones redox. Por ejemplo, los grupos tiol llevan a cabo la S-nitrosilación en respuesta al estrés nitrosativo. También, S-nitrosilación de TXNDC5 lleva a la formación de puentes disulfuro con cisteína, homocisteína, glicina-cisteína y glutatión. La S-nitrosilación puede ser potencialmente dañina ya que elevados niveles de PDI han sido descritos en enfermedades como el Parkinson y el Alzheimer [169,174,175].

Por último, los grupos tiol pueden ser oxidados por especies reactivas de oxígeno para producir subespecies oxidadas tales como las que presentan sulfénico (-SOH), sulfínico (-SO₂H) o sulfónico (-SO₃H). Estos grupos tiol oxidados pueden llevar a cabo un rol en señalización celular, así como ser importantes intermediarios en la formación de puentes disulfuro. Los grupos tiol oxidados son intermediarios del metabolismo de la cisteína y pueden funcionar como agonistas de ciertos receptores. En general la oxidación de los grupos tiol se considera irreversible, sin embargo, la oxidación de los grupos tiol en Prx's puede regenerarse gracias a la actividad reductasa de las sulfirreodoxinas. Teóricamente, los grupos tiol de los dominios-Trx de TXNDC5 son susceptibles de llevar a cabo estas modificaciones, sin embargo, no hay estudios suficientes llevados a cabo sobre los dominios catalíticos de TXNDC5 y por consiguiente, cómo puede TXNDC5 mediar en la señalización celular [169,173,176].

II.2.4 Mecanismos de TXNDC5 en cáncer

II.2.4.1 Interacciones con receptores de membrana y señalización extracelular

La mayoría de TXNDC5 se sitúa en el RE o en el aparato de Golgi, sin embargo, se cree que una quinta parte se encuentra presente en la membrana plasmática, donde presumiblemente está implicada en la traducción de señales extracelulares. Se encontró una interacción entre TXNDC5 y el receptor de adiponectina 1 (AdipoR1), específicamente con el dominio N-terminal de AdipoR1 que es crítico para su remodelamiento. En células HeLA, el aumento de TXNDC5 en la membrana plasmática inhibe su señalización, reduciendo la distribución de AdipoR1 de la superficie celular [161,177]. En las células de carcinoma renal (RCC) hay un ratio muy elevada de TXNDC5/AdipoR1 en metástasis comparado con un control no metástatico; así como TXNDC5 en RCC promueve invasión celular y crecimiento de tumores injertados en ratones desnudos [178,179].

Otro ejemplo del rol de TXNDC5 en la membrana como modulador de receptor de señal es la activación del receptor de andrógenos (AR). La interacción con TXNDC5 estabiliza y protege AR de la degradación, este mayor nivel de AR permite su traslocación al núcleo mediante unión con ligando, aumentando la activación de cascada de señalización. Este mecanismo funciona como una vía alternativa para aumentar la activación de AR en cáncer de próstata resistente a la castración. Cuando el nivel de andrógenos es bajo TXNDC5 estabiliza AR, aumentando la sensibilidad de las células a los andrógenos, promoviendo a su vez una activación anormal del receptor del factor de crecimiento epidérmico 2, activando la proteína quinasa B y las cascadas de señalización extracelular consiguientes incluso cuando el nivel de andrógenos es bajo. Por último, TXNDC5 modula la proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK) a través de TNFα y la activación del receptor TNF, antes de c-Raf en la cascada de la MAPK. De esta forma no sería inconcebible que TXNDC5 pudiera interactuar directamente con el receptor del factor de necrosis tumoral (TNF) aunque esta interacción no está confirmada y habría que determinar cómo TXNDC5 afecta a la respuesta celular mediada por TNFα [177,179].

Revisión bibliográfica

II.2.4.2 Crecimiento tumoral

Se ha observado que la expresión de TXNDC5 aumenta la proliferación de las células tumorales. Así, su expresión en la progresión del ciclo celular aumenta el número y porcentaje de células en la fase G2/M, mientras que su carencia conduce a la acumulación de células en la fase G0/G1. De hecho, en las células del cáncer gástrico, el nivel elevado de TXNDC5 contribuye a una mayor tasa de proliferación celular, migración, formación de colonias y tasa reducida de apoptosis [180].

La función anti-apoptótica de TXNDC5 se ha corroborado también en cáncer pancreático, donde el receptor nuclear huérfano 4A1 (NR4A1) y TXNDC5 están sobreexpresados. La activación de NR4A1 protege del daño causado por estrés del retículo, estando asociado con la activación transcripcional de TXNDC5. Su disminución causa desfragmentación en el RE y expresión alterada de varias proteínas de señalización implicadas en la UPR como ATF-4, GRP78, IDH1 y CHOP. De esta forma, el efecto protector de NR4A1 está mediado por la expresión de TXNDC5, aliviando el estrés celular y facilitando la supervivencia celular [181].

Además de células cancerígenas, se ha encontrado que TXNDC5 se encuentra altamente expresado en tejidos endoteliales de tumores y placas ateroscleróticas, particularmente bajo condiciones hipóxicas. La ausencia de TXNDC5 causa la reducción de endotelina 1, adrenomedulina y CD105, las cuales promueven la supervivencia y podría ser la causa a través de la cual TXNDC5 puede proteger las células cancerígenas de la muerte por hipoxia [182].

El tratamiento de cáncer prostático por privación de andrógenos puede inducir la expresión de TXNDC5, como ya hemos visto, la cual está mediada por las rutas de activación inducida por hipoxia a través de HIF-1 α y de miR-200b. Las condiciones hipóxicas fortalecen la interacción entre TXNDC5 y el receptor de andrógenos y en consecuencia aumentan la señal de la cascada de activación de las rutas ERK1/2, AKT y MEK. En el mecanismo de regulación de TXNDC5 participa el micro RNA miR-200b que se une al dominio 3'UTR para su degradación, sin embargo, este miRNA está regulado negativamente por HIF-1 α . De esta forma, cuando hay un ambiente hipódico, HIF-1 α es estabilizado y translocado al núcleo, donde inhibe la degradación de TXNDC5 por miR-200b, aumentando TXNDC5, lo que está asociado con una mayor invasión migración celular [183,184].

II.2.4.3 TXNDC5 en el entorno extracelular.

En células humanas endoteliales, la carencia de TXNDC5 conduce a una reducción de la activación de las quinasas Ras/Raf y la ruta de ERK1/2 en respuesta a las citoquinas inflamatorias como TNF α . Esta insuficiente activación resulta en una menor actividad de la proteína activadora 1 (AP-1), la cual activa varias proteínas proteasas como MMP9 o catepsina 9. La regulación negativa de estas proteasas tiene un efecto negativo en la angiogénesis de las células endoteliales. Por último, TXNDC5 promueve la expresión de MMP1 y MMP13 que tienen un rol importante en invasión celular y metástasis como resume la figura 8 [185].

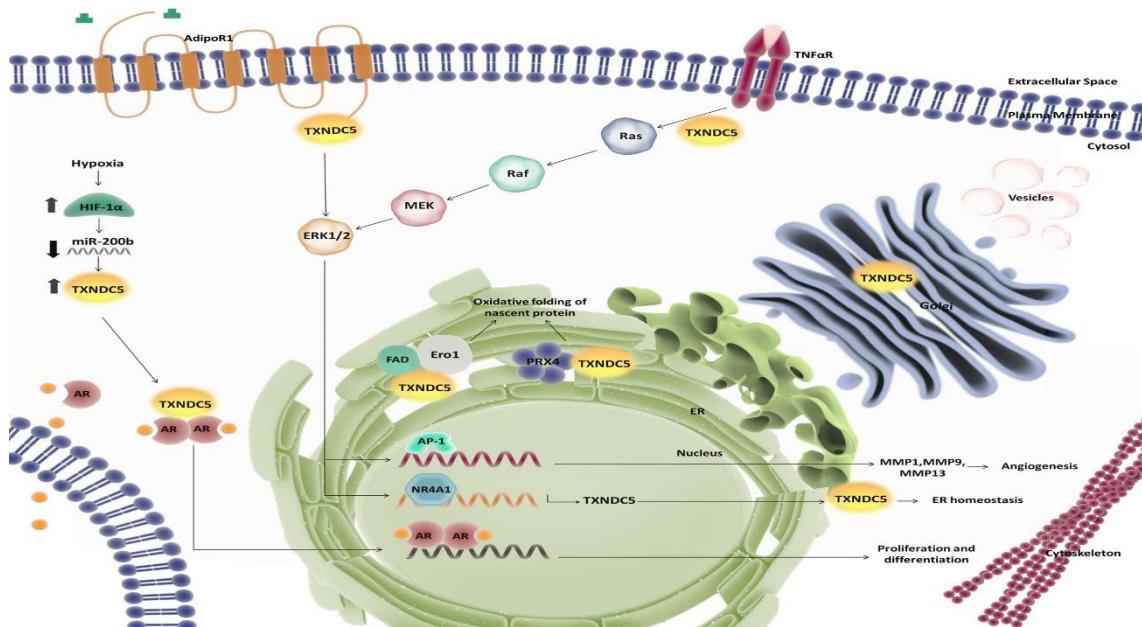


Figura 8: Mecanismos de TXNDC5 en la señalización celular y desarrollo de cáncer. Resumen de mecanismos descritos en el apartado II.2.4. Adaptada de [169].

II.2.5 TXNDC5 y fibrosis

La fibrosis es un proceso de reparación de tejidos dañados en el cual el tejido conectivo sustituye el tejido parenquimal hasta el punto de producir una remodelación. En un daño tisular continuado se desarrolla fibrosis, causada por una acumulación de componentes de matriz extracelular (ECM), como colágeno, producidos por el fibroblasto hasta producir una cicatriz fibrótica permanente. Se ha postulado la proteína TXNDC5 es un mediador de fibrosis, encontrándose una mayor expresión de *TXNDC5* en los tejidos afectados de pacientes con fibrosis cardiaca, pulmonar, renal y hepática [186–189].

TXNDC5 promueve la fibrosis a través de la activación del factor de crecimiento transformante β1 (TGF-β1). La carencia de *TXNDC5* redujo TGF-β1 y la ECM en fibroblastos humanos cardiacos. *TXNDC5* promueve el plegamiento de las proteínas de ECM y la activación y proliferación de los fibroblastos a través de la actividad quinasa c-Jun N-terminal, aumentando las especies reactivas de oxígeno derivadas de la NAD(P)H oxidasa 4. Posteriormente en fibrosis renal, pulmonar y hepática, la carencia de *TXNDC5* mitigaba la progresión de dicha patología [186–189].

En estos tejidos se ha postulado el mismo mecanismo molecular, TGF-β1 induce la expresión de *TXNDC5* a través de un aumento de estrés del retículo y una regulación transcripcional mediada por la diana previamente comentada, ATF6. En fibroblastos pulmonares se postuló que el aumento de señal de TGF-β1 causada por *TXNDC5* es debido a la estabilización de su unión con su receptor, amplificando la cascada de señalización. Sin embargo, en células hepáticas estelares la traducción de la señal de TGF-β1 parece ser la inductora de estrés, causando la activación de ATF6, siendo este el modulador transcripcional de *TXNDC5* que por la vía de redox dependiente-JNK y STAT3 eleva los niveles de ROS celulares, promoviendo una resistencia a la apoptosis, activación y proliferación celular, y la consecuente producción de ECM en la progresión de la patología como resume la figura 9 [187–189].

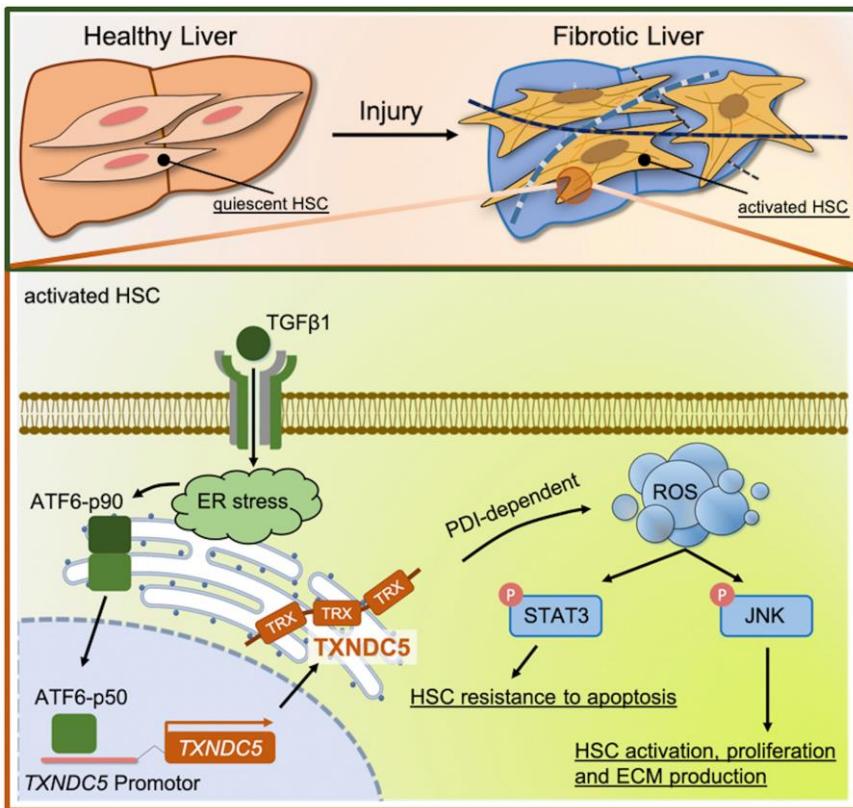


Figura 9: Mecanismos de TXNDC5 en la activación de la fibrosis hepática. Adaptada de [189].

II.2.6 TXNDC5, inflamación e hipoxia

Como hemos visto, TXNDC5 parece estar implicado en la regulación de la señalización de varias cascadas, promoviendo en muchos casos la proliferación celular y la resistencia a la apoptosis. Hemos visto que, en cáncer de próstata, TXNDC5 afecta a la señalización de TNF α , postulando una interacción directa que estabilizara su unión con el receptor, regulando a través de la cascada de MAPK. En células endoteliales, así como en próstata, la carencia de TXNDC5 conduce a una reducción de la cascada de señalización de TXNDC5. Parece que una regulación por el factor inducible de hipoxia HIF-1 α regule a TXNDC5, estando involucrados en varios puntos de la regulación [179,184].

La artritis reumatoide (RA) es una enfermedad articular inflamatoria crónica causada por la hiperplasia de los fibroblastos sinoviales (SF) y una angiogénesis irregular. En varios artículos, se ha relacionado con TXNDC5 con RA. En un estudio con muestras de pacientes encontraron una fuerte correlación entre la concentración de TXNDC5 o calreticulina con su nivel de inflamación histológico. La expresión en fibroblastos *in vitro* corroboró que su expresión aumenta al inducir estrés del retículo a nivel endógeno y secretorio y vinculando de nuevo la viabilidad con su presencia. Esto se comprobó usando RNA de silenciamiento sintético con el microRNA-573 que regula su expresión en el fibroblasto y parece tener una función importante en la patogénesis de la enfermedad ya que la reducción de TXNDC5 redujo la viabilidad y la invasión celular [190–193].

El mecanismo molecular que traduce la inflamación implica la señalización de TNF α junto con la interleuquina 6 (IL-6), en el cual hay tres posibles rutas de señalización en las que TXNDC5 estaría implicado. En primer lugar, la sobreexpresión del microRNA-573 suprimió la actividad de las quinasas MAPK, PI3K/Akt y de STAT3 en respuesta al lipopolisacárido (inductor respuesta

Revisión bibliográfica

inmune) aunque no necesariamente debido a la disminución de TXNDC5 ya que este microRNA tiene otras dianas como TLR2. En segundo lugar, el silenciamiento específico de TXNDC5 elevó la expresión del factor similar a IGF (IGFBP1) mientras disminuyó la expresión de IL-6. El factor de crecimiento similar la insulina (IGF) tiene propiedades anti-apoptóticas y pro-supervivencia, e IGFBP1 suprime su actividad, contribuyendo así la reducción de TXNDC5 a la reducción de la proliferación y secreción de IL-6. En tercer lugar, TXNDC5 se considera como una diana directa de NF-κB y TXNDC5 interacciona con HSC70 para secuestrarla en el citoplasma. Se postula que TXNDC5 y HSC70 en conjunto promueven la activación de la cascada de NF-κB, activando mecanismos proinflamatorios como el aumento de transcripción de TNFα. Por último, en un trabajo se postuló que TXNDC5 reduce la expresión de dos genes proapoptóticos CXCL10 (“C-X-C motif chemokine ligand 10”) y el factor de necrosis tumoral asociado a apoptosis inducida por ligando, TRAIL. También, se vinculó TXNDC5 no solo a la producción de IL-6 sino también de IL-8 [190–194].

Se ha postulado un papel de TXNDC5 para promover la secreción de citoquinas inflamatorias y el reclutamiento de células inflamatorias, observándose una expresión sérica más alta de TXNDC5 en pacientes sépticos. Igualmente, la inducción de shock séptico por LPS resultó en una mayor expresión tanto *in vivo* e *in vitro*. Los ratones y macrófagos carentes de *Txndc5* no solo reprimieron la inducción de factores proinflamatorios inducidos por LPS, sino que promovieron la expresión de la citoquina antiinflamatoria IL-10. Por lo tanto, se concluyó que la carencia de TXNDC5 mejora la sepsis inducida por LPS, suprimiendo la actividad de NF-κB y los niveles citoquinas proinflamatorias como TNF-α, IFN-γ, IL-12, IL-6, and MCP-1 [195].

II.2.7 TXNDC5 y ateroesclerosis

Las funciones vasculares y el mantenimiento de la homeostasis vascular está regulado por varios mecanismos, en los cuales la activación de las células endoteliales (ECs) juega un papel importante. Se encontró una mayor concentración de TXNDC5 en lesiones ateroscleróticas de humanos y de ratones carentes de *Apoe*, modelo animal usado para el estudio de la ateroesclerosis. Este papel se verificó cuando el doble ratón carente de *Txndc5* y *Apoe* redujo su lesión aterosclerótica en comparación con el ratón carente de *Apoe* [196]. TXNDC5 parece ser un regulador de ECs y la aterosclerosis mediante la desestabilización de la sintasa endotelial de óxido nítrico (eNOS), ofreciendo un nuevo mecanismo molecular. La proteína eNOS está muy regulada y su expresión es crítica para la homeostasis vascular. Su desestabilización reduce la producción de óxido nítrico, un metabolito clave, cuya disminución puede causar enfermedades vasculares. El mecanismo propuesto indica que el flujo sanguíneo perturbado, ocasionado por TXNDC5, aumenta la degradación mediada por proteasoma del factor de choque térmico 1 (HSF1), reduciendo la proteína de choque térmico 90 (HSC90) y por último acelerando la degradación de eNOS [196].

Un posible papel de TXNDC5 en la prevención de la lesión aterosclerótica, como veremos más en profundidad en el apartado del escualeno, podría tener lugar. En resumen, una intervención dietética con escualeno en ratones carentes *Apoe* redujo la lesión aterosclerótica y a su vez aumentó la expresión hepática a nivel transcripcional y postranscripcional de TXNDC5. Estos datos parecen contradecir los resultados previos, sin embargo, debido a las múltiples funciones de TXNDC5 no tiene por qué modular una respuesta inflamatoria, sino que podría estar implicado en conjunción con el escualeno en la secreción de unas lipoproteínas con una menor oxidación y una mayor actividad de PON1 [7,8].

II.3 Escualeno

La dieta mediterránea ha sido relacionada con una menor mortalidad debida a enfermedades cardiovasculares, convirtiéndose en un modelo dietético. En la dieta mediterránea tradicional, la grasa provenía principalmente del aceite de oliva virgen, siendo uno de los aceites vegetales con mayor proporción de escualeno. En humanos, su nivel sérico proviene de la síntesis endógena como de la dieta, encontrándose en mayor cantidad en aquellas poblaciones que consumen grandes cantidades de aceite de oliva virgen o hígado de tiburón [197–199].

El escualeno, un hidrocarburo presente en el aceite de oliva virgen, cuya fórmula molecular es 2,6,10,15,19,23-hexametiltetracosa-2,6,10,14,18,22-hexano ($C_{30}H_{50}$), con 6 dobles enlaces, es un lípido neutro con una estructura de isoprenoide, que forma parte de la familia de los terpenos y es un intermediario de la biosíntesis de colesterol en animales y de fitoesteroles en plantas. Hay muchos estudios sobre el escualeno ya que se ha demostrado que es un antioxidante con un interés en múltiples áreas de la biomedicina como el cáncer, el sistema inmune utilizado como coadyuvante en varias vacunas o en enfermedades cardiovasculares [198].

En cultivo celular de hepatocitos humanos (HepG2) se ha observado un efecto hipolipídico por parte del escualeno ya que mediante la activación del factor PPAR α estimula genes relacionados con la oxidación de ácidos grasos y el transporte reverso del colesterol mientras que inhibe la DNL. Experimentos *in vivo* en ratones carentes de la apolipoproteína E han demostrado que su administración de 1 g/kg en una dieta esteatósica logra disminuir el contenido de triglicéridos y colesterol hepático, pero no reduce la superficie ocupada por la gota lipídica. Aunque cabe destacar que la superficie de gota lipídica está considerada como un mecanismo de defensa frente a la lipotoxicidad de los ácidos grasos no esterificados y no como un mecanismo patológico. Por último, los machos que recibieron escualeno mostraron una menor lesión aterosclerótica, muy relacionada con el contenido hepático de grasa, efecto sexo dependiente no observado en hembras. De esta forma, en un posterior artículo, donde varios modelos de ratón que recibieron el hidrocarburo mostraron una menor oxidación de sus lipoproteínas, así como una mayor actividad de la proteína sérica PON1 en machos que podría explicar este efecto anti-aterogénico [7,200–203].

Al replicar los experimentos con una dosis inferior, no se reprodujeron los resultados, indicando un efecto dosis dependiente en el que puede influir no solo la concentración del metabolito, sino la especie del modelo animal e incluso la dieta. En modelos donde el escualeno no provocó una disminución de la gota lipídica, se ha observado que su acumulación en este puede desplazar o neutralizar especies lipotóxicas. La acción del escualeno en el hígado parece tener una compleja regulación tanto transcripcional de genes asociados a proteínas mitocondriales y microsómicas como postraduccionales de genes como *Lipin1*, *Txndc5* y *Thr1* en ratones carentes *Apoe* y de varios citocromos a nivel transcripcional como *Cyp2b10* y *Cyp2c55* [7,8,204].

Aunque la expresión de *Txndc5* en ratones *wild-type* no se ha visto modificada por la adición de escualeno en la dieta, se ha observado una posible interacción *in vitro*. Mientras que en la línea hepática murina AML12 normal, el escualeno redujo los niveles de ROS, en la línea carente de *Txndc5*, el ROS aumentó. Además, se evaluó el impacto del escualeno sobre el estrés del retículo, aumento la transcripción de 3 dianas (*Atf6*, *Em1* y *Eif2ak3*) solamente en la línea carente. Sin embargo, cuando se incubó con un fármaco inductor de estrés del retículo el escualeno redujo la expresión de *Ern1* mientras que en la línea carente *Eif2ak3* fue la diana reducida. Estos

Revisión bibliográfica

resultados sugieren que TXNDC5 es necesario para modular la acción del escualeno, llegando a ser un posible estresor en ausencia de esta tiorredoxina [205].

II.4 Sistema de edición genética CRISPR/cas9

La capacidad para la manipulación del DNA ha sido un paso verdaderamente importante para la comunidad científica y la compresión del genoma. Desde la manipulación del genoma se puede proporcionar un punto de vista alternativo de enfermedades, así como identificar nuevas dianas para tratamientos médicos. No obstante, conseguir cambios específicos en el genoma ha sido uno de los mayores retos de la genética [206].

Sin embargo, ha habido muchas limitaciones que se han ido solucionando con los nuevos avances, empezando por las integraciones al azar de transgenes, que se solucionaron con el uso de células embrionarias y su posterior diferenciación a embriones enucleados hasta la aparición de las primeras endonucleasas, los dedos de zinc, las proteínas efectoras de tipo activador transcripcional fusionadas a nucleasas (TALENs) hasta el sistema más popular actualmente, la nucleasa cas9 [207–211].

El sistema CRISPR (Cortas repeticiones palindrómicas agrupadas y regularmente interespaciadas) /cas9 se desarrolló a partir de un sistema de inmunidad bacteriano, en el que pequeñas secuencias víricas (crRNA) se integraban en el genoma de la bacteria. De forma que cuando una secuencia similar, generalmente vírica, entraba en el interior celular de la bacteria, la nucleasa cas9 gracias al crRNA lo reconocería y eliminaría la amenaza. Este sistema descubierto en 2005 se refinó en 2012 permitiendo sintetizar los crRNA junto con un oligómero necesario para la unión de cas9 (tracrRNA), pudiendo dirigir específicamente la nucleasa a la secuencia deseada con tan solo la síntesis específica de un oligómero de 20-23 nucleótidos de RNA. El único requisito es la presencia de un motivo adyacente protoespaciador (PAM) al final de la secuencia 5'-NGG-3' [211–213].

La nucleasa cas9 produce un corte de doble hebra (DSB) específico de la guía, normalmente entre 3-5 nucleótidos en 5' del motivo PAM, que puede ser reparado por la célula de dos formas diferentes. Cuando no hay ninguna secuencia de homología, es reparado por la propia célula a través de la ruta predeterminada NHEJ (“*non-homologous end-joining*”) para la cual es muy probable que se produzcan inserciones o delecciones aleatorias, rompiendo el marco de lectura de la traducción y la consecuente pérdida de función de la proteína. Sin embargo, en el caso de que haya una molécula de DNA con homología en ambos lados del corte (brazos de homología) se producirá la reparación directa por homología (HDR), de forma que la célula copiará la zona presente en los brazos de homología, permitiendo hacer desde modificaciones de una sola base hasta la inserción de grandes secuencias (Figura 10) [211].

Por último, el principal inconveniente de esta nucleasa es la posibilidad de que se puedan producir cortes no específicos u *off-targets*, ya que podrían ocasionar la pérdida de función de un gen, al producirse una reparación NHEJ, por ejemplo. Sin embargo, con el fin de evitar estos cortes, multitud de herramientas bioinformáticas se han desarrollado como CHOPCHOP o Cas-OFFinder para prevenir al máximo estos eventos. Además, la cristalización de la nucleasa cas9 permitió conocer en profundidad las interacciones de forma que varios grupos de investigación y casas comerciales han realizado mutaciones puntuales sobre la nucleasa cas9 con el objetivo de mejorar su fidelidad y reducir al máximo estos eventos no específicos [214–219].

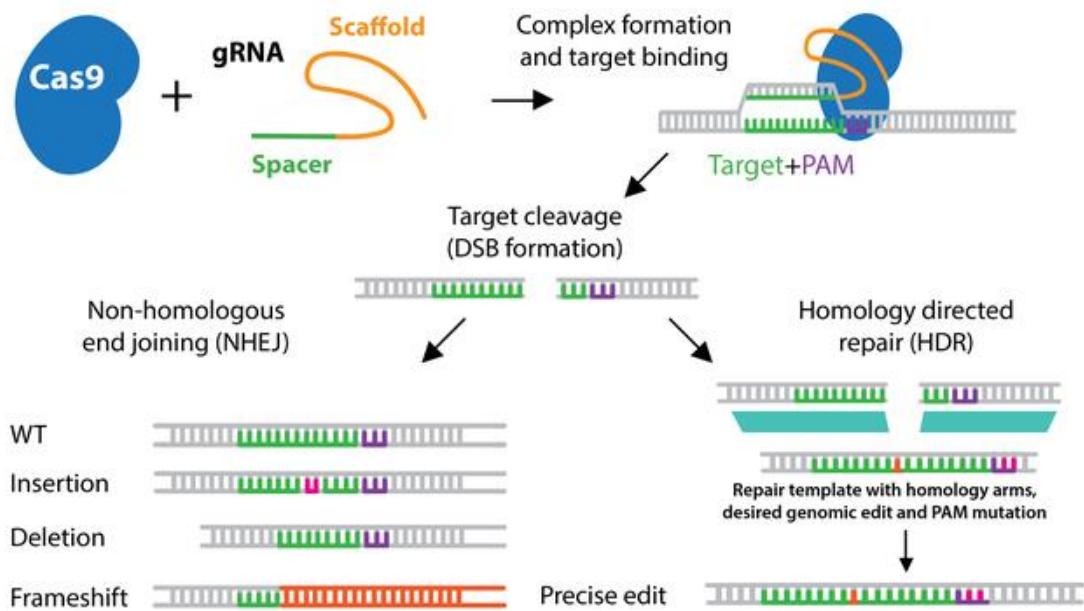


Figura 10: Resumen de la reparación de cortes de doble hebra (<https://www.addgene.org/crispr/cut/>)

II.5 Modelo celular: AML12

El desarrollo de modelos celulares para el trabajo *in vitro* ha sido uno de los grandes avances para la bioquímica, ya que permite el mantenimiento de células procedentes de diversos tejidos y especies bajo un control absoluto de las condiciones. El cultivo celular nos permite desarrollar estudios con poblaciones idénticas sobre las cuales experimentar.

En este trabajo se ha ensayado con la línea celular hepática murina AML12 (“*alpha mouse liver 12*”), derivada de hepatocitos de ratón (cepa CD1, línea MT42) modificados genéticamente para que expresen el TGF α humano. Se comprobó mediante microscopía electrónica que esta línea exhibe las características típicas del hepatocito como peroxisomas y el canalículo biliar en su estructura. La línea celular mantiene la capacidad de expresar altos niveles de mRNA para proteínas séricas como la albumina, alfa1 antitripsina, transferrina, así como proteínas de unión GAP (conexinas 26 y 32). Por último, aunque la expresión de proteínas hepatoespecíficas decrece con el número de pasajes, esto se reactiva al cultivarlas en medio libre de suero [220].

II.6 Modelo animal: Ratón

Aunque el uso de modelos animales se ha ido reduciendo con los años, debido a la creciente preocupación por el bienestar animal y los conflictos éticos que suponen, presentan fuertes ventajas en comparación con el modelo celular. El modelo animal da una respuesta integral y coordinada entre sus órganos y tejidos ante un tratamiento de estudio, algo difícilmente replicable *in vitro*, así como una mayor cantidad de muestra sobre la que poder trabajar. Además, las líneas celulares pueden perder características originales al proceder de líneas tumorales. Sin embargo, el modelo celular y el modelo animal no son excluyentes, sino complementarios, pudiendo utilizar las ventajas de ambos para la realización de un estudio.

El ratón es el modelo de experimentación animal más utilizado, suponiendo entre el 55-65% de los animales utilizados en España entre el año 2018 y el 2020. Su uso es tan popular debido a la

Revisión bibliográfica

gran similitud fisiológica y genómica con el humano y por su pequeño tamaño y rápido crecimiento en comparación con otros animales. Dentro del ratón, la cepa más común es la C57BL/6J, utilizada tanto para la realización de experimentos, así como la generación de modelos animales fruto de la inducción de mutaciones gracias a la caracterización de su genoma. Esta cepa es utilizada para una multitud de áreas como biología cardiovascular, diabetes, obesidad, genética o inmunología entre otros. Esta cepa tiene una buena longevidad con una baja probabilidad de desarrollar tumores, así como una alta susceptibilidad a desarrollar obesidad inducida por dieta, diabetes tipo 2 o aterosclerosis entre otras [221,222].

III. Objetivos

Debido a los numerosos estudios previos recogidos en la revisión bibliográfica que recogen la importancia y complejidad del metabolismo y el correcto estatus del retículo en la esteatosis hepática, así como la implicación de TXNDC5 en numerosos procesos celulares y la influencia del escualeno en la dieta, se plantearon los diferentes objetivos:

1. Generar un modelo animal de ratón carente de *Txndc5*.
2. Generar un modelo *in vitro* hepático carente de *Txndc5*.
3. Caracterizar la influencia de TXNDC5 en el desarrollo de esteatosis bajo diferentes dietas.
4. Estudiar la implicación de *Txndc5* en el transcriptoma murino
5. Explorar el efecto de TXNDC5 en la glucemia y la resistencia a la insulina bajo diferentes dietas.
6. Estudiar la implicación de TXNDC5 en el metabolismo del escualeno y el proteoma de las gotas lipídicas en la ausencia del gen y del hidrocarburo.

IV. Materiales y métodos

IV.1 -Material biológico.

Como hemos comentado previamente en el apartado II.4, el sistema CRISPR/cas9 nos permite realizar cortes de doble hebra de una forma específica en el DNA. En este trabajo se realizaron dos modelos de trabajo *in vitro* e *in vivo* para el estudio de la función de la proteína TXNDC5, mediante la inactivación de su gen y en consecuencia la pérdida de la función de la proteína.

IV.1.1 Estudios con ratones.

Todos los estudios realizados para esta tesis que implicasen el uso de animales se realizaron de acuerdo con 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 con los expedientes PI35/18 y PI03/21.

Los ratones se albergaron en el animalario del Centro de Investigación Biomédica de Aragón, centro autorizado por el Ministerio de Agricultura. Se alojaron en jaulas con tapa de filtro estéril en habitaciones con un clima controlado, temperaturas entre 20-23 °C, una humedad entre 50-60% con una relación del ciclo de luz-oscuridad de 12 horas con un cambio de luz progresivo y acceso *ad libitum* a pienso y agua.

IV.1.1.1 Generación del ratón carente o *knock-out* de TXNDC5.

Hay muchas estrategias posibles a la hora de abordar como realizar la inactivación de un gen en ratón. Resulta recomendable eliminar uno de los primeros exones del gen *Txndc5*. Para ello, se diseñaron dos guías independientes en vez de usar una única guía. Esto conlleva dos cortes y la delección del fragmento de DNA delimitado por las guías al producirse un evento de unión de extremos de DNA sin homología (NHEJ). De esta forma, resulta más sencillo el genotipado ya que el DNA mutado será más pequeño y no requerirá digestión con enzimas de restricción.

Por último, se decidió trabajar con embriones en vez de células ES por la experiencia de trabajo del servicio de transgénesis del IACS y la alta probabilidad de estos eventos cuando se usa la estrategia de CRISPR/cas9. Se decidió realizar electroporación de embriones en vez de microinyección debido a la buena experiencia observada por muchos grupos y la versatilidad que proporciona [223].

IV.1.1.1.2 Diseño guías CRISPR/cas9.

Se buscaron dos guías que flanquearan uno de los primeros exones que fuera común a todos los transcritos del gen *Txndc5* usando el programa web CHOPCHOP (<http://chopchop.cbu.uib.no/>). Este programa encuentra todas las posibles guías y da un porcentaje de eficacia de corte y de posibilidad de generar cortes aleatorios.

Se seleccionaron dos guías que cortan en el segundo (crRNA 1: 5'-CCAACCAGAAAGGGCACAG-3') y tercer intrón (crRNA 2: 5' CCAACCAGAAAGGGCACAG 3'), flanqueando el tercer exón que es común a todas los transcritos e isoformas de TXNDC5, de forma que cuando corten ambas guías se producirá la pérdida del tercer exón, como indica la figura 11. Mediante la herramienta web de IDT (Integrated DNA Technologies) se verificó que estas guías tenían una baja posibilidad de generar cortes inespecíficos conocidos como *off-targets*.

Materiales y métodos

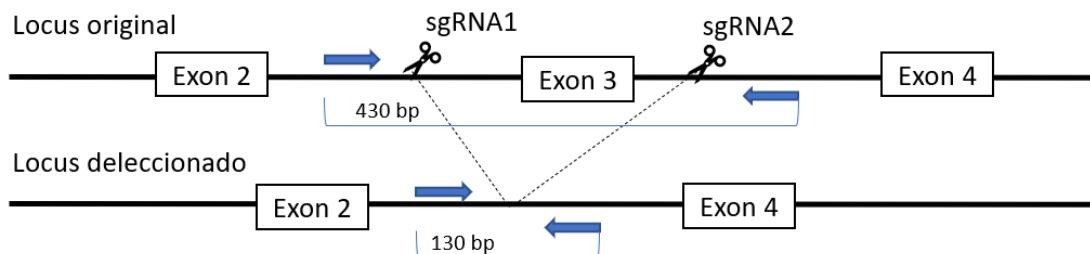


Figura 11: Representación esquemática del mapa genómico correspondiente al gen *Txndc5* antes y después de la delección del tercer exón. Las tijeras representan las zonas de corte del complejo ribonucleico dirigido por las guías sgRNA. Las flechas azules indican los *primers* TXNDC5 intrón 2 F TXNDC5 intrón 3 R con los que se verificó la delección, así como el tamaño del amplicón producido

IV.1.1.1.3 Preparación de los complejos de corte y electroporación.

- Reactivos:
 - crRNA1 y crRNA2 (IDT; Lovaina, Bélgica)
 - tracrRNA (IDT #1072532)
 - Tampón de hibridación (IDT #1072532)
 - Hifi cas9 proteína (IDT #1081060)
 - Medio Opti-MEM (Thermo Fisher Scientific; Madrid, España #11058021)
 - Tampón TE: Tris-HCl 10 mM, EDTA 0,1 mM (Sigma-Aldrich; Madrid, España)
 - Cubetas de electroporación de 0,1 cm (BIO-RAD, Alcobendas, Madrid, España #1652089)
 - Electroporador Gene Pulser Xcell (BIO-RAD # 1652662)
- Procedimiento:

Siguiendo el protocolo de Tröder [223], el primer paso fue formar el complejo crRNA:tracRNA. Se resuspendieron ambos tracRNA y crRNA en TE para obtener concentraciones finales de 100 μ M. En un tubo de PCR libre de DNAsas se añadieron 5 μ l de tracRNA y 2,5 μ l de ambas guías crRNA en proporciones equimolares, y se calentó en el termociclador S1000 de BIO-RAD a 95 °C durante 5 minutos con un posterior enfriado progresivo de 5 grados por minuto.

Se añadió 1,6 μ l del duplex crRNA:tracRNA y 1,3 μ l de la proteína cas9 hifi en 17,1 μ l de Opti-MEM y se mezcló. Se incubaron 10 minutos a temperatura ambiente y se conservaron a 4 °C para su uso durante la semana inmediata o a -20 °C para un potencial uso en los siguientes 6 meses. Antes de la electroporación, se centrifugó 2 minutos para eliminar pequeños precipitados.

Se cruzaron hembras previamente superovuladas de sustrato C57BL/6J (Janvier Labs, Le Genest-Saint-Isle, Francia) con machos de este mismo fondo genético. A la mañana siguiente, por el servicio de transgénesis del IACS se recogieron sus embriones y se preincubaron en medio M2. Antes de la electroporación, se les cambio al medio Opti-MEM.

Se electroporaron 40 embriones en 20 μ l del medio con los complejos de corte en una cubeta de 0,1 cm previamente precalentada a 37 °C. Se aplicaron dos pulsos de 30 V mantenidos durante 3 ms y con un intervalo de 100 ms entre ambos. Los embriones se recuperaron mediante suave resuspensión con el medio M16 en la cubeta usando una pipeta de 200 μ l.

Materiales y métodos

El personal del servicio de transgénesis transfirió el mismo día los embriones en el estadio de una célula a madres pseudogestantes de sustrato Swiss (Janvier Labs), implantando 15 embriones en cada madre.

IV.1.1.1.4 Verificación de la delección.

IV.1.1.1.4.1 Diseño de los cebadores.

El diseño de los cebadores o primers se realizó utilizando el programa web Primer Blast del NCBI que utiliza el software Primer 3 [224]. Se siguieron los siguientes parámetros:

- Longitud de 18-25 nucleótidos.
- Contenido de G-C del 40-60%.
- Temperatura de *melting* (Tm) entre 55-65 °C.

Se eliminaron los cebadores que eran susceptibles de formar dímeros, así como todos los que generasen una amplificación inespecífica.

Se encontraron dos cebadores: uno que hibridaba 60 nucleótidos en 5' de la guía sgRNA1 y otros 60 pares de bases en 3' de sgRNA2 como se indica en la Figura 11, a los que llamaremos como TXNDC5 intrón 2 F (5'- GCAGCTATGCTATGTTCTTGAGCT -3') y TXNDC5 intrón 3 R (5'- GCATGGTTTTGTTACCTCATTGG 3').

IV.1.1.1.4.2 Extracción DNA en medio básico.

- Reactivos:
 - NaOH 50 mM (Sigma-Aldrich).
 - Tris-HCl 1 M (Sigma-Aldrich).
- Procedimiento:

A partir del tejido proporcionado por el servicio de Animalario, se extrajo el DNA para el genotipado. Se añadieron 100 µl de NaOH 50 mM a cada Eppendorf, se centrifugó 30 s a 5.000g para asegurarnos que todo el tejido se encontraba en el fondo y se incubó 15 minutos a 95 °C. La mezcla de un pH básico unido a una alta temperatura disgregó del tejido.

Pasado este tiempo, las muestras se enfriaron en hielo y se añadieron 10 µl de Tris-HCl 1M para equilibrar el pH. Se centrifugaron durante 10 minutos a 15.000g para dejar todos los productos no digeridos al fondo, se recogieron 40 µl de sobrenadante en un nuevo tubo.

IV.1.1.1.4.3 PCR a tiempo final.

La técnica de PCR o reacción en cadena de la polimerasa consiste en la propiedad natural de las polimerasas termoestables de replicar DNA de doble hebra y no desnaturalizarse en la apertura térmica de las cadenas del DNA, para ello será necesario un cebador sobre el cual se inicie esta amplificación.

- Reactivos:
 - Tampón 10X TrueStart™ Taq (Thermo Fisher Scientific).
 - TrueStart™ Taq DNA polimerasa (Thermo Fisher Scientific).
 - Cebadores [5 µM] (Thermo Fisher Scientific).
 - MgCl₂ 25 mM (Thermo Fisher Scientific).
 - dNTPs [10 mM] (Thermo Fisher Scientific)
 - Agua libre de DNAsas.
- Procedimiento:

Materiales y métodos

Para preparar 20 μ l de reacción se mezclaron 2 μ l de tampón, 0,125 μ l de enzima, 1 μ l de DNA extraído en el apartado IV.1.1.1.4.2 y cebadores directo y reverso a 0,25 μ M, MgCl₂ 2 mM, y dNTP 0,1 mM.

Se utilizó el termociclador “PTC-100™ Programmable Thermal Controller cycler”. El programa ejecutó las siguientes instrucciones [a 95 °C, 5 minutos, después 38 ciclos (a 95 °C durante 30 segundos; a 60 °C, 30 segundos y a 72 °C, 30 segundos) y almacenamiento indefinido a 4 °C]. Se cargaron 5 μ l de la reacción de amplificación en un gel de agarosa al 2% para la visualización del tamaño del amplicón. Como se indica en la Figura 12, los fragmentos correspondientes al locus original tienen una longitud de aproximadamente 450 pares de bases mientras que los fragmentos más cortos, cerca de 130 pb, corresponderían al locus deletado.

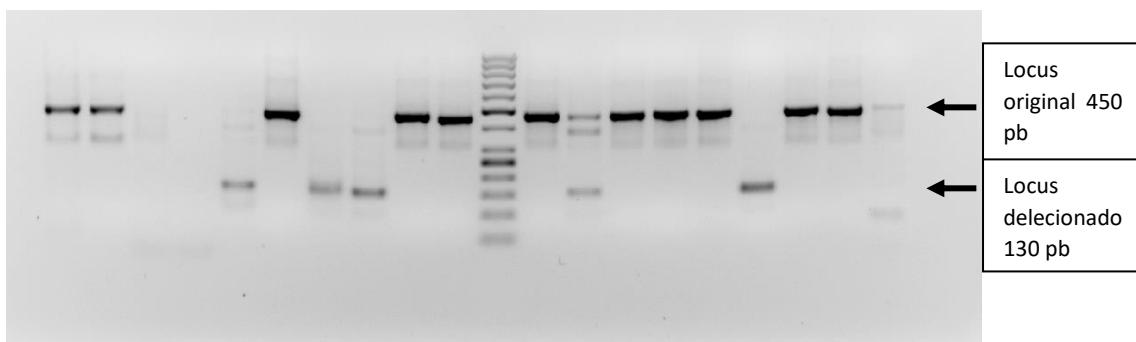


Figura 12: Separación en un gel de agarosa al 2% de los productos de PCR de 18 de los 30 ratones nacidos de la electroporación. Se incluye un marcador de peso molecular Gene Ruler 50 bp. La banda de 450 pb representa el locus original mientras que la banda de 130 pb corresponde al locus deletado.

IV.1.1.1.4.4 Extracción y purificación del DNA a partir del gel de agarosa

- Reactivos:
 - Kit GeneJET Gel Extraction (Thermo Fisher Scientific).
 - Cebadores [5 μ M] (Thermo Fisher Scientific).
 - Tampón TE: Tris-HCl 10 mM, EDTA 0,1 mM (Sigma-Aldrich).
- Procedimiento:

Las supuestas bandas correspondientes a la delección se trajeron del gel para tener una lectura más limpia, debido a que los cebadores hibridarían tanto en el locus original como en el deletado. Se recortó la banda deseada visualizando el gel bajo una lámpara de luz ultravioleta de onda larga.

El producto de PCR se extrajo usando el protocolo del kit *GeneJET Gel Extraction* que permite la extracción de bandas cuyo tamaño se encuentre entre 100-10.000 pares de base. En resumen, se disolvió la banda en un tampón a 65 °C durante 10 minutos, se purificó en columnas de sílice y se eluyó la banda en tampón TE. Una vez purificada, se cuantificó espectrofotométricamente con el NanoDrop D-1000 y el programa asociado ND-1000 DataViewer v3.3.0

IV.1.1.1.4.5 Secuenciación Sanger.

Los fragmentos purificados en el apartado IV.1.1.1.4.4 se enviaron al servicio de secuenciación de la unidad de genómica de la Universidad Complutense de Madrid. Allí fueron analizados utilizando el secuenciador 3730xl DNA Analyzer (Thermo Fisher Scientific). Las secuencias se analizaron manualmente para comprobar que había una única secuencia, y mediante BLAST se verificó que la secuencia deletada correspondía con el diseño previsto en la Figura 11.

Materiales y métodos

Los ratones seleccionados se cruzaron con ratones del sustrato C57BL/6J (Janvier Labs) para evitar posibles efectos *off-target* y comprobar si la delección se transmitía a la descendencia. Se comprobó que 3 de los 4 candidatos transmitieron la delección a la descendencia, se repitió el genotipado, se extrajo la banda de 130 bp y se secuenció de nuevo, verificando la delección como se observa en la figura 13. De los 3 posibles ratones fundadores se escogió el ratón 25 por tener un mayor número de descendientes heterocigotos para la generación de la nueva línea de ratones denominada *Txndc5 KO* (C57BL/6JRj-Txndc5<em2Mdnp>/Ciba, MGI:6444222).

gcagctatgctatgttcttgagctcctgtgc当地aaattgaactcttggcaaccaggaaaggq**CACAA**gcggagaaggctattta
caacttcaaaagaattgaaacttcagcatgtcaccccttgcctctggcagtaaaggagggaggagggacactcacggc
tggctccctcggtcaagtgtcgacatccagttccagtggttcaaagtctcttaggaccctgtacttcactgctctgtccaggctta
aaaaacttcaggctqaqaqaqaqaqcacggatataqaaaqacqaaqttqaaaqgtqccctqgqtaqcqac
gagcaaacggaaatggagca**ACCA**Gggctgcagccaggcacctatctgccactcaagcaaaactccaatgaggtaacaaaaa
ccatgc

Figura 13: Secuencia amplificada por los *primers* de genotipado *Txndc5* intrón 2 F e *Txndc5* intrón R. En mayúscula y negrita están marcadas las posibles zonas de corte por los complejos de corte y en cursiva y subrayado los nucleótidos que fueron delecionados tras la verificación en la secuenciación.

IV.1.1.1.5 Mantenimiento de la línea *Txndc5 KO*.

Para la generación de animales de la línea *Txndc5 KO* se cruzaron los descendientes de primera generación que presentaban heterocigosis. Los animales nacidos se genotizaron usando los primers *Txndc5* intrón 2 F e *Txndc5* intrón R para determinar su genotipo como se indica en la figura 14.

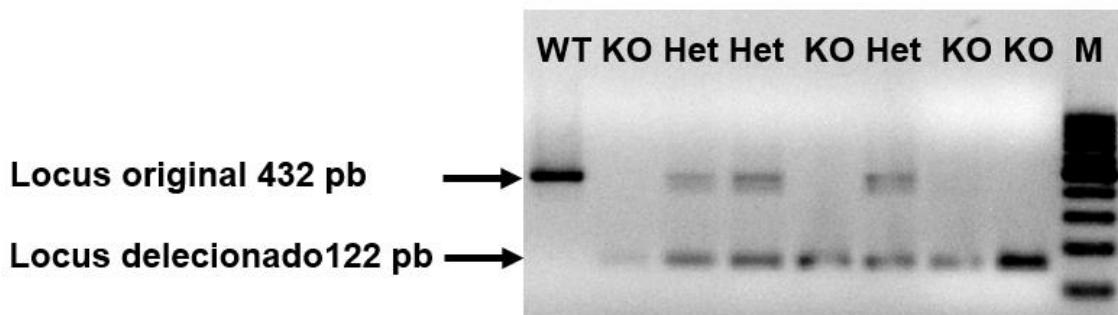


Figura 14: Imagen del gel de agarosa al 2% con los productos de PCR obtenidos del genotipado de la línea *Txndc5 KO*. Se realizó la amplificación con los cebadores de genotipado *Txndc5* intrón 2 F y *Txndc5* intrón R. Las calles con una única banda superior indican la presencia de dos alelos originales o *wild-type* (WT), mientras que las calles con dos bandas indican heterocigosis (Het) y única banda inferior indica ambos alelos delecionados, o *knock-out* (KO).

Posteriormente, se cruzaron los descendientes heterocigotos de segunda generación, las crías nacidas con ambos alelos originales, o *wild-type* (WT), y con ambos alelos delecionados, o *knock-out* (KO) se emplearon para los experimentos posteriores. Las crías heterocigóticas se utilizaron para generar animales para los siguientes experimentos.

IV.1.1.1.6 Análisis de los cortes genómicos inespecíficos u off-targets.

Uno de los potenciales peligros de la edición genética con CRISPR/cas9 es que siempre existe la posibilidad de que este complejo corte en una zona para la cual no está destinada. Para ello se

Materiales y métodos

utilizó una nucleasa de alta fidelidad que minimiza estos efectos además de elegir guías que no sean similares con otras secuencias del genoma.

Sin embargo, se comprobaron los 4 locus más probables de ser cortados inespecíficamente y se verificó su integridad, para cada una de las dos guías. Se usó el software CRISPRoff (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30367669/>) para encontrar las secuencias y se diseñaron cebadores para su amplificación como se describe en el apartado IV.1.1.1.4.1, Tablas 2 y 3.

Tabla 2: Características de los cuatro potenciales cortes inespecíficos “off-targets” de la sgRNA1 (Off 1.A-D) y de la sgRNA 2 (Off 2.A-D).

	Chr	Inicio	Final	Secuencia	MM	MMKEY	SCORE	Anotación
Off 1.A	6	154065608	154065631	AACGGGACTGGA GCAAGCAGAGG	2	[8:17]	3	<i>Bcat1</i>
Off 1.B	10	65003871	65003894	AAGAGGAATGTA GCAACCAGAGG	3	[3:4:11]	1.4	-
Off 1.C	11	43568735	43568758	ACTTAGAATGGA GCAACCAGAGG	4	[2:3:4:5]	1.3	-
Off 1.D	17	28315322	28315345	GGAGGGAATAGA GCAACCAGAGG	4	[1:2:3:1 0]	1.3	-
Off 2.A	16	102296899	102296922	CTAACCCAGAAAG GGCTCAAGAGG	2	[2:16]	2	<i>Ripk4</i>
Off 2.B	9	18802692	18802715	AGCACCAACAAAG GGCACAAAGCGG	4	[1:2:3:8]	1.4	<i>Dnmt1</i>
Off 2.C	13	11928981	11929004	ACAAACAGAAAG GGCAGAAGGGG	3	[1:5:17]	1.3	<i>Hecw1</i>
Off 2.D	11	94650158	94650181	CAACCCAGAAAG GGCAGAAGGGG	3	[2:4:17]	1.2	-

Los datos obtenidos de la herramienta CRISPRoff, nos indica el número de cromosoma (CHR), el número de *mismatch* (MM), la anotación de estos (MMKEY), su potencial peligro de corte (Score) y la anotación del genoma de esta secuencia.

Tabla 3: Diseño de los cebadores para amplificar las zonas de los off-targets junto con los tamaños de los amplicones esperados.

		Cebadores	Tamaño amplicón
Off 1.A	Directo	TGCCAGGGATATGCTGTGAC	290 pb
	Reverso	TGGAATGTAGGGTGGGGAA	
Off 1.B	Directo	GCAACAAAACAGAGTCTGACAGG	374 pb
	Reverso	AGCAGAAACAAGGACCGCATC	
Off 1.C	Directo	GAGCAGAGTGAGCTTCTGTG	734 pb
	Reverso	CTTTCTGACTTGCTTCAGCATT	
Off 1.D	Directo	CACAGCTCTGTGCTTCCA	386 pb
	Reverso	AACAGGGGACAGCTGAATGG	
Off 1.A	Directo	GGCTCCCAACCATCCGTAAT	300 pb
	Reverso	CCTTGTCCAACGCCTCAGAA	
Off 1.B	Directo	ATCAAACAGGTGTAGGGACC	531 pb
	Reverso	GAGTCTCAGGGTCGGGAAATAG	
Off 1.C	Directo	GAGGTAATCCGTAGGCCAGG	561 pb

Materiales y métodos

Off 1. D	Reverso	CTACTTGAAGAGGTAACGAGGGAA	366 pb
	Directo	TCTTGCCCTCCGTTGCCCTAAG	
	Reverso	TGCTGGGAGTCATACTGGGA	

IV.1.1.1.7 Detección de off-targets mediante digestión con T7 endonucleasa.

- Reactivos:
 - Kit T7 endonuclease I Assay (GeneCopoeia; Rockville, USA #IC005).
 - Agua libre de DNAsas.
 - Tampón 10X TrueStart™ Taq (Thermo Fisher Scientific).
 - TrueStart™ Taq DNA polimerasa (Thermo Fisher Scientific).
 - Cebadores [5 µM] (Thermo Fisher Scientific).
 - MgCl₂ 25 mM (Thermo Fisher Scientific).
 - dNTPs [10 mM] (Thermo Fisher Scientific).
- Procedimiento:

Cuando se produce un corte de doble hebra y no hay una región de homología se produce una reparación no homóloga, lo que supone un pequeño cambio de nucleótidos o *indels*, como se describe en el apartado II.4. La enzima T7 endonucleasa es una enzima que realiza un corte en las zonas de doble hebra de DNA que no se encuentran apareadas.

Primero se amplificaron las regiones con los posibles *off-targets* como se describe en el apartado IV.1.1.4.3 usando los cebadores de la tabla 3 y el DNA de los ratones de la primera generación. Se amplificó el control positivo del kit, añadiendo 2 µl del control en vez de cebadores y DNA. Los productos de amplificación se separaron en un gel de agarosa al 2% para comprobar la correcta amplificación.

Para ver estos posibles *indels*, se desnaturizaron los productos de la amplificación a 95 °C y se dejaron enfriar a 5 grados por minuto para que se volviesen a hibridar de forma que hebras con *indels* se habrían apareado con hebras wt, que serán las zonas de corte de la T7 endonucleasa. Se incubaron a 37 grados durante 1 hora: 10 µl de producto de PCR, 8 µl de agua libre de DNAsas, 1 µl de tampón 10X T7EN y 1 µl de T7 endonucleasa (2 U/µl). Se utilizó un control positivo del kit, añadiendo endonucleasa y como control negativo no se añadió enzima. Se corrieron en un gel de agarosa al 2% para comprobar la acción de esta enzima y, por tanto, un corte inespecífico.

IV.1.1.2 Administración de dietas y control de ingestas.

Se generaron dos grupos de ratones en función de su genética WT o KO, tanto en machos como hembras de 8 semanas de edad.

Se realizaron 4 dietas diferentes: dieta *chow* purificada o dieta control, dieta *Western* u occidental con más contenido en grasa y con colesterol, dieta *Western* con escualeno al 1% y, por último, una dieta en alto contenido en grasa y sacarosa, para la cual además del pienso se añadió un 20% de sacarosa en la bebida. Las dietas fueron formuladas con todos sus ingredientes como se indica en la tabla 4, liofilizadas y almacenadas al vacío a -20 °C.

Al comienzo del experimento se registró el peso inicial y los animales tuvieron acceso *ad libitum* al pienso y agua, recibiendo semanalmente la ración de nueva dieta. Se pesó el pienso añadido, así como su residuo, controlando la cantidad de la ingesta de cada jaula. Se realizó un seguimiento quincenal del peso del animal.

Materiales y métodos

Tabla 4. Composición de los piensos administrados a los animales.

	Control	Occidental	Dieta alto contenido grasa
Proteína (%)	14,2	11,3	25,5
Fibra (%)	5	4	3,5
CHO (%)	72,1	57,6	32
Azucares (%)	25,5	20,4	39
Grasa (%)	4	23,35	25,5
Colesterol (%)	0	0,15	0
Colina (%)	0,25	0,2	0,25
Minerales (%)	3,5	2,8	3,5
Vitaminas (%)	1	0,8	1

Al comienzo del experimento se registró el peso inicial y los animales tuvieron acceso *ad libitum* al pienso y agua, recibiendo semanalmente la ración de nueva dieta. Se pesó el pienso añadido, así como su residuo, controlando la cantidad de la ingesta de cada jaula. Se realizó un seguimiento quincenal del peso del animal.

A la cuarta semana de consumir las dietas, se ayunaron los ratones 4 horas para la obtención de sangre del plexo maxilar para la obtención de plasma, como indica el apartado IV.1.1.3. A las 6 semanas, se ayunaron 16 horas y se sacrificaron, como se indica en el apartado IV.1.1.3, poniendo fin al estudio.

IV.1.1.3 Sacrificio, obtención de tejidos, plasma y suero.

Los animales se anestesiaron por inhalación de CO₂. Se obtuvo sangre mediante punción cardiaca y se guardaron en tubos sin anticoagulante para la obtención de suero y en otros con EDTA para la obtención de plasma. Se centrifugaron durante 10 minutos a 2.000 g, recogiendo el sobrenadante en un nuevo tubo.

Los tejidos se recogieron en un margen de 5 minutos, recogiendo hígado, páncreas, duodeno, yeyuno, íleon, músculo y grasa inguinal, subcutánea y parda en criotubos, congéndolos en nitrógeno líquido para evitar su degradación. Para estudios histológicos se guardaron en formol el hígado, el páncreas, tejido adiposo inguinal y músculo (cuádriceps femoral).

IV.1.1.4 Ensayos de tolerancia.

Se generaron dos grupos de 6-7 ratones de genética WT o KO, tanto machos como hembras de 8-12 semanas de edad.

IV.1.1.4.1 Test de tolerancia a la glucosa.

- Reactivos:
 - Solución de glucosa a 100 g/l en PBS (Sigma-Aldrich #G8270).
- Procedimiento:

Los ratones se ayunaron 16 horas, cambiando las cubetas de los animales. Se pesaron pasadas las 16 horas y se sacó sangre del plexo maxilar, medida que se utilizó como 0 horas.

Utilizando una sonda gástrica, se les administró por vía oral la solución de glucosa a razón de 2 g por kg de peso. A partir del momento de administración y transcurridos 30, 60 y 120 minutos

Materiales y métodos

se obtuvo sangre del plexo maxilar para la obtención de plasma según el apartado IV.1.1.3. Se realizó una curva con los 4 tiempos, midiendo la concentración de glucosa en plasma según se describe en el apartado IV.3.1.

IV.1.1.4.2 Test de tolerancia a la insulina.

- Reactivos:
 - Solución de insulina recombinante humana 0,075 U/ml en PBS (Thermo Fisher Scientific, #12585014).
 - Solución de glucosa a 100 g/l en PBS (Sigma-Aldrich, #G8270).
- Procedimiento:

Los ratones se ayunaron 6 horas. Se pesaron y se les sacó sangre del plexo maxilar, medida que se utilizó como 0 horas.

Se les administró por vía intraperitoneal la solución de insulina para proporcionar 0,75 U por kg de peso. A partir del momento de administración y pasados 15, 30 y 60 minutos se obtuvo sangre del plexo maxilar para la obtención de plasma según el apartado IV.1.1.3. Completado el procedimiento a los 60 minutos, se les administró intraperitonealmente 600 µl de la solución de glucosa para reducir problemas relacionados con la hipoglucemia. Se realizó una curva con los 4 tiempos, midiendo la concentración de glucosa en plasma según se describe en el apartado IV.3.1.

IV.1.1.4.3 Test de tolerancia al piruvato.

- Reactivos:
 - Solución de piruvato a 100 g/l en PBS (Sigma-Aldrich, # P2256).
- Procedimiento:

Los ratones se ayunaron 16 horas, cambiando las cubetas de los animales. Se pesaron pasadas las 16 horas y se sacó sangre del plexo maxilar, medida que se utilizó como 0 horas.

Se les administró la solución de piruvato para administrar 2 g por kg de peso por vía oral mediante una sonda gástrica. A partir del momento de administración y pasados 30, 60 y 120 minutos se sacó sangre del plexo maxilar para la obtención de plasma según el apartado IV.1.1.3. Se realizó una curva con los 4 tiempos, midiendo la concentración de glucosa en plasma según se describe en el apartado IV.3.1.

IV.1.1.4.4 Test de tolerancia al ayuno.

Se ayunaron los ratones durante 48 horas antes del sacrificio y toma de muestras, registrando su peso corporal y cogiendo sangre del plexo maxilar al inicio del experimento, 24 y 36 horas del ayuno para la obtención de plasma según el apartado IV.1.1.3. Se realizó una curva con los 4 tiempos, midiendo la concentración de glucosa en plasma según se describe en el apartado IV.3.1.

IV.1.2 Cultivo celular.

Se utilizó la línea celular AML12 ya que exhibe las características propias del hepatocito como hemos comentado en el apartado II.5.

IV.1.2.1 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.

Materiales y métodos

IV.1.2.3 Cultivo y mantenimiento de la línea celular AML12.

- Reactivos:
 - Medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) con glucosa (Thermo Fisher Scientific).
 - Medio de cultivo Hams-F12 (Thermo Fisher Scientific).
 - 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 termostatizado para inactivar las proteínas del complemento.
 - Penicilina-estreptomicina (100X) (Thermo Fisher Scientific).
 - Aminoácidos no esenciales (100X) (Thermo Fisher Scientific).
 - Estreptomicina 100X (Thermo Fisher Scientific).
 - Dexametasona (Sigma-Aldrich).
 - ITS (100X) (Insulina, transferrina y selenio) (Thermo Fisher Scientific).
 - Material de cultivo celular estéril (Sarstedt, Nümbrecht, Alemania).
- Procedimiento:

Siguiendo las indicaciones de la ATCC [220], 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%, estreptomicina al 1%, aminoácidos no esenciales al 1%, ITS al 1% y dexametasona a 40 ng/ml. El medio de cultivo se cambió cada 2 días.

IV.1.2.4 Tripsinización y siembra 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 (Sigma-Aldrich).
 - Azul Trypan 2X (Thermo Fisher Scientific).
- Procedimiento:

Cada 7 días aproximadamente, cuando las células alcanzaban un 100 % 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 contaron utilizando el contador celular Countess™ 3 FL Automated Cell Counter (Thermo Fisher Scientific), añadiendo a la cámara de contero 10 µl de azul Trypan y de suspensión celular previa incubación de 5 minutos.

El volumen de siembra de las células viene determinado por la superficie sobre la que se va a trabajar. Debido al rápido crecimiento celular de la línea, para el mantenimiento celular se sembraron 200.000 células en una caja o flask de 25 cm² en un volumen final de 5 ml, llegando a confluencia aproximadamente a los 7 días. Para la realización de experimentos y con el fin de controlar mejor la homogeneidad se sembraron 750.000 células con la previsión de alcanzar el 80-90% de confluencia al segundo día, tras el cual se realizó el tratamiento o procedimiento oportuno. En este trabajo se han utilizado otras superficies de trabajo distintas, como por

Materiales y métodos

ejemplo las placas de 6 pocillos, de 9,07 cm², para su trabajo se adaptó el número de células y el volumen de una forma proporcional a su superficie.

IV.1.2.5 Congelación/descongelación de las células.

- Reactivos:
 - SFB (Thermo Fisher Scientific).
 - DMSO (Sigma-Aldrich Aldrich; Merck Millipore).
 - 5100 Cryo 1 °C Freezing Container, "Mr. Frosty" (Thermo Fisher Scientific).
- Procedimiento:

Se procedió de manera similar a la tripsinización, los 5 ml de células resuspendidas en medio de cultivo resultante se centrifugaron a 300g durante 5 minutos. Posteriormente, se aspiró el medio y al sedimento celular se le añadió gota a gota 1 ml de SFB con DMSO al 10% muy frío. La mezcla se guardó en viales y la congelación se efectuó de manera progresiva en un contenedor con isopropanol (Mr. Frosty) en un congelador de -80 °C durante 24 h. Posteriormente, los tubos se almacenaron en nitrógeno líquido hasta su utilización. La descongelación se realizó añadiendo progresivamente 5 ml de medio de cultivo con suero hasta que se descongelara totalmente para rápidamente proceder a centrifugar para eliminar el DMSO. Se retiró el sobrenadante y se sembró una concentración celular 5 veces superior a lo normal debido a una esperable muerte celular y crecimiento ralentizado.

IV.1.2.6 Generación de la línea celular carente o *knock-out* de TXNDC5.

Para el desarrollo de la línea celular se decidió utilizar un sistema de dos plásmidos. El plásmido *Txndc5* CRISPR/cas9 KO (sc-430580, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA) expresa la proteína cas9 junto con la guía propia que dirige la nucleasa directamente al quinto exón (Figura 15). Un segundo plásmido contiene los brazos de homología (HA) que flanquean el exón junto con un gen de resistencia a la puromicina y la proteína fluorescente roja (RFP) separados por la secuencia T2A que permite continuar la transcripción de varios genes. Cuando la nucleasa corta, se produce la reparación por recombinación homóloga de forma que se bloquea la transcripción de *Txndc5* y se introducen dos genes de selección, como indica la Figura 16.

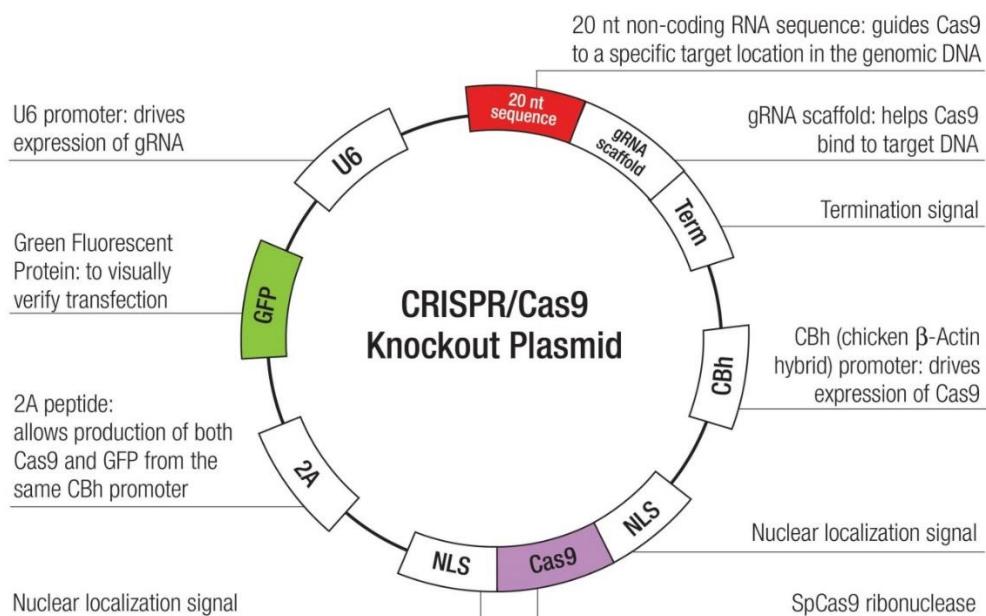


Figura 15: Resumen de los componentes del plásmido CRISPR/cas9 KO. Adaptada de [225].

Materiales y métodos

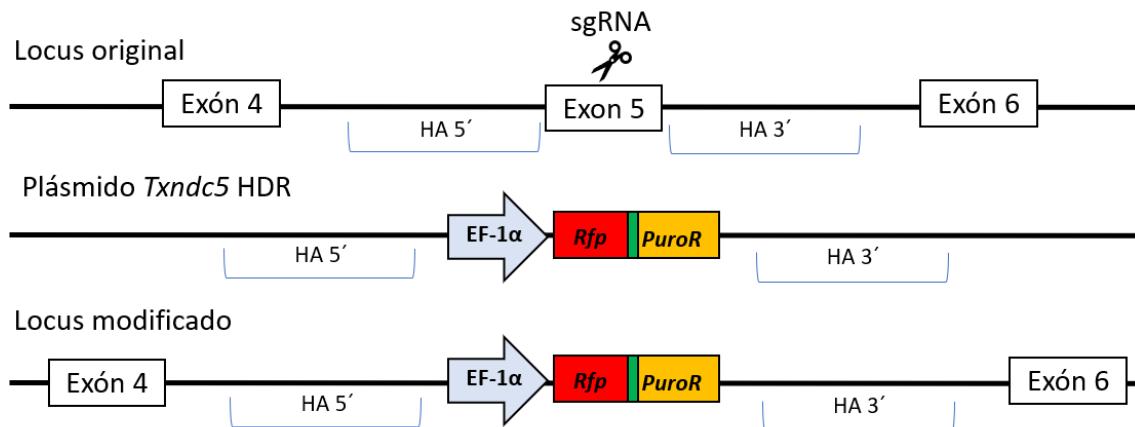


Figura 16: Representación esquemática del mapa genómico correspondiente al gen *Txndc5* antes y después de la inserción del plásmido *Txndc5* HDR. Las tijeras representan la zona de corte del complejo ribonucleico dirigido por la guía sgRNA. La zona comprendida por HA corresponde a los brazos de homología. El plásmido *Txndc5* HDR contiene el promotor EF-1 α seguido de la proteína RFP precedido por la secuencia T2A (verde) y el gen de resistencia a puromicina (*PuroR*).

IV.1.2.6.1 Transfección de plásmidos.

- Reactivos:
 - Plásmido *Txndc5* CRISPR/cas9 KO (Santa Cruz, sc-430580).
 - Plásmido *Txndc5* HDR (Santa Cruz, sc-430580).
 - Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific).
 - Medio de cultivo Opti-Mem (Thermo Fisher Scientific).
 - Medio de cultivo Hams-F12 (Thermo Fisher Scientific).
 - Penicilina-estreptomicina (100X) (Thermo Fisher Scientific).
 - ITS (100X) (Insulina, transferrina y selenio) (Thermo Fisher Scientific).
- Procedimiento:

Para la realización de la transfección, se emplean las células con una confluencia del 60% ya que la expresión de los plásmidos empieza el día posterior y continúa los dos días siguientes. Sin embargo, para que el evento de recombinación ocurra, es necesario que la célula se encuentre en la fase S o G2 del ciclo celular. De esta forma, en este particular caso, las células se transfecaron en una confluencia del 90-100% y se tripsinizaron al día siguiente para favorecer el crecimiento durante los días siguientes y la HDR.

Para la transfección se usaron 5 ml del medio Opti-MEM y Hams F12 en proporción 1:1, suplementado con penicilina al 1%, aminoácidos no esenciales al 1%, ITS al 1% y dexametasona a 40 ng/ml. Se preparó en 300 μ l de Opti-MEM, 2 μ l de plásmido *Txndc5* CRISPR/cas9 KO y 4 μ l del plásmido *Txndc5* HDR junto con 6 μ l de "Lipofectamine 2000® Reagent" y se incubó 5 minutos. Se lavaron las células dos veces con PBS y pasado ese tiempo se añadió el medio de transfección junto con el complejo de transfección

IV.1.2.6.2 Selección celular.

Para la selección celular se realizaron tratamientos con puromicina sobre medio celular de mantenimiento. La puromicina es un antibiótico aminoglucósido que inhibe la síntesis de proteínas en células eucariotas y procariotas, usado muy frecuentemente como gen de resistencia. Se empezó con concentraciones bajas de puromicina [1 μ l/ml] cuando las células

Materiales y métodos

llegaron al 90% de confluencia tras la transfección. Pasada una semana se fue doblando la dosis, tripsinizando debido a que se crean colonias resistentes hasta llegar a concentraciones de puromicina de 8 µl/ml. En este momento la línea celular es resistente a la puromicina, pero no todas las células son resistentes al fármaco [226].

Debido a que la línea celular AML12 necesita de contactos celulares para crecer, el aislamiento de células individuales y crecimiento de colonias fue inviable. Para que la inmensa mayoría fueran resistentes a la puromicina se llevó a cabo un tratamiento más agresivo, añadiendo puromicina al medio de tratamiento después de tripsinizar, cuando las células no tienen contactos entre ellas. Cuando las células resistieron sin muerte a una concentración alta de puromicina de 32 µl/ml, se verificó por *Western-blot*, descrito en el apartado IV.5.4.1 la ausencia de la proteína TXNDC5.

No se realizaron análisis de *off-targets* ya que es un evento poco probable que en una población altamente heterogénea donde han podido ocurrir múltiples eventos, el efecto ocurrido en una de las muchas células transfectadas es despreciable en comparación con el evento ocurrido en un embrión de ratón, ya que todo el individuo compartiría la mutación inespecífica.

IV.1.2.7 Estudio de la viabilidad celular.

- Reactivos:
 - Medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) con glucosa (Thermo Fisher Scientific).
 - Medio de cultivo Hams-F12 (Thermo Fisher Scientific).
 - Penicilina-estreptomicina (100X) (Thermo Fisher Scientific).
 - Aminoácidos no esenciales (100X) (Thermo Fisher Scientific).
 - Dexametasona (Sigma-Aldrich).
 - ITS (100X) (Insulina, transferrina y selenio) (Thermo Fisher Scientific).
 - Material de cultivo celular estéril (Sarstedt, Nümbrecht, Alemania).
 - Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol (Thermo Fisher Scientific).
 - Peróxido de hidrógeno (Sigma).
 - DMSO (Sigma).
- Procedimiento:

Se sembraron 20.000 células por pocillos en una placa de 96 para conseguir una confluencia alta e iniciar el tratamiento 24 horas después. Se ensayaron diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno (50-5 mM) el medio formado por medio DMEM y Hams F12 en proporción 1:1, penicilina al 1%, aminoácidos no esenciales al 1%, ITS al 1% y dexametasona a 40 ng/ml. Se dejó el tratamiento media hora, se lavó con PBS y se cambió el medio.

Para estudiar la viabilidad celular se utilizó el bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol o MTT. Este compuesto incoloro es reducido por la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa de las células que mantienen su integridad, a azul de formazán. Se añadió 10 µl por pocillo de MTT 5 mg/ml y tras incubar dos horas a 37 °C se eliminó el medio por inversión sobre un papel y se añadieron 100 µl de DMSO por pocillo para la disolución del colorante. Finalmente, se procedió a medir la absorbancia a 595 nm en el espectrofotómetro SPECTROstar Nano. Todas las medidas se hicieron con 4 réplicas [227].

Materiales y métodos

IV.1.2.8 Ensayos de radioactividad.

IV.1.2.8.1 Captación in vitro de deoxi-D-glucosa tritiada.

- Reactivos:
 - Medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) con glucosa (Thermo Fisher Scientific).
 - Medio de cultivo Hams-F12 (Thermo Fisher Scientific).
 - Penicilina-estreptomicina (100X) (Thermo Fisher Scientific).
 - Aminoácidos no esenciales (100X) (Thermo Fisher Scientific).
 - Dexametasona (Sigma-Aldrich).
 - ITS (100X) (Insulina, transferrina y selenio) (Thermo Fisher Scientific).
 - Material de cultivo celular estéril (Sarstedt, Nümbrecht, Alemania).
 - Insulina actrapid (Novo Nordisk; Bagsvaerd, Dinamarca)
 - Líquido de centelleo: ULTIMA GOLD (PerkinElmer; Barcelona, España)
 - Viales de centelleo (Tubo 3 ml 11x55 mm) (Desplayte; Zaragoza, España)
 - Tampón de lisis celular (NaOH 0,2 N, SDS al 0,1%)
 - Tampón KRPH (NaCl 136 mM, HEPES 20 mM, Tampón fosfato de sodio 5 mM, KCl 4,7 mM, MgSO₄ 1 mM y CaCl₂ 1 mM)
 - Deoxy-D-glucose, 2-[1,2-3H(N)] (1 mCi/ml) (PerkinElmer, #NET549250UC)
- Procedimiento:

Se sembraron las células en placas de 12 pocillos hasta que alcanzaron el 90% de confluencia. Se dejaron 1 día sin insulina con el medio formado por medio DMEM y Hams F12 en proporción 1:1, penicilina al 1%, aminoácidos no esenciales al 1% y dexametasona a 40 ng/ml. Se lavaron dos veces con el tampón KRPH y se incubaron 90 minutos a 37 °C para inducir una situación de ayuno, posteriormente se añadió insulina para sensibilizar la línea celular (100 y 500 nM). Se añadió glucosa marcada para llegar a una concentración de 15 µCi/ml de medio de cultivo y se incubaron 30 minutos. Pasado ese tiempo se lavaron 2 veces con KRPH y se añadió 600 µl de tampón de lisis. Se incubó a 4 °C en agitación durante 45 minutos. Se guardaron 500 µl para los ensayos de radioactividad y 100 µl para la normalización mediante la técnica de cuantificación de proteína descrita en el apartado IV.5.1.

En los viales de centelleo se añadieron 2 ml del líquido ultima GOLD, sobre el cual se añadieron 500 µl del lisado celular. Se vorteo la muestra para la homogeneización y se midieron utilizando el contador de centelleo. Los niveles de radioactividad se normalizaron con la concentración de proteína de cada pocillo, se realizaron 6 réplicas por condición.

IV.1.2.8.2 Movilización de grasa o lipólisis.

- Reactivos:
 - Medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) con glucosa (Thermo Fisher Scientific).
 - Medio de cultivo Hams-F12 (Thermo Fisher Scientific).
 - Penicilina-estreptomicina (100X) (Thermo Fisher Scientific).
 - Aminoácidos no esenciales (100X) (Thermo Fisher Scientific).
 - Dexametasona (Sigma-Aldrich).
 - ITS (100X) (Insulina, transferrina y selenio) (Thermo Fisher Scientific).
 - Material de cultivo celular estéril (Sarstedt, Nümbrecht, Alemania).
 - Líquido de centelleo: ULTIMA GOLD (PerkinElmer; Barcelona, España)
 - Viales de centelleo (Tubo 3 ml 11x55 mm) (Desplayte; Zaragoza, España)

Materiales y métodos

- Tampón de lisis celular (NaOH 0,2 N, SDS al 0,1%)
- Ácido palmitíco, [9,10-3H(N)] 5 mCi/ml (PerkinElmer, #NET549250UC)
- Procedimiento:

Se sembraron las células en placas de 12 pocillos hasta que alcanzaron el 90% de confluencia. Se dejaron 1 día con 0,5 µCi/ml de ácido palmitíco marcado con el medio formado por medio DMEM y Hams F12 en proporción 1:1, penicilina al 1%, aminoácidos no esenciales al 1%, ITS al 1% y dexametasona a 40 ng/ml. Se lavaron dos veces con el tampón PBS y se incubaron 2 y 4 horas a 37 °C con medio DMEM sin aditivos, albúmina al 2 % e isoprenalina (10 µM) para inducir la lipólisis. Se guardó el sobrenadante del medio para medir la radiactividad. Pasado ese tiempo se lavaron 2 veces con PBS y se añadió 600 µl de tampón de lisis. Se incubó a 4 °C en agitación durante 45 minutos. Se guardó el lisado para la normalización mediante la cuantificación de los triglicéridos hepáticos descrita en el apartado IV.4.2.

En los viales de centelleo se añadieron 2 ml del líquido ultima GOLD, sobre el cual se añadieron 700 µl del medio celular en el cual se encuentran los productos de la digestión del ácido palmitíco. Se vortearon las muestras para la homogeneización y se midieron utilizando el contador de centelleo. Los niveles de radioactividad se normalizaron con concentración de triglicéridos de cada pocillo, se realizaron 6 réplicas por condición.

IV.2 Estudio de la expresión génica.

IV.2.1 Extracción de RNA.

- Reactivos:
 - Homogeneizador mecánico Mini-Beadbeater 16 (BioSpec Products, Inc. Bartlesville, OK 74005, USA, #607EUR).
 - Bolas de zirconio/sílice 2,3 mm (BioSpec, # 6380060).
 - Dietil pirocarbonato (DEPC) (Thermo Fisher Scientific).
 - Agua tratada con dietil pirocarbonato (DEPC) al 0,05% (v/v), autoclavada durante 1 hora a 1 atmósfera.
 - Trizol™ Reagent (Thermo # 15596018).
 - Kit Extracción Direct-zol™ RNA Miniprep (Zymo Research; 17062 Murphy Ave. Irvine, CA 92614, U.S.A.; #R2053).
 - 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.
 - Lector de placas SPECTROstar Nano (BMG Labtech)
- Procedimiento:

Para la extracción de RNA se utilizó material estéril libre de RNasas. El procedimiento de extracción de RNA a seguir fue el mismo tanto para los tejidos de origen animal como para las células en cultivo. En caso del hígado fue necesario homogeneizar primero la muestra, para ello se obtuvo un trozo de tejido por fractura sobre hielo seco para evitar la descongelación del tejido y degradación del RNA. Se colocó en un tubo de 2 ml con rosca y se añadieron dos bolas de circonio, se mantuvo congelado hasta su homogenización. Justo antes de su homogenización, se añadieron 400 µl de Trizol, se procesaron durante 1 minuto y medio con el homogenizador mecánico. Se centrifugó 10 minutos a 1200g para eliminar restos celulares y se guardó el sobrenadante.

Materiales y métodos

Se utilizó el protocolo del kit de extracción Direct-zol™ RNA Miniprep, que consiste brevemente en una extracción y purificación del RNA en columnas de sílica con una digestión con DNAsa I para la eliminación del DNA genómico. El RNA se eluyó en agua libre de RNAsas.

Antes de su congelación, se midió su concentración espectrofotométricamente utilizando una placa LVIS y el lector de placas SPECTROstar Nano. La concentración se calculó en base a que 1 OD a la longitud de onda de A₂₆₀ corresponde a una concentración de 40 µg/ml. Se comprobó que la relación entre las dos longitudes de onda (260/280) se encontrase entre 1,8 y 2,0. Un ratio inferior reflejaría una posible contaminación con proteínas y DNA.

Se corrieron 500 ng del RNA extraído en un gel de agarosa al 1% a 80 V durante 30 min. El gel se visualizó mediante un transiluminador de UV y se comprobó la calidad del RNA si observamos las tres bandas características de los RNA ribosómicos (5S, 18S y 28S). Posteriormente, el RNA se mantuvo almacenado a -80 °C.

IV.2.2 Secuenciación masiva del RNA (RNAseq).

Para el estudio de las diferencias del transcriptoma del ratón *wild-type* y del ratón carente de *Txndc5* se prepararon 3 *pools* por condición, formados por la misma cantidad de RNA extraído de 3 ratones diferentes. Las 6 muestras resultantes se mandaron al servicio del Instituto de Genética de Beijing (BGI Genomics, Shenzhen, China).

El servicio primero analizó la calidad del RNA usando el Bioanalizador Agilent 2100 (Agilent RNA 6000 nano kit, Santa Clara, CA, USA). Una vez verificada la integridad, comenzó la construcción de la librería purificando los RNA mensajeros (mRNA) mediante su cola de poli-A usando cebadores oligo-dT unidos a sondas magnéticas. El mRNA fue fragmentado, retrotranscrito a cDNA, unido a un adaptador, purificado y amplificado. Este producto de PCR fue cuantificado por Qubit, juntándolas para formar un círculo de DNA mono hebra (ssDNA), formando la librería final. Se generaron nano bolas de DNA (DNBs) con el ssDNA circular mediante replicación enrollada circular (RCR) para aumentar la señal fluorescente de la secuenciación. Se cargaron las DNBs en el entramado del nanoarray y se leyeron las secuencias de 100 nt por la plataforma BGISEQ-500.

Las lecturas de secuencias con baja calidad, contaminaciones del adaptador o un gran contenido de bases desconocidas fueron descartadas para el posterior análisis. Después del filtrado, se realizó un mapeo genómico de las secuencias utilizando HISAT2 (“Hierarchical Indexing for Spliced Alignment of Transcripts”), cada muestra supuso 4,52 Gb de datos y el mapeo del genoma fue del 92,76% de media.

Después del mapeo, se utilizó la herramienta StringTie para reconstruir los transcriptos, los nuevos transcriptos fueron identificados usando la herramienta de Cufflinks, Cuffcompare. Se predijo la capacidad codificante de los transcriptos usando Coding Potential Calculator. En total se identificaron más de 16000 transcriptos [228,229].

GATK (Broad Institute, Inc, Boston, MA, USA) se usó para identificar polimorfismos de un nucleótido (SNP) e INDEL para cada muestra. Se detectaron las diferencias en splicing de los genes usando la herramienta RMATS. Después de la detección de estos nuevos transcriptos, los nuevos transcriptos codificantes fueron mezclados con los transcriptos de referencia para obtener una completa referencia, después las lecturas filtradas fueron mapeadas usando Bowtie2. Por último, los niveles de expresión génica para cada muestra se calcularon con RSEM. Los archivos completos fueron depositados en la base de datos GEO (Número de acceso GSE185515) [230–232].

Materiales y métodos

IV.2.3 Retrotranscripción del RNA.

- Reactivos:
 - Kit comercial Prime ScriptTM Reagent (Perfect Real Time) (Takara, Kusatsu, prefectura de Shiga, Japón)
 - Agua libre de RNAsas (DEPC)
- Procedimiento:

Utilizando el protocolo del fabricante se realizó la retrotranscripción del RNA o síntesis de cDNA, necesario para las posteriores amplificaciones. Se llevaron 500 ng de RNA a un volumen de 6,5 μ l, completando con agua DEPC y se añadió 3,5 μ l de la mezcla de retrotranscripción compuesta por primers random, primers oligo dT, enzima retrotranscriptasa y tampón 5X en proporción 1:1:1:4. Se centrifugó brevemente y se incubó a 37 °C durante 15 minutos seguido de 5 segundos a 85 °C.

IV.2.4 PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR).

- Reactivos:
 - PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix (Thermo Fisher Scientific, #A25779)
 - Agua libre de DNAsas
 - Cebadores o primers [5 μ M] (Thermo Fisher Scientific)
 - Placas de 96 pocillos MicroAmp™ Optical (Thermo Fisher Scientific, #N8010560)
- Procedimiento:

La qPCR es una técnica capaz de medir la amplificación de un fragmento DNA específico mientras se desarrolla la reacción, en comparación con la PCR tradicional, en la que solo se permite valorar a tiempo final la presencia o ausencia del fragmento amplificado 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 nuestro caso SYBR™ Green.

SYBR™ Green es un agente intercalante que al introducirse en la estructura secundaria de la doble hélice de DNA es capaz de emitir una señal fluorescente a 520 nm cuando se excita a 497 nm. Esta señal es proporcional al número de copias generadas por la PCR, para ello el equipo va realizando mediciones de dicha fluorescencia en cada ciclo.

Para llevar a cabo la qPCR se realizaron 40 ciclos de amplificación en el termociclador, que constaban de las siguientes etapas: desnaturación 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, añadiendo 2 μ l de cDNA diluido 1/8 - 1/32, 6,25 μ l de SYBR™ Green, el volumen de cebador [5 μ M] necesario para su concentración óptima, completando con agua libre de DNAsas.

IV.2.5 Diseño de cebadores y optimización.

Para el diseño de primers, se siguió las recomendaciones del apartado IV.2.5. Se intentó que los cebadores hibridasen en exones diferentes, para evitar la amplificación de una potencial contaminación de DNA genómico.

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

Materiales y métodos

la dilución de trabajo óptima en cada caso. Las secuencias de oligonucleótidos utilizadas se indican en el apartado de resultados según las normas MIQE [233].

IV.2.6 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 (*Pipb*), ya que es un gen muy estable en hígado, como se ha podido comprobar en estudios precedentes de nuestro grupo de investigación. La cantidad relativa de todos los mRNAs se expresó en relación con la expresión del gen de referencia mediante la ecuación $2^{-\Delta\Delta Ct}$ [234,235].

IV.3 Determinaciones plasmáticas.

IV.3.1 Determinación colorimétrica de glucosa.

- Reactivos:
 - Kit para la determinación de glucosa (BioSystem #11503).
 - Placas de 96 pocillos de poliestireno (Sarsted #82.1581).
 - Agua miliQ autoclavada (ADDE).
 - Lector de placas SPECTROstar Nano (BMG Labtech; Ortenberg, Alemania).
- Procedimiento:

Se tomaron 2 µl de suero por duplicado de cada animal, 2 µl del calibrador por triplicado y 2 µl de agua por duplicado como blanco. Se añadieron 100 µl del reactivo a cada uno de ellos y tras incubar 10 minutos se leyó la absorbancia a 485 nm.

IV.3.2 Determinación colorimétrica de colesterol total.

- Reactivos:
 - Kit Infinity™ Cholesterol (Thermo Fisher Scientific #TR13421).
 - Placas de 96 pocillos de poliestireno (Sarsted #82.1581).
 - Agua miliQ autoclavada (ADDE).
 - Lector de placas SPECTROstar Nano (BMG Labtech).
- Procedimiento:

Se tomaron 2 µl de suero por duplicado de cada animal, 2 µl del calibrador por triplicado y 2 µl de agua por duplicado como blanco. Se añadieron 100 µl del reactivo a cada uno de ellos y tras incubar 10 minutos se leyó la absorbancia a 485 nm.

IV.3.3 Determinación colorimétrica de triglicéridos.

- Reactivos:
 - Kit Infinity™ Triglycerides (Thermo Fisher Scientific #TR22421).
 - Glicerol (Sigma-Aldrich).
 - Placas de 96 pocillos de poliestireno (Sarsted #82.1581).
 - Agua miliQ autoclavada (ADDE).
 - Lector de placas SPECTROstar Nano (BMG Labtech).

Materiales y métodos

- Procedimiento:

Se preparó una recta de calibrado con glicerol por duplicado en el rango de concentraciones de 0,1 a 3 mM. Se tomaron 2 µl de suero de cada animal, 2 µl de los cinco puntos de la recta y 2 µl de agua como blanco, todos por duplicados. Se añadieron 100 µl del reactivo a cada uno de ellos y tras incubar 10 minutos se leyó la absorbancia a 485 nm. Se calculó una recta de regresión que debería tener un $R^2 > 0.97$ con la recta de calibrado y se calculó su ecuación de regresión. Sobre esta ecuación de regresión se calcularon los valores de los triglicéridos.

IV.3.4 Determinación colorimétrica de cuerpos cetónicos.

- Reactivos:

- Kit para la determinación de los cuerpos cetónicos (FujiFilm #415-73301, #411-73401).
- Calibrador de cuerpos cetónicos (FujiFilm #418-73891).
- Placas de 96 pocillos de poliestireno (Sarsted #82.1581).
- Agua miliQ autoclavada (ADDE).
- Lector de placas SPECTROstar Nano (BMG Labtech).

- Procedimiento:

Se tomaron 2 µl de suero por duplicado de cada animal, 2 µl del calibrador por triplicado y 2 µl de agua por duplicado como blanco. Se añadieron 150 µl del reactivo 1 y tras incubar 3 minutos se añadieron 50 µl del reactivo 2. Se leyó inmediatamente la absorbancia a una longitud de 405 nm cada 30 segundos durante 5 minutos.

IV.3.5 Determinación colorimétrica de ácidos grasos no esterificados (NEFA).

- Reactivos:

- Kit determinación de NEFA compuesto de Reactivo 1 y 2 (FujiFilm; Madrid, España, #91797 #91898)
- Estándar NEFA 1 mM (FujiFilm #270-77000)
- Placas de 96 pocillos de poliestireno (Sarsted #82.1581)
- Agua miliQ autoclavada (ADDE)
- Lector de placas SPECTROstar Nano (BMG Labtech)

- Procedimiento:

Se tomaron 5 µl de suero por duplicado de cada animal, 5 µl del calibrador por triplicado y 5 µl de agua por duplicado como blanco. Se añadieron 100 µl del reactivo 1 y tras incubar 3 minutos se añadieron 50 µl del reactivo 2. Despues de incubar 5 minutos se leyó la absorbancia a una longitud de onda principal de 546 nm y una secundaria de 660 nm.

IV.3.6 Separación de lipoproteínas mediante cromatografía en fase líquida.

- Reactivos:

- Columna cromatográfica Superose 6B (Sigma-Aldrich).
- Tampón PBS: NaCl 136 mM, KCl 0,2 g/l, Na₂HPO₄ 1,44 g/l y KH₂PO₄ 0,24 g/l, pH 7,4 (Sigma-Aldrich).
- Azida sódica (Sigma-Aldrich).

Materiales y métodos

- Procedimiento:

La cromatografía en fase líquida consiste en separar una muestra, en este caso plasma, por su interacción con una matriz cuando el fluido de arrastre es un líquido. La matriz Superose 6B está formada por esferas porosas de pequeño tamaño que constituyen un polímero entrecruzado de agarosa que permite un rango de separación óptimo de $5 \cdot 10^3$ - $5 \cdot 10^6$ Da de peso molecular. Las proteínas de mayor tamaño son retenidas menos tiempo, mientras que las de menor peso molecular son eluidas más tarde.

Durante tiempos prolongados de inactividad, la columna se mantiene en PBS pH 7,4 con azida sódica al 0,1% para evitar el crecimiento de microorganismos. Antes de trabajar con ella se lavó 1 hora a un flujo de 0,3 ml/min con PBS.

Se realizaron *pooles* por grupo de 50 µl de plasma junto con 50 µl de PBS, y se cargaron en el *loop* del sistema usando una jeringa Hamilton. Se usó un programa que utiliza un flujo de 0,3 ml/min, descartando los primeros 5 minutos de elución, y separando el resto en 48 fracciones de 0,5 ml.

El programa realiza una medida espectofotométrica a una longitud de onda de 280 nm, permitiendo detectar las lipoproteínas eluidas, obteniéndose un cromatograma. Con estas fracciones se realizaron los siguientes experimentos.

IV.3.6.1 Determinación del colesterol total y no esterificado.

- Reactivos:

- Agua ADDE.
- Reactivo Amplex Red 0,1 mg/ml (Tebu-bio #C291) disuelto en DMSO (Sigma-Aldrich #D8418).
- Peroxidasa de rábano 200 U/ml (Sigma-Aldrich #P8375) disuelta en glicerol al 50% (Sigma-Aldrich).
- 5X tampón de reacción: fosfato potásico 0,5 M pH 7,4, cloruro sódico 0,25 M, ácido cólico 25 mM, Triton X-100 al 0,5% (Sigma-Aldrich # T8787).
- Colesterol oxidasa 200 U/ml (Sigma-Aldrich #228250) disuelta en tampón potásico 50 mM pH 7.
- Colesterol esterasa 200 U/ml (Sigma-Aldrich #C1403) disuelta en tampón de reacción.
- Estándar de colesterol 100 mg/dl (ByoSystems #11805).
- Lector de placas Spectrostar OMEGA (BMG Labtech).

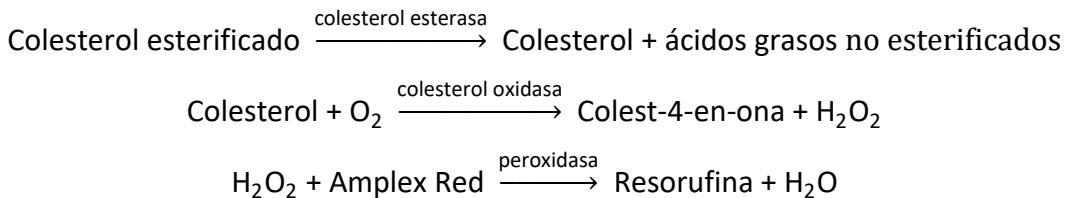
- Procedimiento:

Se preparó una recta patrón de colesterol en un rango de 0,625 a 20 µM. Se utilizó estándar de colesterol 100 mg/dl para preparar una solución de 20 µM de colesterol en PBS, y se realizan 5 diluciones seriadas a la mitad para completar la recta.

La mezcla de reacción contenía tampón de reacción, Amplex Red 0,01 mg/ml, peroxidasa 2 U/ml, colesterol oxidasa 2 U/ml, colesterol esterasa 0,2 U/ml. Se cargaron 50 µl de la recta por duplicado, del blanco (PBS) y de las fracciones en una placa de 96 pocillos. Se incubaron 10 minutos a 37 °C para que se completasen las reacciones enzimáticas descritas abajo y se midió la fluorescencia de la resorufina con una excitación de 550 nm y 590 nm para la emisión.

Para medir el colesterol no esterificado no se añadió colesterol oxidasa, de forma que toda la fluorescencia medida correspondería a colesterol libre, siendo estas las reacciones:

Materiales y métodos

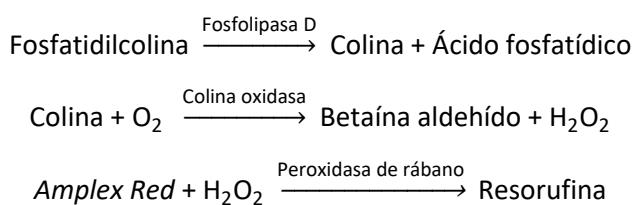


IV.3.6.2 Determinación de la fosfatidil colina.

- Reactivos:
 - Agua ADDE.
 - Reactivo Amplex Red 1 mg/ml (Tebu-bio, Barcelona, Spain #C291) disuelto en DMSO (Sigma-Aldrich #D8418).
 - Peroxidasa de rábano 200 U/ml (Sigma-Aldrich #P8375) disuelta en glicerol 50% (Sigma-Aldrich).
 - 5X tampón de reacción: Tris/HCl 0,25 M, CaCl₂ 250 mM, pH 8 (Sigma-Aldrich).
 - Fosfolipasa D 5.000 U/ml (Sigma-Aldrich # P0065) .
 - Colina oxidasa 50 U/ml (Sigma-Aldrich # C5896) disuelta en glicerol 50% (Sigma-Aldrich).
 - Cloruro de colina (Sigma-Aldrich)
 - Placas de 96 pocillos de poliestireno (Sarstedt #82.1581).
 - Lector de placas Spectrostar OMEGA (BMG Labtech)
- Procedimiento:

Se preparó una recta patrón de colina en un rango de 0,625 a 20 µM. Se preparó una recta de calibrado utilizando cloruro de colina, preparando una solución 20 µM de colina en PBS, y se realizaron 5 diluciones seriadas a la mitad para completar la recta.

La mezcla de reacción contenía tampón de reacción, Amplex Red 0,01 mg/ml, peroxidasa 2 U/ml, colina oxidasa 0,5 U/ml, fosfolipasa D 0,5 U/ml. Se cargaron 50 µl de la recta por duplicado, del blanco (PBS) y de las fracciones en una placa de 96 pocillos. Se incubaron 10 minutos a 37 °C para que se completasen las reacciones enzimáticas descritas abajo y se midió la fluorescencia de la resorufina con una excitación de 550 nm y 590 nm para la emisión. Las reacciones son las siguientes:



IV.3.6.3 Ensayo de las especies reactivas de oxígeno (ROS) de las lipoproteínas.

- Reactivos:
 - Tampón PBS (pH 7,4).
 - Azida sódica (Sigma-Aldrich).
 - Diacetato 2-7 diclorofluoresceína (DCFH-DA) (Sigma-Aldrich, # D6883) 2 mg/ml disuelta en metanol (Panreac).
 - Placas de 96 pocillos de poliestireno (Sarstedt #82.1581).

Materiales y métodos

- Lector de placas Spectrostar OMEGA (BMG Labtech)
- Procedimiento:

La molécula de DCFH-DA es una molécula ampliamente utilizada para estimar las especies reactivas de oxígeno (ROS). En presencia de ROS se oxida al compuesto fluorescente DCF, lo que permite cuantificar las diferencias entre las lipoproteínas.

Se utilizaron 0,2 µg de colesterol de las fracciones que comprenden las diferentes lipoproteínas y se completaron hasta 180 µl de PBS, siendo el control PBS únicamente. Se añadieron 20 µl de PBS con azida al 1% y DCFH-DA (1%) para que la reacción comience simultáneamente. Se incubaron 1 hora a 37 °C y se midieron con una longitud de onda de excitación de 485 nm y una emisión de 535 nm.

IV.3.7 Determinación de la actividad paraoxonasa 1.

- Reactivos:
 - Cloruro cálcico (0,9 mM)
 - Fenilacetato 1 mM ($P_m = 136,15$, $d=1,077$ g/ ml)
 - Tampón Tris HCl 20 mM pH 8
 - Lector de placas SPECTROstar Nano (BMG Labtech)
- Procedimiento:

Para la determinación de la actividad esterásica de la PON1 en una cubeta estrecha de cuarzo, se mezclaron por inversión 800 µl de la mezcla de reacción atemperada a 37 °C y 2 µl de suero. Se colocó rápidamente la cubeta en un espectrofotómetro termostatizado a 37 °C. Se dejó atemperar durante 30 segundos y se midió la variación de absorbancia a 270 nm durante 90 segundos, repitiendo las medidas por triplicado.

Se realizaron dos ensayos para controlar el ruido del proceso. En uno de ellos se puso el suero sin sustrato y en el otro el sustrato sin suero (la hidrólisis no enzimática del fenilacetato). En ambos ensayos, la variación fue despreciable comparada con el valor obtenido en presencia de suero y de sustrato.

Para el cálculo en unidades internacional el $\Delta A/min \times 305343,51$ permitió expresar la variación de absorbancia en UI/ L de suero que equivalen a 1 µmol de fenilacetato hidrolizado por minuto en las condiciones de ensayo ($\epsilon = 1310 M^{-1}.cm^{-1}$).

IV.3.7 Determinación de la actividad PAF-AH.

- Reactivos:
 - PAF acetylhydrolase assay kit (#760901, Cayman Chemical, Ann Arbor, USA).
 - Lector de placas SPECTROstar Nano (BMG Labtech; Ortenberg, Alemania).
- Procedimiento:

Para la determinación de la actividad hidrolásica de la PAF-AH se incubaron 2 µl de suero junto con 5 µl del tampón, 10 µl de DTNB y 200 µl de sustrato atemperado, proporcionados por el kit en cada pocillo de una placa de 96, repitiendo cada medida por triplicado. Se incubó durante 2 minutos a 37 °C y se midió la variación de absorbancia a 412 nm durante 90 segundos.

Se realizaron dos ensayos para controlar el ruido del proceso. En uno de ellos se puso el suero sin sustrato y en el otro el sustrato sin suero de la misma forma que en el apartado IV.3.7.). En ambos ensayos, la variación fue despreciable comparada con el valor obtenido en presencia de suero y de sustrato.

Materiales y métodos

Para el cálculo en unidades internacional el $\Delta A/\text{min} \times 10553$ permitió expresar la variación de absorbancia en UI/ L de suero que equivalen a 1 μmol de DTNB hidrolizado por minuto en las condiciones de ensayo ($\epsilon = 13600 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

IV.3.7 Determinación del malonildialdehído (MDA).

- Reactivos:
 - Lipid Peroxidation (MDA) Assay Kit (#MAK085, Sigma-Aldrich).
 - Ácido sulfúrico (Panreac).
 - Ácido acético glacial (Panreac).
 - Ácido perclórico (Panreac).
 - 1-Butanol (Panreac).
 - Lector de placas SPECTROstar Nano (BMG Labtech).
- Procedimiento:

La peroxidación lipídica es la degradación de lípidos que ocurre como resultado del daño oxidativo y por ello, se usa como marcador de estrés oxidativo. Los lípidos poliinsaturados son susceptibles de un ataque oxidativo, cuyo resultado es una cadena de reacciones que termina en productos como el malonildialdehído (MDA). Este kit determina la concentración de MDA mediante la reacción con el ácido tiobarbitúrico para formar un producto que puede ser determinado fluorimétricamente.

Siguiendo el protocolo del kit, se ajustaron los volúmenes a 5 μl de suero, para el cual se añadieron 125 μl de ácido sulfúrico 42 mM junto con 31,25 μl de ácido fosfotungstico. Se mezcló la muestra y se dejó incubar 5 minutos a temperatura ambiente para posteriormente centrifugar 3 minutos a 13.000g. El pellet se resuspendió con 50 μl de butilhidroxitolueno (BHT).

Para formar el aducto MDA-TBA se añadieron 150 μl de TBA y se incubaron 60 minutos a 95 °C. Se enfriaron en hielo 10 minutos y se añadieron 100 μl de 1-butanol y 33 μl de NaCl 5 M. Se mezcló y centrifugó a 16.000g durante 3 minutos, quedándose la fase superior que se midió fluorimétricamente con una longitud de onda de excitación de 532 nm y una emisión de 553 nm. Se calcularon los resultados extrapolando en la recta de calibrado generada entre 0 y 2 nmol. Las determinaciones se efectuaron por duplicado.

IV.4 Estudio histológico y determinaciones analíticas del hígado.

El análisis histológico se realizó con las muestras de hígado conservadas en paraformaldehído al 4%. Pasadas al menos 48 horas en paraformaldehído se incluyeron en parafina siguiendo la técnica convencional, siguiendo un proceso de deshidratación gradual con alcoholos, aclaramiento mediante sumersión en xileno y finalmente inclusión en parafina utilizando un inclusor automático. Se separaron los bloques de parafina, realizándose cortes histológicos de 4 μm de espesor que fueron desparafinados mediante aplicación de calor durante 30 minutos a 60 °C, precedido de dos lavados de cinco minutos en un baño de xileno. Se transfirieron los cortes para su hidratación durante tres minutos a temperatura ambiente en: etanol al 100% dos veces; etanol 95%, 90%, 85%, 70%, 50% y 30%; y finalmente dos lavados en agua destilada.

Materiales y métodos

IV.4.1 Tinción de 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) de acuerdo con un protocolo estándar. 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 el área de las gotas lipídicas. El resultado se expresó como porcentaje del área de la sección ocupada por las gotas lipídicas [236].

IV.4.2 Extracción de lípidos hepáticos.

- Reactivos:
 - Tampón PBS 7,4.
 - Homogeneizador mecánico Mini-Beadbeater 16 (BioSpec Products).
 - Bolas de zirconio/sílice 2,3 mm (BioSpec, # 6380060).
 - Cloroformo: metanol en proporción 2:1 (Panreac).
 - Isopropanol (Panreac).
 - 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 siguiendo el apartado IV.2.1 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 500g durante 5 minutos siguiendo el método de Folch [237].

Tras la centrifugación, en la fase inferior orgánica, se encontraban los lípidos solubilizados, los cuales se recogieron con pipeta Pasteur y se transfirieron a otro tubo de vidrio. Se repitió 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 100 µl de isopropanol. Con los extractos lipídicos disueltos en isopropanol se determinaron los triglicéridos y el colesterol siguiendo el apartado IV.3.2 y IV.3.3.

IV.4.3 Determinación de escualeno hepático por CG-MS.

- Reactivos:
 - Tampón PBS 7,4.
 - Homogeneizador mecánico Mini-Beadbeater 16 (BioSpec Products).
 - Bolas de zirconio/sílice 2,3 mm (BioSpec, # 6380060).
 - Cliclohexano (Panreac).
 - Diclorometano (Panreac).
 - 5- α -colestano (Sigma-Aldrich).
 - Sílica Gel G/UV₂₅₄ (figuray-Nagel; Düren, Alemania)
 - Viales de vidrio de 2 ml para CG-MS (Agilent; Santa Clara, California, USA).
- Procedimiento:

Materiales y métodos

Para este procedimiento todos los reactivos usados fueron de calidad para cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS). Se recogió 100 mg de tejido, homogeneizándose en 1 ml de PBS siguiendo el protocolo del apartado IV.2.1. Se pasaron las muestras a tubos de vidrio y se añadieron a las muestras 9 µl de 5- α -colestano (20 mM) diluido en diclorometano como control interno del rendimiento de la extracción. Se añadió 1,5 ml de ciclohexano y se mezcló la muestra durante 5 segundos para posteriormente centrifugar durante 10 minutos a 2200g, la fase orgánica fue transferida a un nuevo tuvo. Este proceso se repitió con 1,5 ml de ciclohexano para mejorar la eficiencia de la extracción. Se añadió 200 mg de sílica y se volvió a centrifugar, en este paso eliminaremos otros lípidos y fosfolípidos, consiguiendo un perfil cromatográfico más limpio. Se pasó 1,5 ml del sobrenadante a un vial de vidrio de 2 ml de Agilent [203].

El análisis por CG-MS fue realizado en Instituto Agroambiental de Zaragoza, utilizando el equipo de Agilent formado por un cromatógrafo de gas 6890, un inyector 7638B, la unidad de adquisición de parámetros de espectrometría de masas 5975B usando una columna J&W122-5532 con una longitud nominal de 30 metros, un diámetro de 0,25 mm y un flujo de helio de 1 ml/min. La identificación de los picos fue hecha por los tiempos de retención del escualeno y el 5- α -colestano (9,8 y 11,3 min, respectivamente) y por su ión masa específico (m/z de 69,1 y 217,2, respectivamente). Se usó una recta de calibración con concentraciones variables de escualeno entre 0 y 1 mM con una concentración fija de 50 µM de 5- α -colestano. Para la realización de los cálculos se normalizó con el contenido de 5- α -colestano.

IV.4.4 Determinación de las gotas lipídicas en cultivo celular.

- Reactivos:
 - Medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) con glucosa (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).
 - Medio de cultivo Hams-F12 (Thermo Fisher Scientific).
 - Penicilina-estreptomicina (100X) (Thermo Fisher Scientific).
 - Aminoácidos no esenciales (100X) (Thermo Fisher Scientific).
 - Dexametasona (Sigma-Aldrich).
 - ITS (100X) (Insulina, transferrina y selenio) (Thermo Fisher Scientific).
 - Formaldehído al 16% (Panreac).
 - Isopropanol (Panreac).
 - Colorante Nile Red (Thermo Fisher Scientific).
 - Colorante Hoechst 33342 (Thermo Fisher Scientific).
 - Material de cultivo celular estéril (Sarstedt).
- Procedimiento:

Usando la línea celular AML12, sembrando 2000 células por pocillo en una placa de 24 pocillos, se cultivaron 2 días en un medio de ayuno formado por medio DMEM sin glucosa y Hams F12 en proporción 1:1, suplementado con penicilina al 1%, estreptomicina al 1%, aminoácidos no esenciales al 1%, ITS al 1% y dexametasona a 40 ng/ml. Se trataron las células con escualeno 30 µM vehiculado en las nanopartículas PLGA preparadas por el grupo del Profesor Manuel Arruebo del Instituto de Nanociencia de Aragón utilizando un medio formado por DMEM y Hams F12 en proporción 1:1, suplementado con penicilina al 1%, estreptomicina al 1%, aminoácidos no esenciales al 1%, ITS al 1% y dexametasona a 40 ng/ml.

Pasados los tres días las células se lavaron dos veces con PBS, se añadió sobre el pocillo formaldehído al 4% disuelto en PBS para fijar las células durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se lavaron las células con isopropanol 60 % en PBS 5 veces y posteriormente se

Materiales y métodos

añadieron el colorante rojo Nile Red al 1 %, específico de lípidos y el colorante azul Hoesch a 1 µg/ml, específico de DNA y núcleos. Se lavó la muestra 5 veces con PBS y se realizó la captura de las imágenes con el microscopio de fluorescencia Floid Cell Imaging System con una longitud de excitación de 552 nm y emisión de 636 nm

IV.5 Detección de proteínas.

IV.5.1 Extracción y cuantificación de proteínas.

- Reactivos:
 - Reactivo Bradford (Bio-Rad, # 5000006).
 - Tampón PBS 7,4.
 - Tampón con urea 8 M/tiourea 2 M a pH 9 (Sigma-Aldrich).
 - Inhibidor de proteasas cComplete™ Protease Inhibitor Cocktail (Sigma-Aldrich # 11697498001).
 - Albúmina sérica bovina (BSA) (Sigma-Aldrich # A7030).
 - Lector de placas SPECTROstar Nano (BMG Labtech).
- Procedimiento:

Se homogeneizaron 50 mg de tejido en 1 ml de tampón con urea 8 M/tiourea 2 M a pH 9 con inhibidores de proteasas y en el caso de tejido hepático se homogeneizó siguiendo el apartado IV.2.1. La cuantificación de proteínas se realizó mediante la técnica de Bradford, que consiste en cambio de coloración del Azul Brillante de Coomassie cuando interacciona con los aminoácidos aromáticos y los residuos de arginina [238].

Se preparó una recta de calibrado con albúmina con un rango de 0 a 1200 µg/ml. Se añadieron 2 µl de las diferentes muestras a la dilución oportuna por duplicado, la recta y agua como blanco en triplicados. Se añadieron 100 µl del reactivo Bradford diluido 1/5 y tras incubar 10 minutos se leyó la absorbancia a 595 nm con el lector de placas Spectrostar Nano.

Se verificó que la recta de regresión tenía un $R^2 > 0.97$ con la recta de calibrado y se calculó su ecuación de regresión. Sobre esta ecuación de regresión se extrapolaron los valores de proteínas.

IV.5.2 Fraccionamiento de gotas lipídicas.

- Reactivos:
 - Tampón PBS 7,4.
 - Inhibidor de proteasas cComplete™ Protease Inhibitor Cocktail (Sigma-Aldrich).
 - Sacarosa (Sigma-Aldrich).
 - Acetona (Panreac).
 - Dietil éter (Panreac).
 - Triton X-100 (Sigma-Aldrich).
 - Glicerol (Sigma-Aldrich).
 - Agua destilada desionizada y estéril (ADDE).
- Procedimiento:

Para el fraccionamiento celular se siguió el protocolo de Ontko, se hicieron *pooles* de 200 mg con dos animales y se homogeneizaron en 3 ml de sacarosa al 65% con inhibidor de proteasas a 4 °C. Se homogeneizó la muestra físicamente con el *potter* y se añadieron gradientes discontinuos de sacarosa antes de centrifugar. Se colocó el homogeneizado en el fondo y se

Materiales y métodos

añadieron cuidadosamente 2 ml de sacarosa al 60%, seguido de 2 ml sacarosa al 52%, 2 ml de sacarosa al 44% y por último 2 ml de agua destilada. Se centrifugaron a 25.000g durante 30 minutos a 4 °C y se recogieron las muestras en la banda del agua destilada. Se repitió el proceso añadiendo agua destilada. Se guardó una alícuota para hacer mediciones bioquímicas y el resto se mezcló con 3 volúmenes de acetona a -80 °C durante 10 minutos y a -20 °C durante toda la noche.

Los tubos con acetona se utilizaron para purificar las proteínas de las gotas lipídicas, para ello centrifugaron los tubos 15.000g durante 15 minutos a 4 °C. Se lavaron los pellets 3 veces, primero con acetona: dietil éter 1:1 y dos veces con dietil éter. Se secaron los pellets y se disolvieron en PBS con Triton X-100 al 0,2% y 10% de glicerol, y se centrifugaron a 15.000g durante 10 minutos para eliminar las proteínas insolubles.

IV.5.3 Proteómica por espectrometría de masas

Después de la extracción y cuantificación proteica, se enviaron aproximadamente 150 µl al servicio de proteómica de la Universidad Complutense de Madrid (Madrid, España)

IV.5.3.1 Preparación de la muestra

Las muestras se secaron hasta aproximadamente 40 µl. Todo el volumen de cada una de las muestras se cargó en un gel concentrador para su limpieza antes de la digestión. El gel concentrador es un gel SDS-PAGE discontinuo con una porción mayor de gel concentrador al 4% seguida de gel separador al 10% (descrito en el apartado IV.5.4.1). La electroforesis se paró cuando el frente estaba a unos 3 mm del comienzo del gel separador. La banda correspondiente a las proteínas sin separar, de cada una de las muestras, se visualizó con tinción de Coomassie coloidal (G-250) y se recortaron para su posterior digestión en gel.

Las bandas de las proteínas se cortaron del gel y se incubaron en el tampón reductor con ditiotreitol 10 mM a 56 °C durante 30 min y alcalinizadas en un tampón de iodocetamida 25 mM durante 20 min. Por último las proteínas fueron digeridas con tripsina recombinante (ratio enzima: proteína 1: 50) en un tampón de bicarbonato amónico (pH 8,5) toda la noche a 37 °C. Los péptidos fueron extraídos en dos pasos, incubando las partes del gel en tampón acetonitrilo (ACN) al 80%, trifluoroacético al 0,1% durante 30 minutos para terminar la extracción en acetonitrilo. Los extractos de las partes de los geles se combinaron, secaron y disolvieron en acetonitrilo al 2%, ácido fórmico al 0,1% y congeladas hasta el posterior análisis.

IV.5.3.2 Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas.

Los péptidos fueron analizados por nano-cromatografía líquida (nano Easy-nLC 1000, Thermo Scientific) acoplada a un espectrómetro de masas de alta resolución Q-Exactive HF (Thermo Scientific, Bremen, Germany). Los péptidos fueron concentrados "on-line" por cromatografía de fase reversa (RP) usando una precolumna Acclaim PepMap 100 (Thermo Scientific) 20 mm x 75 µm ID, C18 de 3 µm diámetro de partícula y 100 Å de tamaño de poro y entonces separados en una columna C18 PicoFrit (Thermo Scientific Easy Spray Column, PepMap RSLC C18n de 500 mm x 75 µm ID, 2 µm de diámetro de partícula, 100 Å de tamaño de poro) con punta integrada para spray, operando a un flujo de 250 nL/min. Los péptidos se eluyeron utilizando un gradiente desde el 2% hasta el 35% de tampón B en 150 min y de 35 hasta 45% de tampón B en 10 minutos más. (Tampón A: 0,1% AF en ACN)

El nano-HPLC está acoplado on-line a la fuente Easy nanoelectrospray del espectrómetro de masas Q-exactive HF con el que se analizaron los péptidos. La entrada de los péptidos se realizó por ionización con *electrospray* utilizando la punta integrada en la columna analítica. La

Materiales y métodos

adquisición de datos se realizó con un voltaje de 1.8 Kv para el electrospay y el “*ion transfer tuve*” que guía los iones desde el spray hasta el interior del espectrómetro de masas tenía una temperatura de 290 °C. Se utilizó un método *Shotgun* dependiente de la información (DDA, Data-dependent acquisition) para detectar los péptidos presentes en las muestras.

IV.5.3.3 Identificación de proteínas

Los datos adquiridos se analizaron a través del software Proteome Discoverer 2.4 (Thermo Scientific) que utiliza el motor de búsqueda Mascot 2.6. Los espectros MS/MS identifican un péptido por comparación, usando determinados parámetros de búsqueda, con la masa y secuencia de los péptidos tripticos resultantes de la digestión in silico de las proteínas anotadas en las bases de datos, siempre que las coincidencias superen un umbral establecido de probabilidad. Cada espectro que identifica un péptido se denomina PSM (Peptide-Spectrum Match). Los péptidos así identificados se asignan a la proteína en la que alcanzan mayor puntuación. Cuando un péptido se puede asignar a varias proteínas, el software utiliza un algoritmo basado en el principio de parsimonia para agrupar estas proteínas y elegir la proteína representante del grupo o “Master”, para la que se reportan los resultados

IV.5.3.3.1 Parámetros de búsqueda.

Se han utilizado las bases de datos UP-Mouse (55366 sequence) con el proteoma de referencia de Mus musculus (Strain C57BL/6J) descargado de Uniprot (www.Uniprot.org) y la base de datos contaminantes (247 sequences) que incluye los contaminantes más habituales. Los parámetros empleados en las búsquedas de Mascot para identificar péptidos fueron: tolerancia del péptido precursor de 10 ppm, tolerancia del fragmento de 0,02 Da, hasta 2 puntos de corte perdidos permitidos para la tripsina, carbamidometil cisteína como modificación fija y oxidación de metionina, pérdida de la metionina, o pérdida de la metionina más acetilación del extremo amino terminal como modificaciones variables.

Las puntuaciones o scores resultantes de Mascot fueron ajustados por el algoritmo percolador, que consigue discriminar mejor entre las identificaciones correctas e incorrectas de los péptidos.

IV.5.3.3.2 Criterios de identificación.

Se consideran proteínas correctamente identificadas aquellas que están por debajo de un False Discovery Rate (FDR) del 1% y tienen al menos 1 péptido único identificado con un intervalo de confianza (CI) que supera el 99%, esto es que la probabilidad de que el péptido identificado se deba al azar es menor del 1% (q value< 0.01).

IV.5.3.4 Cuantificación de proteínas basada en la abundancia de espectros usando NSAF (Normalized Spectral Abundance Factor).

La aproximación para cuantificación relativa de proteínas basada en la estimación del índice NSAF permite comparar la abundancia de una proteína en diferentes muestras en función del número de espectros que se le asignan a dicha proteína para identificarla [239].

IV.5.4 Detección inmunoespecífica.

IV.5.4.1 Western-Blot.

Esta técnica analítica es usada para la detección de proteínas específicas, previa separación por tamaño, mediante el uso de anticuerpos marcados conjugados directa o indirectamente [240].

Materiales y métodos

IV.5.4.1.1 Electroforesis desnaturizante para separación de proteínas.

- Reactivos:
 - Solución de acrilamida al 30%: Acrilamida 29,2% (Sigma-Aldrich) y bisacrilamida 0,8% (Sigma-Aldrich).
 - Tampón del gel Inferior de glicina, Tris/HCl (pH 8,8) 1,39 mM, EDTA 8 mM y SDS (sodio dodecil sulfato) al 0,4%.
 - Tampón del gel superior de glicina, Tris/HCl (pH 6,8) 0,45 M, EDTA 8 mM y SDS al 0,4%.
 - Tampón del gel de tricina Tris/HCl 3 M y SDS al 0,3%, (pH 8,45).
 - APS 10%: Solución de persulfato amónico al 10% y (Sigma-Aldrich).
 - TEMED (N,N,N,N'-tetrametilnediamina) (Sigma-Aldrich).
 - Tampón de carga, Tris/HCl (pH 6,8) 45 mM, EDTA 0,8 mM, glicerol al 10% (v/v), β-mercапto etanol (v/v) al 5%, Azul de bromofenol al 0,004% y SDS al 3%.
 - Marcador de peso molecular (Biorad, #1610374).
 - Isopropanol (Panreac).
 - Agua destilada desionizada y estéril (ADDE).
 - Tampón de electroforesis glicina, Tris/HCl (pH 8,3) 25 mM, glicina 192 mM y SDS al 0,1%.
 - Tampón de electroforesis tricina del ánodo Tris/HCl 2 M.
 - Tampón de electroforesis tricina del cátodo Tris 1 M, Tricina 1 M y SDS al 1%).
- Procedimiento:

La electroforesis es una técnica que permite diferenciar moléculas en función de su tamaño y carga, en este caso proteínas sobre un gel de poliacrilamida con SDS. La resistencia que ofrecerá el gel dependerá del porcentaje de acrilamida 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, a más porcentaje, mayor resistencia.

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 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 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 tampón de electroforesis, y el segundo por la presencia de tricina en su tampón de electroforesis y la adición de glicerol en los geles. Los geles de tricina se utilizan para proteínas de peso molecular inferior a 30 kDa como es el caso de la proteína SAA.

Se prepararon los geles utilizando 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 añadió el gel inferior según la tabla 5 y 6 para los geles de glicina y tricina respectivamente, y se añadió isopropanol para favorecer su polimerización y evitar el secado. Pasada 1 hora, se retiró el isopropanol y se añadió el gel superior o concentrador, introduciendo el peine del tamaño adecuado inmediatamente después para crear los pocillos sobre los que cargaremos las muestras.

Materiales y métodos

Tabla 5: Componentes y volúmenes para la preparación de un gel SDS de glicina.

	Gel inferior 8%	Gel inferior 12%	Gel inferior 16%	Gel superior
Acrilamida 30%	1,25 ml	1,95 ml	2,5 ml	333 µl
Tampón del gel	1,25 ml	1,25 ml	1,25 ml	500 µl
Agua	2,5 ml	1,8 ml	1,25 ml	1,2 ml
TEMED	4 µl	4 µl	4 µl	7 µl
APS (10 %)	34 µl	34 µl	34 µl	20 µl

Tabla 6: Componentes y volúmenes para la preparación de un gel SDS de tricina.

	Gel inferior	Gel superior
Acrilamida 30%	4 ml	333 µl
Tampón del gel	2,5 ml	500 µl
Agua	0,25 ml	1,2 ml
Glicerol	0,75 ml	-
TEMED	7 µl	7 µl
APS (10 %)	24 µl	60 µl

Las muestras de proteínas previamente lisadas sobre PBS con inhibidor de proteasas y cuantificadas, apartado IV.5.1, se diluyeron a 2 µg/ µl en PBS con 1/3 de tampón de carga y se incubaron en un baño de arena 15 minutos a 95 °C para su desnaturalización. Pasado ese tiempo, se enfriaron en hielo y se cargaron 10 µl de muestra y 5 µl de marcador de peso molecular para poder controlar la electroforesis. Se corrió 2 horas y media a 80 V en un único tampón de electroforesis para los geles de glicina. Mientras que en el caso de los geles de tricina se utilizaron dos, uno para el tanque del ánodo (el inferior) y otro para el tanque del cátodo (el superior).

IV.5.4.1.2 Transferencia a membrana de PVPF.

- Reactivos:
 - Tampón de transferencia (Tris base 25 mM, con metanol al 10% pH 9,3).
 - Membrana de PVDF (GE Healthcare; Chicago, Illinois, USA).
 - 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%, Tween 20 al 1%.
 - Solución de lavado: Tampón PBS (pH 7,4) con Tween 20 al 0,1 %
 - Metanol (Panreac).
 - Anticuerpos primarios y secundarios Tabla 7.
 - Agua destilada desionizada y estéril (ADDE).
 - Capturador de imágenes Odyssey® Clx (LI-COR, Bad Homburg, Germany).
- Procedimiento:

Una vez realizada la electroforesis se realizó una transferencia semiseca de las proteínas del gel a una membrana de PVPF. Se utilizó el instrumento de transferencia Trans-Blot SD (Bio-Rad) con el programa 30 V, 20 min, a 1,5 mA/cm² de membrana.

Materiales y métodos

A continuación, se bloquearon los sitios de unión inespecíficos incubando la membrana 1 hora a temperatura ambiente en la solución de bloqueo. Para la detección específica se retiró la solución de bloqueo y se añadió el anticuerpo primario en dilución de anticuerpos (Tabla 7) durante 2 horas a temperatura ambiente seguido de una noche a 4 °C.

Tabla 7: Diluciones empleadas y características de los anticuerpos primarios y secundarios usados en la técnica de *western-blot* para cada proteína ensayada.

	Anticuerpo primario			Anticuerpo secundario		
	Especie	Descripción	Dilución	Especie	Descripción	Dilución
TXNDC5	Conejo	Policlonal Proteintech (#19834-1-AP)	1/1000	Cabra	anti conejo IgG DyLight 800 Thermo (#SA5-35575)	1/80000
SAA1/2	Conejo	Policlonal Thermo (#PA5-102456)	1/500	Cabra	anti conejo DyLight 800 Thermo (#SA5-35575)	1/80000
B-ACTIN	Ratón	Policlonal Sigma-Aldrich (#A5441)	1/2000	Cabra	anti conejo DyLight 680 Thermo (#SA5-35518)	1/40000
INSR	Conejo	Policlonal Finetest (#FNab04336)	1/500	Cabra	anti conejo DyLight 800 Thermo (#SA5-35575)	1/80000
CALR	Conejo	Policlonal Proteintech (#10292-1-AP)	1/2000	Cabra	anti conejo DyLight 800 Thermo (#SA5-35575)	1/80000
APMAP	Conejo	Policlonal Proteintech (#25953-1-AP)	1/2000	Cabra	anti conejo DyLight 800 Thermo (#SA5-35575)	1/80000

Se lavaron 3 veces las membranas con la solución de lavado durante 10 minutos y se incubó con el anticuerpo secundario correspondiente durante 1 hora a temperatura ambiente. Pasado este tiempo se repitieron otros 3 lavados con solución de lavado y tras un cuarto lavado en agua ADDE se procedió a la captura de imágenes usando el aparato Odyssey® Clx. Todas las incubaciones se realizaron con agitación moderada, mientras que para los lavados se utilizó una agitación intensa.

IV.5.4.2 Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas o ELISA.

La técnica de ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay) es un inmunoensayo utilizado para la detección y cuantificación de proteínas, para el cual hay diferentes variantes que veremos a continuación.

IV.5.4.2.1 ELISA indirecto.

- Reactivos:
 - Tampón PBS: NaCl 136 mM, KCl 0,2 g/l, Na₂HPO₄ 1,44 g/l y KH₂PO₄ 0,24 g/l, pH 7,4 (Sigma-Aldrich)
 - Tampón bicarbonato (Na₂CO₃ y de NaHCO₃) 0,2 M, azida sódica 0,025% (pH 9,6)
 - Solución de bloqueo: PBS con leche en polvo descremada al 5% (pH 7,4)
 - TPBS: PBS con Tween 20 al 0,2% (pH 7,4)
 - Tampón revelado: Tampón de dietanolamina al 10% en MgCl₂ 0,5 mM, p-nitrofenilfosfato al 0,1% (Sigma-Aldrich, # 487663) (pH 9,8)
 - Placas 96 pocillos Nunc MaxiSorp (Thermo, #44-2404-21)
 - Anticuerpos diluidos en TPBS (Tabla 8)
 - Agua ADDE
 - Lector de placas SPECTROstar Nano (BMG Labtech)
 - Placas de 96 pocillos de poliestireno (Sarsted #82.1581)

Materiales y métodos

- Procedimiento:

Se uso este ELISA para la detección de la apoliproteínas A1, A4, nos permitirá realizar una medida semi-cuantitativa. El fundamento consiste en la unión de la proteína a la placa, que detectaremos utilizando un anticuerpo específico conjugado directa o indirectamente a la fosfatasa alcalina. La cantidad de nuestra proteína será proporcional a la actividad de la enzima.

Se incubaron 100 µl de las fracciones diluidas en tampón bicarbonato en una placa de 96 pocillos NUNC, Tabla 8, toda la noche a 4 °C en agitación. Se retiró la muestra por inversión y se bloqueó con 200 µl de solución bloqueo durante 30 minutos a temperatura ambiente en agitación. Se realizaron 3 lavados de 5 minutos en agitación con TPBS y se incubó con 100 µl de anticuerpo primario, Tabla 8, durante hora y media a 37 °C en agitación.

Pasado ese tiempo, se realizaron 4 lavados de 5 minutos y se incubó con 100 µl de anticuerpo secundario durante 45 minutos a 37 °C en agitación. Por último, se realizaron 5 lavados de 5 minutos y se añadió 200 µl de la solución de revelado previamente atemperada a 37 °C. Pasados 20 minutos se midió la absorbancia a 405 nm usando el lector de placas Nano.

Tabla 8: Diluciones empleadas y características de los anticuerpos primarios y secundarios usados en la técnica de ELISA directo para cada proteína ensayada.

Dilución muestra	Anticuerpo primario			Anticuerpo secundario con fosfatasa alcalina		
	Especie	Descripción	Dilución	Especie	Descripción	Dilución
APOA1	1/40000	Conejo	BioDesign #K23001R	1/2000	Cabra	Anti-Rabbit IgG (Sigma-Aldrich #A3687)
APOA4	1/20000	Cabra	SantaCruz-sc-19036	1/1000	Burro	Anti-IgG de cabra (Sigma-Aldrich-A4187)

IV.5.4.2.2 ELISA Sandwich.

- Reactivos:
 - ELISA SAA murina (#MOFI00094, ARP American Research Products, Inc.TM, Waltham, USA).
 - ELISA Insulina murina (RAI007R; RayBiotech, Peachtree Corners, GA, USA).
- Procedimiento:

De forma similar al ELISA indirecto, es una técnica basada en la unión específica antígeno-anticuerpo y podremos conocer la concentración de proteína de la muestra, en este caso de una forma cuantitativa al disponer de una recta de calibrado con la proteína de interés provista por el kit. La diferencia con el ELISA previo es que en este tipo se emplea una primera capa de anticuerpos o anticuerpo de captura (generalmente monoclonales) fijados en la superficie del pocillo, de modo que al adicionarse la muestra se fijará de una forma específica y no por adsorción. De forma similar al ELISA anterior se añadirá un anticuerpo primario que reconocerá la proteína de interés seguido de un anticuerpo que reconozca el epítopo de éste, marcado con una enzima como la peroxidasa.

Se procedió siguiendo el protocolo del kit, diluyendo las muestras de plasma 1/10 para ajustar las concentraciones a la recta de calibrado.

IV.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 al 0,05.

V. Resultados

V.I-Thioredoxin domain containing 5 suppression elicits serum amyloid A-containing high-density lipoproteins

A b s t r a c t

Thioredoxin domain containing 5 (TXNDC5) is a protein disulfide isomerase involved in several diseases related to oxidative stress, energy metabolism and cellular inflammation. In a previous manuscript, a negative association between fatty liver development and hepatic *Txndc5* expression was observed. To study the role of TXNDC5 in the liver, we generated *Txndc5*-deficient mice. The absence of the protein caused an increased metabolic need to gain weigh along with a bigger and fatter liver. RNAseq was performed to elucidate the putative mechanisms, showing a substantial liver overexpression of serum amyloid genes (*Saa1*, *Saa2*) with no changes in hepatic protein but discrete plasma augment by the gene inactivation. Higher levels of malonyldialdehyde, apolipoprotein A1 and platelet activating factor-aryl esterase activity were also found in serum from *Txndc5*-deficient mice. However, no difference in distribution of high-density lipoproteins (HDL)-mayor components and SAA was found between groups, and even the reactive oxygen species decreased in HDL coming from *Txndc5*-deficient mice. These results confirm the relation of this gene with hepatic steatosis and with a fasting metabolic derive remedying an acute phase response. Likewise, they pose a new role in modulating the nature of HDL particles, and SAA-containing HDL particles are not particularly oxidized.

Keywords: Thioredoxin domain containing 5; TXNDC5; serum amyloid; HDL; SAA; *Saa1*; *Saa2*; liver, *Txndc5*-deficient mice; RNAseq

Resultados

1. Introduction

The transcriptome is the complete set of transcripts in the cell, including mRNA (mRNA), non-coding RNAs (ncRNA) and small RNA [241]. In mammals only around 20,000 of these transcripts are translated, but alternative splicing generates an even larger number of different proteins [242,243]. Approximately a third of the proteins are being transported through the endoplasmic reticulum (ER), an organelle specialized in protein homeostasis, folding and assembly, in which the oxidative environment maintained by glutathione balance is crucial to the correct formation of disulfide bonds [244].

Protein disulfide isomerase family (PDIs) and several chaperones work together to reduce the risk of misfolding and aggregation in the ER [245,246]. PDIs contain at least one thioredoxin (TRX)-like domain that catalyze the protein disulfide isomerase and redox activity [246,247]. One of these PDI, thioredoxin domain containing protein 5 (TXNDC5), also known as resident endoplasmic reticulum 46 (Erp46) or PDI15, contains three TRX domain which show a CXXC catalytic [8] sequence involved in redox and disulfide isomerase activities, followed by a C-terminal KDEL sequence that retains it in the ER [9].

Several biological functions of TXNDC5 have been proposed including anti-oxidation, angiogenesis promotion, energy metabolism and involvement in cellular inflammation among others [169,248,249]. According to that, several studies have proved that high expression of Txndc5 is linked with high resistance tumors including hepatocellular, cervical, gastric carcinoma, prostate and renal cell adenocarcinoma, rhabdomyosarcoma and colorectal cancer [169,178,248,250–256]. For last, it is involved in other diseases correlated with oxidative tissues like rheumatoid arthritis (RA), diabetes, and non-alcoholic fatty liver [192,194,249,257,258].

In a previous manuscript from the group, TXNDC5 was found negatively associated with the degree of fatty liver development, following squalene administration [8]. Squalene is the main hydrocarbon present in extra virgin olive oil and has been postulated to be one of the main components to modulate the known anti-hepatic steatosis effect of Mediterranean diet in *Apoe*-deficient mice [7,198,259]. Chronic liver disease is a major cause of morbidity and mortality in which the progression is characterized by an ongoing inflammatory process

Resultados

along with an alteration of hepatic lipid metabolism [260,261]. All the findings may suggest an important role for TXNDC5 in hepatic steatosis development.

Recent evidence has found that *in vivo* deletion of *Txndc5* in endothelial cells has been shown to increase endothelial nitric oxide synthase protein and reduce atherosclerosis in Apoe-deficient mice [196]. Moreover, TXNDC5 promoted liver fibrosis through redox-dependent hepatic stellate cell activation [189], but its inhibition alleviated LPS-induced sepsis by inhibiting the NF-kappaB signaling pathway [195]. These recent advances suggest that TXNDC5 may have an impact role on hepatic transcriptome as well. In this manuscript, we developed a *Txndc5*-deficient mice using CRISPR-Cas9 technology and perform a liver RNA-seq to characterize and elucidate if any of the hepatic steatosis factors may be linked with this PDI.

2. Materials and Methods

2.1. Generation of *Txndc5*-deficient mice using CRISPR/ hifiCas9 genome-editing.

Recombinant high fidelity (hifi) Cas9 enzyme and two single guide RNAs (sgRNA) targeting intron 2 and intron 3 of *Txndc5* were electroporated into C57Bl/6J mouse zygotes to generate mice with a deletion spanning exon 3 of *Txndc5* (Supplemental Figure1A). Briefly, the two CRISPR RNA guides were designed using CHOPCHOP (<http://chopchop.cbu.uib.no/>) and were used as annealed two-part synthetic crRNA and tracrRNA molecules (Alt-R® CRISPR guide RNAs, Integrated DNA Technologies, Inc. (IDT), Leuven, Belgium).

The resulting sequences were crRNA1: 5' CCAACCAGAAAGGGCACAAG 3' and crRNA2: 5' CCAACCAGAAAGGGCACAAG 3'. The ribonucleoprotein mixes were prepared as described [223]. The hifi Cas9 protein (IDT #1081060) in complex with both targeting sgRNA (cr:trac RNA) (IDT #1072532) that direct the Cas9 at both ends of the third exon of *Txndc5* were electroporated into C57BL/6J (Janvier labs, Le Genest-Saint-Isle, France) mouse zygotes in M2 medium and cultured overnight at 37 °C [223]. Two-cell embryos were transferred into the uterus of pseudopregnant Swiss (Janvier labs) female mice at 2.5 dpc. The preparation of mouse zygotes, electroporation of hifi Cas9 /sgRNAs, embryo transfer, and initial breeding of the *Txndc5*-deficient mice were performed by the transgenic mouse facility at the Centro de Investigación

Resultados

Biomédica de Aragón (CIBA) as previously described [262]. Founders harboring a deletion of the intended target site were identified by the presence of a smaller PCR amplicon (~132 base pair) instead of the original amplicon (432 bp), corresponding to the expected size of the region with exon 3 deleted using 5'-forward primer 5'- GCAGCTATGCTATGTTCTTGAGCT 3' and reverse primer 5'- GCATGGTTTGTACCTCATTGG 3'. Four different founders with the deletion were obtained of 31 born mice from electroporated zygotes, all PCR products of the founders were confirmed by sequencing.

The potential off-targets of CRISPR were assayed by sequencing analysis at off-target sites predicted by CHOPCHOP, CRISPRater and Off-spotter. Four loci displaying the highest likelihood of unspecific cleavage of each guide were selected and amplified on the first mice generation and T7 endonuclease assay (#IC006, Genecopoeia, Rockville, USA) was used to check off-target effects.

One random male founder was crossed to C57BL/6J wildtype mice to obtain heterozygous offspring; the heterozygous progeny was crossed to generate homozygous *Txndc5*-deficient mice (C57BL/6JRj-*Txndc5*<em2Mdnp>/Ciba, MGI:6444222). The latter were born at the expected Mendelian frequency, showed no detectable developmental defects, thrived at normal rate and both sexes were fertile.

2.2. Animals and diets.

Two-month-old male mice were used in all experiments and housed in sterile filter-top cages on a 12-hour light/12-hour dark cycle at the CIBA. All had *ad libitum* access to food and water. Mouse experiments were carried out in accordance with the EU Directive 2010/63 on the protection of animals used for scientific purposes and the study protocol was approved by the Ethics Committee for Animal Research of the University of Zaragoza (PI35/18 and PI03/21).

For 4 weeks, mice received a purified diet, based on the purified AIN-93 diet for laboratory mice. All diets were prepared in our facilities, lyophilized, and stored at -20 °C until use. The composition of these diets was described previously [263]. Intake and body weights were monitored every week. At the end of the 4-week dietary intervention, food was withdrawn for 16 hours, and the mice were weighed and then sacrificed by suffocation in a CO₂ chamber. Blood

Resultados

samples were drawn by cardiac puncture, and plasma and serum were centrifuged at 3000g for 10 minutes. The livers were removed and frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C until processing and an aliquot was stored in buffered formaldehyde.

2.3. RNA extraction.

Each liver was homogenized using Tri Reagent from Ambion® (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) and total RNA was extracted using spin column kit Direct-zol™ RNA Miniprep (Zymo Research, Irvine, CA U.S.A), following the manufacturer's instructions. RNA was quantified by absorbance at A_{260/280} using Nanodrop Spectrophotometer (Thermo) and the ratio was greater than 1.75 as well as the ratio A_{260/230}. The integrity of the 28S and 18S ribosomal RNAs was verified by 1% agarose gel electrophoresis followed by ethidium bromide staining with a ratio 28S/18S greater than 2.

2.4. RNAseq analysis.

For RNA sequencing, 3 pools of wildtype mice were prepared using equal amounts of hepatic total RNA of three mice. Another 3 pools were prepared for *Txndc5*-deficient mice combining total RNA from three mice per pool. The resulting 6 samples were sent to the Beijing Genomics Institute (BGI Genomics, Shenzhen, China) service. RNA quality tested, library construction, sequencing reads and posterior clean, genome mapping, analysis, identification, and quantification was realized as previously described [264]. A Bioinformatics flow of about 4.52 Gb per sample with an average genome mapping rate of 93.1%. The complete datasets were deposited in the GEO database (Accession number GSE185515).

2.5. Quantification of mRNA and cDNA synthesis.

To verify the most relevant changes induced by the absence of TXNDC5 using RNAseq, represented by signal log2 ratio > 1.0 or <-1.0 and a P value <0.005 for up-regulated and down-regulated, respectively, 10 genes fulfilling these criteria were chosen. Primer design (Supplementary Table 1), RT-PCR and cDNA synthesis was carried out as previously described [264]. ViiA7 Real-TIME PCR System (Life Technologies) was used, and relative amount of mRNA

Resultados

was calculated using the comparative $2^{-\Delta\Delta Cq}$ method and normalized to the reference *Ppib* expressions.

2.6. Western blotting.

Liver protein extraction, quantification and transference to a PVDF membrane was done as previously described [265]. Rabbit polyclonal antibodies were used against the different proteins: TXNDC5 (#19834-1-AP) (1/1,000) from Proteintech (Manchester, UK) and serum amyloid protein (# PA5-102456) (1/500) from Thermo Fisher Scientific (Madrid, Spain). Equal loadings were confirmed by using a mouse monoclonal anti- β -ACTIN (#A5441) (1/2,000) from Sigma (St Louis, MO, USA). Membranes were washed three times with a 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) and goat anti-mice IgG (H&L) DyLight 680 secondary antibody (SA5-35518), both from Thermo-scientific, diluted 1/ 80.000. Images were captured using an Odyssey®Clx (LI-COR, Bad Homburg, Germany).

2.7. Histological analysis.

A portion of the liver was fixed in formaldehyde, paraffin-embedded, and sectioned. Sections were then stained with hematoxylin and eosin, scanned and scored for lipid droplet area, inflammation, necrosis, and fibrosis by trained histologists blinded to the experimental groups. The lipid droplet areas were estimated in sections with Adobe Photoshop CS3 (Adobe Inc. San Jose, CA, USA) and expressed as percentage of total liver section as previously described [7]

2.8. Plasma determinations and liver lipids.

Total plasma cholesterol and triglyceride concentrations were measured in a microtiter assay, using InfinityTM commercial kits (Thermo Scientific, Madrid, Spain). Plasma ketones were measured using a colorimetric assay (Fujifilm Wako chemicals, Richmond VA, USA). Total apolipoprotein A1 (APOA1) and apolipoprotein A4 (APOA4) were quantified by ELISA using anti-mouse APOA1 (#K23001R, Biodesign, Standford, USA) and anti-goat APOA4 (sc-19036, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany). Serum amyloid A protein was

Resultados

determined by an ELISA kit (#MOFI00094, ARP American Research Products, Inc.TM, Waltham, USA). Serum arylesterase activity of paraoxonase (PON1) was assayed as previously described [266] and PAH-AH activity was determined using PAF acetylhydrolase assay kit (#760901, Cayman Chemical, Ann Arbor, USA). Malondialdehyde (MDA) was determined using Lipid Peroxidation (MDA) Assay Kit (#MAK085, Sigma).

Plasma lipoprotein profile was determined in 100 µl of pooled plasma samples from each group by fast protein liquid chromatography (FPLC) gel filtration using a Superose 6B column (GE Healthcare, Chicago, IL, USA) in 48 fractions as previously described [267].

Total cholesterol was determined using 0.01 mg/ml Amplex Red (#C291, Tebu-bio, Barcelona, Spain), 2 U/ml horseradish peroxidase, 0.5 U/ml cholesterol oxidase and 0.5 U/ml cholesterol esterase (#P8375, #228250, # C1403, Sigma) dissolved in 50 mM K₂HPO₄ and 25 mM CaCl₂ pH 7.4. To determine non-esterified cholesterol, the same protocol without the addition of cholesterol esterase was used, and the difference between both was calculated and expressed as the esterified cholesterol. Phosphatidylcholine was determined using 0.01 mg/ml Amplex Red (#C291, Tebu-bio), 2 U/ml horseradish peroxidase, 0.5 U/ml choline oxidase and 0.5 U/ml phospholipase D (#P8375, #C5896, #P0065, Sigma) dissolved in 25 mM Tris/HCL and 25 mM CaCl₂, pH 8, resorufin was measured at 550 nm excitation wavelength and 590 nm emission wavelength.

Hepatic lipids were extracted using chloroform-methanol, dried, solubilized in isopropanol and measured using InfinityTM commercial kits (Thermo Scientific, Madrid, Spain).

2.9. Reactive oxygen species (ROS) content in lipoproteins.

The presence of ROS was assessed by measuring the conversion of 2,7-dichlorofluorescein diacetate into fluorescent dichlorofluorescein [268] in FPLC-isolated fractions corresponding to the different lipoproteins [269]. Briefly, high density lipoproteins (HDL) were incubated at 37 °C with 10 µg of dichlorofluorescein, 0.1% sodium azide in PBS. After 2 h of incubation, fluorescence was measured at an excitation wavelength of 485 nm and an emission wavelength of 535 nm [44].

Resultados

2.10. Statistics.

Results are presented as means and their standard deviations. The normal distribution of data was analyzed according to Shapiro–Wilk test, and homology of variance among groups using Bartlett's or Levene's tests. Parameters fitting both criteria were analyzed using one-tailed Student's t test. A Mann-Whitney U test or non-parametric Kruskal–Wallis ANOVA followed by Dunn's multiple comparisons was used to compare the groups failing in any of the hypotheses. Association between variables was assessed by Spearman's correlation coefficient (ρ). All calculations were performed using SPSS version 15.0 software (SPSS Inc, Chicago, IL, USA) or GraphPad Prism 5 for Windows (GraphPad, S. Diego, CA, USA). A P value of less than 0.05 was considered statistically significant.

3. Results

3.1. Generation of *Txndc5*-deficient Mice.

We verified that the two-single guide RNAs designed to flank the third exon of *Txndc5* (Supplementary Figure 1A) produce the deletion of the exon, showing a 310 bp deletion which verified the correct deletion of the third exon of *Txndc5* (Supplementary Figure 1B). Off-target analyses were carried out in four potential loci for each guide, resulting in a non-specific cut (Supplementary figure 1C). For last, levels of expression at RNA and protein levels were verified, which allow us to confirm the total loss of TXND5 in the liver (Supplementary Figure 1D).

3.2. Somatometric Parameters.

To avoid hormonal influences and due to a limited number of females, these were not included in this study, what represents a limitation

For 4 weeks, 13 wild type (WT) and 10 *Txndc5*-deficient (or Knock-out, KO) two-month-old male mice born of heterozygous crosses were fed with a purified chow diet. After this period, KO males gained significantly less weight (mg) per kcal of food intake (Fig 1A). Mice were fasted 16 hours prior to sacrifice, in which the percentages of loss of weight during fasting were non-significant different between both groups (5.8 ± 0.9 vs 5.5 ± 1.2 , $p < 0.278$ for WT and KO

Resultados

respectively). In contrast with the animal weight, there was a significant increase in its liver weight (Fig 1B).

3.3. Liver Histological Analyses and Hepatic Lipid Content.

According with the gained mass in KO livers, there were a significant increase in the hepatic content of both cholesterol and triglycerides (Figure 1, panels C and D). However, lipid droplet area did not differ between both groups, nor were inflammatory foci (Figure 1, panels E and F).

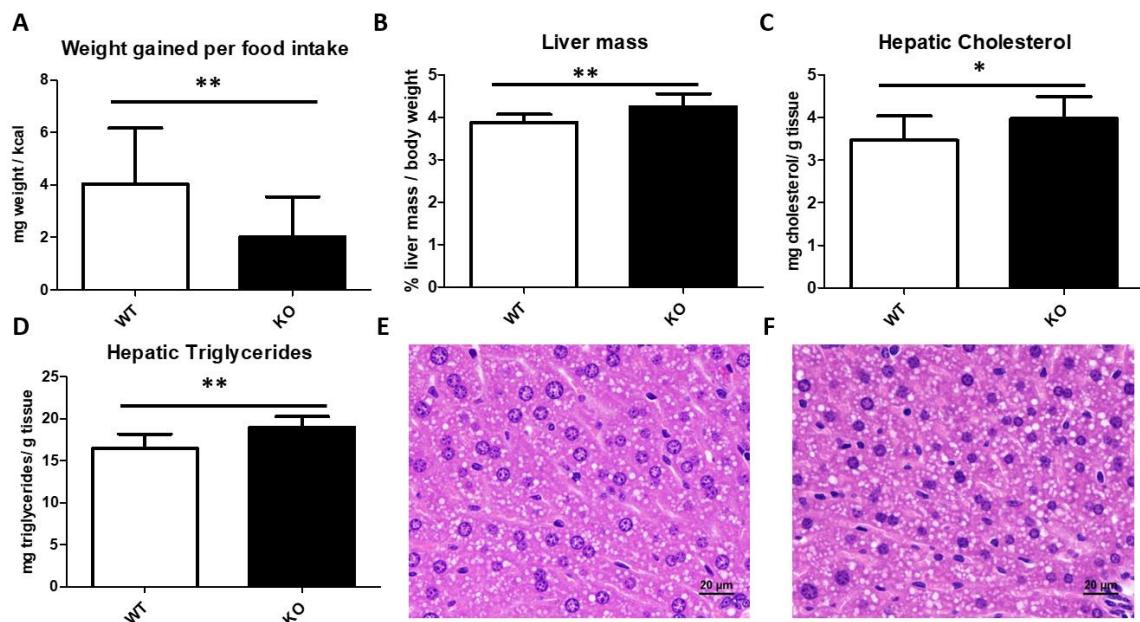


Figure 1: Somatometric parameters and hepatic fat content. Animal weight gained (mg) in 4 weeks per food intake (kcal) (A). Liver mass percentage of body weight after 16 hours fasting (B) Hepatic cholesterol (C) and triglyceride (D) contents. Representative liver micrographs from wildtype (E) and *Txndc5*-deficient mice (F), bar denotes 20 μ m. Data are means \pm SD for each group ($n= 13$ and $n = 10$, respectively for WT and KO). Statistical analyses were done according to Mann–Whitney’s U-test and *, p value < 0.05; **, p value < 0.01.

3.4. Hepatic Gene Expression of *Txndc5*-deficient Male Mice Fed for 4 weeks on a Chow Diet.

To determine the impact of *Txndc5* on hepatic transcriptome, three RNA pools from 13 WT and 10 KO animals receiving chow diet were submitted to next generation sequencing. Reads from each library were mapped onto genome of reference followed by gene prediction, having a mapping ratio close to 93% (Supplementary Table 2). Transcripts were reconstructed, identifying 5419 novel transcripts, of which 4879 them were predicted coding transcripts.

Resultados

After genome mapping, SNP and INDEL variant for each sample were analysed with no difference observed between groups (Supplementary Table 3). Changes in relative abundance of isoforms, regardless of the expression change, indicate a splicing-related mechanism. We detect five types of alternative splicing (AS) events, including Skipped Exon (SE), Alternative 5' Splicing Site (A5SS), Alternative 3' Splicing Site (A3SS), Mutually exclusive exons (MXE) and Retained Intron (RI), with no changes in total events (Supplementary Table 4).

Differentially expressed genes, shown in Figure 2A, were 638 in the WT and 674 in the KO group. Differentially expressed genes (DEGs) with < -2 or > 2 expressed as log₂ ratio and a low false discovery rate of $P < 0.0001$ displayed only 4 genes (Figure 2B).

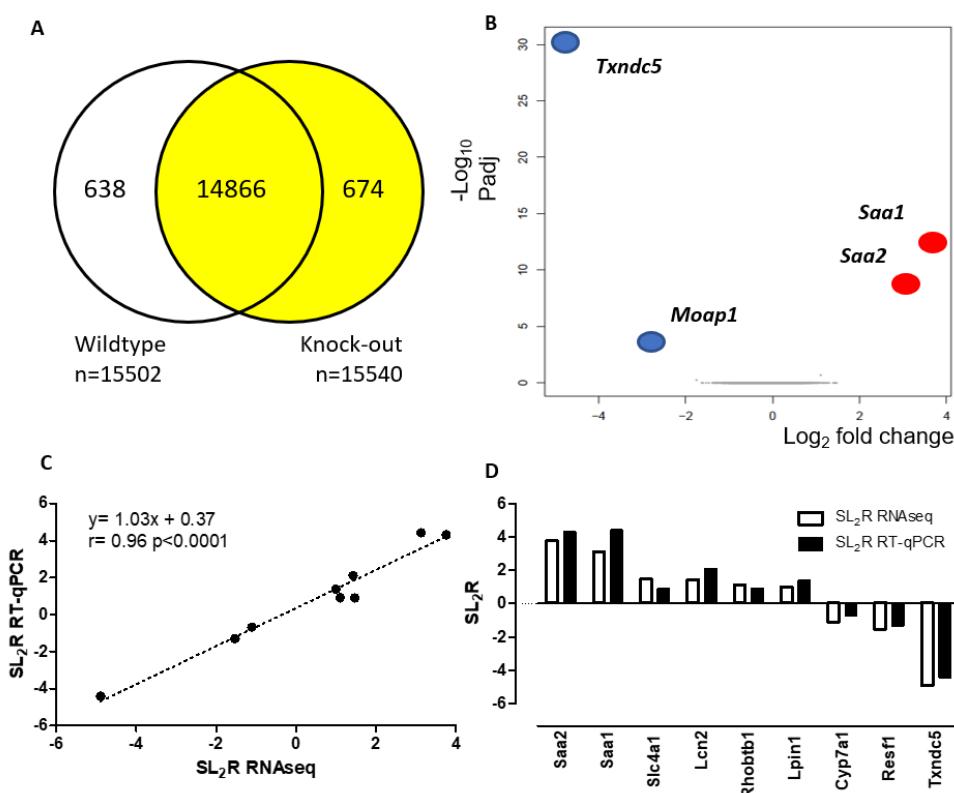


Figure 2: Differentially expressed genes. (A), Venn diagram of gene expression between groups. (B)Volcano plot of DEGs. X axis represents log₂ transformed fold change. Y axis represents -log₁₀ transformed significance. Red points represent up-regulated DEGs. Blue points represent down-regulated DEGs. Grey points represent non-regulated DEGs. Gray points represent genes with no changes. (C) Correlation analysis of 10 selected genes between RNAseq and RT-qPCR normalized to the invariant *Pipp* gene. The mean values obtained for signal log₂ ratio (SL₂R) from individual analyses were plotted against the RNAseq (Table 1). Good agreement between the procedures was seen ($r = 0.96$, $p < 0.0001$). (D) Changes in values of SL₂R expression for the 10 selected genes.

Resultados

To validate the RNAseq method, 10 genes with signal log2 ratio > 1 or < -1 and a p value < 0.005 for up-regulated and down-regulated were randomly chosen to design their RT-qPCR assays (Table 1). The latter were carried out on individual hepatic RNA samples of each mouse. Using the log2 ratio of fold changes obtained by RNAseq and RT-qPCR for the ten selected transcripts, a correlation analysis was carried out with a significant agreement ($r = 0.96, p < 0.0001$) between both methods (Figure 2C) and all samples were properly categorized (Figure 2D).

All the genes selected, but *Cyp7a1*, were significantly regulated, with a heavily difference in the predicted genes in RNAseq (*Saa1*, *Saa2* and *Txndc5*). Two genes were found highly significant regulated, *Lcn2*, a potential biomarker for hepatic steatosis, damage, and inflammation [270], and *Resf1*, a factor regulator of epigenetics modification associated with SETDB1 [271]. However, *Moap1* cannot be amplified by RT-qPCR due to its low expression, being the number of its transcripts found in RNAseq much fewer than the amplified genes.

3.4 .Serum Amyloid Content on Liver and Plasma.

Both serum amyloid A1 (SAA1) and A2 (SAA2) are acute phase complexed to HDL as apolipoproteins that are concurrently expressed in the liver, in response to inflammatory stimuli [272]. *Saa1* and *Saa2* genes are ~ 3.5 kb and codified a 122 amino acid-long similar sequences which differ in only 9 positions [273]; moreover, these genes are thought to have been formed through gene duplication [272,274]. The increased expression of both genes at the mRNA level (Table 1) was reflected in a strong correlation ($\rho = 0.948, p < 0.0001$), between *Saa1* and *Saa2* expressions. These mRNA changes were suggestive of changes at the protein level. Surprisingly, when hepatic SAA protein levels were determined by Western-blot (Figure 3A-B) no significant changes were observed; however, SAA showed a ~ 1.4-fold increase in plasma of *Txndc5*-deficient mice (Figure 3C). Furthermore, a significant negative correlation was found in the WT group between *Txndc5* and plasma SAA ($r = -0.566, p < 0.02$), confirming the role of this PDI to control SAA expression.

Resultados

Table 1: Hepatic transcripts differentially expressed by the lack of *Txndc5* at the level of signal log2 ratio < or >1 and p value < 0.005 in male mice according to RNAseq and RT-qPCR.

Name	GenBank	Biological Process	Gene Symbol	SL2R RNA seq	p value RNA seq	WT	KO	SL2R qPCR
Serum Amyloid A2	NM_011314.3	Acute phase protein	<i>Saa2</i>	3.76	5.91E-17	1.3 ± 1	26 ± 27 ***	4.31
Serum Amyloid A1	NM_009117.4	Acute phase protein	<i>Saa1</i>	3.13	6.41E-13	1.1 ± 0.5	23 ± 24 ***	4.41
Solute Carrier Family 4 Member 1	NM_011403.2	Anion Exchange Protein	<i>Slc4a1</i>	1.47	1.80E-03	1.6 ± 1.1	2.9 ± 1.8 *	0.90
Lipocalin 2	NM_008491.1	Iron-trafficking protein	<i>Lcn2</i>	1.43	1.08E-03	1.5 ± 1.2	6.3 ± 7 **	2.11
Rho Related BTB Domain Containing 1	NM_001081347.1	Small GTPase of Rho family	<i>Rhobtb1</i>	1.11	7.12E-05	1.1 ± 0.7	2.5 ± 2 *	0.91
Lipin 1	NM_001355598.1	Triglyceride synthesis	<i>Lpin1</i>	1.00	3.74E-03	1.1 ± 0.6	2.9 ± 2 *	1.37
Cytochrome P450, family 7, subfamily a, polypeptide 1	NM_007824.3	Bile acid synthesis	<i>Cyp7a1</i>	-1.11	2.79E-03	1.4 ± 0.8	0.9 ± 0.6	-0.68
Retroelement Silencing Factor 1	NM_001289662.1	Regulation of imprinted gene expression	<i>Resf1</i>	-1.53	1.24E-03	1.2 ± 0.7	0.5 ± 0.6 **	-1.30
Thioredoxin Domain Containing 5	NM_145367.4	Disulfide isomerase	<i>Txndc5</i>	-4.89	2.77E-35	1.1 ± 0.4	0.1 ± 0 ***	-4.41
Modulator of Apoptosis 1	NM_001142937.2	Receptor-dependent apoptosis	<i>Moap1</i>	-2.85	6.35E-08	NA	NA	NA

Mice were 4 weeks on a chow diet and fasted 16 hours prior to sacrifice. Data are means ± SD for each group (n= 13 and n = 10, respectively for WT and KO) normalized to *Pbib* as reference gene. Statistical analyses were done according to Mann–Whitney's U-test and *, p value < 0.05; **, p value < 0.01; ***, p value < 0.005 vs WT.

Resultados

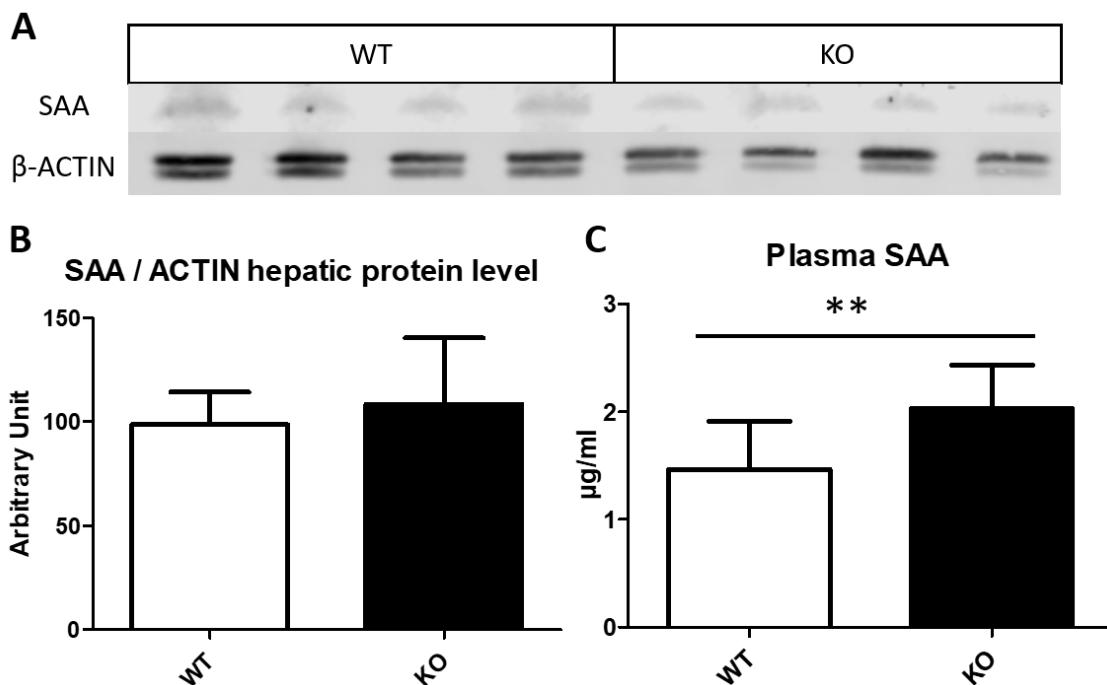


Figure 3. Serum amyloid A protein level. (A) Western blot of three protein pools from hepatic tissue in wildtype (WT) and *Txndc5*-deficient (KO) male mice where SAA (13 kDa) and β-ACTIN, used as loading control, were detected. (B) Western blot bands were quantified using ACTIN as reference. (C) Total plasma SAA quantified by ELISA. Data are means ± SD for each group (n= 13 and n = 10, respectively for WT and KO). Statistical analyses were done according to Mann–Whitney's U-test and **, p value < 0.01.

3.5. Plasma Parameters Determinations.

Plasma basic parameters were measured and non-significant changes in total plasma for triglycerides, cholesterol, phosphatidylcholine and ketone bodies were observed (Table 2).

Table 2. Plasma parameters of male wildtype and *Txndc5*-deficient mice

	Wildtype (n= 13)	Knock-out (n= 10)
Triglycerides (mM)	1.8 ± 0.3	2 ± 0.5
Cholesterol (mM)	2.7 ± 0.4	3 ± 0.2
Phosphatidylcholine (mM)	4.2 ± 1.4	4.7 ± 1.8
Ketone bodies (mM)	1.7 ± 0.5	1.7 ± 0.4
Malondialdehyde (mM)	0.59 ± 0.17	0.67 ± 0.12 *

Mice were 4 weeks on a chow diet and fasted 16 hours prior sacrifice. Data are means ± SD for each group. Statistical analyses were done according to Mann–Whitney's U-test and *, p value < 0.05

As SAA tends to be accumulated in high density lipoproteins (HDL) as minor components, we determined the concentration of two proteins of HDL, apolipoprotein 1 and 4 (APOA1 and APOA4) to elucidate whether the presence of the amyloid may have an impact on the HDL protein composition. Their

Resultados

protein concentrations showed no changes in APOA4 but a surprising augment of APOA1 in *Txndc5*-deficient mice (Figure 4A-B).

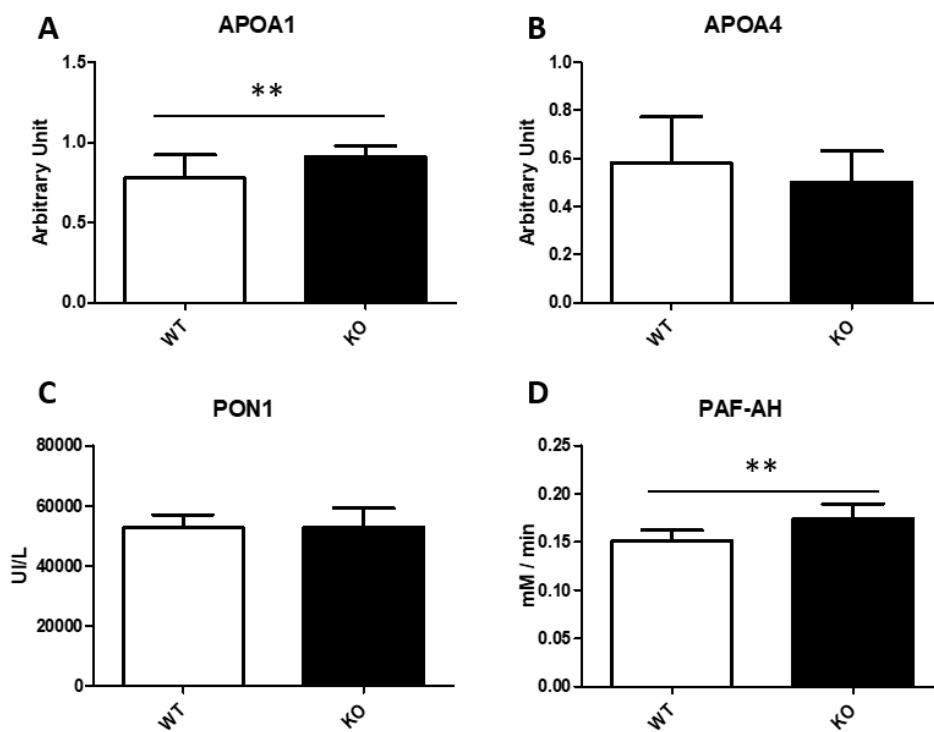


Figure 4: Influence of *Txndc5* and SAA in functional plasma parameters. APOA1 (A) and APOA4 (B) were determined by ELISA while activity assays were done to determine paraoxonase 1 (C) and PAF-acetylhydrolase activities (D). All measurements were done in total serum collected from mice fed for 4 weeks on a chow diet and fasted 16 hours prior to the sacrifice. Data are means \pm SD for each group ($n=13$ and $n=10$, respectively for WT and KO). Statistical analyses were done according to Mann–Whitney's U-test and *, p value < 0.05 ; **, p value < 0.01 .

One crucial aspect of TXND5 is its antioxidant properties involved in several processes; the determination of malondialdehyde (MDA) is commonly used as a marker for oxidative stress of lipid peroxidation that occurs because of oxidative damage [275]. Consequently, a significant increase in plasma MDA was seen in *Txndc5*-deficient mice (Table 2), adding more evidence for the antioxidant role of TXND5.

As there was an increased plasma lipid peroxidation, the antioxidant enzymes of HDL were assayed. In this sense, serum paraoxonase 1 (PON1) activity, an esterase with cardioprotective properties involved in several human diseases [276,277] and linked to APOA1, showed no change by the inactivation of *Txndc5* gene (Figure 4C). By contrast, the activity of PAF-acetylhydrolase (PAF-AH), whose activity has been found to hydrolyse oxidized phospholipids [278], was

Resultados

increased in *Txndc5*-deficient mice (Figure 4D). In addition, PAF-AH activity and APOA1 were highly correlated ($\rho = 0.748$, $p < 0.0001$), showing an association between these parameters not influenced by the inactivation of *Txndc5* gene.

3.6. Analysis of Lipoproteins.

Two pools of plasma for each group were prepared and separated by FPLC. Total cholesterol, non-esterified cholesterol and phosphatidylcholine were determined along with protein levels of APOA1, APOA4 and SAA to elucidate if the increase of SAA and APOA1 might influence the size and content of HDL. No difference was observed in the distribution of the measured parameters (Figure 5), being cholesterol mainly carried in HDL particles, which can be divided into two different population of HDL: the large HDL loaded with more cholesterol (IHDL) and the small population of nascent HDL (sHDL) with more phosphatidylcholine. While the APOA1 was mainly located in IHDL, SAA was found in the sHDL.

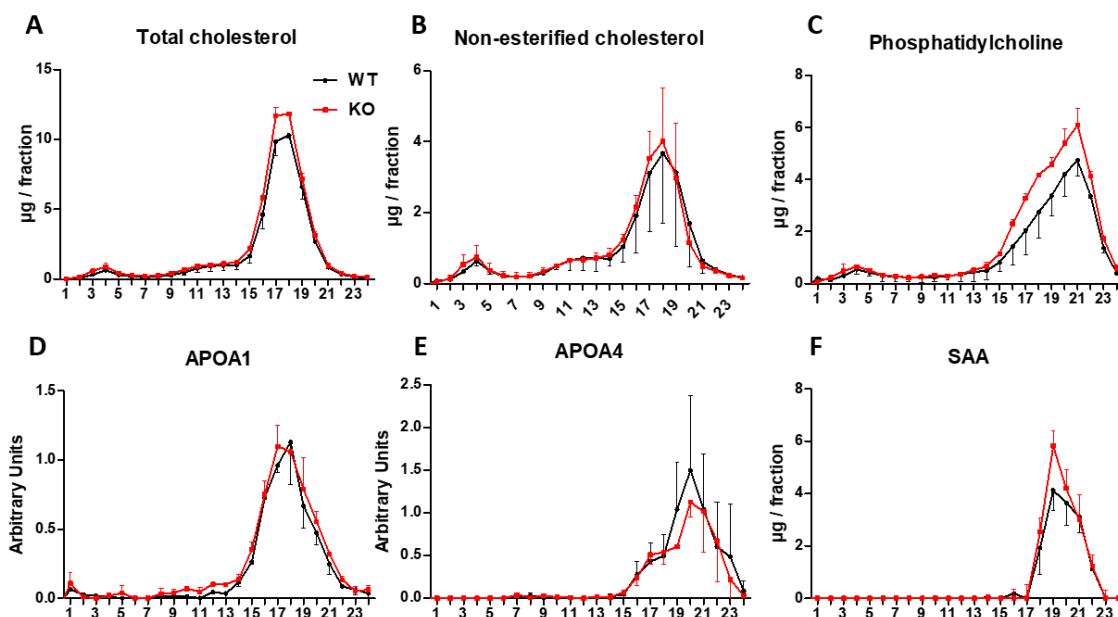


Figure 5: Influence of *Txndc5* deficiency on plasma FPLC chromatographs of male mice on a chow diet. Mice were 4 weeks on a chow diet and fasted 16 hours prior sacrifice. Two pools per experimental group were prepared and data is represented as mean \pm SD. Fluorometric assays were performed to determine total cholesterol (A), non-esterified cholesterol (B) and phosphatidylcholine (C). ELISA assays were used to measure APOA1 (D), APOA4 (E) and SAA (F)

To clarify whether SAA induced dysfunctional sHDL, two pools per group were prepared and PON1 and PAF-AH assayed. PON1 and PAF-AH activities were detected in both IHDL and sHDL, proving that SAA augment did not seem

Resultados

to affect their functionality (data do not show). To explore ROS content in IHDL and sHDL, DCF was assayed (Figure 6). There was a significant ROS reduction in sHDL of *Txndc5*-deficient mice, but in this type of assay is hard to distinguish whether the lesser ROS signal is due to less oxidised lipides in the sample or to the antioxidant properties of APOA1 and PAF-AH preventing the ROS production.

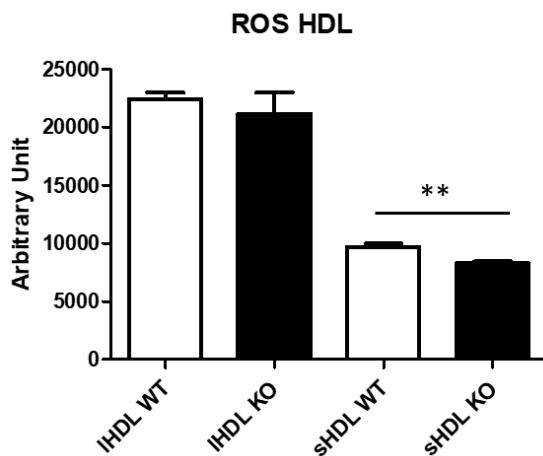


Figure 6: ROS content of HDL subgroups in wildtype and *Txndc5*-deficient male mice. Two pools of each group were separated by FPLC and fractions 16-19 and 20-22 were combined into large HDL (IHDLDL) and small HDL (sHDL) respectively. Data are means \pm SD for each group. Statistical analyses were done according to Mann-Whitney's U-test and **, p value < 0.01.

4. Discussion

This report describes the generation and phenotypic characterization of *Txndc5*-deficient mice in the terms represented in Figure 7. The latter showed an inefficient use of food to gain weight and an increased hepatic mass with higher contents of triglycerides and cholesterol. Next generation sequencing of the liver mRNA evidenced a pronounced increased *Saa1* and *Saa2* expressions, verified by qPCR, along with *Lcn2* and *Resf1* changes. Amyloid augments were not reflected in the hepatic protein, but a discrete elevation of plasma SAA was observed, corresponding to small HDL. The characterization of small HDL showed decreased ROS content in agreement with the increases of APOA1 and PAF-AH and in opposition to the increased plasma MDA levels (Table 2, Figure 4). Overall, TXND5 is a new player controlling the presence of SAA in HDL and this protein does not influence the antioxidant properties of these lipoparticles.

Resultados

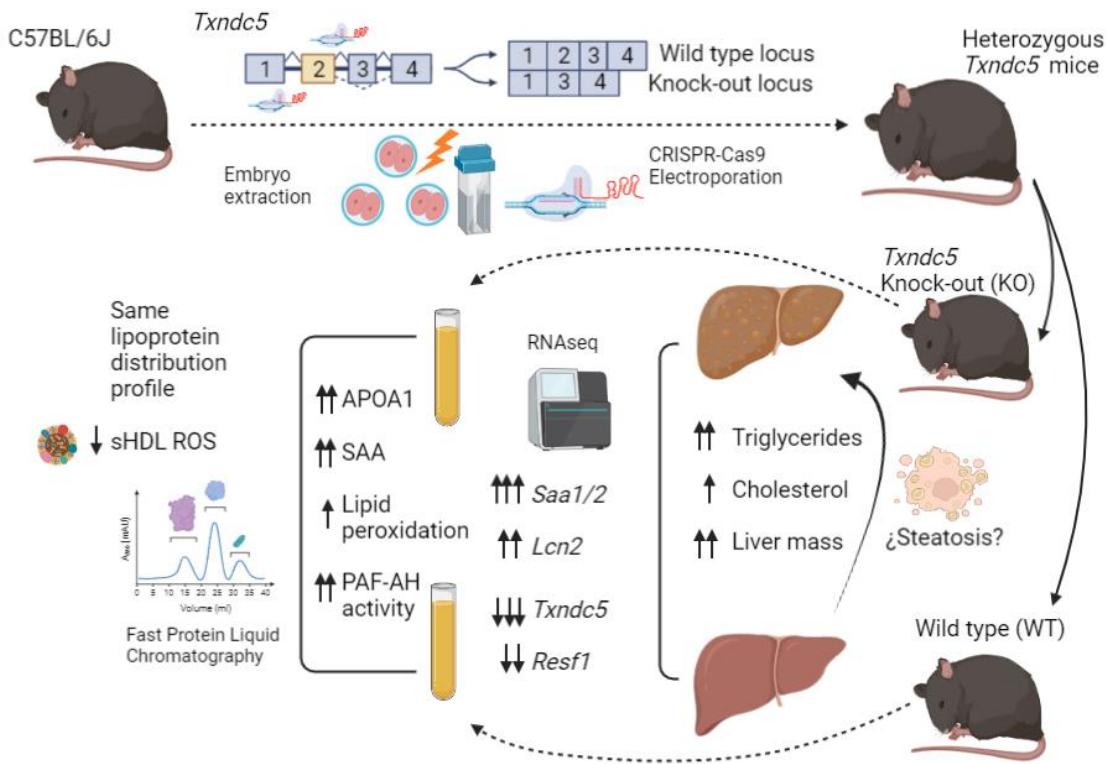


Figure 7. Comprehensive scheme displaying the experimental approaches. The preparation of knock-out mice, the analyses of livers and plasma and the main findings of hepatic RNAseq and plasma characterization are summarized.

The inefficient use of food to gain weight as well as the increased hepatic mass have not been described in previous generations of *Txndc5*-deficient mice [186,187]. We may discard a potential malabsorption, considering that TXNDC5 deficiency resulted in hepatomegaly linked to increased triglyceride and cholesterol contents and normal values of these plasma parameters. Little is known regarding regulation of hepatic *Txndc5* expression, in order to gain insight into this issue, we searched for submitted liver transcriptomes at GEO database (Supplementary Table 5). Two studies reported changes associated with dietary fat content: GDS1307 and GDS1517. In the first one, four types of high fat diets were administered differing in their fatty acid composition, the livers with the highest *Txndc5* expressions corresponded to the rats who received the fish oil diet, being the only group that did not show a hepatic triglyceride augment compare with the control group. In the second one, *Txndc5* was significantly increased in both wildtype and Scdl-deficient mice on a low-fat and high-carbohydrate diet. In addition, in Apoe-deficient mice receiving squalene, we observed an inverse association between hepatic lipid droplet area and *Txndc5* expression [8]. These facts suggest that TXNDC5 is involved in the fine-tuning

Resultados

of the lipid metabolism, but its effect is very subtle and more stressful conditions are required to observe an overt phenotype.

Using RNAseq, we have identified that *Txndc5* inactivation induced increased hepatic *Saa1* and *Saa2* expressions resulting in a significant increase in plasma SAA (Figure 3). These results suggest a role of TXNDC5 in the regulation of these gene expressions in a setting of discrete hepatomegaly and absence of histological features of inflammation. In fact, plasma SAA levels were significantly correlated with the liver mass ($\rho = 0.563$, $p < 0.005$), but not with hepatic triglycerides. SAA is an acute phase protein produced in hepatocytes after induction by cytokines and released into the plasma linked to HDL in mice [274]. Surprisingly, the observed increase at the plasma level was rather modest compared with the magnitude of elevated mRNAs suggesting an inefficient translation, a facilitated export into plasma or a rapid removal from this compartment. All these aspects have been described related to SAA [279]. The fact that hepatic protein did not experience any significant change may reinforce the first interpretation in agreement with the findings of Chait et al. [280]. Two genes were significantly regulated by *Txndc5* inactivation: Lipocalin 2 (*Lcn2*) and *Resf1* and their changes were found to correlate with the hepatic triglycerides as well as *Saa1* and *Saa2* expressions ($p < 0.01$). *Lcn2* is a potential biomarker for hepatic inflammation regulated by cytokines as well [270]. *Resf1* is a silencing factor, which regulates repressive epigenetic modifications associated with SETDB1 [281]; analysis of genes regulated by several factors including SETDB1 identified pathways similar to those upregulated in old livers, that would contribute to metabolic dysfunction [282]. In this way, a reduction in *Resf1* could accelerate this genetic program of aging. PAF-AH activity has been also found to be modulated by cytokines and its activity helps to decrease not only lipid peroxidation but pro-inflammatory interleukins [283]. In the present report, hepatic increased *Lcn2* expression together with the increased *Saa1*, *Saa2* expressions, and PAF-AH activity seem to suggest an acute response in absence of liver inflammation elicited by the lack of TXNDC5. A 16-hour fasting is considered a stressor in mice fed *ad libitum*, losing around 5-6% of their body weight and activating their ketone metabolism and consequently fatty acid oxidation [284]. In our experimental approach, this fasting regime has been adopted, so it is reasonable to assume that absence of TXNDC5 makes mice

Resultados

prone to develop acute phase responses. All these aspects have been described related to SAA [279]. Moreover, TXNDC5 is known to play an important role in inflammation and controlling redox status [169,191,193], its absence made cells more susceptible to apoptosis in several tissues [192,285], and its expression has been correlated with bad prognosis in multiple types of cancer since it provides more ROS tolerance [250,286,287]. ROS control has been linked to TXNDC5 through JNK/STAT3 and ATF6 pathways, confirming the PDI function to modulate oxidative stress. ROS levels are related to aging and metabolic dysregulation [288] as *Resf1* down expression along with biomarkers of hepatic inflammation (*Saa1/2* and *Lcn2*) are significantly correlated with hepatic triglycerides offers a vision of how the absence of *Txndc5* has an impact on hepatic steatosis as a global multifactorial disease in which more studies need to be addressed. In this regard, there were increased hepatic triglyceride and plasma malondialdehyde levels, and these stressors might have induced the inflammatory cascade that triggered *Saa1* and *Saa2* expressions resembling a sterile inflammation.

To elucidate whether SAA has an impact on plasma lipid metabolism, several plasma parameters were analyzed. A higher APOA1 concentration was observed, this main component of HDL highly correlated with the increased PAF-acetylhydrolase activity. In addition, the plasma SAA increase did not influence cholesterol distribution in lipoproteins since it was mainly carried out in HDL as corresponds to C57BL/6J mice. SAA was found in the small HDL containing more phosphatidylcholine than the large HDL loaded with cholesterol and APOA1. The absence of changes in large HDL cholesterol is suggesting that SAA-containing small HDL particles are not interfering the reverse-cholesterol transport in agreement with previous reports [289]. ROS content of both HDL subgroups showed no difference in large HDL and a lesser content in small HDL by TXNDC5 deficiency, the latter is consistent with the APOA1 and PAF-AH augments and their antioxidant properties. Increased levels of SAA are associated with increased risk for atherosclerosis and are being considered as a predictor for acute coronary syndrome [290,291]. However, absence of SAA did not reduce atherosclerosis in experimental models [292]. The finding of the present report may add new complexity to the discrepancy observed regarding SAA role in atherogenesis.

Resultados

5. Conclusions

TXNDC5, as we hypothesized, was correlated with hepatic steatosis and redox control in the liver, showing an increased liver mass with a higher fat content linked to *Saa1*, *Saa2* expressions. This metabolic unbalance produced by the lack of TXNDC5 under fasting stress led to a prodromal stage of sterile inflammation, increasing lipid peroxidation and releasing SAA to the plasma, which was compensated by an enhanced activity of PAF-AH, linked with APOA1. Serum amyloid does not seem to impair HDL antioxidant function in this early stage. However, how the absence of TXNDC5 may influence SAA regulation under more stressful conditions like non-alcoholic fatty liver disease, fibrosis or atherosclerosis remains unclear. These represent fascinating endeavours to understand the link among serum amyloid and lipid oxidation and their role in hepatic steatosis and inflammation.

Funding:

This work was supported by the MCIN/ AEI /10.13039/501100011033 grant number PID2019-104915RB-I00, CIBEROBN (CB06/03/1012), and Gobierno de Aragón (B16-20R, Fondos FEDER “Otra manera de hacer Europa”). J.S.-M. was recipient of a Fundación Cuenca Villoro fellowship.

Acknowledgments:

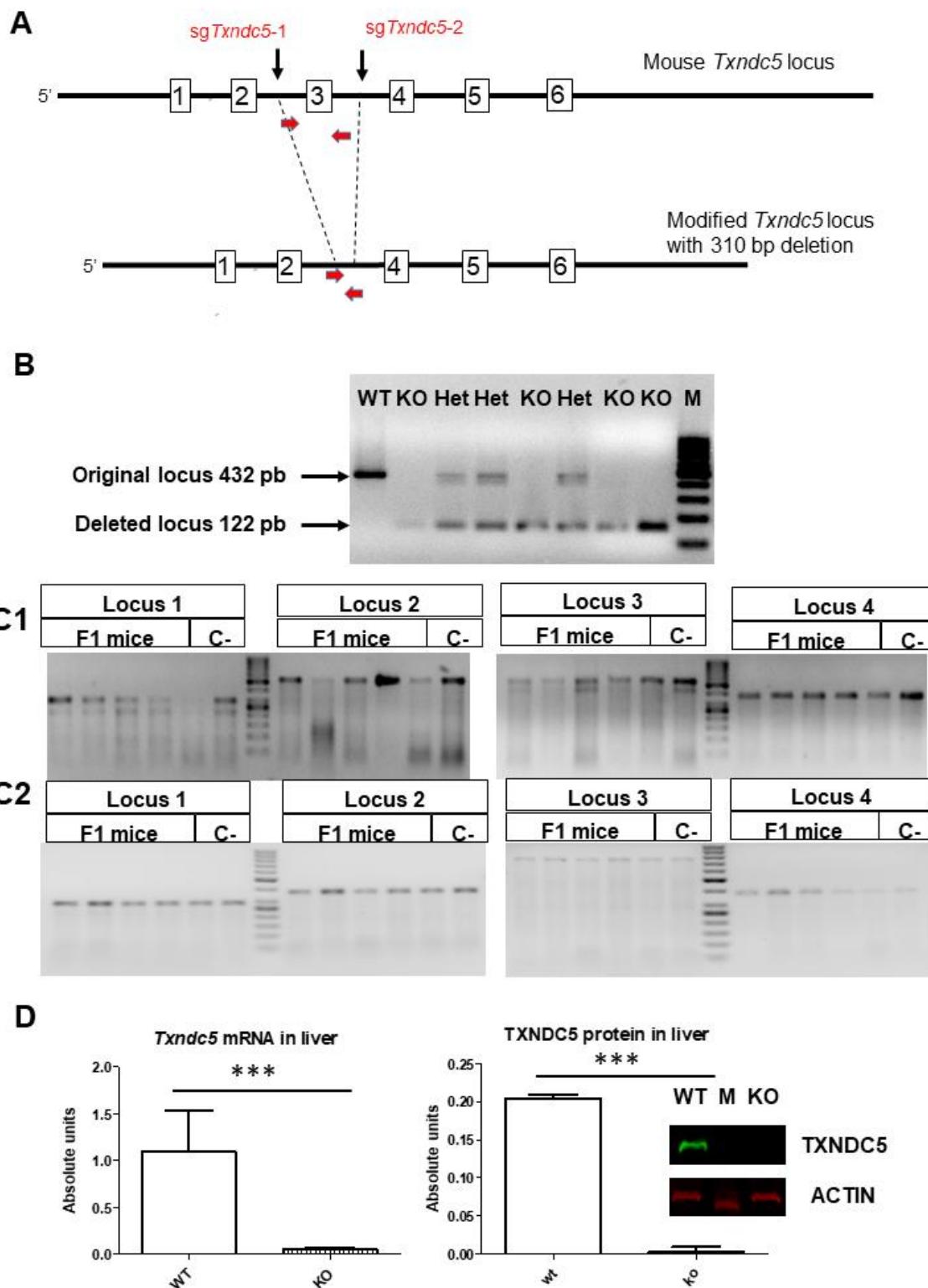
We thank Jose Luis Pitarch, Cristian Alvarez, Silvia Garcés and M^a Pilar Lierta for help in maintaining the animals.

Conflicts of Interest:

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

Resultados

Supplemental files



Supplemental Figure 1. Targeted deletion of *Txndc5* locus.

- Graphic depicting the strategy to delete mouse exon 3 of *Txndc5* gene using two single-guide RNAs (sgRNA) and hifiCas9. Position of PCR primers is denoted.
- PCR characterization. Amplicons used to characterize mouse founders. The 432 bp band corresponding to wildtype (WT) allele and the 122 bp band

Resultados

corresponding with the deletion, causing the knock-out (KO) allele. Heterozygous are represented as Het.

- C. Off-target analyses. Amplified loci putative off-targets of sgTxndc5-1 (C1) and sgTxndc5-2 (C2) corresponding to the 5 F1-mice analysed with T7 endonuclease.
- D. Hepatic mRNA (left) and protein (right) expressions. Inset shows Western bands of hepatic TXNDC5 and ACTIN in wild-type (WT) and knock-out (KO) mice. Molecular marker (M) band correspond to 37 kDa. Data are means ± SD for each group (n= 13 and n = 10 in mRNA and n=4 and n=4 for protein, respectively for WT and KO). Statistical analyses were done according to Mann–Whitney's U-test and ***, p value < 0.001.

Resultados

Supplemental Tables:

Supplementary Table 1: Characteristics of primers used in RT-qPCR according to MIQE guidelines.

Gene symbol	Accession	Sequence	Amplicon length	Exons	[Primer]	Efficiency
<i>Cyp7a1</i>	NM_007824.3	Sense CATTACAGAGTGCTGGCCAAGA Antisense CTGTCCGGATATTCAAGGATGC	144	4/5	0.1 µM	97%
<i>Lcn2</i>	NM_008491.1	Sense GGAACGTTTCACCCGCTTTG Antisense TGAACCATTGGGTCTCTGCG	140	5/6	0.1 µM	104%
<i>Lpin1</i>	NM_001355598.1	Sense TACCCCCAGTCAGCATCGTA Antisense CTTTTGGTGTGAGGGCCG	89	5/6	0.1 µM	96%
<i>Resf1</i>	NM_001289662.1	Sense AATCCCGACGGAGGGACTAA Antisense GCTTGAGGTGGCCTGTAT	232	3	0.1 µM	98%
<i>Rhobtb1</i>	NM_001081347.1	Sense CGGGAGCGAGAGCTTTGTAAG Antisense CAGCAGCTGGTACTGTGTCA	158	2/3	0.1 µM	101%
<i>Saa1</i>	NM_009117.4	Sense TTAGCTCAGTAGGTTGTGCTGG Antisense ACAATGTTCCCCAGAGAGCA	92	4	0.1 µM	97%
<i>Saa2</i>	NM_011314.3	Sense CTGGCTGGAAAGATGGAGAC Antisense TGTCCTCGTGTCTCTGC	147	3/4	0.1 µM	104%
<i>Slc4a1</i>	NM_011403.2	Sense GATCCCAGATCGAGACAGCG Antisense CACATAGACCTGACCGGAGC	184	3/5	0.1 µM	107%
<i>Txndc5</i>	NM_145367.4	Sense CAGGCTTGTCAAGATGTCACCAT Antisense TAACCTCGTACCGAGTACTTGCTG	82	8/9	0.2 µM	100%
<i>Ppib</i>	NM_011149	Sense GGAGATGGCACAGGAGGAA Antisense GTAGTGCTTCAGCTGAAGTTCTCAT	72	3/4	0.1 µM	103%

Resultados

Supplementary Table 2: Sequence quality metrics and genome mapping of GSE185515.

Group	Total Raw Reads (M)	Total Clean Reads (M)	Clean Reads (%)	Mapping Ratio (%)
Wildtype (n=3)	48,31 ± 1,44	44,69 ± 1,08	44,69 ± 1,08	92,86 ± 1,0652
Knock-out (n=3)	49,97 ± 1,44	45,73 ± 1,08	45,73 ± 0,36	93,34 ± 0,42

Supplementary Table 3: Summary of SNP variant type of GSE185515.

Group	A-G	C-T	Transition	A-C	A-T	C-G	G-T	Transversion	Total
Wildtype	1673 ± 342	1677 ± 351	3350 ± 692	365 ± 93	336 ± 64	301 ± 80	319 ± 78	1321 ± 306	4670 ± 989
Knock-out	1621 ± 342	1635 ± 351	3256 ± 692	350 ± 93	277 ± 64	297 ± 80	328 ± 78	1252 ± 306	4509 ± 989

A-G: The amount of A-G variant type; C-T: The amount of C-T variant type; Transition: The amount of A-G and C-T variant type; A-C: The amount of A-C variant type; A-T: The amount of A-T variant type; C-G: The amount of C-G variant type; G-T: The amount of G-T variant type; Transversion: The amount of A-C, A-T, C-G and G-T variant type Total: The amount of all variant type

Supplementary Table 4: Summary of splice variant type of GSE185515.

Group	SE	MXE	A5SS	A3SS	RI
Wildtype	3353 ± 1019	275 ± 85	693 ± 122	831 ± 150	338 ± 54
Knock-out	3508 ± 1019	302 ± 85	718 ± 122	905 ± 150	346 ± 54

SE: Skipped Exon, MXE: Mutually exclusive exons, A5SS and A3SS: Alternative 5' or 3'Splicing Site respectively and RI: Retained Intron.

Resultados

Supplementary Table 5. Changes in hepatic *Txndc5* expression.

Experimental condition	Type of change	Signal log ₂ ratio	Accession number
Fish oil	Increased	0.6	GDS1307
Iron deficient, LPS injected mice	Increased	0.5	GDS5271
TGFβ-activated kinase 1 deficiency	Increased	0.5	GDS5474
Very low-fat diet in mice	Increased	0.3	GDS1517
Alcoholic hepatitis	Increased	0.1	GDS4389
Dexamethasone	Decreased	-0.6	GDS5035
NF-E2-related factor 2 Nrf2 deficiency	Decreased	-0.3	GDS3476
Sphingosine 1-phosphate lyase deficiency	Decreased	-0.12	GDS3654
Caspase-1 deficiency	No change	-0.06	GDS4922
Dicer1 deficiency	No change	-0.05	GDS3685
Steroid receptor coactivator-2 deficiency	No change	0.05	GDS4785
Interleukin 6	No change	0.02	GSD3773

Data obtained from Genome Expressed Omnibus data bank and Array express. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geoprofiles/> <https://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/>.

V.2 Absence of thioredoxin domain containing 5 improves glucose tolerance and insulin sensitivity in males

A b s t r a c t

Thioredoxin domain containing 5 (TXNDC5) is a protein disulfide isomerase involved in several diseases related to oxidative stress, energy metabolism and cellular inflammation. Metabolism unbalance, diabetes and insulin folding alterations have been also associated with this protein. To gain insight into these relationships, glucose metabolism has been characterized using *Txndc5*-deficient mice. The absence of the protein caused a lower glycaemia correlated with higher non-esterified fatty acid levels following overnight fasting on chow diet in males. Several tolerance tests (pyruvate, glucose and insulin) did not show an impaired gluconeogenesis but a higher insulin sensitivity. *In vitro* assays using an engineered hepatic cell line corroborated the results of an increased glucose uptake. On a high-fat and high-sucrose diet administered to induce a pre-diabetic stage, the absence of TXNDC5 reproduced the lower glycaemia and higher NEFA observed consuming the chow diet. However, higher levels of plasma insulin were observed in *Txndc5*-deficient mice. Insulin receptor was found increased in hepatic membranes, where the insulin signalling cascade starts. Increased hepatic gene expressions of *G6pc*, *Irs2* and *Igfbp1* were also found in the absence of TXNDC5. These results suggest that a complex role of TXNDC5 on the hepatic sex-differential handling of glucose and lipids and an impaired vesicle traffic retaining insulin receptor on the membrane.

Keywords: Thioredoxin domain containing 5; TXNDC5; glucose; glycaemia; insulin; NEFA; insulin resistance; liver; *Txndc5*-deficient mice; *G6pc*; *Irs2*; *Igfbp1*

Resultados

1. Introduction

The thioredoxin domain containing protein 5 (TXNDC5) is a member of protein disulfide isomerase (PDI) family A, member 15 (PDI15), also known as resident endoplasmic reticulum 46 (Erp46). TXNDC5 have three thioredoxin (TRX) Trx-like domains that catalyse its chaperone activity in the endoplasmic reticulum (ER) due to his C-terminal KDEL sequence that retain the protein in the cisternae [9].

One of the principal functions of PDI is the proper folding of secreted and membrane proteins and the maintenance of the redox homeostasis of the cell and ER [169]. TXNDC5 has been overexpressed in several cancers as their anaerobic metabolism and proliferation are linked to hypoxia and this could induce this PDI [9]. In many other pathologies such as diabetes [293], arthritis [183,192], neurodegenerative diseases [294], and vitiligo [295] the same mechanism has been proposed. TXNDC5 have been linked to inflammation in different ways [92,193]. It was also associated with the extent of fatty liver in Apoe-deficient mice receiving squalene [8]. Furthermore, the increase of TXNDC5 via GLP-1 treatment could protect against non-alcoholic fatty acid liver by alleviating RE stress [257]. Recently, the absence of this protein was translated in hepatic steatosis and a fasting metabolic stress resembling an acute phase response [296].

TXNDC5 has also been linked to insulin, a crucial hormone, that requires disulfide bond formation [169]. In β -pancreatic cells, it has been found that TXNDC5 protects from ER stress and apoptosis [293] and it is one of the five PDI activated via IRE1 α -XBP1 pathway which catalyses the oxidative folding of proinsulin [258]. Moreover, in diabetic mice a reduced level of TXNDC5 has been found in pancreas [297]. For last, there is a correlation about heterozygous TXNDC5 loss of function and high risk of development of diabetes type I [298]. However, the role of TXNDC5 in peripheral tissues to main glucose homeostasis has been poorly studied, despite the 7-fold down-regulation of hepatic TXNDC5 in insulin-resistant hamsters fed fructose [299] and the increase in insulin-like growth factor binding protein 1 (IGFBP1) in rheumatoid arthritis synovial fibroblast-like cells lacking TXNDC5 [192]. In light of these facts, it could be hypothesized that TXNDC5 may play a role in peripheral action of insulin. To

Resultados

address this premise, *Txndc5*-deficient mice were characterized in relation to glucose metabolism and insulin sensitivity.

2. Methods and materials

2.1 Animals and diets

Adult female and male mice were used in all experiments and housed in sterile filter-top cages on a 12-hour light/12-hour dark cycle at the *Centro de Investigación Biomédica de Aragón*. All had *ad libitum* access to food and water. Mouse experiments were carried out in accordance with the EU Directive 2010/63 on the protection of animals used for scientific purposes, and the study protocol was approved by the Ethics Committee for Animal Research of the University of Zaragoza (PI35/18 and PI03/21).

Two experimental diets were used, a purified chow diet, based on the AIN-93 diet for laboratory mice whose composition was previously described [263]. This dietary intervention lasted 4 weeks. A purified high fat and high sucrose diet (HFHSD) designed according to Burchfield et al. [300] and provided for 5 weeks. In the latter, sucrose solution was used as beverage and replaced every week. All diets were prepared in our facilities, lyophilized, and stored at -20 °C until use. Food intake and body weights were monitored every two weeks. At the end of the dietary interventions, sacrifices, sample collection and processing were performed as previously described [296].

2.2 Functional assays

For oral glucose tolerance test (OGTT) and pyruvate tolerance test (PTT) mice were fasted 16 hours prior to the experiment. Oral glucose and pyruvate solutions (100 g/ L) were administered at 2 g/ kg body weight. Blood collection at 0, 30, 60 and 120 minutes were taken from the submandibular vein and processed. Animals were fasted 6 hours previous insulin tolerance test (ITT), intraperitoneal 0.75 insulin (Sigma, #91077C) Units/ kg body weight were administered. Blood collection at 0, 15, 30 and 60 minutes were taken from the submandibular vein and processed as above. In long fasting tolerance tests, mice were fasted, and blood was collected from submandibular vein at 0, 24, 36 and 48 hours. At the last time point, mice were euthanized, and samples collected.

2.3 Plasma determinations and liver lipids

Resultados

Plasma glucose, total cholesterol and triglyceride concentrations were measured using Infinity™ commercial kits (Thermo Scientific, Madrid, Spain). Plasma ketone bodies and non-esterified fatty acids were measured using a colorimetric assay (Fujifilm Wako chemicals, Richmond VA, USA). Plasma insulin was determined by an ELISA kit (RAI007R; RayBiotech, Peachtree Corners, GA, USA). Hepatic lipids were extracted using chloroform-methanol, dried, solubilized in iso-propanol and measured using Infinity™ commercial kits (Thermo Scientific).

2.4 RNA extraction, cDNA synthesis and mRNA quantification.

RNA extraction, primer design (Supplementary Table 1), cDNA synthesis and qPCR were carried out as previously described [264].

2.5 Western blotting.

Liver protein extraction, quantification, transference to a PVDF membrane, was performed as previously described [265]. Rabbit polyclonal antibodies were used against the different proteins: TXNDC5 (1:1,000, Proteintech #19834-1-AP, Manchester, UK) and INSR (1:500, FineTest# FNab04336, Wuhan, Hubei, China). Equal loadings were confirmed by using a mouse monoclonal anti- β-ACTIN (1:2,000, Sigma #A5441, St Louis, MO, USA). Membranes were washed three times with a 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) and goat anti-mice IgG (H&L) DyLight 680 secondary antibody (SA5-35518), both from Thermo-scientific, diluted 1/80,000. Images were captured using an Odyssey®Clix (LI-COR, Bad Homburg, Germany).

2.6 Cell culture assays.

AML12 cell culture and *Txndc5*-deficient line were previously described [205]. Growth curve was performed seeding 15.000 cells in 24 well plate, each day 3 wells were trypsinized and cells were countered using cellular Countess™ 3 FL Automated Cell Counter (Thermo Scientific). Cell viability assays were done seeding 10.000 cells per 96-well, following day cells were incubated for 30 minutes with different concentrations of hydrogen peroxidase (5-50 mM) (Sigma), media was removed and changed, MTT viability assay was performed and LD50 calculated as described [205]. Lysolysis and glucose uptake assays were performed as published [301].

Resultados

3. Results

3.1. Plasma, liver and somatometric parameters of *Txndc5*-deficient mice.

Two-month-old male and female wild-type (WT) and *Txndc5* knock-out (KO) mice, generated and genotyped as previously described [296], were used. Both groups were fed a chow diet for 4 weeks. When these groups were fasted for 6 hours, no significant changes in plasma parameters were observed in both sexes (Supplementary Table 1). When a 16-hour fasting regime was established and mice then euthanized, no significant changes were found in plasma parameters in females (Supplementary Table 2) but a significant lower glycaemia was observed in males lacking TXND5 (Figure 1A). The latter mice showed significantly increased NEFA concentrations (Figure 1B) despite the absence of changes in plasma insulin levels (Figure 1C). The values of glycaemia were inversely correlated with those of NEFA (Figure 1D). Calculated HOMA was slightly but not significantly augmented (Figure 1E).

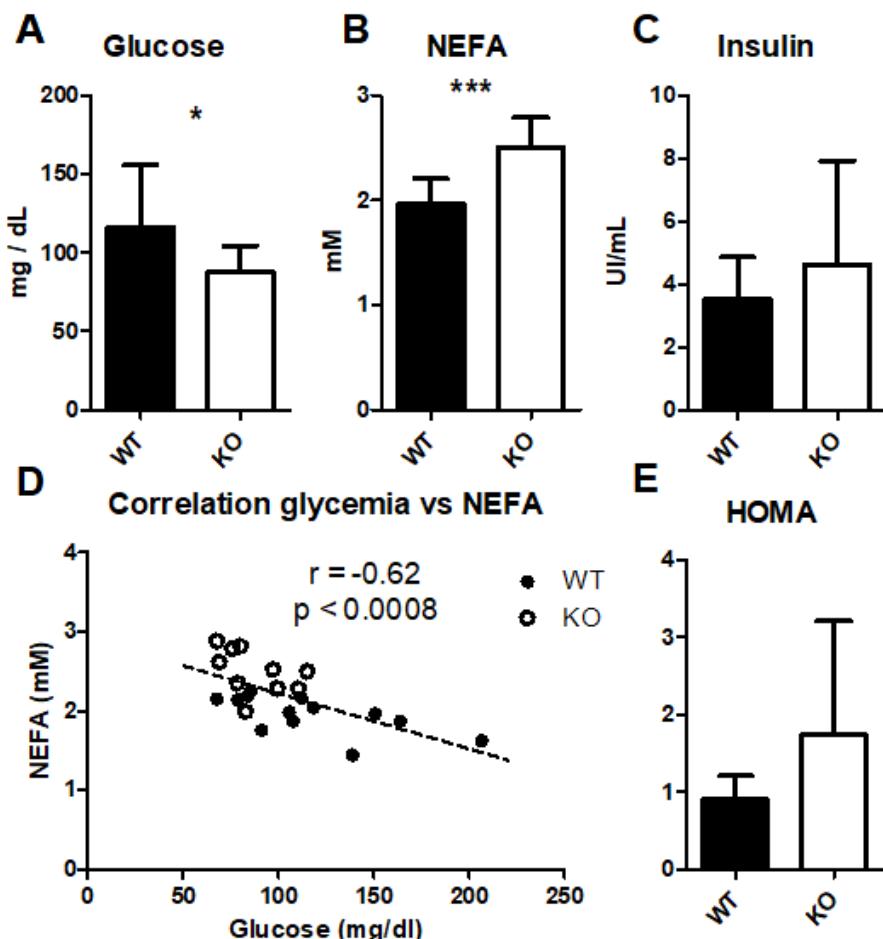


Figure 1. Plasma parameters related to glucose management. Glucose (A), NEFA (B) and insulin (C) concentrations. Association between NEFA and glucose

Resultados

concentrations (D). Calculated HOMA (E). Data are means \pm SD for each group (n= 6 and n = 7, respectively for WT and KO). Statistical analyses were done according to Mann–Whitney's U-test and *, p value < 0.05; and **, p value < 0.005 vs WT. Spearman's correlation coefficient and its significance were obtained.

Male somatometric parameters are reflected in Table 1A. While no difference in body weight was observed by the absence of TXNDC5, TXNDC5-KO mice significantly required more energy to gain weight. The absence of TXNDC5 also induced an increased liver mass along with augment in hepatic and cholesterol contents, which may be a way of storage the consumed extra-calories.

Table 1. Somatometric and liver parameters of males.

	Wildtype (n= 13)	Knock-out (n= 10)
Mice weight (g)	28.8 \pm 1.6	28.9 \pm 1.2
Weight gained per food intake (mg/kcal)	15.6 \pm 8.3	7.9 \pm 5.9 **
Weight loss by 16-hour fasting (%)	5.8 \pm 0.9	5.5 \pm 1.2
Liver mass (%)	3.9 \pm 0.2	4.2 \pm 0.3 **
Hepatic triglycerides (mg Tg/ g liver)	16.5 \pm 1.7	19 \pm 1.3 **
Hepatic cholesterol (mg chol/ g liver)	3.5 \pm 0.6	4 \pm 0.5 *

Mice were 4 weeks on a chow diet and fasted 16 hours prior sacrifice. Data are means \pm SD for each group. Statistical analyses were done according to Mann–Whitney's U-test and *, p value < 0.05; **, p value < 0.01.

3.2 Tolerance test in *Txndc5*-deficient mice

As no change in insulin or HOMA has been observed, it was very likely that TXNDC5 had an impact on gluconeogenesis as a 16-hour fasting may activate this pathway [302,303]. Pyruvate tolerance test (PTT) was assayed and shows no evidence that gluconeogenesis from pyruvate was impaired in the absence of TXNDC5 in males (Figure 2A). Plasma glucose follow-up in long fasting periods was addressed to see if under harsh conditions there an impaired gluconeogenesis was, however, no difference was observed on males (Figure 2B), coinciding with PTT that gluconeogenesis was not impaired.

To obtain more information about the role of TXNDC5 on the glucose homeostasis mechanisms, several tolerance tests were carried out in males. Glucose tolerance test (GTT), via oral administration, showed a significant decrease at 60-minute glucose peak along with a decreased area under the curve (AUC), so absence of TXNDC5 favored glucose utilization (Figure 2C and

Resultados

D). When insulin tolerance tests (ITT) were performed, TXNDC5-KO mice were significantly more sensitive than wild type at 15 min after peritoneal insulin administration (Figure 2E and F). Both results indicate that difference in glycemia is not due to a change in insulin concentration but to increased insulin sensitivity.

Tolerances tests were equally performed in females, confirming no change in gluconeogenesis when facing long periods of fasting (Fig S1A). Although no changes were observed in GTT (Fig S1B-C), females undergoing ITT showed a slight significant reduction in glycaemia at 30 min after insulin administration, resembling the result observed in males.

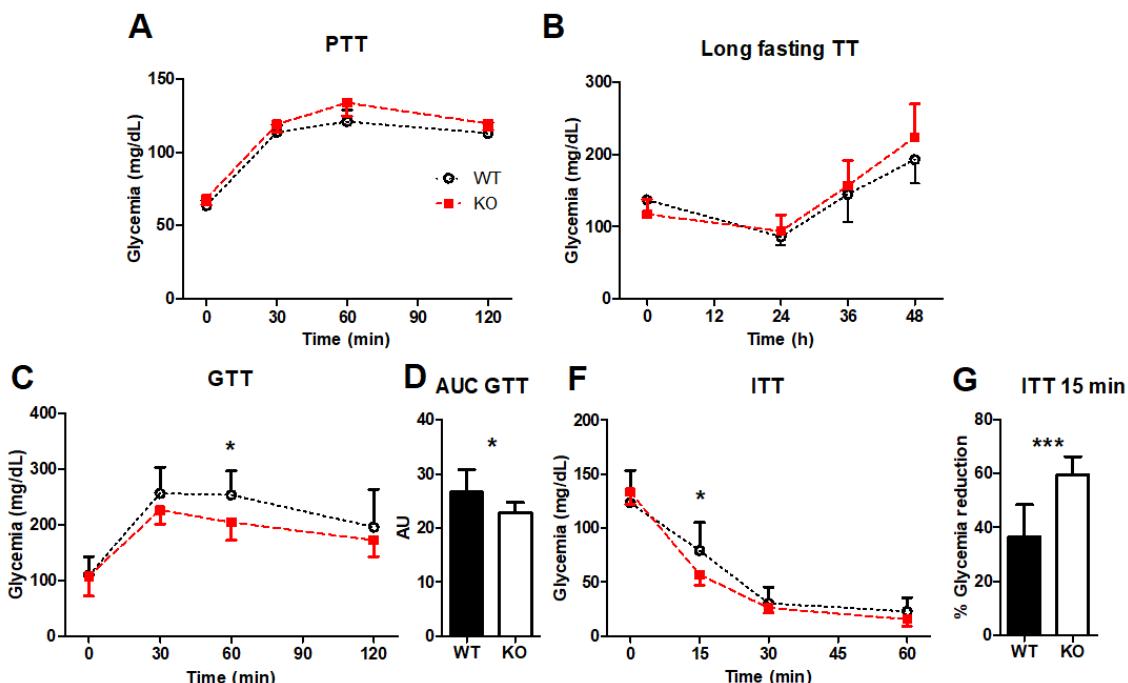


Figure 2. Tolerance tests on *Txndc5*-deficient mice. Pyruvate (A), glucose follow-up along prolonged fasting (B), oral glucose (C) and insulin (E) tolerance tests in male adult *Txndc5*-deficient mice (KO) and wild type (n=6) used as control group. Area under the curve of GTT (D) was calculated with no curve fitting taking baseline 0. Percentages of glycaemia reduction at 15 minutes were plot using ITT data (F). Data are means \pm SD for each group. Statistical analyses were done according to Mann–Whitney's U-test and *, p value < 0.05; ***, p value < 0.005 vs WT.

3.3 High fat and high sucrose diet (HFHSD) on insulin sensitivity in *Txndc5*-deficient mice

Obesity is associated with metabolic dysfunction, including insulin resistance and hyperinsulinemia, something that has been reproduced in mice using high fat and high sucrose diets (HFHSD) (Burchfield et al., 2018). To address to which extent this phenotype was influenced by TXNDC5 absence, mice were

Resultados

administered a HFHSD. No difference in body weight were observed in both sexes by the loss of TXNDC5 (Fig S2). When GTT was carried out after 2 weeks on this diet, *Txndc5*-deficient mice responded better than wild type, having a consistent reduction after 30 minutes of oral glucose administration as well as a significant lower area under the curve (Figure 3A-B). However, at 4 weeks of HFHSD, ITT showed no changes between groups as it may expected due to the insulin resistance caused by this diet (Figure 3 C-D). In female, no difference was observed in GTT (Fig S3A) in agreement with the results on chow diet; when ITT was performed, contrary to males, no insulin resistance was observed in both groups and no significant difference by absence of TXNDC5 (Fig S3B), emphasizing how insulin resistance is influenced by sex.

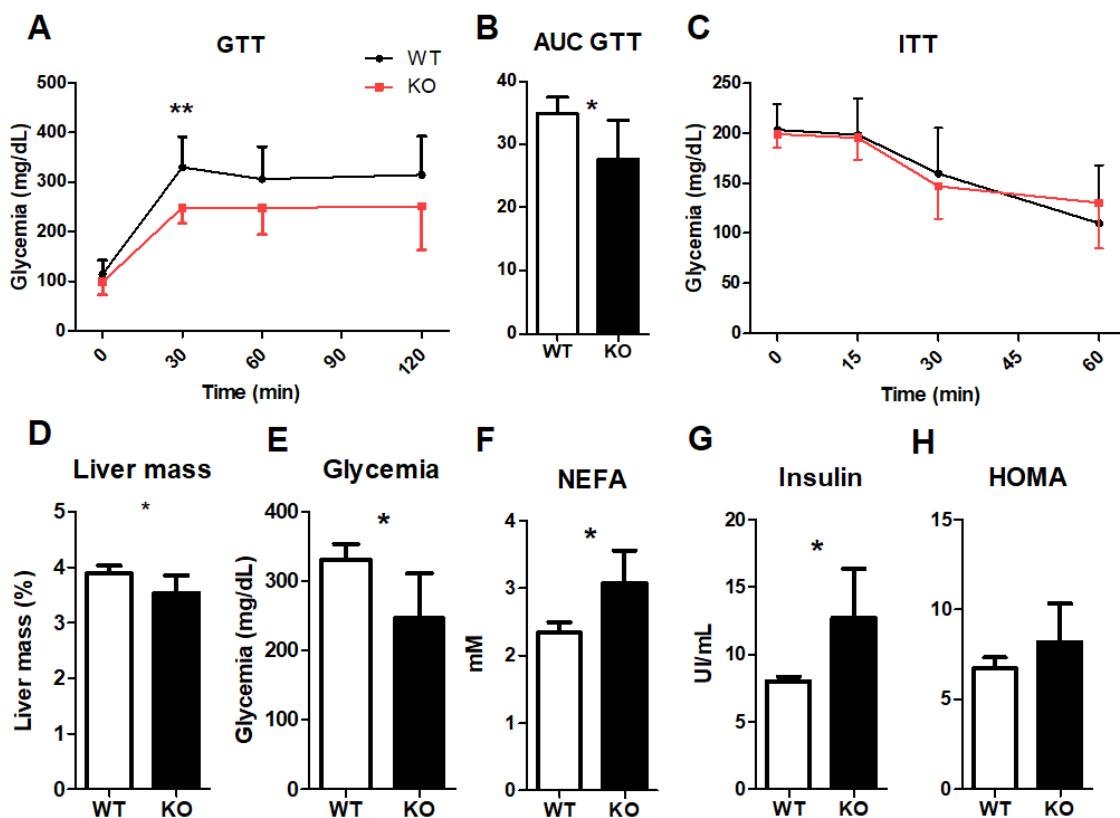


Figure 3. Tolerance test and plasma parameters of male *Txndc5*-deficient mice on a high fat and high sucrose diet. Oral glucose tolerance test (A), area under the curve of GTT (B), insulin tolerance test (C). Liver mass (D), plasma glucose (E), NEFA (F) and insulin (G) were measured after 16-hour fasting prior to sacrifice. Calculated HOMA (J). Data are means \pm SD for each group ($n= 6$ and $n = 7$ for WT and KO, respectively). Statistical analyses were done according to Mann–Whitney's U-test and *, p value < 0.05; **, p value < 0.01 vs WT.

Surprisingly, WT male mice had a higher liver mass (Figure 3D) in contrast with the chow diet. After 16-hour fasting, male plasma parameters were

Resultados

measured. Compared to chow diet (Fig 1A), this HFHSD induced fasting hyperglycaemia that was significantly lower in TXNDC5-KO mice. The latter also showed a significant increase in non-esterified fatty acids (Figure 3E-F), in agreement with the previous results in males receiving the purified chow diet. Plasma insulin showed an expected significant increase in TXNDC5-KO mice (Fig 3G), which may explain the lower levels of glycaemia but contradicting *in vitro* experiments carried out in β -pancreatic cell lines [285,304]. Calculated HOMA was slightly but not significantly increased in the absence of TXNDC5 (Fig 3H). No changes were observed in liver mass and glycaemia in females, nor in plasma triglycerides and cholesterol in both sexes (Table S3).

3.4 Genes implicated in glucose metabolism in liver

The liver is an essential organ for the control of glucose homeostasis, storing the excess of glucose after food intake in form of glycogen and releasing glucose by regulation of glycogenolysis or gluconeogenesis during fasting [305]. Although HOMA has not revealed significant changes in both diets, the fact that under chow or HFHDS diets the absence of TXNDC5 clearly modifies fasting glycaemia and insulin sensitivity in ITT requires a further molecular insight. Protein concentrations of both insulin receptor (INSR) subunits were determined by Western blot in the liver (Figure 4 A-C). No significant changes were observed when using total liver homogenates. However, in the plasma membrane-enriched fractions (Figure 4 D-F), a higher amount of both subunits was found in the TXNDDC5-KO livers which may explain the higher insulin sensitivity.

Using a RNAseq dataset (GSE185515) of a previous manuscript [296], genes involved in glucose metabolism were searched to elucidate the how TXNDC5 might influence them. Three genes were found to have potential differential expressions and were verify by RT-qPCR: *Irs2*, *Igfbp1* and *G6pc* along with *Insr*, all these genes except *Insr* displayed a significant higher number of transcripts in the liver by absence of TXNDC5 (Figure 4 G-J).

Resultados

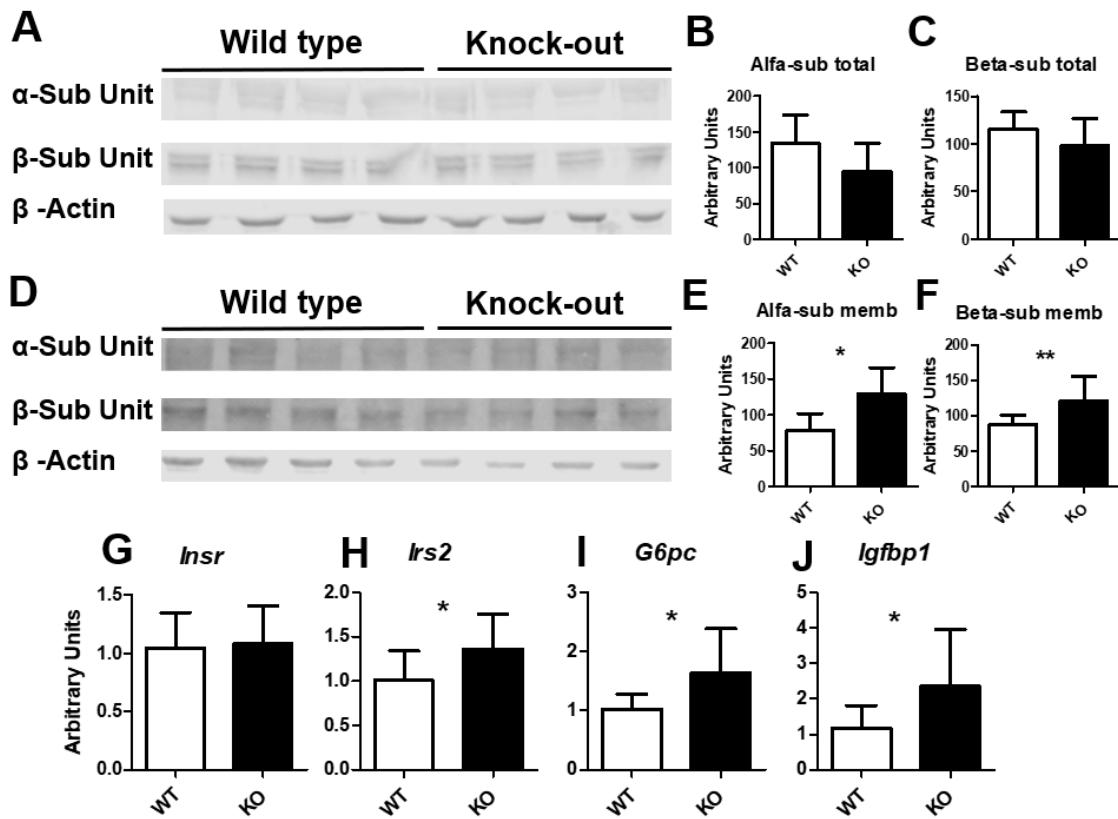


Figure 4. Hepatic expression of insulin receptor and associated genes in mice receiving a chow diet. A Representative Western blots of insulin receptor subunits in whole homogenate. Quantification of intensity bands for alpha subunit (B) at 135 kDa and beta subunit (C) at 90 kDa. (D) Representative Western blots of plasma membrane insulin receptor subunits. Quantification of intensity bands for alpha subunit (E) at 135 kDa and beta subunit (F) at 90 kDa (n=4). Hepatic mRNA expressions of *Insr* (G), *Irs2* (H), *G6pc* (I) and *Igfbp1* (J) (n=10 and n=13 for WT and KO, respectively). Data are means \pm SD for each group. Statistical analyses were done according to Mann-Whitney's U-test and *, p value < 0.05; **, p value < 0.01 vs WT.

3.5-In vitro analysis of insulin sensitivity

To address how the lack of TXNDC5 might influence the insulin sensitivity *in vitro*, a hepatic murine TXNDC5-KO AML12 cell line was generated using CRISPR-Cas9 [205]. Several articles has been described the absence of TXNDC5 with a slow proliferation and more susceptible to oxidative stress and apoptosis As previously described [250,253,286]. In concordance, *Txndc5*-deficient AML12 had a slower growth under several glucose media, including low glucose and low insulin, displaying no influence of insulin on this aspect (Supplementary Figure 4A-C). Moreover, oxidative resistance was tested, showing an expected reduced tolerance by the lack of the TXNDC5 (Supplementary Figure 4D).

Resultados

Glucose uptake (GU) following insulin was assayed, only the *Txndc5*-deficient cell line was sensitive to insulin with an increase in glucose (Fig 5A). Hepatic GLUT2 transporter, in contrast with muscle and fat GLUT4, is not translocated into the membrane upon insulin presence, being constitutive expressed and glucose is retained into the hepatocyte by its phosphorylation [306]. However, insulin swift the glucose phosphorylation-to-dephosphorylation ratio [307]. In this regard, the increased uptake in hepatic glucose in KO cells would support the increased transduced signal of insulin observed in our previous experiments. Isoproterenol activates lipolysis [308,309], to address how the signal is translated, cells were treated with isoproterenol after incubation with radioactively labelled palmitic acid. A higher lipolysis rate was observed in the absence of TXNDC5 (Figure 5B), suggesting a higher sensitivity to this agent similar to that previously observed with insulin in other experiments.

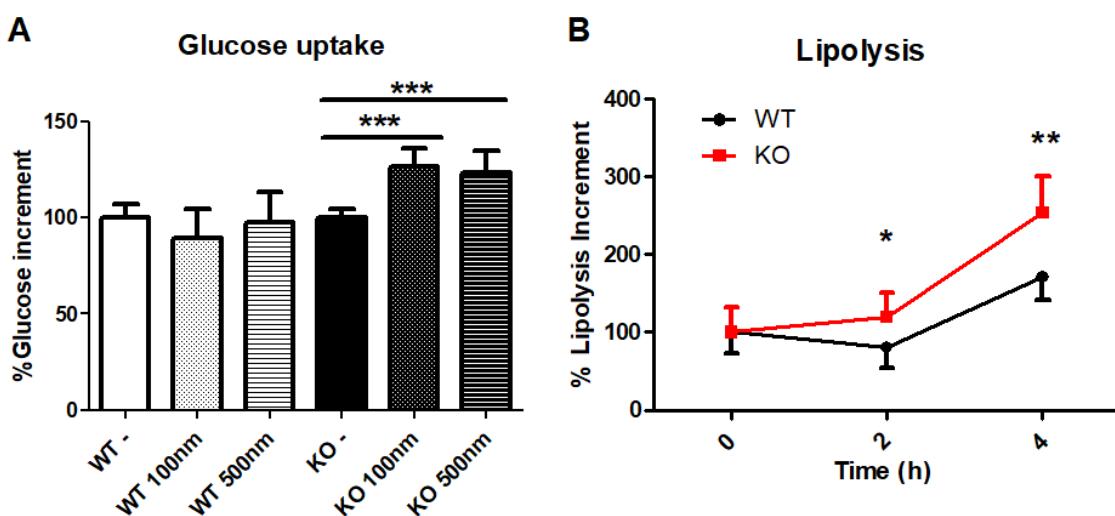


Figure 5. *In vitro* influence of TXNDC5 on the sensitivity to insulin and isoproterenol. (A) Glucose uptake assay were determined by adding 2-deoxy-d-[3H] glucose to cell media and cells were incubated in the presence or absence of 100 nm insulin for 1 h. B Lipolysis assay was performed measuring fatty acid release from 9,10-[3H] palmitate in cellular supernatant after 2 and 4-h incubation with isoproterenol. Counts were normalized to protein content in panel (A) or TG in panel (B). Data are means \pm SD for each group ($n= 6$). Statistical analyses were done according to Mann-Whitney's U-test and *, p value < 0.05; **, p value < 0.01 vs WT.

4. Discussion

The aims of the present study were to characterize the glucose metabolism and insulin sensitivity in the absence of TXNDC5 in mice and to pinpoint involved cellular molecular mechanisms. Our results indicate that only TXNDC5-KO male mice exhibit a lower glycemia that correlated with a higher plasma NEFA levels

Resultados

on a chow diet. In this diet, mice were faced to several metabolic challenges. In this regard, notwithstanding no changes were observed in pyruvate and prolonged fasting tolerance tests, lower glycaemias were observed in KO males subjected to glucose and insulin tolerance tests. To address how glucose may influence insulin metabolism, a prediabetic high fat and high sucrose diet was administered, once again glycaemias were lower in KO males either following a 16-hour fasting regime or after challenging them using both glucose and insulin tolerance tests. In light of these findings, hepatic insulin receptor analyses showed increased levels in plasma membranes of TXNDC5-KO male despite no changes in total protein or RNA expression. Expressions of *Irs2*, *G6pc* and *Igfb1* genes related to glucose metabolism were found to be increased in KO livers. Using an engineered hepatic cell line lacking TXNDC5, glucose uptake was increased upon insulin stimulation in these KO cells, so was the response to the β adrenoceptor agonist, isoprenaline. Collectively, absence of TXNDC5 is translated into a sex-depend increased sensitivity to hepatic insulin action due to a preferential location of the insulin receptor on the plasma membrane.

The decreased glycaemia at 16-hour fasting only observed in males clearly indicates that the impact of TXNDC5 is different between both sexes. Remarkably, this effect was observed without changes in plasma insulin concentrations or HOMA. Furthermore, an increase in the plasma NEFA accompanied the metabolic picture. Another feature is that the effect was not observed on shorter periods of fasting (Table S1) so its impact requires prolonged fasting. These result contrast with previous work related to miss function of β -pancreatic cells in absence of TXNDC5 [285,304] but it is probable than harsher conditions may be required to explore the effect of this protein. However, the observed decreased glycaemia may induce the increment in fatty acid release by peripheral tissues, which may contribute to the metabolic unbalance observed regarding HDL metabolism [296].

The search for the role of TXNDC5 on the glucose homeostasis mechanisms required several tolerance tests to be carried out in males on chow diet. The absence of changes in pyruvate or prolonged fasting tests confirmed that gluconeogenesis was not impaired. The decreased glycaemia observed following glucose tolerance test (GTT) might indicate a higher glucose uptake or a less likely lower renal glucose re-absorption. A significant lower glycaemia was

Resultados

also noted in an insulin tolerance challenge. These combined results suggest that insulin induces a stronger or faster signal in the absence of TXNDC5 and this effect seems to be lower in females. Harsher conditions with a HFHSD were explored to test how a prediabetic diet could affect the insulin response. Despite the consumption of this diet, male *Txndc5*-deficient mice showed an improved response to glucose tolerance test and no changes in females, reproducing the pattern observed in mice consuming the chow diet. When ITT was performed, male mice almost did not react to insulin as supposed to be on a prediabetic diet, but females reacted with no difference between genotypes. This sex-dependent insulin resistance may be the cause why TXNDC5 induces changes only in males. After 16-hour fasting, glycaemia have consistently increased in comparison with the chow diet but it was still lower in the absence of TXNDC5 with the significant increase in NEFA. However, in contradiction with previous articles that attribute to TXNDC5 a role in the insulin folding [258], higher concentrations of insulin were found in KO male mice consuming this HFHSD. The fact that lacking TXNDC5 provides glucose tolerance is a novel role for this protein and how *in vivo* insulin is being folded, secreted and exerts its action needs further studies.

This increased insulin sensitivity led to quantify hepatic insulin receptor (INSR) levels that showed no change in total homogenates but a surprising significant increase in plasma membranes of TXNDC5-KO. Hepatic INSR is believed not to be internalized following phosphorylation contrary to in other tissues [310] but shows a spatial preference in activating its downstream signaling by initiating the PI3K/AKT pathways on the plasma membrane [311]. Its action terminates when INSR is internalized via endocytosis where recruits targets including IRSs and activate the Ras/Raf/MEK/ERK pathway [311]. A higher INSR on plasma membrane may be due to an impaired exosome trafficking [311], which could exert a prolonged insulin response that correlates with the lower glycaemia observed on ITT and GTT.

No change was found in *Insr* mRNA levels, but a higher expression of *Irs2*, *G6pc* and *Igfbp1* were observed in male *Txndc5*-deficient livers. IRS2, insulin receptor substrate 2, is, along with IRS1, the substrate for transduction signal of INSR, activating the PI3K pathway [312]. IRS2 signaling dominates over IRS1 in the period directly after food intake and during long fasting more associated

Resultados

with hepatic lipid metabolism during fasting as the deletion of hepatic *Irs2* resulted in mild fasting hyperglycemia [313–315]. Increased *Irs2* expression may be due to the fasting period as acute phase genes were upregulated in same animal model [296], leading to this slight hypoglycemia observed at 16-hour fasting. A higher *Irs2* may also contribute to the higher response in lowering the glycaemia in GTT. Glucose-6-phosphatase, *G6pc*, is an integral membrane protein of ER, which catalyzes the final step of gluconeogenesis and glycogenolysis, releasing glucose from the liver to plasma [316]. Insulin inhibits this enzyme, in contradiction with our previous results; however, as we did not observe changes in long fasting glycaemia, late expression of gluconeogenesis genes might explain how glycaemia was restored [317]. For last, insulin grow factor-binding protein (IGFBP) regulates IGF signaling, through binding to IGF1R receptor with equal or greater affinity than IGFs [318]. Likewise, IGFs display structural homology to insulin that they can also interact with INSR, being an important function of circulating IGFBPs to prevent this potential interaction as high concentrations of insulin grow factors in serum can cause hypoglycemic effects. Interestingly, IGFBP-1 was also found increased in synovial fibroblast when TXNDC5 was absence [192]. Hepatic IGFBP-1 expression is highly induced by starvation, hypoxia, stress and proinflammatory cytokines such as IL-1 β but reduced by insulin [318]. IGF-1 reduce non-esterified fatty acid (NEFA) release in adipocytes by inhibiting the action of growth hormone as well as reduced NEFA oxidation in liver [319]. Higher IGFBP-1 levels may sequester IGF-1, explaining the high NEFA plasma concentration observed in TXNDC5-KO animals. All of the changes in *Irs2*, *G6pc* and *Igfbp1* were significantly and negatively correlated with the glycaemia (Fig S5), pointing out to a possible connection as previously commented.

In the hepatic cell line, the influence of insulin on glucose uptake showed that TXNDC5-KO cell line significantly up took more glucose, reproducing the previous *in vivo* findings. A non-selective β -adrenoceptor agonist, isoproterenol, also tested in the cell line, induced a stronger lipolysis signal when TXNDC5 was absent. Isoproterenol action is similar to glucagon [320], assuming this *in vitro* finding could have taken place *in vivo*, an enhanced transduction might have activated an early glycogenolysis which could explain the lower glycemia and increased *Irs2* and *G6pc* expressions in absence of TXNDC5.

Resultados

In summary, these results point out to a sex-depend facilitated insulin sensitivity depending on TXNDC5 in relation to lowering glycaemia. A higher INSR in hepatic plasma membranes may explain why the increased insulin signal in TXNDC5-deficient mice and suggest an impaired mechanism of vesicle trafficking to be explored. Contrary to other reports, the absence of TXNDC5 helped to maintain glycaemia in a prediabetes stage with a surprising increase in insulin plasma levels. Furthermore, increased *Irs2* could also help to modulate insulin signal. For last, an augment of plasma non-esterified fatty acids was found in KO mice, significantly correlated with glycaemia in which the increased *Igfbp-1* could be playing a role. Our results emphasize the strongest response of insulin in which INSR may be the key to understand the molecular mechanisms involved, but more experiments are warranted to understand the emerging new hypotheses.

Acknowledgments:

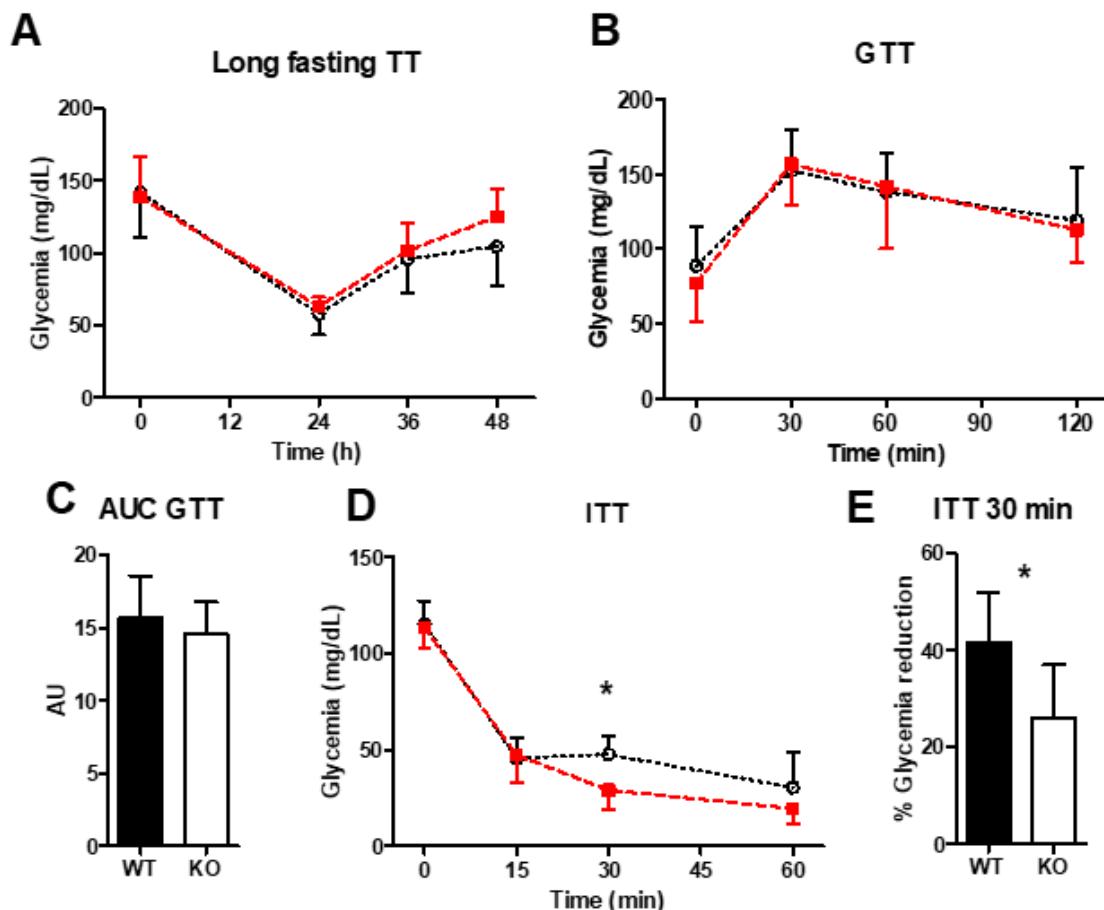
We thank Jose Luis Pitarch, Cristian Alvarez, Silvia Garcés and M^a Pilar Liereta for their help in maintaining the animals. This research was supported by grants (CIBEROBN, CB06/03/1012, 1 January 2008) from CIBER *Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición* as initiative of FEDER-ISCIII, *Ministerio de Ciencia e Innovación-Fondo Europeo de Desarrollo Regional* (PID2019-104915RB-I00, 1 June 2020) and *Fondo Social Europeo-Gobierno de Aragón* (B16_20R, 26 March 2020). S.H.B. was recipient of a joint fellowship from the Universities of Zaragoza and Pau and J.S.-M. was recipient of a *Fundación Cuenca Villoro* fellowship.

Conflicts of Interest:

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

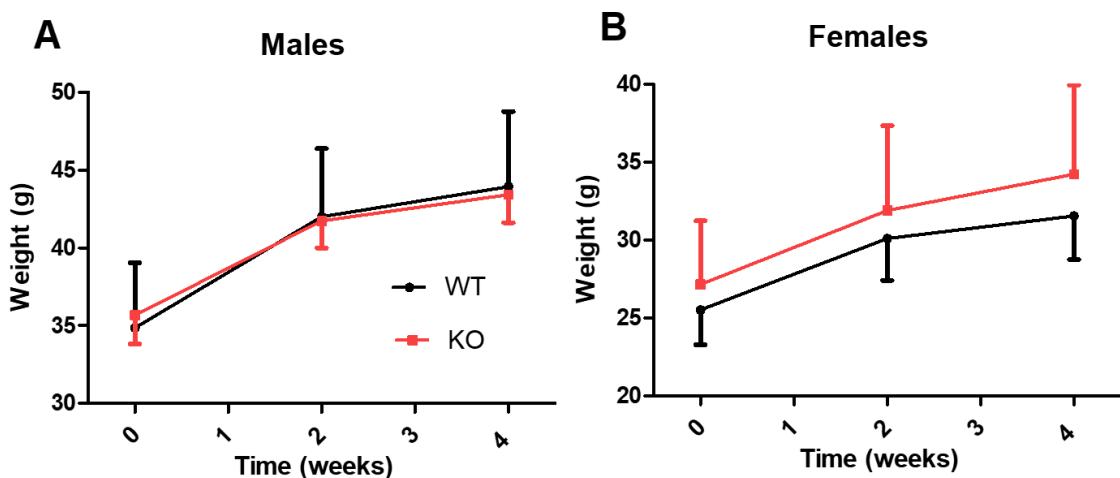
Resultados

Supplemental Figures

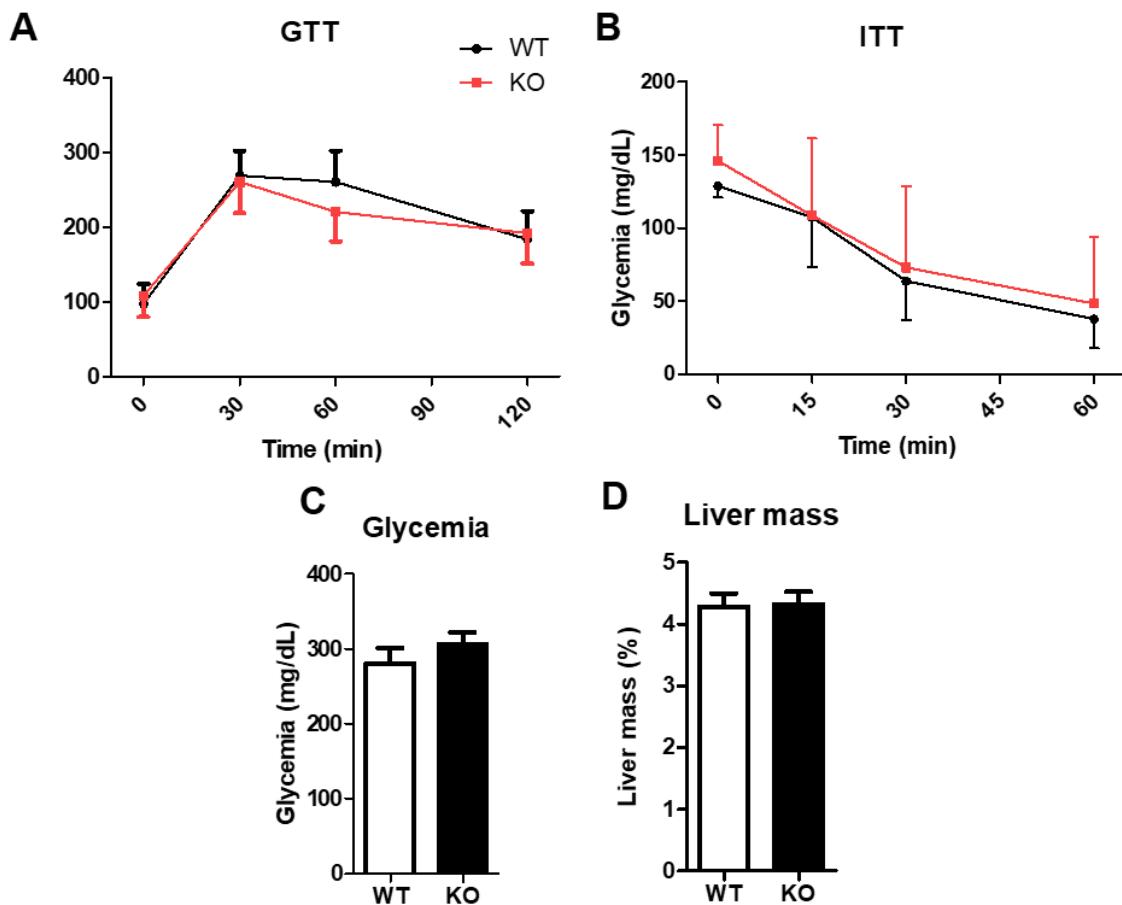


Supplemental figure 1. Tolerance tests on *Txndc5*-deficient mice. Glucose follow-up along prolonged fasting (A), oral glucose (B) and insulin (D) tolerance tests in adult *Txndc5*-deficient mice (KO) and wild type (n=6) used as control group. Area under the curve of GTT (C) was calculated with no curve fitting taking baseline 0. Reduction of glycemia under 15 minutes were plot using ITT data (E). Data are means \pm SD for each group. Statistical analyses were done according to Mann–Whitney's U-test and *, p value < 0.05 vs WT.

Resultados

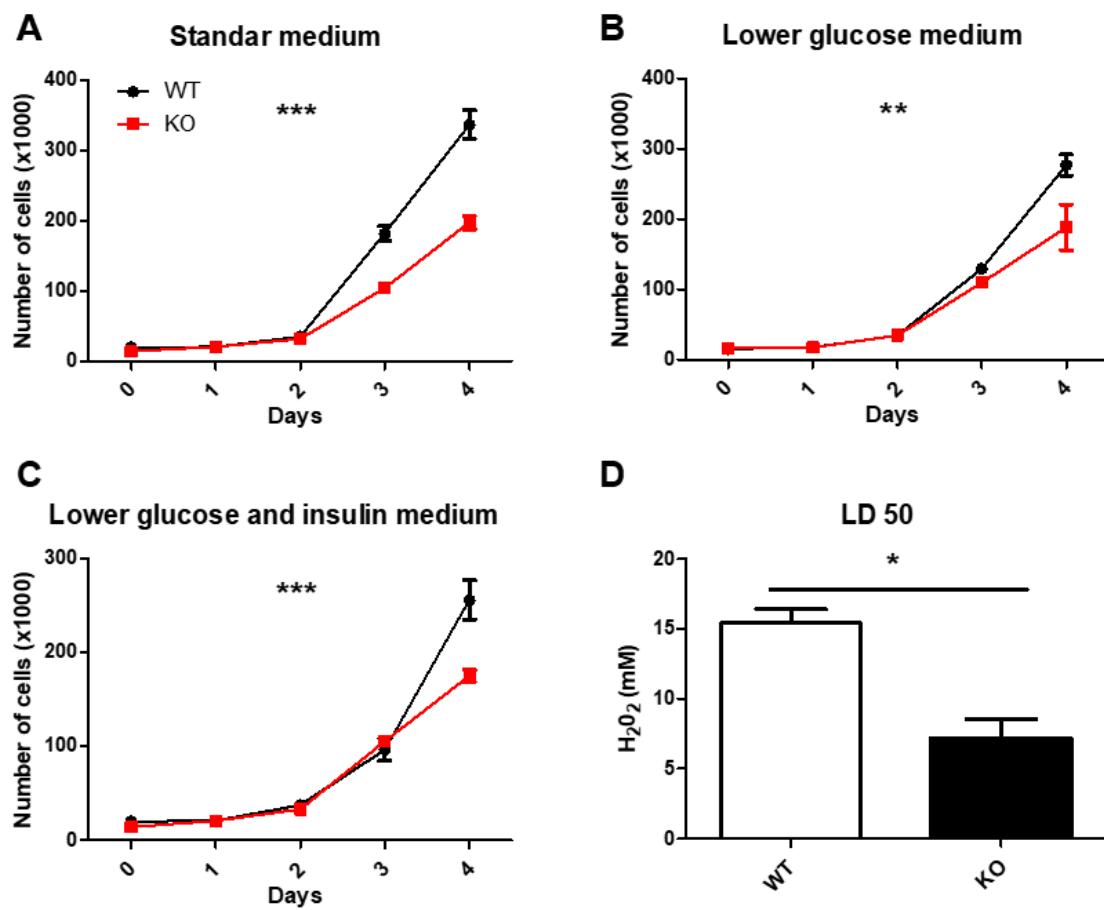


Supplemental figure 2. Weight evolution under high fat and high sucrose diet. Mice were fed during 4 weeks on males (A) and females (B) in adult *Txndc5*-deficient mice (KO) and wild type (n=6) used as control group. Data are means \pm SD for each group. Statistical analyses were done according to Mann–Whitney’s U-test



Supplemental figure 3. Tolerance test and plasma parameters of female *Txndc5*-deficient mice under a high fat and high sucrose diet. Oral glucose tolerance test (A), insulin tolerance test (B). Liver mass (C) and plasma glucose (D) were measured prior 16 hours fasting. Data are means \pm SD for each group (n = 6 and n = 7, respectively for WT and KO). Statistical analyses were done according to Mann–Whitney’s U-test and *, p value < 0.05 vs WT.

Resultados



Supplemental figure 4: Characterization of *Txndc5*-deficient AML12 cell line. (A-C) Growth curve of AML12 under several cell culture mediums. (D) Lethal dose 50 under a treatment of 30 minutes with hydrogen peroxide. Data are means \pm SD for each group (n= 4). Statistical analyses were done by Kruskal-Wallis ANOVA and Mann-Whitney's U-test as post-hoc comparisons. *, P<0.05 and ***, P<0.001

Resultados

Supplemental Tables:

Supplementary Table 1. Characteristics of murine primers used in RT-qPCR assays following MIQE guidelines

Gene symbol	Accession	Sequence	Amplicon length	Junction	[Primer]	Efficiency
<i>G6pc1</i>	NM_008061.4	Sense: AGACTCCCAGGACTGGTTCA Antisense: GTCCAGGACCCACCAATACG	199	Exon 1/2	100 nM	109%
<i>Igfbp1</i>	NM_008341.4	Sense: TCGCCGACCTCAAGAAATGG Antisense: CCATGGGTAGACACACCAGC	206	Exon 5/6	100 nM	106%
<i>Insr</i>	NM_001330056.1	Sense: CTGTGTCTCCCGGAAGCATT Antisense: TGGCAATATTGATGGGACATCT	173	Exon 13/14	200 nM	102 %
<i>Irs2</i>	NM_001081212.2	Sense: TGAAGGAAGGCCACAGTCGTG Antisense: GTTGGTCGGAACATGCCAA	142	Exon 2/3	200 nM	96 %
<i>Ppib</i>	NM_011149	Sense: GGAGATGGCACAGGAGGAA Antisense: GTAGTGCTTCAGCTTGAAGTTCTCAT	72	Exon 3/4	100 nM	98%
<i>Txndc5</i>	NM_145367.4	Sense: CAGGCTTGTCAAGATGTCACCAT Antisense: TAACCTCGTACCGAGTACTTGCTG	82	Exon 8/9	200 nM	100%

Resultados

Supplemental Table 2. Plasma parameters at 6-hour fasting.

	Males		Females	
	Wildtype (n= 13)	Knock-out (n= 10)	Wildtype (n= 5)	Knock-out (n= 14)
Tg (mM)	1 ± 0,2	1 ± 0,1	0,8 ± 0,2	0,8 ± 0,2
Cholesterol (mM)	2,7 ± 0,4	2,9 ± 0,3	1,9 ± 0,2	1,9 ± 0,3
Glucose (mg/dL)	194 ± 33	196 ± 32	151 ± 13	153 ± 38

Mice were 4 weeks on a chow diet and fasted 6 hours prior sampling. Data are means ± SD for each group. Statistical analyses were done according to Mann–Whitney's U-test.

Supplemental Table 3. Plasma parameters at 16-hour fasting.

	Males		Females	
	Wildtype (n= 13)	Knock-out (n= 10)	Wildtype (n= 5)	Knock-out (n= 14)
Tg (mM)	1,8 ± 0,3	2 ± 0,5	1,1 ± 0,3	1,2 ± 0,2
Cholesterol (mM)	2,7 ± 0,4	3 ± 0,2	2,3 ± 0,5	2,1 ± 0,4
Glucose (mg/dL)	-	-	129 ± 38	130 ± 41
NEFA (mM)	-	-	1,6 ± 0,2	1,6 ± 0,2

Mice were 4 weeks on a chow diet and fasted 16 hours prior sampling. Data are means ± SD for each group. Statistical analyses were done according to Mann–Whitney's U-test.

Resultados

Supplemental Table 4. Plasma parameters at 16-hour fasting under HFHDS for 4 weeks.

	Males		Females	
	Wildtype (n= 6)	Knock-out (n= 6)	Wildtype (n= 6)	Knock-out (n= 6)
	Tg (mM)	0,6 ± 0,1	0,6 ± 0,2	0,4 ± 0,1
Cholesterol (mM)	5 ± 0,3	4,9 ± 1	2,8 ± 0,5	3,2 ± 0,5

Mice were 4 weeks on a HFDHS diet and fasted 16 hours prior sampling. Data are means ± SD for each group. Statistical analyses were done according to Mann–Whitney's U-test.

V.3 Thioredoxin domain containing 5 is involved in the hepatic storage of squalene into lipid droplets in a sex-specific way

A b s t r a c t

Hepatic thioredoxin domain-containing 5 (TXNDC5) is a member of the protein disulfide isomerase family found associated with anti-steatotic properties of squalene and located in the endoplasmic reticulum and in lipid droplets. Considering that the latter are involved into hepatic squalene accumulation, the present research was aimed to investigate the role of TXNDC5 on hepatic squalene management in the mouse and AML12 hepatic cell line. Wild-type and TXNDC5-deficient (KO) were fed Western diets with or without 1% squalene supplementation for 6 weeks. In males, but not in females, absence of TXNDC5 blocked hepatic, but not duodenal, squalene accumulation. Hepatic lipid droplets were prepared and characterized using label-free LC-MS/MS analysis. TXNDC5 accumulated in this subcellular compartment of mice receiving squalene and was absent in TXNDC5-KO mice. The latter mice were unable to store squalene in lipid droplets. A search of proteins involved in the squalene response in all conditions identified ALDH1L1, FH, ADK, AGMAT, CALR and APMAP. CALR, APMAP associated with lipid droplets in presence of squalene and this fact was influenced by TXNDC5. The increased squalene content was reproduced *in vitro* using AML12 cells incubated with squalene-loaded nanoparticles and this effect was not observed in an engineered cell line lacking TXNDC5. In conclusion, squalene accumulation in hepatic lipid droplets is sex-dependent on TXNDC5.

Keywords:

Olive oil; liver; squalene; TXNDC5; lipid droplets

Abbreviations: ER, endoplasmic reticulum; LD, lipid droplets; TG, triacylglycerol; TXNDC5, thioredoxin domain containing 5,

1. Introduction

The Mediterranean diet has been associated with a wide range of benefits on cardiovascular health and its associated pathologies such as diabetes, dyslipidaemia, hypertension, metabolic syndrome and obesity. It has also been associated with lower incidence of neurodegenerative disorders, particularly Alzheimer's disease [5] and may positively influence all-age-related diseases and longevity [321]. This dietary pattern consists of varied plant-based food sources such as fruits, vegetables, virgin olive oil and nuts [6]. In fact, virgin olive oil, its main source of fat, has been associated with a reduced risk of general and cause-specific mortality as well [4]. Virgin olive oil, as a fruit juice, is a complex mixture of monounsaturated fatty acid-containing triglycerides containing other biologically active substances named minor components and encompassing chemical categories such as hydrocarbons, terpenes, phytosterols and phenolic compounds [322]. The biological effects of the minor components have lately been the focus of attention [198,323,324].

Hydrocarbons account for about 50% of the unsaponifiable fraction of virgin olive oil representing squalene almost a 90% of the hydrocarbons [325]. Characterized as an isoprenoid, squalene is an intermediary in the plant biosynthesis of phytosterols and terpenes and animal cholesterol [198]. This isoprenoid has shown antioxidant [326], anti-inflammatory [327], anti-atherosclerotic [7] and tumor-protective properties [328]. Our group found that a high squalene dose decreased hepatic fat content in a sex-dependent manner [7] and that modified the hepatic mitochondrial and microsomal proteomes [8,329] of *Apoe*-deficient mice on a chow diet. Using this experimental model on a Western diet, administration of squalene resulted in a decrease in hepatic triglycerides in males, but not in females [204]. Squalene was found to be accumulated in lipid droplets depending on animal model [203].

Lipid droplets (LDs) are cytoplasmic organelles characterized by a neutral lipid core of triacylglycerol (TG), cholesteryl ester and retinyl ester surrounded by a monolayer of phospholipids, non-esterified cholesterol and associated proteins. They are involved in lipid metabolism, signal transduction, protein storage and lipid trafficking [for reviews see [330,331]] and play a pivotal role in the lipid accumulation

during fatty liver diseases [1,332]. Taking into consideration that they are involved in squalene accumulation [203], they may undergo proteome changes in the liver. Furthermore, thioredoxin domain-containing 5 (TXNDC5) levels had been found associated with anti-steatotic properties of squalene [8]. TXNDC5, located in the endoplasmic reticulum, is a member of the protein disulfide isomerase family [9] also present in lipid droplets [333]. Thus, its deficiency may also influence the loading of squalene into them. To address these hypotheses regarding the action of dietary squalene and gain more insight into the involved mechanisms, dietary squalene supplementation was carried out in wild-type (WT) and *Txndc5*-deficient (KO) mice of both sexes fed a Western diet. Hepatic LD were prepared and their proteomic changes investigated using gel-LC-MS/MS analysis. In order to distinguish the solely squalene administration effects, experiments were also performed in WT and *Txndc5*-KO hepatic cell lines.

2. Experimental procedures

2.1 Animals and diets

Two-month-old wild-type and *Txndc5*-deficient mice on C57BL/6J genetic background were generated by crossing heterozygous animals harboring a deletion of exon 3 of *Txndc5* gene and characterized as described [296]. They were housed in sterile filter-top cages on a 12-hour light/12-hour dark cycle at the *Centro de Investigación Biomédica de Aragón*. Mouse experiments were carried out in accordance with the EU Directive 2010/63 on the protection of animals used for scientific purposes, and the study protocol was approved by the Ethics Committee for Animal Research of the University of Zaragoza (PI35/18 and PI03/21).

Four groups ($n= 6$ or 7) for each sex were established: wild-type and *Txndc5*-deficient mice received a purified Western diet, and the same groups were on a purified 1% squalene-supplemented Western diet. All diets were prepared in our facilities, lyophilized, and stored at -20 °C until use. The composition of these diets had previously been described [204,263]. Mice had *ad libitum* access to food and water. Intake and body weights were monitored weekly. At the end of the 6-week dietary intervention, food was withdrawn for 16 hours, and the mice were weighed, suffocated in a CO₂ chamber and sacrificed. Blood samples were drawn by cardiac

puncture, centrifuged at 3000g for 10 minutes to obtain plasma or serum. The livers were obtained and excised; most of the pieces were frozen in liquid N₂ and stored at -80 °C until processing, except an aliquot, which was stored in buffered formaldehyde.

2.2 Preparation of lipid droplets

They were prepared according to the protocol of Ontko et al. [334]. Briefly, pooled livers of two mice (200 mg), three preparations per experimental condition, were homogenized in 3 ml of 65% sucrose solution with protease inhibitor cocktail (Roche, Mannheim, Germany) at 4 °C. Discontinuous sucrose gradients were prepared as follows: 3 ml of liver homogenates in 65% sucrose were pipetted at the bottom of the centrifuge tubes kept on an ice bath. Then 2 ml of 60% sucrose solution were slowly added, followed by 2 ml of 52% sucrose, 2 ml of 44% sucrose and 2 ml of distilled water. The tubes containing gradients were centrifuged at 25,000 ×g for 30 min at 4 °C and the bands containing the different lipid droplets were collected and refloated on a fresh gradient. The purified bands were collected, an aliquot was saved, and the rest mixed with 3 volumes of acetone and kept at -80°C for 10 min and then at -20 °C overnight. The tubes were centrifuged at 15,000 ×g for 15 min at 4 °C. The pellets were washed three times, firstly with acetone: diethyl ether 1:1 and then twice with diethyl ether. Dry pellets were resuspended in PBS containing 0.2% Triton X-100 and 10% glycerol and centrifuged 10 min at 15,000 ×g for in order to remove insoluble proteins. Protein concentrations were determined by BioRad dye binding assay (Hercules, CA, USA).

2.3 Sample preparation for mass spectrometry

The proteomic analysis was performed at the Proteomics Unit of Complutense University (Madrid, Spain). Protein samples (150 µg) were loaded onto a 10% SDS-PAGE gel, run until the loading dye reached the separating gel and visualized with G-250 coomassie blue protein stain (Merck, Darmstadt, Germany). Protein bands were excised for subsequent in gel digestion. Briefly, the proteins were reduced with 10 mM dithiothreitol at 56 °C for 30 min, and then alkylated with 25 mM iodacetamide for 20 min. Finally, proteins were digested with recombinant trypsin (ratio enzyme: protein 1:50, Roche, Mannheim, Germany) in 100 mM ammonium bicarbonate (pH

8.5) overnight at 37 °C. Tryptic peptides were extracted in two steps by incubating the gel pieces with 0.1% trifluoroacetic acid and 80% acetonitrile (ACN) for at least 30 min. A final extraction was performed using 100% ACN. The resulting extracts of each sample were combined, dried, dissolved in 2% ACN, 0.1% formic acid (FA) and frozen until analysis.

2.4 LC-MS/MS of lipid droplet proteins

Peptides were analyzed by nano-liquid chromatography (nano Easy-nLC 1000, Thermo Scientific, Bremen, Germany) coupled to a Q-Exactive HF high-resolution mass spectrometer (Thermo Scientific). Peptides were resolved using multi-dimensional capillary LC through an Acclaim PepMap column C18 100 (Thermo Scientific, #164567) connected to a PepMap™ 100 C18 (Thermo Scientific, #164534) with an integrated spray tip. Separation conditions were a flow rate of 250 nl/min and 160 min linear gradient from 0 to 45% v/v buffer A (0.1% FA in water) and buffer B (0.1% FA in ACN). Peptides were electrospray ionized with a voltage of 1.8 kV at 290 °C. The mass spectrometer operated in data-dependent acquisition mode and peptides were detected in full scan MS mode with a resolution of 60,000 and an m/z range of 350-1800 Da. The fifteen most intense multiply charged ions were sequentially fragmented by high collision dissociation with a normalized energy of 20%. MS/MS spectra were acquired in positive mode in an information dependent mode with a resolution of 30,000. Raw data were processed using Proteome Discoverer 2.4 (Thermo Scientific) with search engine MASCOT 2.6 (MatrixScience, London, UK) to identify peptides against contaminant database (247 sequences) and *Mus musculus* (strain C57BL/6J) proteome (UP000000589), downloaded from Uniprot (www.uniprot.org). Search parameters included a precursor mass tolerance of 10 ppm and a fragment mass tolerance of 0.02 Da, up to 2 skipped breakpoints allowed for trypsin hydrolysis, carbamidomethyl cysteine as a fixed modification and methionine oxidation, loss of methionine, or loss of methionine plus acetylation of the amino terminus as variable modifications. The relative extracted ion chromatograms (EICs) for each identified protein were filtered according to have at least one unique identified peptide and a false discovery rate (FDR) <0.01. Proteins with an observed EIC in

≤ 1 sample across all samples were removed. The normalized spectral abundance factor (NSAF) for each protein was calculated according to McIlwain et al. [239]. Adopting these criteria, the number of proteins and peptides identified, eliminating contaminants, in each of the samples is summarized in Supplementary Table 1. A complete description of the proteins with their NSAF can be found in Supplementary Table 2.

2.5 Mass spectrometry data analysis and network analysis

To simplify and reduce the number of proteins, a series of filters such as number of peptides, Mascot index indicating presence, percentage of coverage and Mascot score (Supplementary Figure 1) were applied. As result, 297 proteins were compared among the different conditions and only those experiencing a change expressed as \log_2 NSAF ratio <-1 or >1 were selected. Those chosen proteins were submitted to the Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes (STRING 11.5) website and their KEGG pathways and their networks generated using the high confidence view (score 0.900).

2.6 Western blotting and immunostaining of membranes

Hepatic homogenate or lipid droplet proteins (20 μ g) were loaded onto SDS-polyacrylamide gels, electrophoresed, transferred to PVDF membranes and blocked as previously described [265]. The primary antibodies, diluted in PBS buffer containing 2.5% BSA and 1% Tween 20, were added and the membranes were incubated 2 h at room temperature and then overnight at 4 °C. The following primary antibodies, with their working dilutions, were used: Rabbit polyclonal antibody against TXNDC5 (1:1,000, Proteintech #19834-1-AP, Manchester, UK), anti-CALR (1:1,000, Proteintech #10292-1-AP) and anti-APMAP (1:2,000, Proteintech #25953-1-AP). Equal loadings were confirmed by using a mouse monoclonal anti- β -ACTIN (1:2,000, Sigma #A5441, St Louis, MO, USA). Membranes were washed three times with a 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 (SA5-35571) or goat anti-mice IgG (H&L) DyLight 680 secondary antibody (SA5-35518), both from Thermo-scientific (Waltham, MA, USA), diluted 1:80,000. Images were captured using an Odyssey®Clx (LI-COR, Bad Homburg, Germany).

2.7 Histological analysis

The portion of the liver stored in formaldehyde was paraffin-embedded and sectioned. Sections were then stained with hematoxylin and eosin, scanned and scored for lipid droplet area, inflammation, necrosis, and fibrosis by trained histologists blinded to the experimental groups. The lipid droplet areas were estimated in sections with Adobe Photoshop CS3 (Adobe Inc. San Jose, CA, USA) and expressed as percentage of total liver section as previously described [7].

2.8 Hepatic lipids

Lipids were extracted and cholesterol and triglyceride measured as previously described [265] using Infinity Reagent kits from Thermo Scientific (Thermo Fisher Scientific Waltham, MA, USA).

2.9 Squalene quantification.

Squalene extraction and measurement were carried out as previously published (17).

2.10 RNA isolation and RT-qPCR analysis

Livers were homogenized using Tri Reagent from Ambion® (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) and total RNA was extracted using spin column kit Direct-zol™ RNA Miniprep (Zymo Research, Irvine, CA U.S.A), following the manufacturer's instructions. RNA was quantified by absorbance at A_{260/280} using Nanodrop Spectrophotometer (Thermo) and the ratio was greater than 1.75 as well as the ratio A_{260/230}. The integrity of the 28S and 18S ribosomal RNAs was verified by 1% agarose gel electrophoresis followed by ethidium bromide staining with a ratio 28S/18S greater than 2. Primer design (Supplementary Table 3), RT and cDNA synthesis was carried out as previously described [263]. ViiA7 Real-TIME PCR System (Life Technologies) was used, and relative amount of mRNA was calculated using the comparative 2^{-ΔΔCq} method and normalized to the reference *Ppib* expressions.

2.11 Cell culture

The wild-type murine hepatocyte cell (AML12) and a stable TXNDC5-knockout AML12 (29) cell line were 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% amphotericin B (1000 mg/mL; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), 1% penicillin (1000 U/ml; ThermoFisher Scientific), and 1% streptomycin (1000 mg/ml; ThermoFisher Scientific) in 25-cm² flasks (four replicates) for squalene extraction and in 6-well plate to RNA isolation (6 replicates). Medium was changed every two days. When cells reached 90–100%, the medium was removed, and cells were washed twice with phosphate buffered saline (PBS) prior to the addition of the serum-free media without amphotericin B containing 30 µM of squalene loaded in PLGA nanoparticles [205] and incubated for 72 h. In squalene epoxidase inhibitor experiments, cells were treated with 1 µM NB-598 or vehicle for 24 hours. Then, media were removed, washed 3 times with PBS and harvested with trypsin, and the cell pellet was measured prior to squalene extraction. To RNA extraction, media were removed and cells collected with Tri-reagent solution (Ambion), RNA isolation and cDNA synthesis were performed as above described. For microscopy, media were removed and cells were fixed and stained with Nile Red and Hoechst 33342 as described [205].

2.12 Statistics

Results are presented as means and their standard deviations. Data distribution was analyzed according to Shapiro–Wilk test, and homology of variance among groups using Bartlett's or Levene's tests. Parameters fitting both hypotheses were analyzed using one-Way ANOVA and Tukey's test as *post-hoc* comparisons. Non-parametric Kruskal–Wallis ANOVA followed by Dunn's multiple comparisons or Mann-Whitney's U test were used to compare the groups failing in any of the hypotheses. Association between variables was assessed by Spearman's

correlation coefficient (p). All calculations were performed using IBM SPSS version 25 software (IBM, Armonk, NY, USA) or GraphPad Prism 8 for Windows (GraphPad, S. Diego, CA, USA). A P value of less than 0.05 was considered statistically significant.

3. Results

3.1 Somatometric and histological analyses

In both sexes during the length of dietary intervention, the four experimental groups showed similar body weight gains (Supplementary Figure 2A and 2E). No statistically significant differences in the ratio of increase in body weight per g of solid intake (Supplementary Figure 2B and 2F) were observed, in females but a significant lower ratio was displayed by male mice lacking TXNDC5 compared to wild-type supplemented with squalene. In females, the body weight lost during the fasting prior to sacrifice (Supplementary Figure 2C and 2G) did not change. However, male TXNDC5-KO mice consuming squalene lost more weight than wild-type and TXNDC5-KO mice, suggesting a possible effect of squalene in the absence of TXNDC5. For last, the hepatic mass (Supplementary Figure 2D and 2H) was similar in all experimental groups in both sexes.

Male *Txndc5*-ko mice accumulated triglycerides and cholesterol in the liver when fed a low fat diet without changes in lipid droplet area [296]. The present report explores the influence of squalene incorporated into a Western diet in presence or absence of TXNDC5 in mice on C57BL/6J genetic background. In females, hepatic TG (Fig. 1A) did not undergo any significant change in the experimental groups, hepatic cholesterol did not change except for the significant decrease of TXNDC5-KO vs WT mice receiving squalene (Fig. 1B). Hepatic squalene content was increased in the groups receiving the diet supplemented with squalene (Fig. 1C) without differences upon the absence of TXNDC5 protein. Male WT mice receiving squalene showed a trend to increase hepatic TG levels (Fig. 1D), something that was not observed in TXNDC5-KO mice. Hepatic cholesterol significantly increased in WT mice receiving squalene and this effect was abolished in absence of TXNDC5 (Fig. 1E). When hepatic squalene content was analyzed, WT showed a significant increase when they consumed the squalene-supplemented diet (Fig. 1F).

Interestingly, TXNDC5-KO mice were not able to accumulate squalene in the liver. To reject an intestinal malabsorption of squalene, duodenal content was analyzed (Figure 1G) and no significant changes were observed by the influence of the TXNDC5 absence. Overall, there is a sexual dimorphism on the influence of TXNDC5 on the hepatic accumulation of squalene and this effect is particularly relevant in the males. Thus, histological analyses were tackled in this sex, and representative images of hepatic sections from male mice are depicted in Figure 2, panels A to D. Quantitative assessment of lipid droplet areas (Figure 2E) showed significantly decreased area occupied by lipid droplets in TXNDC5-KO compared to WT mice consuming squalene. These results are in agreement with those observed at the hepatic triglyceride content. In fact, a significant correlation between hepatic lipid droplet area and TG content was obtained in this experimental approach ($p=0.768$, $p<0.001$).

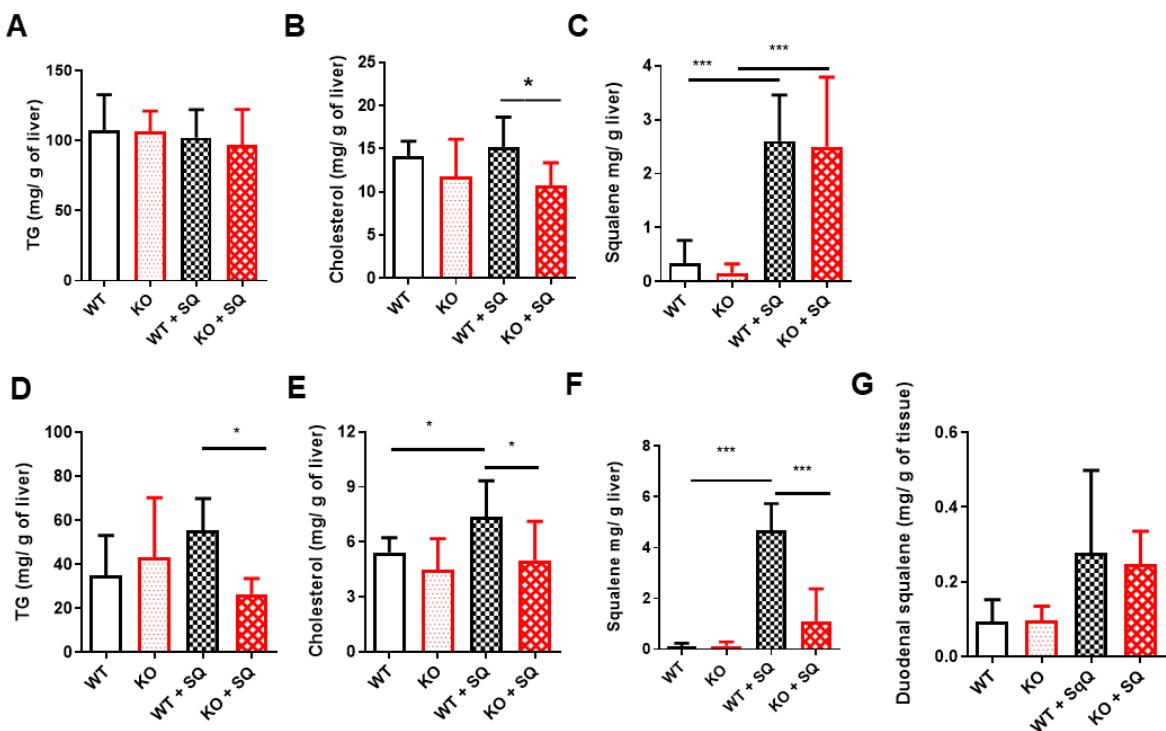


Figure 1. Lipid parameters in the experimental conditions according to sex. Top panels correspond to females and bottom to males. A and D, hepatic triglyceride; B and E, hepatic cholesterol; C and F, hepatic squalene and G, duodenal squalene contents. Results are shown as mean \pm SD. Statistical analyses were done by Kruskal-Wallis ANOVA and Mann-Whitney's U-test as post-hoc comparisons. *, $P<0.05$ and ***, $P<0.001$.

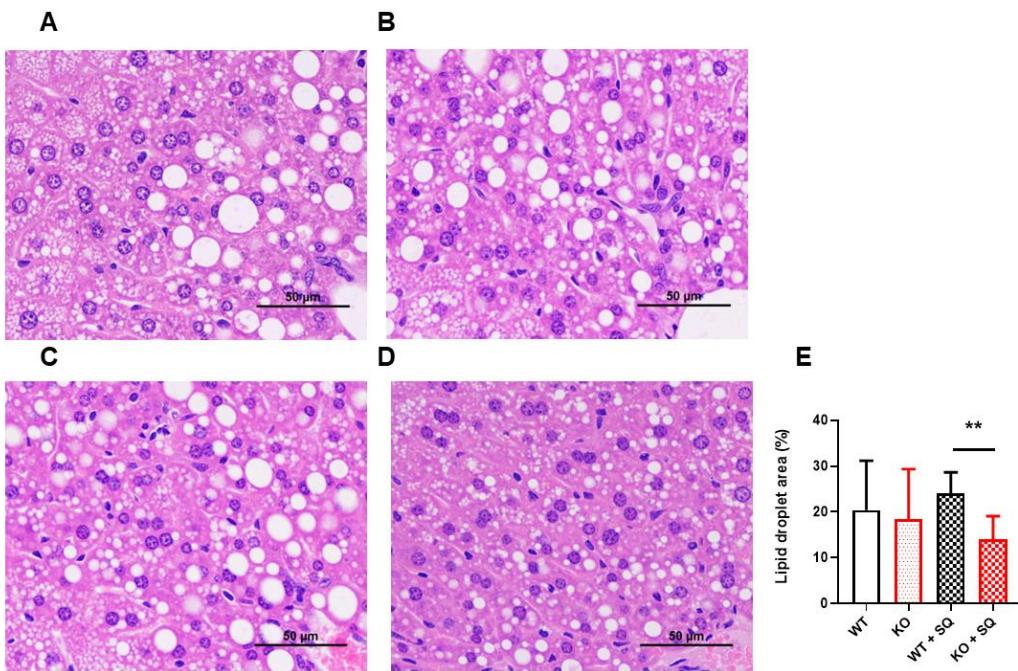


Figure 2. Hepatic histological analyses in male mice fed with different diets for six weeks. A, representative liver micrographs from wild-type (WT) mice receiving a purified Western diet; B, TXNDC5-knock-out (KO) mice fed the Western diet; C, images from WT mice receiving a purified 1%-squalene (SQ) enriched Western diet and D, TXNDC5-KO mice fed the purified 1%-squalene enriched Western diet. Liver sections from each animal were stained with hematoxylin and eosin and evaluated blindly. E, Morphometric difference in amount of lipid droplet area. Results are shown as mean \pm SD. Statistical analyses were done by one-way ANOVA and Mann-Whitney's- U test as post-hoc comparisons. **, P<0.01.

3.2 Preparation and characterization of LDs

Considering our previous results that squalene accumulated in lipid droplets (17) and the impact of TXNDC deletion on squalene accumulation in males, only hepatic LD from this sex were prepared and analyzed.

The results of LD-associated proteins obtained by gel-LC-MS/MS were used to generate a profile of their preparations. In Table 1 the abundance of different proteins normalized to that of monoacylglyceride lipase (MGLL) is compiled. According to the displayed results, the amounts of proteins considered to present into LDs (CES1D, CES1C, CES1F, CES3, RAB7, MGLL or PLIN2) [333] were similar among the different groups. Golgi and plasma proteins were minimally present, the same occurred for ER and mitochondria, although there were important differences depending on the considered marker. For instance, TXNDC5 was found in mice receiving squalene and was absent in the rest of groups. The cytosolic marker

(GAPDH) showed an important change between the WT group and the rest of groups. However, ATPCL was not detected in the prepared LD.

Using an aliquot of lipid droplet preparations, their lipids were also analyzed in the different groups. As shown in Figure 3A and B, lipid droplets of WT animals receiving squalene showed a trend to increase TG and cholesterol contents. Regarding squalene content (Figure 3C), the groups receiving the compound showed increased contents but mice lacking TXNDC5 showed a significant lower amount than the WT. These results agree with the changes observed in the hepatic homogenates.

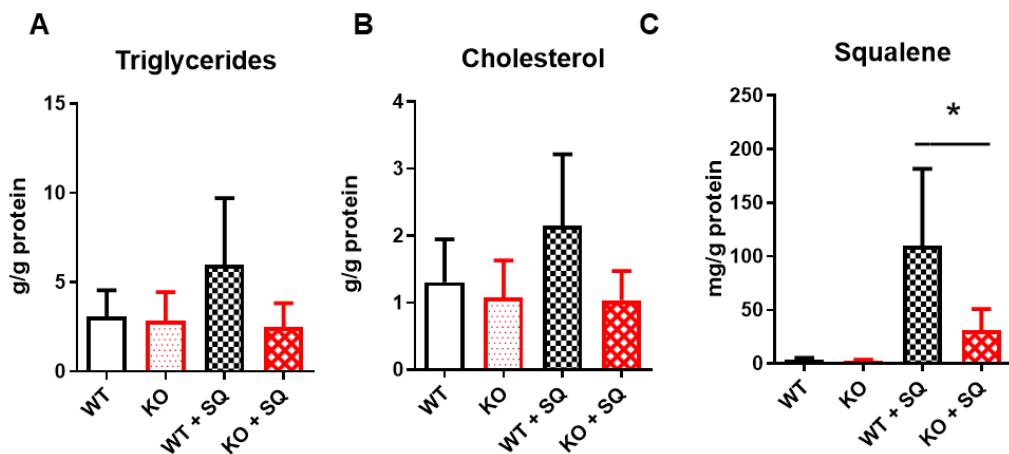


Figure 3. Lipid composition of hepatic lipid droplets in males. A, triglyceride; B, cholesterol and C, squalene contents. Results are shown as mean \pm SD. Statistical analyses were done by Kruskal-Wallis ANOVA and Mann-Whitney's U-test as post-hoc comparisons. *, P<0.05.

3.3 Hepatic LD-associated proteins in the different experimental conditions

The delipidated lipid droplets purified from the livers were analyzed by gel-LC-MS/MS and the data was refined as described in the Materials and Methods. According to this analysis, (Supplementary Table 1), 1326, 1699, 1871 and 1604 proteins were identified in the LDs isolated from WT, KO, WT + SQ and KO + SQ groups, respectively. As shown in Supplementary Figure 3, squalene administration had a profound impact on WT since 643 proteins changed vs squalene administration in KO mice, where only did 144. The absence of TXNDC5 was translated into 482 hits that squalene administration reduced to 85. To reduce the complexity, the algorithm depicted in Supplementary Figure 1 was adopted, and it resulted in 297 proteins to be compared among the different conditions. A

further refinement of selecting those showing \log_2 NSAF ratio between groups <-1 or >1 resulted that squalene administration changed 52 proteins in the WT. According to the pathway enrichment analyses (Figure 4A), these fitted into eight major categories: carbon metabolism, cytochrome P450, pathologies, chemical carcinogenesis, oxidative phosphorylation, thermogenesis, arginine biosynthesis and amino acid metabolism. They were grouped into five networks according to STRING (Figure 4B). The absence of TXNDC5 (Supplementary Figure 1) resulted in 44 proteins with modified expression belonging to categories: carbon metabolism, chemical carcinogenesis, amino acid metabolism, cytochrome P450 and organic and fatty acid metabolism (Figure 4C). They were categorized into seven networks according to STRING (Figure 4D). In absence of TXNDC5, squalene only modified 8 proteins (Supplementary Figure 1). A summary of common proteins modified by squalene in the different conditions resulted in six proteins as evidenced in Venn’s plot (Supplementary Figure 1B) and Table 2: cytosolic 10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase, (ALDH1L1), mitochondrial fumarate hydratase (FH), adenosine kinase (ADK) mitochondrial agmatinase (AGMAT), calreticulin (CALR) and adipocyte plasma membrane-associated protein (APMAP).

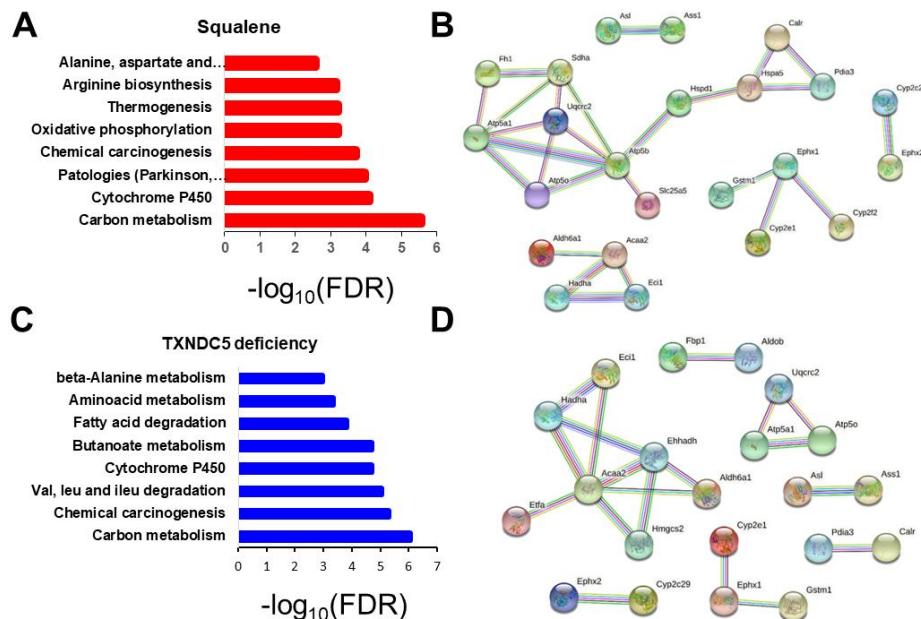


Figure 4. Hepatic lipid droplet-associated proteins found significantly changed by influence of squalene or TXNDC5 deficiency in mice. A, Pathway enrichment of differentially expressed proteins in squalene supplemented animals expressed as the –

\log_{10} (FDR) according to KEGG. B, String (<https://string-db.org/>) network of main differentially expressed proteins by influence of squalene with a 90% of confidence. C, Pathway enrichment of differentially lipid droplet-associated proteins in TXNDC5 deficiency expressed as the $-\log_{10}$ (FDR) according to KEGG. D, String network of main differentially expressed proteins by influence of absence of TXNDC5 with a 90% of confidence.

To confirm the LD-association of some of the identified proteins, and their changes in the different conditions, their abundance in LDs and liver homogenates was assessed by immunoblotting. In a previous experiment using *Apoe*-deficient mice fed chow diet (15), squalene induced increased amounts of TXNDC5 and CALR in hepatic microsomal preparations. In the present conditions in WT animals consuming a Western diet, mice receiving squalene showed a modest increase in the homogenate (Figure 5A and B) but a significant increase in the amount of TXNDC5 in lipid droplets (Figure 5C and D). Obviously, TXNDC5-KO mice did not show this protein either in homogenate or lipid droplets. When CALR was assayed (Figure 6A and B) in homogenate, minimal changes were observed in the different experimental conditions. However, squalene administration in WT animals resulted in an increased content of this protein in the lipid droplets (Figure 6C and D), something abolished in absence of TXNDC5. When APMAP was assayed (Figure 7), the same pattern was observed, although its decrease in lipid droplets by the absence of TXNDC5 was less pronounced (Figure 7C and D). Overall, squalene administration favors the presence TXNDC5, CALR and APMAP in lipid droplets and the lack of TXNDC5 results in a diminished presence of the other proteins.

Resultados

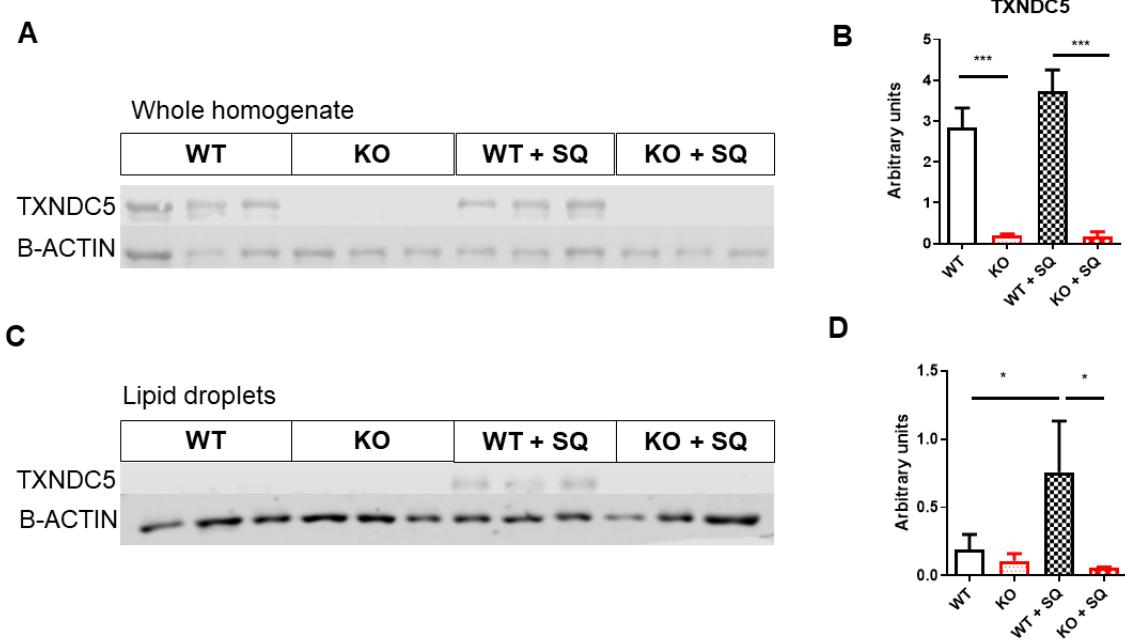


Figure 5. Hepatic expression of TXNDC5 protein. A, Representative Western images of liver homogenates. B, quantitative results of TXNDC5 normalized to β -ACTIN. C, Representative Western images of lipid droplets. D, quantitative results of TXNDC5 normalized to β -ACTIN. Results are shown as mean \pm SD. Statistical analyses were done by one-way ANOVA and Tukey's test as post-hoc comparisons. *, P<0.05 and ***, P<0.001.

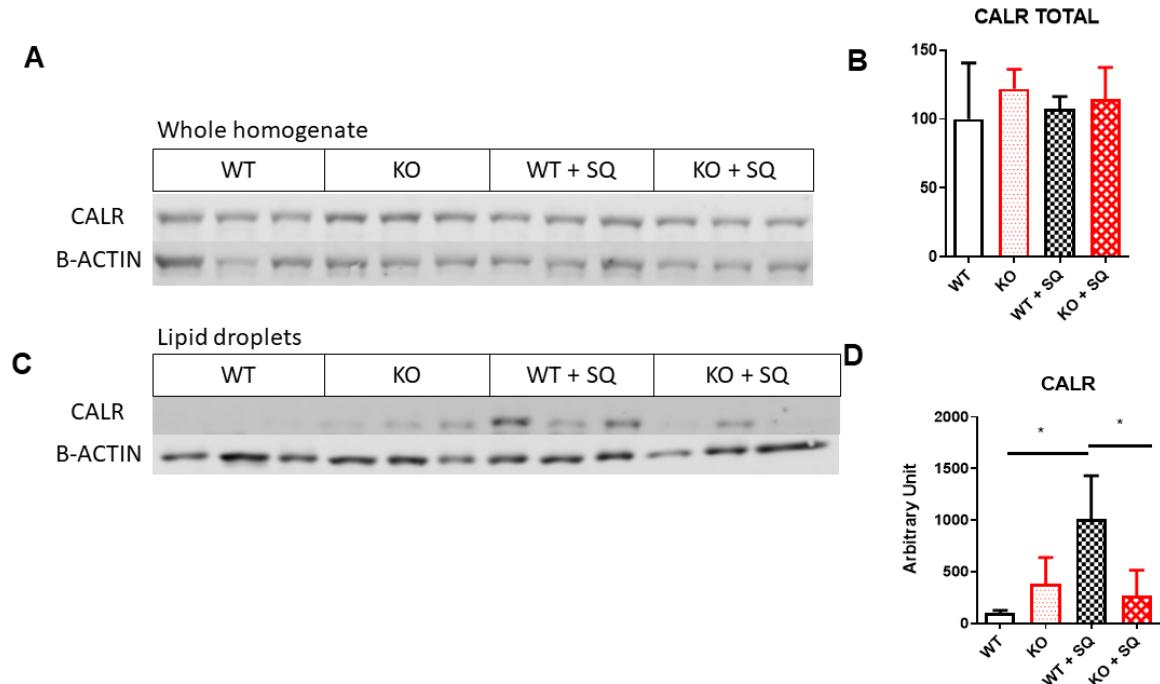


Figure 6. Hepatic expression of CALR protein. A, Representative Western images of liver homogenates. B, quantitative results of CALR normalized to β -ACTIN. C, Representative Western images of lipid droplets. D, quantitative results of CALR normalized to β -ACTIN.

Results are shown as mean \pm SD. Statistical analyses were done by one-way ANOVA and Tukey's test as post-hoc comparisons. *, P<0.05.

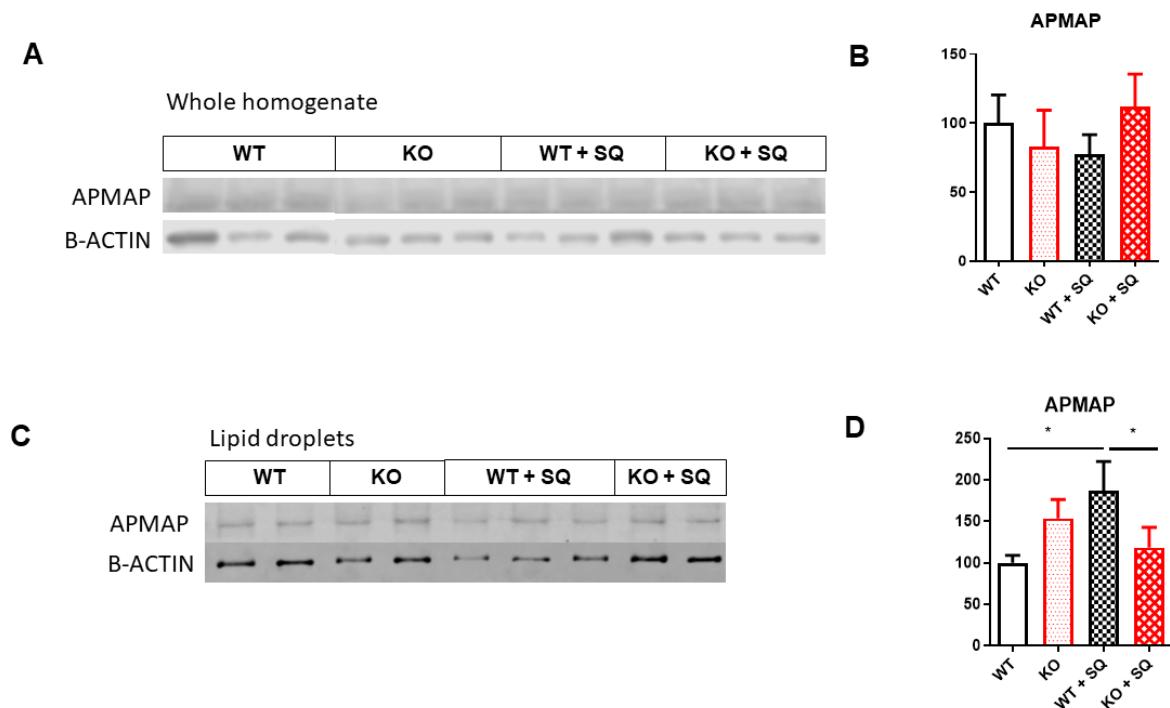


Figure 7. Hepatic expression of APMAP protein. A, Representative Western images of liver homogenates. B, quantitative results of APMAP normalized to β -ACTIN. C, Representative Western images of lipid droplets. D, quantitative results of APMAP normalized to β -ACTIN. Results are shown as mean \pm SD. Statistical analyses were done by one-way ANOVA and Tukey's test as post-hoc comparisons. *, P<0.05.

3.4 RNA analyses of squalene administration target genes.

In order to support the observed squalene-induced changes, mRNA analyses of some previously characterized target genes (16) was carried out by RT-qPCR. *Txndc5* mRNA levels were not influenced by squalene administration, but as expected TXNDC5-KO animals showed a low level of expression. As previously observed (16), squalene administration induced hepatic expressions of *Cyp2b10*, *Cyp2c55* and *Cyp34a1* and absence of TXNDC5 did not suppress this effect with the exception of *Cyp2b10* (Figure 8). Regarding *Acox1*, *Apmap*, *Arf5* y *Calr*, no significant changes were observed. Collectively, these results suggest that the absence of TXNDC5 does not influence transcriptional changes induced by squalene administration.

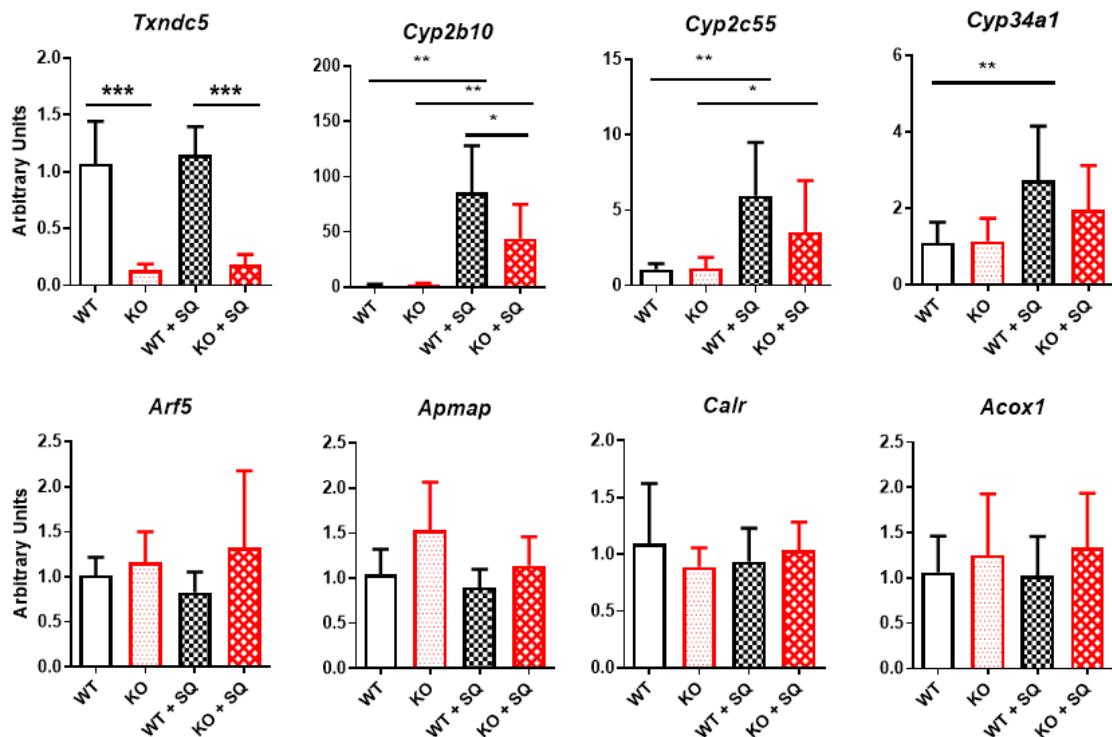


Figure 8. Hepatic mRNA expression of selected genes in males. Results are shown as mean \pm SD. Statistical analyses were done by Kruskal-Wallis ANOVA and Mann-Whitney's U-test as post-hoc comparisons. *, P<0.05, **, P<0.01 and ***, P<0.001.

3.5 Analyses in WT and TXNDC5-KO AML12 cell lines.

To verify whether the observed changes in response to squalene were also reproduced in a hepatic cell line, WT and TXNDC5-KO AML12 cell lines were used and incubated in presence of nanoparticles loaded with squalene [205]. As shown in Figure 9 (panels A-E), squalene incubation resulted in an increased cellular squalene content that was significantly reduced when TXNDC5 was absent. Thus reproducing *in vitro* the mouse findings. Gene expression were equally explored. Surprisingly, *Cyp2b10* expression was decreased by squalene incubation and this effect was more pronounced by the absence of TXNDC5. *Cyp2c55* and *Cyp34a1* expressions were increased by squalene incubation. TXNDC5 deletion partially abolished the squalene effect on *Cyp2c55* and had no impact on *Cyp34a1* expression. Squalene accumulation in presence of a squalene epoxidase inhibitor was also lower in TXNDC5-KO AML12 cells compared to WT-AML12 (Figure 9I).

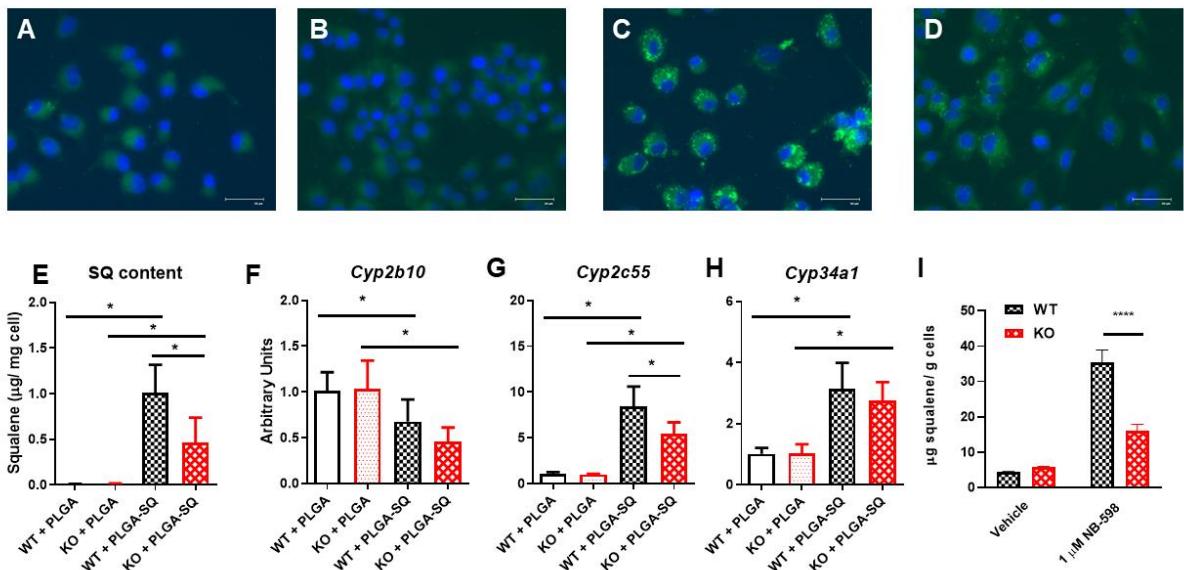


Figure 9. Influence of TXNDC5 on squalene incubation of AML12. Nile red and Hoechst fluorescent staining of cultured cells. A, WT+ PGLA; B, KO + PGLA; C, WT+ PGLA + SQ and D, KO+ PGLA + SQ. E, Squalene content; F, Cyp2b10 mRNA expressions; F, Cyp2c55 mRNA expressions and H, Cyp34a1 mRNA expressions. I, Squalene content with or without inhibition of squalene epoxidase. Results are shown as mean \pm SD. Statistical analyses were done by one-way ANOVA and Tukey's test as post-hoc comparisons. *, P<0.05 and ****, P<0.0001

4. Discussion

The aims of the present study were to verify the influence of TXNDC5 on the hepatic management of squalene provided in a Western diet. Our results indicate that mice consuming 1% squalene-supplemented Western diets (corresponding to a dose of 1 g/kg) showed a sexual dimorphism in the sense that only in males, absence of TXNDC5 blocked hepatic squalene accumulation in a tissue specific way. When hepatic lipid droplets were prepared and characterized, TXNDC5 accumulated in this subcellular compartment of mice fed the hydrocarbon and, as expected, was absent in TXNDC5-KO mice. The latter mice were unable to store squalene in lipid droplets following the pattern observed in the whole liver. A highly stringent scheme of protein selection to detect those involved in the squalene response in all conditions led to the identification of ALDH1L1, FH, ADK, AGMAT, CALR and APMAP. Independent confirmation revealed that CALR, APMAP move to lipid droplets in presence of squalene and this fact was influenced by TXNDC5. To support the specificity of this finding, hepatic expression of previously characterized

squalene gene targets was analyzed and squalene administration induced hepatic expressions of *Cyp2b10*, *Cyp2c55* and *Cyp34a1* and absence of TXNDC5 did not suppress this effect. The increase in squalene content was reproduced *in vitro* using squalene delivered as nanoparticles to an AML12 hepatic cell line. A phenomenon halted in an engineered cell line lacking TXNDC5. In this model, *Cyp2c55* and *Cyp34a1* expressions were increased by squalene, and TXNDC5 deletion partially abolished the squalene effect on *Cyp2c55* and had no impact on *Cyp34a1* expression. Collectively, squalene accumulation in lipid droplets is sex-dependent on TXNDC5, however its downstream effects on gene expression seem to be independent of this protein.

The observed sexual dimorphism in squalene response is something that confirms our previous findings in *Apoe*-deficient mice where decrease of atherosclerotic lesion was associated with hepatic fat content only in males [7]. In the search of proteins involved in that lipid changes, male microsomal TXNDC5 protein was found increased by squalene administration and significantly associated with hepatic fat content [8]. To establish the molecular mechanisms of this protein with squalene, TXNDC5-KO mice of both sexes were generated [296] and fed a Western diet with or without squalene. When their livers were analyzed for squalene content, absence of TXNDC5 abolished the hepatic squalene accumulation only in males. This phenomenon did not occur in duodenum either, rejecting the hypothesis of an intestinal malabsorption of squalene and suggesting that represents a sex- and tissue-specific mechanism. To further characterize this observation and profiting a previous finding that squalene accumulated in male mouse lipid droplets [203], the latter were the focus of attention.

Shotgun proteomics via LC-MS/MS was used to characterize the murine hepatic LD proteome in the different experimental conditions. The identified associated proteins ranged from 1,326 to 1,871 (Supplementary Table 1), what is in agreement with reports of 1,520 using a high-fat diet [335], 932 [333,336] or 810 [333], 613 [337] in the fasting state. More recently, even 4,515 unique proteins have been found in mice consuming a high-fat diet (60% of calories as fat content for 18 weeks) [338]. One important concern when analyzing organelle proteomes is the purity of preparations. As expected, PLIN2 and PLIN3 canonical LD-marker proteins were

present in our LD preparations (Table 1). Likewise, MGLL was a constituent of the prepared lipid droplets. In fact, the latter was found extraordinarily consistent among the different lipid preparations, so it was used as reference protein to normalize the abundance of other proteins. Although PLIN2 has been used as normalization protein [333], other authors have raised concerns regarding its suitability as LD marker since it is not present on all hepatic LDs [335]. Furthermore, PLIN2 has been found to increase in 24-hour fasting and decrease after refeeding [333]. Using, an extreme content of fat (60% of calories) for 9 weeks (30) or the same high fat diet for refeeding [339], this protein was found particularly abundant. In the present report due to the short period of Western diet (6 weeks), the relative low percentage of fat (35% of calories) and a 16-hour fasting period, PLIN2 was not particularly abundant and variable among the different experimental conditions. Interestingly, DGAT2, CIDEA, CIDEB, CIDEC, ATGL (PNPLA2) were not found in our lipid droplets and CGI-58 (ABHD5) was only present in certain conditions. In contrast, others such as RAB7 [338] was uniformly present. Using a fat content (60% of calories) for 12 weeks, Krahmer et al. [340] reported the plasma membrane-ER contact site protein ESYT2 to be increased in their LD preparations. In our case, lipid droplets were poorly enriched in this protein. Mitochondrial markers were present ACSL1, COX4I1, CPT2, VDAC [339], while peroxisomal and Golgi markers were almost absent. Surprisingly, a cytosolic marker GAPDH was increased whereas ATPCL (30) was not detected. Regarding ER-localized proteins, a particular profile was also observed, while CES3 or CANX were found in agreement with Kramer et al. [333], PEMT was absent in our LD preparation, so was VPS13A, proposed as ER protein able to contact with mitochondria by Krahmer et al. [340] or GRP78 [339]. Another ER protein, TXNDC5, also previously found in lipid droplets [333] accumulated in this subcellular compartment of mice fed the hydrocarbon and, as expected, was absent in TXNDC5-KO mice. Lipid droplet-associated proteins have been proposed as the organelle association to reach their metabolic functions [340]. While the extent of dietary intervention has been shown to modulate the amount of LD-associated proteins [340] as well as the length of fasting [333], little attention has deserved to the provided amount of fat [339] and even less to the composition of those dietary

fats or oils. In light of the present finding where a single fatty compound, squalene, has a profound impact, a new avenue is emerging.

The male TXNDC5-KO mice were unable to store squalene in lipid droplets following the pattern observed in the whole liver, something reproduced *in vitro* using squalene delivered as nanoparticles to AML12-WT and AML12-TXNDC5-KO hepatic cell lines, observing a lower amount of SQ in the absence of TXNDC5. This would suggest that hepatocytes are the main cells involved in this squalene storage. Moreover, using a squalene epoxidase inhibitor without squalene administration, a higher amount of SQ was equally observed in WT and this process was impaired in the absence of TXNDC5. To gain more insight into the altered mechanisms of squalene accumulation or favoured secretion in this experimental setting, a proteomics approach of lipid droplets was carried out. A highly stringent scheme of protein selection to detect those involved in the squalene response in all conditions led to the identification of ALDH1L1, FH, ADK, AGMAT, CALR and APMAP. Independent confirmation by Western blot analyses revealed that CALR and APMAP associated with lipid droplets in presence of squalene and this fact was influenced by TXNDC5. The change in CALR was not a transcriptional, nor a translational since its hepatic mRNA and protein levels were not modified. Calreticulin (CALR) has been involved in preventing the secretion of Z-antitrypsin (ZAAT) in a complex with ERdj3 through an exosome-mediated pathway [341]. Our lipid droplets were depleted of ERdj3, but although they contained antitrypsin, this was not enriched by squalene administration. Squalene seems to modulate the presence of CALR in lipid droplets only in presence of TXNDC5 and this favors its accumulation. A hypothetical situation would be that the incorrect CALR modulation in absence of TXNDC5 promotes the secretion of squalene through an exosome-mediated pathway. Adipocyte plasma membrane associated protein (APMAP, also known as C20orf3) has been proposed as a plasma membrane and endoplasmic reticulum protein to have hydrolase activity. Initially discovered in adipocytes, it was also described in the liver [342,343]. The observed changes in APMAP are related to its lipid droplet association since no change in hepatic homogenate, nor in mRNA levels were observed. The lower squalene accumulation in the whole liver of TXNDC5-KO mice would favor an exosome-mediated pathway of secretion of this

compound and the role of APMAP as a membrane linker would contribute it. These suggestive hypotheses emerging from this work need further experimental support.

Hepatic expressions of previously characterized squalene gene targets (*Cyp2b10*, *Cyp2c55* or *Cyp34a1*) [204] were analyzed to investigate whether or not the response was modified by absence of TXNDC5 either *in vivo* or *in vitro*. While both models reproduced the induction of *Cyp2c55* and *Cyp34a1* by squalene administration, the changes in *Cyp2b10* were different between the *in vivo* and the *in vitro* approaches. Equally differential was the relevance of TXNDC5 absence, while maintaining a tendency it hardly modified the squalene effect, *in vivo* or *in vitro*. These gene changes are consistent with the data that some changes in gene expression in squalene action are executed independently of its accumulation in lipid droplets.

In summary, squalene accumulation in lipid droplets is sex-dependent on TXNDC5, however its downstream effects on gene expression are independent of this protein. The lack of hepatic squalene accumulation in LD in the absence of TXNDC5 would be possible through an exosome-mediated pathway where CALR and APMAP would be involved. Our results also emphasize the relevance of a single dietary component, squalene, on the dynamics of LD-associated proteins and the role of TXNDC5 to control specific lipid droplets.

Acknowledgments

We thank Jose Luis Pitarch, Cristian Alvarez, Silvia Garcés and M^a Pilar Lierta for their help in maintaining the animals. This research was supported by grants (CIBEROBN, CB06/03/1012, 1 January 2008) from CIBER *Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición* as initiative of FEDER-ISCIII, *Ministerio de Ciencia e Innovación-Fondo Europeo de Desarrollo Regional* (PID2019-104915RB-I00, 1 June 2020) and *Fondo Social Europeo-Gobierno de Aragón* (B16_20R, 26 March 2020). S.H.B. was recipient of a joint fellowship from the Universities of Zaragoza and Pau and J.S.-M. was recipient of a *Fundación Cuenca Villoro* fellowship.

Conflicts of Interest:

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

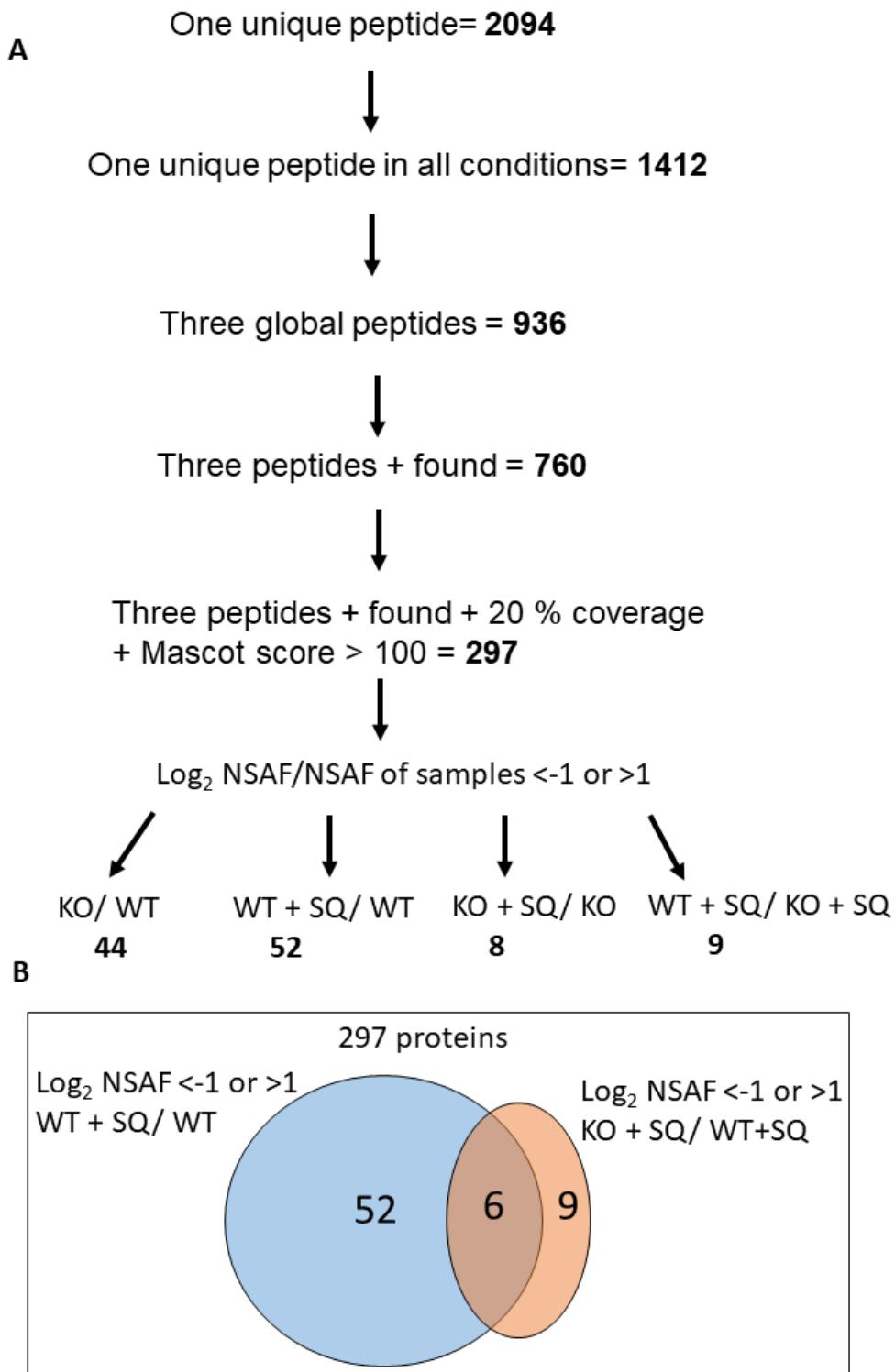
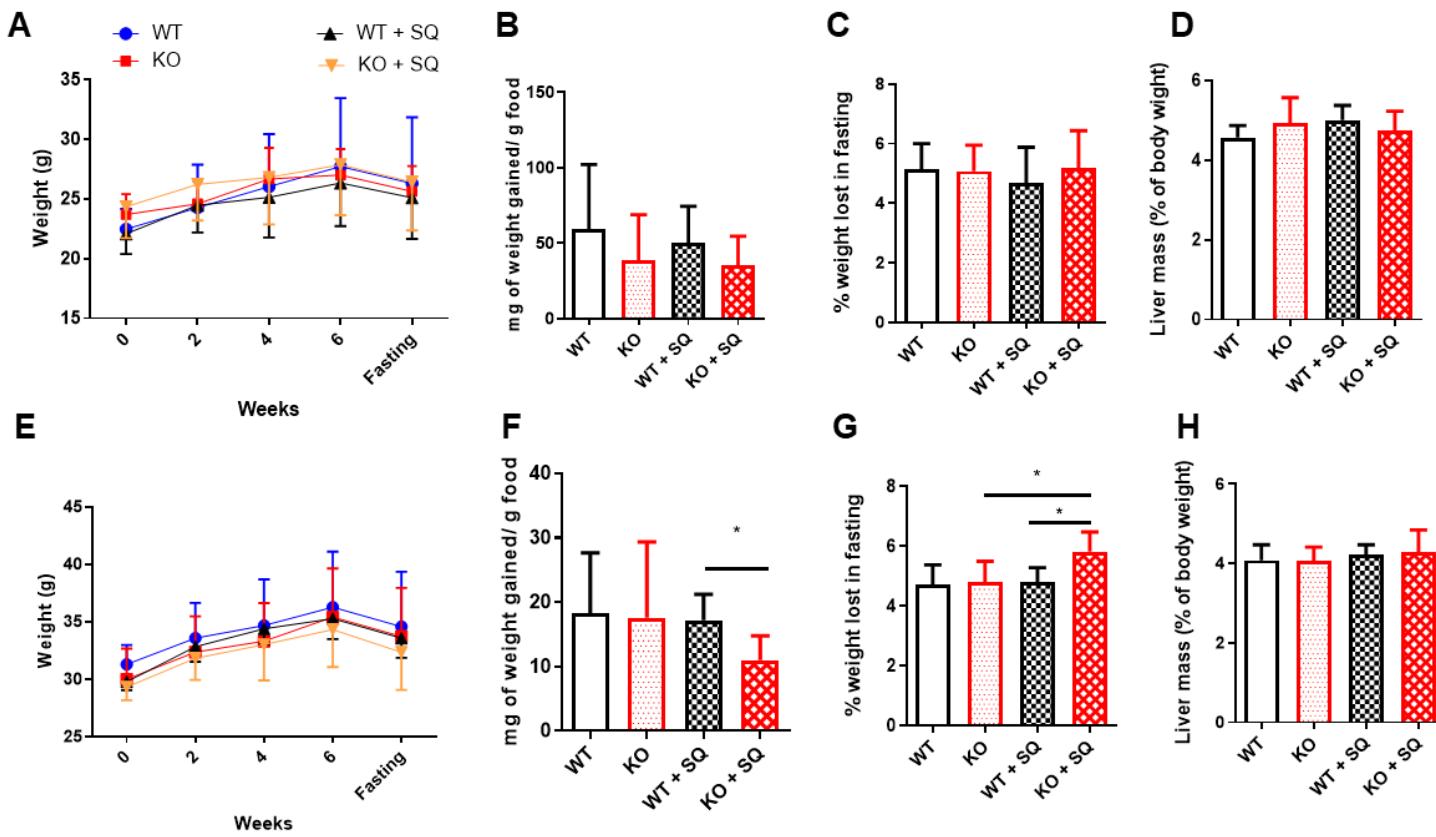
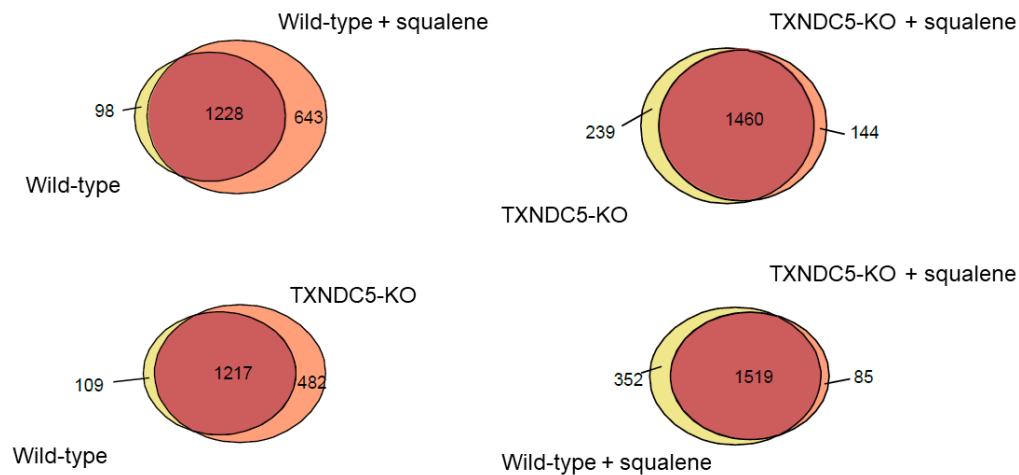
Supplemental Files:

Figure S1. Scheme of protein discrimination. (A) Algorithm used to reduce the complexity and select more striking changes of protein expressions associated with lipid droplet area in the experimental conditions. (B) Venn's diagram showing interaction.



Supplementary Figure 2. Somatometric parameters in the experimental condition according to sex. Top panels correspond to females and bottom to males. A and E, Body weight follow-up of mice in the different conditions; B and F, gained body weight per g of consumed food; C and G, percent of body weight lost in the fasting prior to sacrifice and D and H, percentage of liver weight related to body weight. Results are shown as means and their standard deviations. Statistical analyses were done by one-Way ANOVA and Tukey's test as post-hoc comparisons. Statistical analyses were done by Kruskal-Wallis ANOVA and Mann-Whitney's U-test as post-hoc comparisons. *, P<0.05.

Resultados



Supplementary Figure 3. Venn's diagrams showing differentially expressed proteins in the different conditions. Numbers represent proteins unique or determined to be more abundant, by comparison of the normalized spectral abundance factor of the peptides derived from the proteins to a specific condition.

Resultados

Supplemental Tables:

Supplementary Table 1. Summary of male lipid droplet characteristics according to the different experimental groups. Number of identified peptides and proteins with at least one peptide and a FDR <0.01 in the different groups.

Samples	Identified peptides	Identified proteins
Wild-type	6776	1326
TXNDC5-KO	8892	1699
Wild-type + squalene	10601	1871
TXNDC5-KO + squalene	8341	1604

Supplementary Table 2. Global characteristics of male lipid droplet proteomic analysis

<https://docs.google.com/spreadsheets/d/1r90k15nHR2BYCvhbH4w0yBxoCKvM1CZk/edit?usp=sharing&ouid=115891934969843911352&rtpof=true&sd=true>

Resultados

Supplementary Table 3. Characteristics of murine primers used in RT-qPCR assays following MIQE guidelines

Gene symbol	Accession	Sequence	Amplicon length	Junction	[Primer]	Efficiency
<i>Acox1</i>	NM_015729	Sense: CAGACAGAGATGGGTATGGAA	82	Exon 3/4	100 nM	97%
		Antisense: GAATGAACTCTGGGTCTTGGG				
<i>Apmap</i>	NM_027977.3	Sense: CTAGCAGCTCTGGCGGATAC	251	Exon 8/9	100 nM	104%
		Antisense: TTCATGCGCCTCACTCACAT				
<i>Arf5</i>	NM_007480.2	Sense: GTTTGCCAACAAAGCAGGACA	245	Exon 5/6	100 nM	105%
		Antisense: AGTCGGGAGTCTGGTCATC				
<i>Calr</i>	NM_007591	Sense: GAATACTCCCCGATGCAAA	89	Exon 7/8	100 nM	96%
		Antisense: AAGATTGTCCCGGACTTGACCT				
<i>Cyp2b10</i>	NM_009999	Sense: TGCTGTCGTTGAGCCAACC	80	Exon 2/3	100 nM	101%
		Antisense: CCACTAACATTGGGCTTCCT				
<i>Cyp2c55</i>	NM_028089	Sense: ATCGAGGATCGCATTCAAGAGG	94	Exon 3/4	100 nM	100%
		Antisense: CAGCTCAGGATGAATGTGGGAT				
<i>Cyp34a1</i>	NM_017396.3	Sense: GCTGACAGACAAGCAGGGA	102	Exon 1/2	100 nM	108%
	NM_001105159.1	Antisense: ACGGGTCCCATATCGGTAGA				
<i>Ppib</i>	NM_011149	Sense: GGAGATGGCACAGGAGGAA	72	Exon 3/4	100 nM	98%
		Antisense: GTAGTGCTTCAGCTTGAAGTTCTCAT				
<i>Txndc5</i>	NM_145367.4	Sense: CAGGCTTGTCAAGATGTCACCAT	82	Exon 8/9	200 nM	100%
		Antisense: TAACCTCGTACCGAGTACTTGCTG				

VI. Discusión

El hígado es el órgano central del metabolismo, siendo la dieta uno de los factores más influyentes en el metabolismo. A través de sus diferentes componentes, tanto macronutrientes como micronutrientes, ejerce efectos e interacciones entre las diversas rutas metabólicas en todos los niveles conocidos, epigenéticos, transcriptómicos, postranscripcionales y postraduccionales [344–348].

Frente a una dieta rica en escualeno nuestro grupo encontró una mayor expresión de TXNDC5, una proteína prácticamente desconocida en el hígado, que se asoció con el desarrollo de esteatosis. TXNDC5 es una proteína disulfuro isomerasa, encargada del correcto plegamiento de las proteínas como chaperona, así como se le asociaba un papel en el mantenimiento del estrés oxidativo en múltiples patologías. Sin embargo, no se ha descrito de forma clara cuál es su función o mecanismo molecular, ni cómo puede influir en el metabolismo global *in vivo* o si es la proteína encargada de modular los efectos antioxidantes y antiaterogénicos del escualeno [8].

Con el objetivo de comprender la función de esta proteína desde un punto metabólico se decidió generar un modelo de ratón carente de TXNDC5. En este presente trabajo se ha realizado una caracterización metabólica de este modelo mediante la administración de diferentes dietas y el uso de diferentes ómicas en el hígado. Por último, teniendo en cuenta el desconocimiento de esta proteína, y la conexión con el escualeno, es lógico que exista un gran interés en dilucidar cómo pueden estar conectados y las implicaciones de TXNDC5 en la modulación de la acción del metabolito.

VII. 1 La supresión de la proteína 5 que contiene dominios tiorredoxina libera amiloide sérico A localizado en las lipoproteínas de alta densidad

Con el objetivo de comprender el papel de TXNDC5 y usando las nuevas herramientas de edición genética, nos planteamos generar un modelo de ratón que careciera de TXNDC5. Para ello, se decidió eliminar uno de los primeros exones del gen y de esta forma, se generará un transcrito incompleto y, por consiguiente, la pérdida de función de la tiorredoxina. Se seleccionaron dos guías que flanqueaban el tercer exón de TXNDC5. De los 31 ratones que nacieron de la electroporación de embriones con cas9, 4 de ellos tuvieron delecciones que se secuenciaron y comprobaron que correspondían con la delección del tercer exón. La delección se mantuvo en generaciones posteriores en un ratio mendeliano y se verificó la pérdida del transcrito y de la proteína (S1 D-E).

Teniendo ya el modelo animal, se planteó comenzar con una dieta control purificada durante 4 semanas empezando a las 8 semanas de edad. No se observaron diferencias de peso al inicio ni al final de la intervención dietética, sin embargo, se observó al cuantificar la ingesta que los animales KO necesitaban más calorías para ganar peso (Fig 1A, M1) así como que mostraban un hígado más grande (Fig 1B, M1), estos cambios no habían sido descritos anteriormente en artículos previos [186]. Viendo este cambio en la masa hepática, se cuantificaron los lípidos hepáticos, observándose una mayor concentración tanto de triglicéridos como de colesterol hepático en el ratón carente de TXNDC5 (Fig 1C-D, M1). Para comprobar el estado de la lesión,

Discusión

se realizó un estudio histológico para el cual se cuantificó la gota lipídica sin observar diferencias entre los genotipos. Debido al poco conocimiento existente con la regulación hepática de *Txndc5* se exploraron cambios en la expresión de *Txndc5* en los transcriptomas hepáticos subidos a la base de datos GEO (Tabla S5, M1). Se encontraron dos artículos con intervenciones dietéticas en el cual se producían aumentos de *Txndc5* y del contenido de grasa: GDS1307 and GDS1517. En ambos estudios, en las dietas que el contenido de grasa era menor o que producía un menor aumento de lípidos hepáticos, se encontró una expresión mayor de la tiorreductasa. Estos resultados parecen corresponder con los resultados previos del grupo, que observaron una correlación negativa entre *Txndc5* y el área de gota grasa lipídica [8]. Parece claro que TXNDC5 tienen un papel en el correcto mantenimiento del metabolismo. Sin embargo, esta función parece ser sutil y depende tanto de la situación como del fondo genético.

Con el objetivo de buscar posibles dianas o interacciones de TXNDC5, se decidió estudiar las diferencias en el transcriptoma del hígado del ratón carente de *Txndc5*. Se validó el método mediante qPCR (Fig 2, M1), encontrándose varios genes significativos (Tabla 1, M1), entre los que destacaban muy significativamente el amiloide sérico 1 y 2 (*Saa1*, *Saa2*) así como *Txndc5*, *Lcn2* y *Resf1*. Ambas proteínas séricas amiloides A (SAA) son proteínas de fase aguda empaquetadas dentro de las HDL y son expresadas en el hígado en respuesta a estímulos inflamatorios. Estos dos genes tienen una gran similaridad, a nivel transcripcional y traduccional, y una expresión prácticamente idéntica por lo que las determinaciones proteicas se hicieron con anticuerpos que reconocían ambas proteínas. Sorprendentemente, no se observaron cambios en el contenido de SAA hepático (Fig 3B, M1), por lo que se analizó si estaban siendo empaquetadas y liberadas al torrente sanguíneo, donde si se observó un aumento en los ratones carentes de TXNDC5 (Fig 3C, M1), pero más ligero que a nivel transcripcional, corroborando los resultados observados por Chait et al. [280] de que los cambios proteicos no se corresponden con los transcripcionales.

Debido a este aumento, se decidió hacer una caracterización plasmática. Los aumentos de lípidos hepáticos no se reflejaron a nivel plasmático, sin embargo, los niveles de peroxidación lipídica medidos a través del malonildialdehído (MDA) si fueron significativamente superiores (Tabla 2, M1). El malonildialdehído, como se comentó en el apartado III.1.3.4.1, se produce al disminuir la eNOS que es estimulada por las HDL [55], y curiosamente se observó una mayor concentración de APOA1, y de la actividad de PAF-AH sin una disminución de la actividad de PON1 (Fig 4, M1). Se podría haber esperado que un incremento de MDA supusiera una reducción de la actividad PON1 o que la aparición de SAA desplazara la APO1, principal componente de HDL. Sin embargo, se encontró una fuerte correlación entre APOA1 y PAF-AH, cuyo aumento parece ir de la mano posiblemente para aliviar el estrés lipídico ya que se ha descrito a PAF-AH que ayuda en la disminución de la peroxidación lipídica [55,278].

El aumento de SAA y APOA1, en conjunto con la experiencia del grupo de investigación en lipoproteínas, planteó una caracterización del perfil lipoproteico del ratón carente de TXNDC5. No se habían encontrado cambios en el colesterol plasmático ni en PC, y al realizar el perfil cromatográfico por FPLC no se observaron diferencias en su perfil, así como en el perfil de APOA1 y APOA4 (Fig 5A-E, M1). Se reflejó un ligero aumento en el perfil del amiloide, sin observar cambios en las fracciones en las que apareció (Fig 5F, M1). Se pudieron apreciar dos subpoblaciones de HDL: las HDL más grandes y cargadas de colesterol (IHDL) y las HDL nacientes, con un mayor contenido de fosfatidil colina (sHDL). Mientras que se observó APOA1 en IHDL, SAA se localizaba en sHDL. Se estudiaron las actividades de PON1 y PAF-AH, sin cambios entre genotipo y comprobando que el amiloide no afecta a la funcionalidad. Por último, se estudió el

Discusión

estado oxidativo de las lipoproteínas, sin encontrarse cambios en IHDL pero si una reducción del ROS en las sHDL de los ratones KO (Fig 6, M1). Es complicado discriminar si esta reducción es debida a unos lípidos menos oxidados o a las propiedades antioxidantes de APOA1 o PAF-AH pero reafirman la hipótesis del mantenimiento de su funcionalidad.

Toda esta caracterización se resume en la Figura 7 del primer manuscrito, sin embargo, es muy complicado a partir de estos resultados encontrar cual es causa directa de la pérdida de función de TXNDC5, y cuál es indirecta debido a los cambios previamente ocasionados. Se han vinculado a TXNDC5 con numerosas patologías como se describe en el apartado III.2, sin embargo, la mayoría de estas están fuertemente relacionadas con la inflamación y el mantenimiento del estado oxidativo de la célula, concediéndoles resistencia frente a este y a la apoptosis [169,191,193,285]. En este estudio, los ratones fueron ayunados durante 16 horas previo al sacrificio y toma de muestras, llegando a perder en torno al 5-6 % de su masa corporal, activando su metabolismo de cuerpos cetónicos y en consecuencia la oxidación de ácidos grasos. Tanto el aumento de expresión de *Saa1/2* así como *Lcn2*, un biomarcador de inflamación hepática, son regulados por citoquinas en situaciones de estrés [270,272]. Teniendo en cuenta el mayor gasto calórico previamente observado para ganar peso, así como el aumento de lípidos hepáticos se podría originar un desajuste metabólico que se vea acrecentado en un ayuno tan largo. La falta de TXNDC5 es posible que haga más propenso a una respuesta de fase aguda. *Saa1*, *Saa2* y *Resf1* se encontraron fuertemente correlacionados con el contenido hepático de triglicéridos, indicando una posible conexión. Por último, el aumento de actividad PAF-AH se ha visto también modulado por citoquinas reduciendo tanto la peroxidación lipídica como la inflamación [283]. Una posible hipótesis podría ser que la carencia de TXNDC5, debido al desajuste metabólico y oxidativo cause el aumento del contenido lipídico hepático y de peroxidación en plasma que tras un ayuno prolongado haya inducido la cascada inflamatoria observada en los aumentos de *Saa1*, *Saa2*, *Resf1* y PAF-AH simulando una inflamación estéril, no observada histológicamente, como resume la Figura 17.

Estos cambios en las HDL, unido con la posible inflamación y el aumento de la peroxidación podrían sugerir una mala prognosis en enfermedades previamente vinculadas con TXNDC5 como la aterosclerosis. Sin embargo, el aumento de APOA1, principal componente de APOA1 así como la mayor actividad de PAF-AH, manteniendo la actividad de PON1 abre un nuevo paradigma. Pese a que el aumento de SAA se ha correlacionado con un mayor riesgo de aterosclerosis [290,291], la ausencia del amiloide no redujo la lesión coronaria en el modelo animal [292]. Es importante destacar que no se observó que el transporte reverso de las HDL estuviera impedido, encontrándose la mayor parte del colesterol en las HDL, como artículos previos han corroborado [289]. Por último, las lipoproteínas con SAA, sHDL, presentaron un menor ROS en comparación. Estos resultados ofrecen una nueva visión de como la ausencia de TXNDC5 y la aparición de SAA no tiene que ser necesariamente negativa en cuanto a la prognosis en el desarrollo de la aterosclerosis.

Discusión

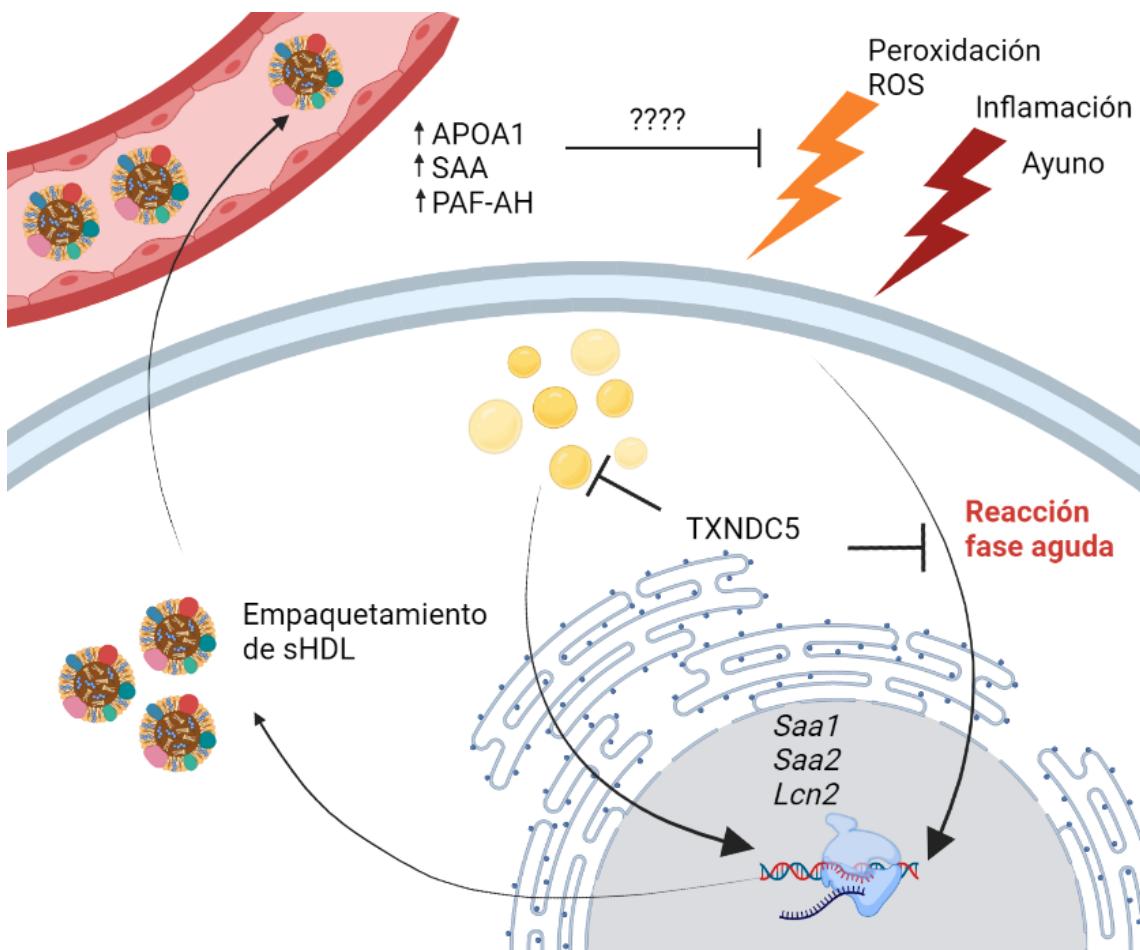


Figura 17: Resumen de la posible cascada de acción causada por la pérdida de TXNDC5.

VII.2 La ausencia de la proteína 5 con dominios de tiorredoxina mejora la tolerancia a la glucosa y la sensibilidad a la insulina en machos

Como hemos comentado en el apartado III.1.4, el hígado es el centro del metabolismo y tiene un papel fundamental en la homeostasis glucídica [14]. Además, TXNDC5 es una proteína disulfuro isomerasa, con un papel en el mantenimiento del correcto estrés del retículo [191], involucrada en varias respuestas asociadas al malplegamiento proteico o UPR [189,205,258], un hecho crucial en el mantenimiento correcto de la glucemia, como se describió en el apartado III.1.5.2. De esta forma, dentro de la caracterización metabólica del ratón carente de *Txndc5*, habiendo observados desequilibrios metabólicos en el metabolismo lipídico y sabiendo de la potencial importancia del mantenimiento del estrés del RE, se decidió abordar una caracterización del metabolismo glucídico.

De forma similar al apartado VII.1, se decidió empezar la caracterización midiendo los parámetros plasmáticos de los ratones de ambos性 que habían recibido una dieta estándar de ratón. No se observaron cambios en los niveles de glucosa en un ayuno de 6 horas en ambos性 (Table S1, M2). Sin embargo, mientras que no se observaron cambios en hembras en los parámetros plasmáticos cuando los ratones se ayunaron 16 horas, en machos se observó una disminución de la glucemia y un aumento de los ácidos grasos no esterificados (NEFA), fuertemente correlacionados entre sí (Fig 1, M2). Se repite el dimorfismo sexual acompañado de la necesidad de un ayuno prolongado para poder observar cambios, por lo que es posible que TXNDC5 sea necesaria en situaciones de estrés. La reducción de glucosa podría ser la causa de la liberación de ácidos grasos para compensar este déficit, pudiendo haber contribuido al desajuste metabólico previamente observado en el apartado VII.1.

La reducción de la glucemia indicó que se deberían conocer los niveles de insulina plasmática, sin cambios aparentes en su concentración, así como en el valor del HOMA. Sin embargo, este resultado no coincide con artículos en los que describían el malfuncionamiento de las células β-pancreáticas [285,304]. Se decidió realizar varias pruebas de tolerancia con el objetivo de caracterizar el impacto de TXNDC5 y el metabolismo de la glucosa y acción de la insulina.

Debido a que los resultados se observaron en ayunas, se realizó el test de tolerancia al piruvato y de ayuno prolongado en machos, sin observar cambios (Fig 2A-B, M2). Los animales fueron capaces de mantener la glucemia a partir de piruvato y sus reservas, indicando que la gluconeogénesis no parece estar impedida en ausencia de TXNDC5. Cuando se realizó el test de tolerancia a la glucosa, la carencia de TXNDC5 mejoró la tolerancia en machos (Fig 2 C-D, 2M), pero no en hembras (Fig S2A, M2), indicando una mayor captación de la glucosa plasmática o una más improbable menor reabsorción renal. Se comprobó mediante el test de tolerancia a la insulina que la ausencia de TXNDC5 reducía la glucemia, muy significativamente en machos (Fig 2 E-F, M2) y significativamente en hembras (Fig S2B, M2), de forma similar a los resultados previos en ambos性. Todos estos datos combinados apuntan que la insulina ejerce un efecto más rápido o fuerte en los ratones deficientes de *Txndc5*.

Como ya hemos observado que las diferencias fenotípicas aparecen en condiciones estresantes, se decidió explorar el comportamiento de los ratones bajo una dieta alta en grasa y sacarosa (HFDHS) que puede inducir resistencia a la insulina. A las dos semanas de consumir esa dieta, se

Discusión

realizó el test de glucosa, de nuevo la ausencia de TXNDC5 confirió una mayor tolerancia a la glucosa únicamente en machos. Pasadas cuatro semanas, se hizo el test de tolerancia a la insulina, sin haber diferencias en la glucemia de ambos sexos, observándose una resistencia a la insulina en machos que no se observó en las hembras. Esta diferencia sexual observada, no influenciada por TXNDC5 puede ser la causa del porqué se observan estos dimorfismos sexuales, ya que los ratones macho parecen ser más propensos a ser resistentes a la insulina. Al final de la dieta, después de un ayuno de 16 horas, se observó una hiperglucemia en ambos sexos, pero significativamente inferior en machos KO. De forma similar a la dieta estándar del ratón, los niveles de NEFA fueron superiores en machos KO. Sin embargo, en contradicción con artículos previos donde TXNDC5 parece tener un papel en el plegamiento de la insulina [258], se observaron unos niveles de insulina significativamente superiores en la ausencia de TXNDC5, sin cambios en el HOMA. El hecho de que la ausencia de TXNDC5 confiera tolerancia a la glucosa es una función nueva para este tiorredoxina, y abre un campo de estudio acerca de cómo la insulina se pliega, secreta y ejerce su acción *in vivo*.

El aumento de la señal de la insulina observado nos llevó a explorar el inicio de la cascada, el receptor de la insulina (INSR). No se encontraron cambios en la proteína total hepática, sin embargo, cuando se aislaron las membranas plasmáticas se observó una cantidad significativamente superior de INSR en los animales KO. El receptor hepático parece no ser internalizado seguido por fosforilación en contradicción con otros tejidos [310] y muestra una preferencia espacial de forma que empieza su señalización activando PI3K/AKT en la membrana plasmática [311]. La actividad de INSR termina cuando es internalizado por endocitosis donde recluta sus dianas como los IRSs y activa las rutas Ras/Raf/MEK/ERK [311]. Se puede encontrar un mayor nivel de INSR en la membrana debido a un fallo en el tráfico de exosomas [311], el cual podría ser la causa de como una respuesta más prolongada de la insulina causaría los efectos observados en la baja glucemia de los test de tolerancia de glucosa e insulina como recoge en un resumen del mecanismo la Figura 18.

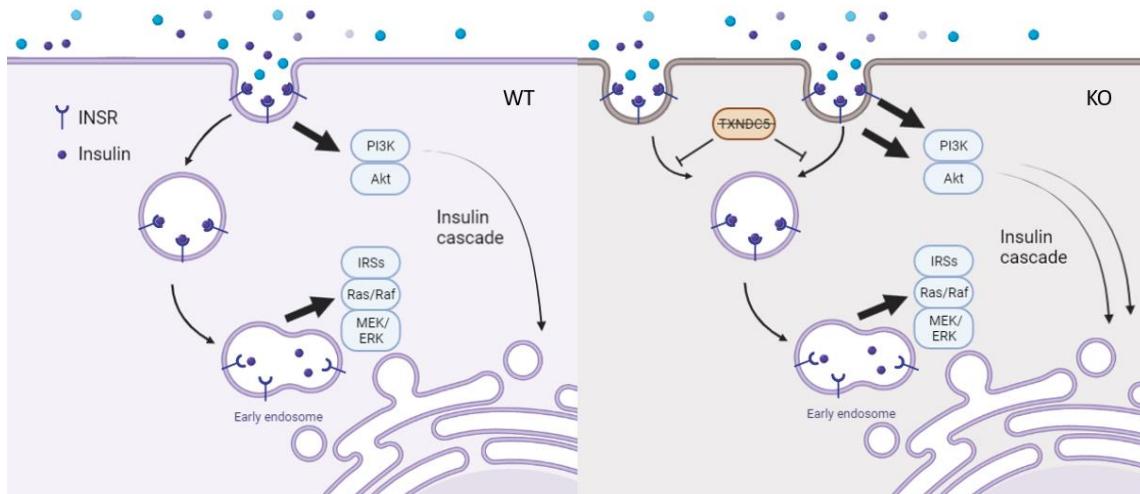


Figura 18: Resumen de la implicación de TXNDC5 en la traducción de la señal de la insulina propuesto.

Se decidieron estudiar genes relacionados con el metabolismo glucídico. Mientras que no se observaron cambios en la expresión de *Insr*, se encontró una mayor expresión de *Irs2*, *G6pc* e *Igfbp1* en el hígado de los ratones deficientes de *Txndc5*. IRS2 (“insulin receptor substrate 2”) es, junto con IRS1, uno de los substratos para la traducción de señal de INSR activando la ruta

Discusión

PI3K [312]. Durante el periodo posprandial y durante un ayuno prolongado IRS2 domina sobre IRS1 [313] al estar más relacionado con el metabolismo lipídico [314], sin embargo, la ausencia de *Irs2* causó una ligera hiperglucemia en ayunas [315]. El aumento de *Irs2* puede haber sido causado debido a que el ayuno fuera más estresante, como vimos en el apartado VII.1, ya que se encontraron aumentadas las expresiones de los genes de respuesta aguda, siendo una posible causa de esta ligera hipoglucemia observada en un ayuno de 16 horas. De la misma forma, el aumento de *Irs2* puede haber contribuido a reducir la glucemia en los test de tolerancia a la glucosa, hechos sobre un ayuno de 16 horas. La glucosa 6 fosfatasa, como hemos comentado en el apartado III.1.4.3 es una proteína integral del retículo que cataliza el paso final de la gluconeogénesis y glucogenolisis, liberando la glucosa del grupo fosfato y permitiendo su salida al torrente sanguíneo [14]. Aunque la insulina inhibe esta fosfatasa en contradicción con nuestros resultados, el hecho de que no se hayan observados cambios en ayunos más prolongados, una expresión tardía de genes gluconeogénicos podría explicar cómo se restableció la glucemia [317]. Por último, la proteína de unión al factor de crecimiento similar a la insulina (IGF) 1 (IGFBP1) regula la señalización de IGF a través de la unión con su receptor con la misma o incluso mayor afinidad que los propios IGFs [318]. De forma similar, IGFs tienen una gran homología estructural con la insulina y también pueden interactuar con el INSR, siendo una de las funciones de IGFBPs prevenir esta interacción potencial ya que se ha observado que altas concentraciones de IGFs pueden causar efectos hipoglucémicos [318]. Curiosamente, se había encontrado mayores niveles de IGFBP-1 en fibroblastos sinoviales carentes de TXNDC5 [192]. La expresión hepática de IGFBP-1 está fuertemente inducida por ayuno, hipoxia, estrés y citoquinas proinflamatorias como IL-1 β pero reducida por insulina [318], condiciones que explicarían su sobreexpresión en la ausencia de la tiorredoxina como hemos visto en el apartado VII.1. Sin embargo, en el adipocito IGF-1 reduce la liberación de NEFA mediante la inhibición de la acción de la hormona de crecimiento, así como reduce la oxidación en NEFA en el hígado [319]. Unos aumentos de IGFBP-1 en plasma podrían haber secuestrado a IGF-1, lo que explicaría las altas concentraciones observadas en los ratones TXNDC5-KO. Todos estos cambios en los tres genes se encontraron significativamente correlacionados negativamente con la concentración de glucosa (Fig S5, M2), remarcando la posible relación que hemos comentado y que se resumen en la figura 19.

En la línea hepática murina, se analizó la influencia de la insulina en la absorción de glucosa. De forma coherente con los resultados *in vivo*, las células carentes de TXNDC5 incorporaron más glucosa (Fig 5A, M2). Se estudió también el efecto del agonista β -adrenoceptor, isoproterenol, induciendo una lipólisis mayor en las células KO (Fig 5B, M2). Debido a que la acción de isoproterenol es similar al glucagón [320], podríamos asumir que, si resultados obtenidos *in vitro* se replicaran *in vivo*, una mayor traducción de la señal activaría antes la glucogenolisis, causando la menor glucemia y explicaría la expresión de *Irs2* y *G6pc* en los ratones deficientes de *Txndc5*.

Discusión

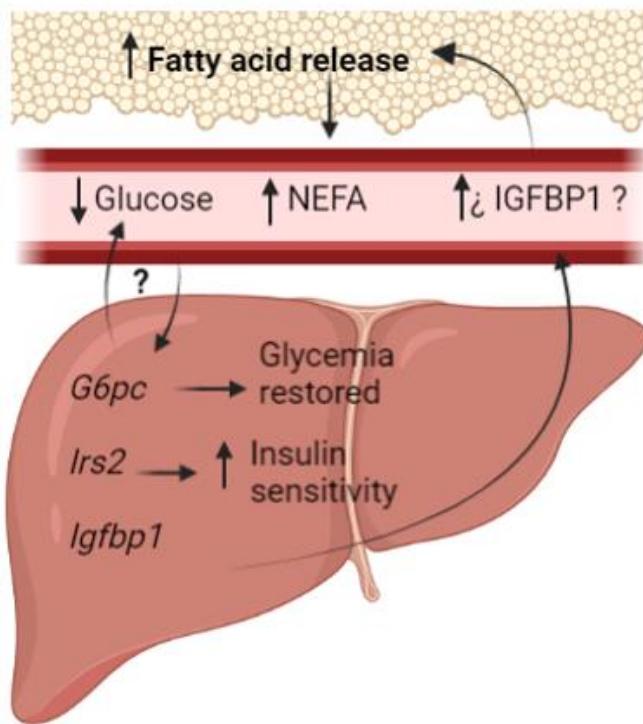


Figura 19: Resumen de las diferencias caracterizadas en ausencia de TXNDC5 en el metabolismo de la glucosa en un ayuno de 16 horas.

En resumen, estos resultados nos indican una mayor sensibilidad a la insulina y una mayor tolerancia a la glucosa sexo dependiente de TXNDC5. Los mayores niveles de INSR en membranas plasmáticas puede explicar porque la señal de la insulina es más fuerte en la ausencia de la tiorredoxina, proponiendo un mecanismo alterado de tráfico vesicular. Al contrario que otros artículos, los ratones deficientes de TXNDC5 mostraron una mayor tolerancia a la glucosa en un estadio prediabético con un sorprendente aumento de la insulina plasmática. Además, un aumento de *Irs2* podría ayudar a la modulación de la señal de la insulina. Por último, un aumento en los ácidos grasos no esterificados en plasma se observó en los ratones KO, significativamente correlacionado con la glucemia en el cual el aumento de *lgfbp1* podría estar implicado.

VI.3 La proteína 5 que contiene dominios de tiorredoxina está implicada en el almacenamiento hepático de escualeno en las gotas lipídicas de forma dependiente del sexo

Uno de los puntos más importantes que resolver era la influencia de TXNDC5 en una dieta con la administración de escualeno. Es importante destacar que el aumento transcripcional y traduccional previamente encontrado en el grupo se observó al administrar este compuesto a ratones *Apoe-KO* alimentados con una dieta occidental o tipo *Western* [8]. Sin embargo, pese a no tener el fondo genético de carencia de *Apoe*, se decidió realizar una intervención dietética formada por cuatro grupos, WT y KO, con dieta occidental y dieta occidental que contenía escualeno al 1%. De esta forma podríamos estudiar el efecto de una dieta occidental, así como observar el efecto que tiene el escualeno en ausencia de TXNDC5.

No se encontraron diferencias de peso durante la intervención en ambos sexos ni en el peso ganado por gramo de comida salvo en los machos que recibieron escualeno (Fig S2, M3). Este dimorfismo sexual ya se observó en VII.1, siendo curioso que no ocurra sin la administración de escualeno, habiendo una gran dispersión en ambas poblaciones (Fig S2, M3). Curiosamente, los machos KO que recibieron escualeno perdieron una mayor masa corporal en el ayuno previo al sacrificio, sugiriendo una posible alteración metabólica en la ausencia de TXNDC5 cuando la dieta se suplementó con escualeno.

Observando esto, se decidió analizar el contenido lipídico en el hígado. Mientras que, en hembras, el contenido de escualeno era mayor en el hígado de las dietas con escualeno no hubo cambios entre genotipos con la excepción de un mayor colesterol hepático en los animales WT frente a KO, en la dieta con escualeno (Fig 1, M3). Sin embargo, en machos se observó un efecto diferente ya que los ratones carentes de TXNDC5 no fueron capaces de acumular escualeno a diferencia de los ratones WT. Este incremento de escualeno hepático fue similar al contenido de triglicéridos y colesterol, excepto en los ratones WT frente a escualeno en el cual hay una tendencia no significativa. Mediante histología se verificó el mayor contenido de gota lipídica en los ratones *wild-type* cuando recibían escualeno, de forma similar a lo observado previamente. Se comprobó el contenido de escualeno intestinal, sin cambios entre dietas y rechazando que la pérdida de función de TXNDC5 pueda causar un fallo de absorción intestinal. Estos resultados vuelven a presentar un dimorfismo sexual, siendo una constante a lo largo de este trabajo, tal como se ha observado en los previos apartados VII.1 y VII.2. Este fenómeno además encaja con los resultados previos del grupo donde la reducción de la lesión aterosclerótica por acción del escualeno se encontró asociada con el contenido de grasa hepática únicamente en machos [7].

Con el objetivo de caracterizar el mecanismo molecular causante de este fallo de acúmulo de escualeno hepático se decidió estudiar la composición proteica del compartimento celular en el que supuestamente se localiza el escualeno, las gotas lipídicas [203]. Se aislaron las gotas por gradiente de sacarosa y se cuantificaron los niveles de lípidos, observándose una mayor cantidad de escualeno en el grupo WT (Fig 3, M3) y corroborando los resultados anteriores de menor contenido de escualeno en los animales KO; el perfil de distribución de colesterol y triglicéridos fue muy similar al homogenizado total, pero no significativo, debido al menor tamaño muestral.

Discusión

Para esclarecer esta selectiva acumulación de escualeno en las gotas lipídicas, se efectuó un estudio proteómico para ver las diferencias de composición y elucidar posibles interacciones.

Se caracterizó el proteoma de LD mediante LC-MS/MS en las cuatro condiciones experimentales. Se identificaron péptidos en el rango entre 1326-1871 (Table S1, M3), correspondiéndose con otras proteómicas de gotas lipídicas, encontrándose bajo una dieta grasa 1520 proteínas [335], 932 [336] o 810 [333] y 613 [337] en un estado de ayunas. Más recientemente, se llegaron a encontrar hasta 4515 proteínas únicas en ratones que consumieron una dieta con un contenido del 60% de sus calorías como grasa durante 18 semanas [338]. Sin embargo, es muy importante destacar la pureza de las preparaciones a la hora de hacer proteómica. Como era de esperar, PLIN2 y PLIN3, marcadores canónicos de LD, se encontraron en las preparaciones (Tabla 1, M3) así como MGLL que al encontrarse de forma extraordinariamente consistente se utilizó como referencia para la normalización de la abundancia de las otras proteínas. Aunque PLIN2 ha sido utilizada como proteína control de normalización [333], otros autores han visto que no está presente en todas las LD hepáticas [335]. Además, se ha visto que la concentración de PLIN2 aumenta durante un ayuno de 24 horas y disminuye con la ingesta [333]. Cuando se empleó una dieta grasa (60% de las calorías) durante 9 semanas en ayuno [335] o la misma dieta después de la ingesta [339], se encontró de una forma abundante. Hay que remarcar que nuestro estudio se llevó a cabo durante 6 semanas en una dieta con un porcentaje de grasa bajo (35% de las calorías) en comparación con los estudios anteriores y podría explicar porque PLIN2 no era particularmente abundante y varía entre las diferentes condiciones experimentales. Curiosamente, no se encontraron DGAT2, CIDEA, CIDEB, CIDEC o ATGL en las gotas lipídicas de nuestras preparaciones, sin embargo, RAB7 [338] se encontró presente de forma uniforme. Se volvieron a encontrar diferencias con dietas más grasas y tiempos más largos (12 semanas) [340] donde se encontraron proteínas de contacto RE-membrana como ESYT2, algo que no ocurrió en nuestras muestras. En nuestro caso, si observamos marcadores mitocondriales como ACSL1, COX4I1, CPT2 o VDAC [339] mientras que los marcadores peroxisomales o de Golgi estaban casi ausentes. Sorprendentemente, mientras que el marcador citosólico GAPDH se encontró en las muestras, ATPCL no se detectó [335]. En referencia al retículo endoplasmático, mientras que marcadores como CES3 o CANX se encontraron de forma similar a Kramer et al. [333], no se encontró a PEMT y sí a VPS13A, con un supuesto papel en el contacto RE-mitocondria [340] o GRP78 [339]. Por último, se había encontrado previamente a TXNDC5 como proteína del RE en LD en ratones alimentados con escualeno [333], y en nuestras muestras volvió aparecer de forma similar, estando ausente como era esperable en los ratones KO. Se ha propuesto que las proteínas asociadas a las gotas lipídicas son las encargadas de formar las conexiones con los diferentes orgánulos para llevar a cabo las reacciones metabólicas [340]. Aunque no era el objetivo principal del trabajo, mientras que se ha visto que la duración de la intervención dietética [340], así como el tipo de ayuno [333], prácticamente no se había prestado atención en la cantidad de grasa de la dieta [339], y mucho menos en el tipo de grasa o aceites. De esta forma, acabamos de describir el impacto que el cambio de un solo ácido graso ha tenido en las gotas lipídicas, abriendo una emergente línea de investigación.

Volviendo a la caracterización de las gotas lipídicas en la ausencia de TXNDC5, para verificar la incapacidad de almacenar escualeno en las mismas siguiendo el mismo patrón que en el hígado total, se trató de reproducir *in vitro*. Para ello, se utilizaron la línea hepática murina AML12 normal y la carente de TXNDC5 que se incubaron con escualeno encapsulado en nanopartículas y se verificó el mismo efecto (Figura 8, M2). Aprovechando la facilidad de trabajo *in vitro*, se añadió un inhibidor de la enzima escualeno epoxidasa, encargada del primer paso en la ruta

Discusión

metabólica de degradación del escualeno, observándose el mismo patrón de falta de acumulación en ausencia de TXNDC5 y descartando un metabolismo más rápido del hidrocarburo. Esto sugiere que los hepatocitos, dentro de las células que componen el hígado, son las encargadas de su almacenamiento.

Se hizo una fuerte selección de proteínas para detectar posibles dianas del cambio fenotípico (Fig 1, M3) en respuesta al escualeno, dejando 6 proteínas: ALDH1L1, FH, ADK, AGMAT, CALR and APMAP. Se verificó independientemente mediante Western-blot la presencia de CALR y APMAP en las gotas lipídicas con escualeno, así como que este efecto, de hecho, está influenciado por TXNDC5. Los cambios de CALR no eran transcripcionales ni traduccionales ya que no hubo cambios en la expresión de mRNA (Fig 9, M3), ni en la proteína total (Fig 6, M3). La proteína CALR en unión con Erdj3 participa en la formación de cuerpos de inclusión de Z-antitripsina (ZAAT) para su correcta degradación. En ausencia de calreticulina, se forma un complejo entre ZAAT y Erdj3 que lleva a su secreción mediante una ruta mediada por exosomas [341]. No se encontró Erdj3 en nuestras LD y aunque contenían antitripsina, no se encontró enriquecida por la administración de escualeno. El escualeno parece promover la presencia de CALR en gotas en presencia de TXNDC5 para su correcto almacenamiento. Una hipótesis sería que el incorrecto modulamiento de calreticulina en ausencia de TXNDC5 promoviera la secreción de escualeno de forma similar a ZAAT mediante la ruta mediada por exosomas. La proteína asociada a la membrana plasmática del adipocito (APMAP) se le presupone actividad hidrolasa en la membrana plasmática y en el retículo, siendo recientemente descrita en el hígado. De forma similar a CALR, solo encontramos cambios en su concentración en las LD ya que se observaron cambios en el homogeneizado total (Fig 7, M3) ni en los niveles de RNA mensajero (Fig 9, M3). Se ha observado que APMAP está involucrada en el almacenamiento de grasa en adipocitos [349]. Los niveles más altos de escualeno en el hígado, unido a los mayores contactos con APMAP podrían indicar un papel en el almacenamiento del escualeno en el cual la proteína APMAP podría tener un papel como proteína de unión. Sin embargo, esto es una hipótesis, resumida en la figura 20, que necesita apoyo experimental para ser corroborada.

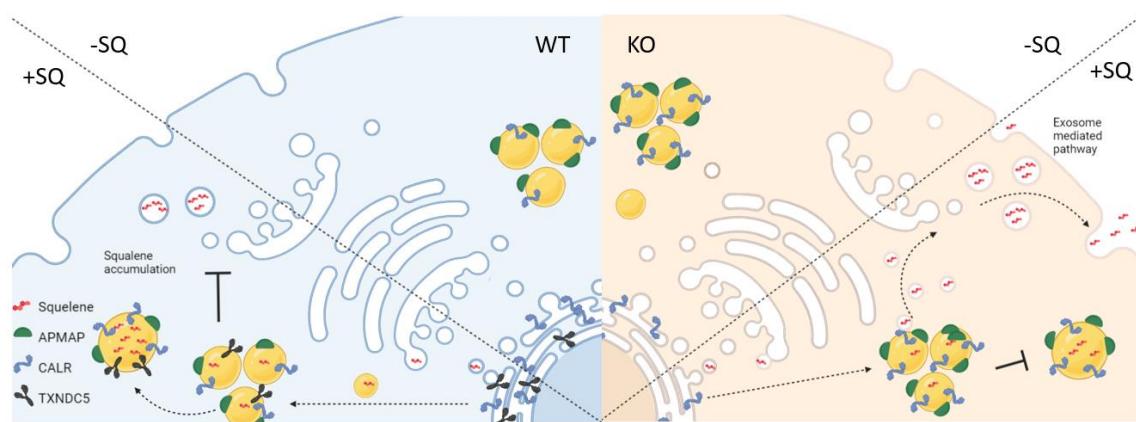


Figura 20: Resumen del mecanismo propuesto en ausencia de TXNDC5 en la acumulación o secreción del escualeno.

La expresión de genes hepáticos previamente caracterizados como respondedores al escualeno (*Cyp2b10*, *Cyp2c55* o *Cyp34a1*) [204] se analizaron para investigar si su respuesta estaba modificada en la ausencia de TXNDC5 tanto *in vivo* como *in vitro*. Mientras que en ambos modelos se reprodujeron la inducción de *Cyp2c55* y *Cyp34a1* (Fig 8-9, M3), los cambios de *Cyp2b10* se reprodujeron *in vivo*, mientras que *in vitro* ocurrió sorprendentemente lo contrario.

Discusión

Sin embargo, la influencia de TXNDC5 fue prácticamente similar, manteniéndose una tendencia que prácticamente no modificaba la influencia del escualeno. Estos cambios son consistentes con los datos que algunos cambios en la expresión genética debidos a la acción del escualeno son independientes de su acumulación en gotas lipídicas.

En resumen, la acumulación del escualeno en las gotas lipídicas del hepatocito es dependiente del sexo en la ausencia de TXNDC5. Sin embargo, no parece tener un efecto sobre los cambios de expresión genética inducidos por el escualeno. Esta ausencia de acumulación en las gotas lipídicas en los animales carentes de *Txndc5* podría ser debido a una vía preferente de secreción del escualeno en la cual CALR y APMAP podrían estar implicadas. Por último, nuestros resultados enfatizan la relevancia de como un único cambio en la dieta, el escualeno, influye en las dinámicas de las proteínas asociadas a las gotas lipídicas, así como el rol de TXNDC5 en la modulación específica de estas gotas lipídicas.

VII. Conclusiones

1. Se generó un modelo animal y celular murino carente de la proteína TXNC5 utilizando el sistema de edición genética CRISPR/cas9. Los cambios observados en la caracterización metabólica ocurrieron principalmente en ratones macho, lo que sugiere un dimorfismo sexual en la acción de la proteína.
2. En los ratones macho carentes de la proteína se observó una mayor necesidad calórica para ganar peso así como un acúmulo de triglicéridos y colesterol hepáticos. El estudio del transcriptoma hepático reveló un importante aumento de la expresión de los genes de fase aguda, amiloide sérico 1 y 2 (*Saa1, Saa2*). Se encontró un mayor contenido de amiloide sérico A, apolipoproteína A1, malonildialdehído y actividad hidrolasa de la enzima factor activador de plaquetas (PAF-AH).
3. La caracterización del perfil lipoproteico no mostró diferencias en la distribución del amiloide, colesterol, fosfatidilcolina o apolipoproteínas A1 y A4 pero sorprendentemente las lipoproteínas de alta densidad nacientes del ratón sin TXNDC5 estaban menos oxidadas.
4. La carencia de TXNDC5 en los ratones macho en una situación de ayuno de 16 horas causa una menor glucemia correlacionada con un aumento de los ácidos grasos no esterificados. Los test de tolerancia de la glucosa e insulina mostraron también unos menores niveles de glucosa, a causa de una mayor sensibilidad de la insulina en los ratones macho desprovistos de TXNDC5.
5. Una mayor concentración del receptor de insulina en las membranas plasmáticas hepáticas debido a un mecanismo impedido de endocitosis podría ser la causa de la mayor sensibilidad a la insulina. Se encontraron los genes *G6pc, Irs2* and *Igfbp1* más expresados en ratones sin la proteína, siendo el último un posible candidato de la regulación de la oxidación de ácidos grasos en los adipocitos.
6. La ausencia de TXNDC5 en machos bloqueó la acumulación de escualeno en el hígado, pero no en el duodeno. Este efecto se reprodujo *in vitro* mediante la administración de escualeno encapsulado en nanopartículas y mediante el

Conclusiones

bloqueo de su catabolismo en una línea celular hepática carente de TXNDC5.

Los animales normales mostraron un mayor nivel de triglicéridos y colesterol, y de gotas lipídicas tras la administración de escualeno, fenómeno que no ocurrió en los animales carentes de TXNDC5.

7. Las gotas lipídicas hepáticas obtenidas de ratones alimentados con escualeno presentaron un contenido similar de colesterol y triglicéridos con un mayor contenido de escualeno en los ratones normales. El proteoma de este orgánulo evidenció que las proteínas TXNDC5, ALDH1L1, FH, ADK, AGMAT y CALR estaban involucradas en la respuesta al escualeno y que CALR y APMAP estaban a su vez influenciadas por la ausencia de TXNDC5.

VIII. Bibliografía

- [1] Loomba R, Friedman SL, Shulman GI. Mechanisms and disease consequences of nonalcoholic fatty liver disease. *Cell* 2021;184:2537–64.
- [2] Romeo S, Kozlitina J, Xing C, Pertsemlidis A, Cox D, Pennacchio LA, et al. Genetic variation in PNPLA3 confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Genet* 2008;40:1461–5.
- [3] Daly AK, Ballestri S, Carulli L, Loria P, Day CP. Genetic determinants of susceptibility and severity in nonalcoholic fatty liver disease. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 2011;5:253–63.
- [4] Shannon OM, Ashor AW, Scialo F, Saretzki G, Martin-Ruiz C, Lara J, et al. Mediterranean diet and the hallmarks of ageing. *Eur J Clin Nutr* 2021;75:1176–92.
- [5] Guasch-Ferré M, Willett WC. The Mediterranean diet and health: a comprehensive overview. *J Intern Med* 2021;290:549–66.
- [6] Guasch-Ferré M, Li Y, Willett WC, Sun Q, Sampson L, Salas-Salvadó J, et al. Consumption of olive oil and risk of total and cause-Specific mortality among U.S. adults. *J Am Coll Cardiol* 2022;79:101–12.
- [7] Guillén N, Acín S, Navarro MA, Perona JS, Arbonés-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;197:72–83.
- [8] Ramírez-Torres A, Barceló-Batllo S, Martínez-Beamonte R, Navarro MA, Surra JC, Arnal C, et al. Proteomics and gene expression analyses of squalene-supplemented mice identify microsomal thioredoxin domain-containing protein 5 changes associated with hepatic steatosis. *Journal of Proteomics* 2012;77:27–39.
- [9] Horna-Terrón E, Pradilla-Dieste A, Sánchez-de-Diego C, Osada J. TXNDC5, a newly discovered disulfide isomerase with a key role in cell physiology and pathology. *International Journal of Molecular Sciences* 2014;15:23501.
- [10] Tortora GJ, Derrickson B. *Principios de Anatomía y Fisiología*. Editorial Médica Panamericana 2016. <https://www.medicapanamericana.com/mx/libro/principios-de-anatomia-y-fisiologia> (accessed April 21, 2022).
- [11] Hall JE. *Tratado de fisiología médica*. 13 Edition. Elsevier Health Sciences Spain; 2016.
- [12] Uchoa Junqueira LC, Carneiro J, González M, Mezzano G, Abrahamsohn PA. *Histología básica. Texto y atlas*. 12th ed. Español. México DF: Panamericana, Médica; 2016. <https://booksmedicos.org/histologia-basica-texto-y-atlas-junqueira-carneiro-12a-edicion/> (accessed May 19, 2022).
- [13] Stryer L, Berg JM, Tymoczko JL, Gatto GJ, Trueba MA. *Bioquímica con aplicaciones clínicas*. vol. II. Elsevier; 2013.

Bibliografía

- [14] Han HS, Kang G, Kim JS, Choi BH, Koo SH. Regulation of glucose metabolism from a liver-centric perspective. *Experimental & Molecular Medicine* 2016;48:e218.
- [15] Oh H, Jun DW, Saeed WK, Nguyen MH. Non-alcoholic fatty liver diseases: update on the challenge of diagnosis and treatment. *Clinical and Molecular Hepatology* 2016;22:327–35.
- [16] Ipsen DH, Lykkesfeldt J, Tveden-Nyborg P. Molecular mechanisms of hepatic lipid accumulation in non-alcoholic fatty liver disease. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2018;75:3313–27.
- [17] Tanase DM, Gosav EM, Costea CF, Ciocoiu M, Lacatusu CM, Maranduca MA, et al. The intricate relationship between type 2 diabetes mellitus (T2DM), insulin resistance (IR), and nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Journal of Diabetes Research* 2020;2020:3920196.
- [18] Petersen MC, Shulman GI. Mechanisms of insulin action and insulin resistance. *Physiological Reviews* 2018;98:2133–223.
- [19] Reddy JK, Rao MS. Lipid metabolism and liver inflammation. II. Fatty liver disease and fatty acid oxidation. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology* 2006;290:852–8.
- [20] Bechmann LP, Hannivoort RA, Gerken G, Hotamisligil GS, Trauner M, Canbay A. The interaction of hepatic lipid and glucose metabolism in liver diseases. *Journal of Hepatology* 2012;56:952–64.
- [21] Bechmann LP, Gieseler RK, Sowa JP, Kahraman A, Erhard J, Wedemeyer I, et al. Apoptosis is associated with CD36/fatty acid translocase upregulation in non-alcoholic steatohepatitis. *Liver Int* 2010;30:850–9.
- [22] Donnelly KL, Smith CI, Schwarzenberg SJ, Jessurun J, Boldt MD, Parks EJ. Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Invest* 2005;115:1343–51.
- [23] Mashek DG. Hepatic Fatty Acid Trafficking: Multiple Forks in the Road. *Advances in Nutrition* 2013;4:697–710.
- [24] 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. *The FASEB Journal* 2014;28:3159–70.
- [25] Mashek DG. Hepatic fatty acid trafficking: multiple forks in the road. *Adv Nutr* 2013;4:697–710.
- [26] 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. *The FASEB Journal* 2014;28:3159–70.

Bibliografía

- [27] Koonen DPY, Jacobs RL, Febbraio M, Young ME, Soltys CLM, Ong H, et al. Increased hepatic CD36 expression contributes to dyslipidemia associated with diet-induced obesity. *Diabetes* 2007;56:2863–71.
- [28] Wang GQ, Bonkovsky HL, de Lemos A, Burczynski FJ. Recent insights into the biological functions of liver fatty acid binding protein 1. *Journal of Lipid Research* 2015;56:2238–47.
- [29] Fessler MB, Rudel LL, Brown JM. Toll-like receptor signaling links dietary fatty acids to the metabolic syndrome. *Current Opinion in Lipidology* 2009;20:379–85.
- [30] Endo M, Masaki T, Seike M, Yoshimatsu H. TNF- α induces hepatic steatosis in mice by enhancing gene expression of sterol regulatory element binding protein-1c (SREBP-1c). *Experimental Biology and Medicine* 2017;232:614–21.
- [31] 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;87:81–6.
- [32] Ricchi M, Odoardi MR, Carulli L, Anzivino C, Ballestri S, Pinetti A, et al. Differential effect of oleic and palmitic acid on lipid accumulation and apoptosis in cultured hepatocytes. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 2009;24:830–40.
- [33] Sanders FWB, Griffin JL. De novo lipogenesis in the liver in health and disease: more than just a shunting yard for glucose. *Biological Reviews* 2016;91:452–68.
- [34] Ferré P, Foufelle F. Hepatic steatosis: a role for de novo lipogenesis and the transcription factor SREBP-1c. *Diabetes, Obesity and Metabolism* 2010;12:83–92.
- [35] Sun LP, Seemann J, Goldstein JL, Brown MS. Sterol-regulated transport of SREBPs from endoplasmic reticulum to Golgi: Insig renders sorting signal in Scap inaccessible to COPII proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:6519–26.
- [36] Ricoult SJH, Manning BD. The multifaceted role of mTORC1 in the control of lipid metabolism. *EMBO Rep* 2013;14:242–51.
- [37] Yellaturu CR, Deng X, Cagen LM, Wilcox HG, Mansbach CM, Siddiqi SA, et al. Insulin Enhances Post-translational Processing of Nascent SREBP-1c by Promoting Its Phosphorylation and Association with COPII Vesicles. *Journal of Biological Chemistry* 2009;284:7518–32.
- [38] Dentin R, Tomas-Cobos L, Foufelle F, Leopold J, Girard J, Postic C, et al. Glucose 6-phosphate, rather than xylulose 5-phosphate, is required for the activation of ChREBP in response to glucose in the liver. *Journal of Hepatology* 2012;56:199–209.
- [39] Ma L, Tsatsos NG, Towle HC. Direct Role of ChREBP-Mlx in Regulating Hepatic Glucose-responsive Genes. *Journal of Biological Chemistry* 2005;280:12019–27.
- [40] Brownsey RW, Boone AN, Elliott JE, Kulpa JE, Lee WM. Regulation of acetyl-CoA carboxylase. *Biochem Soc Trans* 2006;34:223–7.
- [41] Dirkx R, Vanhorebeek I, Martens K, Schad A, Grabenbauer M, Fahimi D, et al. Absence of peroxisomes in mouse hepatocytes causes mitochondrial and ER abnormalities. *Hepatology* 2005;41:868–78.

Bibliografía

- [42] Rao MS, Reddy JK. Peroxisomal β -oxidation and steatohepatitis. *Seminars in Liver Disease* 2001;21:43–55.
- [43] Akkaoui M, Cohen I, Esnous C, Lenoir V, Sournac M, Girard J, et al. Modulation of the hepatic malonyl-CoA–carnitine palmitoyltransferase 1A partnership creates a metabolic switch allowing oxidation of de novo fatty acids. *Biochemical Journal* 2009;420:429–38.
- [44] Leung TM, Nieto N. CYP2E1 and oxidant stress in alcoholic and non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of Hepatology* 2013;58:395–8.
- [45] Reddy JK, Hashimoto T. Peroxisomal beta-oxidation and peroxisome proliferator-activated receptor alpha: an adaptive metabolic system. *Annu Rev Nutr* 2001;21:193–230.
- [46] Dentin R, Benhamed F, Hainault I, Fauveau V, Foufelle F, Dyck JRB, et al. Liver-Specific Inhibition of ChREBP Improves Hepatic Steatosis and Insulin Resistance in ob/ob Mice. *Diabetes* 2006;55:2159–70.
- [47] Hegardt FG. Mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase: a control enzyme in ketogenesis. *Biochemical Journal* 1999;338:569.
- [48] Videla LA, Pettinelli P. Misregulation of PPAR functioning and its pathogenic consequences associated with nonalcoholic fatty liver disease in human obesity. *PPAR Research* 2012;2012:107434.
- [49] Kersten S, Stienstra R. The role and regulation of the peroxisome proliferator activated receptor alpha in human liver. *Biochimie* 2017;136:75–84.
- [50] Heeren J, Scheja L. Metabolic-associated fatty liver disease and lipoprotein metabolism. *Molecular Metabolism* 2021;50:101238.
- [51] Wu SA, Kersten S, Qi L. Lipoprotein Lipase and Its Regulators: An Unfolding Story. *Trends in Endocrinology & Metabolism* 2021;32:48–61.
- [52] 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. *Journal of Biological Chemistry* 1999;274:24714–20.
- [53] Améen C, Edvardsson U, Ljungberg A, Asp L, Åkerblad P, Tuneld A, et al. Activation of Peroxisome Proliferator-activated Receptor α Increases the Expression and Activity of Microsomal Triglyceride Transfer Protein in the Liver. *Journal of Biological Chemistry* 2005;280:1224–9.
- [54] Ference BA, Ginsberg HN, Graham I, Ray KK, Packard CJ, Bruckert E, et al. Low-density lipoproteins cause atherosclerotic cardiovascular disease. 1. Evidence from genetic, epidemiologic, and clinical studies. A consensus statement from the European Atherosclerosis Society Consensus Panel. *European Heart Journal* 2017;38:2459–72.
- [55] Ben-Aicha S, Badimon L, Vilahur G. Advances in HDL: Much More than Lipid Transporters. *International Journal of Molecular Sciences* 2020;21:732.
- [56] Okada T, Ohama T, Takafuji K, Kanno K, Matsuda H, Sairyo M, et al. Shotgun proteomic analysis reveals proteome alterations in HDL of patients with cholesteryl ester transfer protein deficiency. *Journal of Clinical Lipidology* 2019;13:317–25.

Bibliografía

- [57] Aviram M, Rosenblat M, Bisgaier CL, Newton RS, Primo-Parmo SL, la Du BN. Paraoxonase inhibits high-density lipoprotein oxidation and preserves its functions. A possible peroxidative role for paraoxonase. *The Journal of Clinical Investigation* 1998;101:1581–90.
- [58] Yu BL, Wang SH, Peng DQ, Zhao SP. HDL and immunomodulation: an emerging role of HDL against atherosclerosis. *Immunol Cell Biol* 2010;88:285–90.
- [59] Nordlie RC, Foster JD, Lange AJ. Regulation of glucose production by the liver. *Annual Review of Nutrition* 2003;19:379–406.
- [60] Agius L. Role of glycogen phosphorylase in liver glycogen metabolism. *Molecular Aspects of Medicine* 2015;46:34–45.
- [61] Ros S, García-Rocha M, Domínguez J, Ferrer JC, Guinovart JJ. Control of Liver Glycogen Synthase Activity and Intracellular Distribution by Phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry* 2009;284:6370–8.
- [62] Brouwers MCGJ, Jacobs C, Bast A, Stehouwer CDA, Schaper NC. Modulation of Glucokinase Regulatory Protein: A Double-Edged Sword? *Trends in Molecular Medicine* 2015;21:583–94.
- [63] Pilkis SJ, Claus TH. Hepatic Gluconeogenesis/Glycolysis: Regulation and Structure/Function Relationships of Substrate Cycle Enzymes. *Annual Review of Nutrition* 2003;11:465–515.
- [64] Zhang Y, Gu Y, Chen Y, Huang Z, Li M, Jiang W, et al. Dingxin Recipe IV attenuates atherosclerosis by regulating lipid metabolism through LXR- α /SREBP1 pathway and modulating the gut microbiota in ApoE $-/-$ mice fed with HFD. *J Ethnopharmacol* 2021;266:113436.
- [65] Yoon YS, Seo WY, Lee MW, Kim ST, Koo SH. Salt-inducible Kinase Regulates Hepatic Lipogenesis by Controlling SREBP-1c Phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry* 2009;284:10446–52.
- [66] Repa JJ, Liang G, Ou J, Bashmakov Y, Lobaccaro JMA, Shimomura I, et al. Regulation of mouse sterol regulatory element-binding protein-1c gene (SREBP-1c) by oxysterol receptors, LXR α and LXR β . *Genes & Development* 2000;14:2819–30.
- [67] Denechaud PD, Bossard P, Lobaccaro JMA, Millatt L, Staels B, Girard J, et al. ChREBP, but not LXRs, is required for the induction of glucose-regulated genes in mouse liver. *The Journal of Clinical Investigation* 2008;118:956–64.
- [68] Kawaguchi T, Takenoshita M, Kabashima T, Uyeda K. Glucose and cAMP regulate the L-type pyruvate kinase gene by phosphorylation/dephosphorylation of the carbohydrate response element binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:13710–5.
- [69] Oh KJ, Han HS, Kim MJ, Koo SH. CREB and FoxO1: two transcription factors for the regulation of hepatic gluconeogenesis. *BMB Rep* 2013;46:567–74.
- [70] Erion DM, Ignatova ID, Yonemitsu S, Nagai Y, Chatterjee P, Weismann D, et al. Prevention of Hepatic Steatosis and Hepatic Insulin Resistance by Knockdown of cAMP Response Element-Binding Protein. *Cell Metabolism* 2009;10:499–506.

Bibliografía

- [71] Altarejos JY, Montminy M. CREB and the CRTC co-activators: sensors for hormonal and metabolic signals. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2011;12:141–51.
- [72] Chrivia JC, Kwok RPS, Lamb N, Hagiwara M, Montminy MR, Goodman RH. Phosphorylated CREB binds specifically to the nuclear protein CBP. *Nature* 1993;365:855–9.
- [73] Koo SH, Flechner L, Qi L, Zhang X, Scretton RA, Jeffries S, et al. The CREB coactivator TORC2 is a key regulator of fasting glucose metabolism. *Nature* 2005;437:1109–14.
- [74] Yoon YS, Lee MW, Ryu D, Kim JH, Ma H, Seo WY, et al. Suppressor of MEK null (SMEK)/protein phosphatase 4 catalytic subunit (PP4C) is a key regulator of hepatic gluconeogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:17704–9.
- [75] Wang Y, Inoue H, Ravnskjaer K, Viste K, Miller N, Liu Y, et al. Targeted disruption of the CREB coactivator Crtc2 increases insulin sensitivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:3087–92.
- [76] Daitoku H, Hatta M, Matsuzaki H, Aratani S, Ohshima T, Miyagishi M, et al. Silent information regulator 2 potentiates Foxo 1-mediated transcription through its deacetylase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:10042–7.
- [77] Haeusler RA, Kaestner KH, Accili D. FoxOs Function Synergistically to Promote Glucose Production. *Journal of Biological Chemistry* 2010;285:35245–8.
- [78] Matsumoto M, Pocai A, Rossetti L, DePinho RA, Accili D. Impaired Regulation of Hepatic Glucose Production in Mice Lacking the Forkhead Transcription Factor Foxo1 in Liver. *Cell Metabolism* 2007;6:208–16.
- [79] Yoon JC, Puigserver P, Chen G, Donovan J, Wu Z, Rhee J, et al. Control of hepatic gluconeogenesis through the transcriptional coactivator PGC-1. *Nature* 2001;413:131–8.
- [80] Kim DK, Gang GT, Ryu D, Koh M, Kim YN, Kim SS, et al. Inverse Agonist of Nuclear Receptor ERR γ Mediates Antidiabetic Effect Through Inhibition of Hepatic Gluconeogenesis. *Diabetes* 2013;62:3093–102.
- [81] Kim DK, Ryu D, Koh M, Lee MW, Lim D, Kim MJ, et al. Orphan nuclear receptor estrogen-related receptor γ (ERR γ) is key regulator of hepatic gluconeogenesis. *Journal of Biological Chemistry* 2012;287:21628–39.
- [82] Lee JM, Seo WY, Song KH, Chanda D, Kim YD, Kim DK, et al. AMPK-dependent repression of hepatic gluconeogenesis via disruption of CREB-CRTC2 complex by orphan nuclear receptor small heterodimer partner. *Journal of Biological Chemistry* 2010;285:32182–91.
- [83] Kim YD, Park KG, Lee YS, Park YY, Kim DK, Nedumaran B, et al. Metformin Inhibits Hepatic Gluconeogenesis Through AMP-Activated Protein Kinase–Dependent Regulation of the Orphan Nuclear Receptor SHP. *Diabetes* 2008;57:306–14.
- [84] Nedumaran B, Hong S, Xie Y bin, Kim YH, Seo WY, Lee MW, et al. DAX-1 acts as a novel corepressor of orphan nuclear receptor HNF4 α and negatively regulates gluconeogenic enzyme gene expression. *Journal of Biological Chemistry* 2009;284:27511–23.
- [85] Lee JM, Seo WY, Han HS, Oh KJ, Lee YS, Kim DK, et al. Insulin-Inducible SMILE Inhibits Hepatic Gluconeogenesis. *Diabetes* 2016;65:62–73.

Bibliografía

- [86] Bruce A, Alexander J, Julian L, Martin R, Keith R, Peter W. The Endoplasmic Reticulum - Molecular Biology of the Cell. 4th ed. New York: Garland Science; 2002. <https://web.archive.org/web/20171003052046/><https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26841/> (accessed November 11, 2021).
- [87] Görlich D, Prehn S, Hartmann E, Kalies KU, Rapoport TA. A mammalian homolog of SEC61p and SECYp is associated with ribosomes and nascent polypeptides during translocation. *Cell* 1992;71:489–503.
- [88] Seiser RM, Nicchitta C v. The Fate of Membrane-bound Ribosomes Following the Termination of Protein Synthesis. *Journal of Biological Chemistry* 2000;275:33820–7.
- [89] Schwarz DS, Blower MD. The endoplasmic reticulum: structure, function and response to cellular signaling. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2015;73:1 2015;73:79–94.
- [90] Maxfield FR, Wüstner D. Intracellular cholesterol transport. *The Journal of Clinical Investigation* 2002;110:891–8.
- [91] Burchell A. Endoplasmic reticulum phosphate transport. *Kidney Int* 1996;49:953–8.
- [92] de Seny D, Bianchi E, Baiwir D, Cobraiville G, Collin C, Delière M, et al. Proteins involved in the endoplasmic reticulum stress are modulated in synovitis of osteoarthritis, chronic pyrophosphate arthropathy and rheumatoid arthritis, and correlate with the histological inflammatory score. *Scientific Reports* 2020;10:14159.
- [93] Stornaiuolo M, Lotti L v., Borgese N, Torrisi MR, Mottola G, Martire G, et al. KDEL and KKXX retrieval signals appended to the same reporter protein determine different trafficking between endoplasmic reticulum, intermediate compartment, and golgi complex. *Molecular Biology of the Cell* 2003;14:889–902.
- [94] Yang L, Li P, Fu S, Calay ES, Hotamisligil GS. Defective hepatic autophagy in obesity promotes ER stress and causes insulin resistance. *Cell Metabolism* 2010;11:467–78.
- [95] Zhang J, Zhang K, Li Z, Guo B. ER Stress-induced Inflammasome Activation Contributes to Hepatic Inflammation and Steatosis. *J Clin Cell Immunol* 2016;7:457.
- [96] Maiers JL, Malhi H. Endoplasmic Reticulum Stress in Metabolic Liver Diseases and Hepatic Fibrosis. *Seminars in Liver Disease* 2019;39:235–48.
- [97] Xu C, Bailly-Maitre B, Reed JC. Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions. *The Journal of Clinical Investigation* 2005;115:2656–64.
- [98] Tirosh B, Iwakoshi NN, Glimcher LH, Ploegh HL. Rapid Turnover of Unspliced Xbp-1 as a Factor That Modulates the Unfolded Protein Response. *Journal of Biological Chemistry* 2006;281:5852–60.
- [99] Calfon M, Zeng H, Urano F, Till JH, Hubbard SR, Harding HP, et al. IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA. *Nature* 2002;415:92–6.
- [100] Hollien J, Weissman JS. Decay of endoplasmic reticulum-localized mRNAs during the unfolded protein response. *Science* 2006;313:104–7.

Bibliografía

- [101] Urano F, Wang XZ, Bertolotti A, Zhang Y, Chung P, Harding HP, et al. Coupling of Stress in the ER to Activation of JNK Protein Kinases by Transmembrane Protein Kinase IRE1. *Science* 2000;287:664–6.
- [102] Hu P, Han Z, Couvillon AD, Kaufman RJ, Exton JH. Autocrine Tumor Necrosis Factor Alpha Links Endoplasmic Reticulum Stress to the Membrane Death Receptor Pathway through IRE1 α -Mediated NF- κ B Activation and Down-Regulation of TRAF2 Expression. *Molecular and Cellular Biology* 2006;26:3071–84.
- [103] Vattem KM, Wek RC. Reinitiation involving upstream ORFs regulates ATF4 mRNA translation in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:11269–74.
- [104] Wang P, Li J, Tao J, Sha B. The luminal domain of the ER stress sensor protein PERK binds misfolded proteins and thereby triggers PERK oligomerization. *Journal of Biological Chemistry* 2018;293:4110–21.
- [105] Harding HP, Zhang Y, Ron D. Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. *Nature* 1999;397:271–4.
- [106] Fagone P, Jackowski S. Membrane phospholipid synthesis and endoplasmic reticulum function. *Journal of Lipid Research* 2009;50:S311–6.
- [107] Wang S, Chen Z, Lam V, Han J, Hassler J, Finck BN, et al. IRE1 α -XBP1s induces PDI expression to increase MTP activity for hepatic VLDL assembly and lipid homeostasis. *Cell Metabolism* 2012;16:473–86.
- [108] Ji C, Kaplowitz N, Lau MY, Kao E, Petrovic LM, Lee AS. Liver-specific loss of glucose-regulated protein 78 perturbs the unfolded protein response and exacerbates a spectrum of liver diseases in mice. *Hepatology* 2011;54:229–39.
- [109] Rutkowski DT, Wu J, Back SH, Callaghan MU, Ferris SP, Iqbal J, et al. UPR Pathways Combine to Prevent Hepatic Steatosis Caused by ER Stress-Mediated Suppression of Transcriptional Master Regulators. *Developmental Cell* 2008;15:829–40.
- [110] Lloyd DJ, Wheeler MC, Gekakis N. A Point Mutation in Sec61 α 1 Leads to Diabetes and Hepatosteatosis in Mice. *Diabetes* 2010;59:460–70.
- [111] So JS, Hur KY, Tarrio M, Ruda V, Frank-Kamenetsky M, Fitzgerald K, et al. Silencing of lipid metabolism genes through ire1 α -mediated Mrna decay lowers plasma lipids in mice. *Cell Metabolism* 2012;16:487–99.
- [112] Herrema H, Zhou Y, Zhang D, Lee J, Hernandez MAS, Shulman GI, et al. XBP1s Is an Anti-lipogenic Protein. *J Biol Chem* 2016;291:17394–404.
- [113] Lee AH, Scapa EF, Cohen DE, Glimcher LH. Regulation of hepatic lipogenesis by the transcription factor XBP1. *Science* 2008;320:1492–6.
- [114] Zeng L, Lu M, Mori K, Luo S, Lee AS, Zhu Y, et al. ATF6 modulates SREBP2-mediated lipogenesis. *The EMBO Journal* 2004;23:950–8.
- [115] Zhang K, Wang S, Malhotra J, Hassler JR, Back SH, Wang G, et al. The unfolded protein response transducer IRE1 α prevents ER stress-induced hepatic steatosis. *The EMBO Journal* 2011;30:1357–75.

Bibliografía

- [116] Lemmer IL, Willemse N, Hilal N, Bartelt A. A guide to understanding endoplasmic reticulum stress in metabolic disorders. *Molecular Metabolism* 2021;47:101169.
- [117] Zhang K, Shen X, Wu J, Sakaki K, Saunders T, Rutkowski DT, et al. Endoplasmic reticulum stress activates cleavage of CREBH to induce a systemic inflammatory response. *Cell* 2006;124:587–99.
- [118] Scheuner D, Song B, McEwen E, Liu C, Laybutt R, Gillespie P, et al. Translational Control Is Required for the Unfolded Protein Response and In Vivo Glucose Homeostasis. *Molecular Cell* 2001;7:1165–76.
- [119] Acosta-Alvear D, Zhou Y, Blais A, Tsikitis M, Lents NH, Arias C, et al. XBP1 Controls Diverse Cell Type- and Condition-Specific Transcriptional Regulatory Networks. *Molecular Cell* 2007;27:53–66.
- [120] Wang Y, Vera L, Fischer WH, Montminy M. The CREB coactivator CRTC2 links hepatic ER stress and fasting gluconeogenesis. *Nature* 2009;460:534–7.
- [121] Villalobos-Labra R, Sáez PJ, Subiabre M, Silva L, Toledo F, Westermeier F, et al. Pre-pregnancy maternal obesity associates with endoplasmic reticulum stress in human umbilical vein endothelium. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 2018;1864:3195–210.
- [122] Mustapha S, Mohammed M, Azemi AK, Jatau AI, Shehu A, Mustapha L, et al. Current Status of Endoplasmic Reticulum Stress in Type II Diabetes. *Molecules* 2021;26:4362.
- [123] Hotamisligil GS. Endoplasmic Reticulum Stress and the Inflammatory Basis of Metabolic Disease. *Cell* 2010;140:900–17.
- [124] Seebacher F, Zeigerer A, Kory N, Krahmer N. Hepatic lipid droplet homeostasis and fatty liver disease. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 2020;108:72–81.
- [125] Mejhert N, Kuruvilla L, Gabriel KR, Elliott SD, Guie MA, Wang H, et al. Partitioning of MLX-Family Transcription Factors to Lipid Droplets Regulates Metabolic Gene Expression. *Molecular Cell* 2020;77:1251–64.
- [126] Chorlay A, Thiam AR. An Asymmetry in Monolayer Tension Regulates Lipid Droplet Budding Direction. *Biophysical Journal* 2018;114:631–40.
- [127] Gomes KB, Fernandes AP, Souza Ferreira AC, Pardini H, Garg A, Magré J, et al. Mutations in the Seipin and AGPAT2 Genes Clustering in Consanguineous Families with Berardinelli-Seip Congenital Lipodystrophy from Two Separate Geographical Regions of Brazil. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2004;89:357–61.
- [128] Becuwe M, Bond LM, Mejhert N, Boland S, Elliott SD, Cicconet M, et al. FIT2 is a lipid phosphate phosphatase crucial for endoplasmic reticulum homeostasis. *BioRxiv* 2018;291765.
- [129] Chitraju C, Trötzmüller M, Hartler J, Wolinski H, Thallinger GG, Lass A, et al. Lipidomic analysis of lipid droplets from murine hepatocytes reveals distinct signatures for nutritional stress. *Journal of Lipid Research* 2012;53:2141–52.

Bibliografía

- [130] Payne F, Lim K, Girousse A, Brown RJ, Kory N, Robbins A, 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;111:8901–6.
- [131] Prévost C, Sharp ME, Kory N, Lin Q, Voth GA, Farese R v., et al. Mechanism and Determinants of Amphipathic Helix-Containing Protein Targeting to Lipid Droplets. *Developmental Cell* 2018;44:73–86.
- [132] Krahmer N, Guo Y, Wilfling F, Hilger M, Lingrell S, Heger K, et al. Phosphatidylcholine Synthesis for Lipid Droplet Expansion Is Mediated by Localized Activation of CTP:Phosphocholine Cytidylyltransferase. *Cell Metabolism* 2011;14:504–15.
- [133] Brandt C, Nolte H, Henschke S, Engström Ruud L, Awazawa M, Morgan DA, et al. Food Perception Primes Hepatic ER Homeostasis via Melanocortin-Dependent Control of mTOR Activation. *Cell* 2018;175:1321–35.
- [134] Wilfling F, Wang H, Haas JT, Krahmer N, Gould TJ, Uchida A, et al. Triacylglycerol synthesis enzymes mediate lipid droplet growth by relocating from the ER to lipid droplets. *Developmental Cell* 2013;24:384–99.
- [135] Wilfling F, Thiam AR, Olarte MJ, Wang J, Beck R, Gould TJ, et al. Arf1/COPI machinery acts directly on lipid droplets and enables their connection to the ER for protein targeting. *Elife* 2014;3:e01607.
- [136] Thiam AR, Antonny B, Wang J, Delacotte J, Wilfling F, Walther TC, 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;110:13244–9.
- [137] Seebacher F, Zeigerer A, Kory N, Krahmer N. Hepatic lipid droplet homeostasis and fatty liver disease. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 2020;108:72–81.
- [138] Roberts MA, Olzmann JA. Protein Quality Control and Lipid Droplet Metabolism. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2020;36:115–39.
- [139] 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;1862:1197–204.
- [140] Valm AM, Cohen S, Legant WR, Melunis J, Hershberg U, Wait E, et al. Applying systems-level spectral imaging and analysis to reveal the organelle interactome. *Nature* 2017;546:162–7.
- [141] Xu D, Li Y, Wu L, Li Y, Zhao D, Yu J, et al. Rab18 promotes lipid droplet (LD) growth by tethering the ER to LDs through SNARE and NRZ interactions. *J Cell Biol* 2018;217:975–95.
- [142] Markgraf DF, Klemm RW, Junker M, Hannibal-Bach HK, Ejsing CS, Rapoport TA. An ER protein functionally couples neutral lipid metabolism on lipid droplets to membrane lipid synthesis in the ER. *Cell Rep* 2014;6:44–55.
- [143] Romanauska A, Köhler A. The Inner Nuclear Membrane Is a Metabolically Active Territory that Generates Nuclear Lipid Droplets. *Cell* 2018;174:700–15.
- [144] Gallardo-Montejano VI, Saxena G, Kusminski CM, Yang C, McAfee JL, Hahner L, et al. Nuclear Perilipin 5 integrates lipid droplet lipolysis with PGC-1 α /SIRT1-dependent

Bibliografía

- transcriptional regulation of mitochondrial function. *Nature Communications* 2016;7:1–14.
- [145] Sołtysik K, Ohsaki Y, Tatematsu T, Cheng J, Fujimoto T. Nuclear lipid droplets derive from a lipoprotein precursor and regulate phosphatidylcholine synthesis. *Nature Communications* 2019;10:1–12.
- [146] Benador IY, Veliova M, Mahdaviani K, Petcherski A, Wikstrom JD, Assali EA, et al. Mitochondria Bound to Lipid Droplets Have Unique Bioenergetics, Composition, and Dynamics that Support Lipid Droplet Expansion. *Cell Metabolism* 2018;27:869–85.
- [147] Cerk IK, Wechselberger L, Oberer M. Adipose Triglyceride Lipase Regulation: An Overview. *Current Protein & Peptide Science* 2018;19:221–33.
- [148] Wang H, Sreenevasan U, Hu H, Saladino A, Polster BM, Lund LM, et al. Perilipin 5, a lipid droplet-associated protein, provides physical and metabolic linkage to mitochondria. *Journal of Lipid Research* 2011;52:2159–68.
- [149] 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;61:1896–907.
- [150] Kaushik S, Cuervo AM. Degradation of lipid droplet-associated proteins by chaperone-mediated autophagy facilitates lipolysis. *Nature Cell Biology* 2015;17:759–70.
- [151] Chang CL, Weigel A v., Ioannou MS, Amalia Pasolli H, Shan Xu C, Peale DR, et al. Spastin tethers lipid droplets to peroxisomes and directs fatty acid trafficking through ESCRT-III. *Journal of Cell Biology* 2019;218:2583–99.
- [152] Gong J, Sun Z, Wu L, Xu W, Schieber N, Xu D, et al. Fsp27 promotes lipid droplet growth by lipid exchange and transfer at lipid droplet contact sites. *Journal of Cell Biology* 2011;195:953–63.
- [153] 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.
- [154] Xu W, Wu L, Yu M, Chen FJ, Arshad M, Xia X, et al. Differential roles of cell death-inducing DNA fragmentation factor- α -like effector (CIDE) proteins in promoting lipid droplet fusion and growth in subpopulations of hepatocytes. *Journal of Biological Chemistry* 2016;291:4282–93.
- [155] 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;61:857–69.
- [156] Grahn THM, Zhang Y, Lee MJ, Sommer AG, Mostoslavsky G, Fried SK, et al. FSP27 and PLIN1 interaction promotes the formation of large lipid droplets in human adipocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2013;432:296–301.
- [157] 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. *Developmental Cell* 2014;30:378–93.
- [158] Li P, Qian H, Chen Y, Nian Z, Su L, Yu H, et al. HDAC6-mediated acetylation of lipid droplet-binding protein CIDEC regulates fat-induced lipid storage. *The Journal of Clinical Investigation* 2017;127:1353–69.

Bibliografía

- [159] Galligan JJ, Petersen DR. The human protein disulfide isomerase gene family. *Human Genomics* 2012;6:1–15.
- [160] Parakh S, Atkin JD. Novel roles for protein disulphide isomerase in disease states: A double edged sword? *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 2015;3:30.
- [161] Appenzeller-Herzog C, Ellgaard L. The human PDI family: Versatility packed into a single fold. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 2008;1783:535–48.
- [162] Rutkevich LA, Cohen-Doyle MF, Brockmeier U, Williams DB. Functional relationship between protein disulfide isomerase family members during the oxidative folding of human secretory proteins. *Molecular Biology of the Cell* 2010;21:3093–105.
- [163] Ensembl. Thioredoxin Domain Containing 5. European Bioinformatics Institute , European Bioinformatics Institute, Ensembl: Avaiable online: http://www.ensembl.org/Mus_musculus/Gene/ExpressionAtlas?db=core;g=ENSMUSG0000038991;r=13:38684055-38712800; n.d.
- [164] Yates AD, Achuthan P, Akanni W, Allen J, Allen J, Alvarez-Jarreta J, et al. Ensembl 2020. *Nucleic Acids Research* 2020;48:D682–8.
- [165] GTEx Portal n.d. <https://gtexportal.org/home/gene/TXNDC5> (accessed November 16, 2021).
- [166] AlphaFold Protein Structure Database n.d. <https://alphafold.ebi.ac.uk/entry/Q8NBS9> (accessed May 24, 2022).
- [167] Gulerez IE, Kozlov G, Rosenauer A, Gehring K. Structure of the third catalytic domain of the protein disulfide isomerase ERp46. *Acta Cryst* 2012;68:378–81.
- [168] Bulleid NJ. Disulfide Bond Formation in the Mammalian Endoplasmic Reticulum. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2012;4:a013219.
- [169] Chawsheen HA, Ying Q, Jiang H, Wei Q. A critical role of the thioredoxin domain containing protein 5 (TXNDC5) in redox homeostasis and cancer development. *Genes and Diseases* 2018;5:312–22.
- [170] Kojima R, Okumura M, Masui S, Kanemura S, Inoue M, Saiki M, et al. Radically Different Thioredoxin Domain Arrangement of ERp46, an Efficient Disulfide Bond Introducer of the Mammalian PDI Family. *Structure* 2014;22:431–43.
- [171] Sato Y, Kojima R, Okumura M, Hagiwara M, Masui S, Maegawa KI, et al. Synergistic cooperation of PDI family members in peroxiredoxin 4-driven oxidative protein folding. *Scientific Reports* 2013;3:1–13.
- [172] Hatahet F, Ruddock LW. Protein disulfide isomerase: A critical evaluation of its function in disulfide bond formation. *Antioxidants and Redox Signaling* 2009;11:2807–50.
- [173] Trivedi M v., Laurence JS, Siahaan TJ. The Role of Thiols and Disulfides on Protein Stability. *Current Protein & Peptide Science* 2009;10:614–25.
- [174] Nakamura T, Prikhodko OA, Pirie E, Nagar S, Akhtar MW, Oh CK, et al. Aberrant protein S-nitrosylation contributes to the pathophysiology of neurodegenerative diseases. *Neurobiology of Disease* 2015;84:99–108.

Bibliografía

- [175] Nakamura T, Tu S, Akhtar MW, Sunico CR, Okamoto S ichi, Lipton SA. Aberrant Protein S-Nitrosylation in Neurodegenerative Diseases. *Neuron* 2013;78:596–614.
- [176] Chang TS, Jeong W, Woo HA, Sun ML, Park S, Sue GR. Characterization of Mammalian Sulfiredoxin and Its Reactivation of Hyperoxidized Peroxiredoxin through Reduction of Cysteine Sulfinic Acid in the Active Site to Cysteine. *Journal of Biological Chemistry* 2004;279:50994–1001.
- [177] Charlton HK, Webster J, Kruger S, Simpson F, Richards AA, Whitehead JP. ERp46 binds to AdipoR1, but not AdipoR2, and modulates adiponectin signalling. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2010;392:234–9.
- [178] Mo R, Peng J, Xiao J, Ma J, Li W, Wang J, et al. High TXNDC5 expression predicts poor prognosis in renal cell carcinoma. *Tumor Biology* 2016;37:9797–806.
- [179] Wang L, Song G, Chang X, Tan W, Pan J, Zhu X, et al. The role of TXNDC5 in castration-resistant prostate cancer—involve ment of androgen receptor signaling pathway. *Oncogene* 2015;34:4735–45.
- [180] Zhang L, Hou Y, Li N, Wu K, Zhai J. The influence of TXNDC5 gene on gastric cancer cell. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 2010;136:1497–505.
- [181] Lee SO, Jin UH, Kang JH, Kim SB, Guthrie AS, Sreevalsan S, et al. The Orphan Nuclear Receptor NR4A1 (Nur77) Regulates Oxidative and Endoplasmic Reticulum Stress in Pancreatic Cancer Cells. *Molecular Cancer Research* 2014;12:527–38.
- [182] Sullivan DC, Huminiecki L, Moore JW, Boyle JJ, Poulsom R, Creamer D, et al. EndoPDI, a Novel Protein-disulfide Isomerase-like Protein That Is Preferentially Expressed in Endothelial Cells Acts as a Stress Survival Factor. *Journal of Biological Chemistry* 2003;278:47079–88.
- [183] Wang L, Zheng Y, Xu H, Yan X, Chang X. Investigate Pathogenic Mechanism of TXNDC5 in Rheumatoid Arthritis. *PLOS ONE* 2013;8:e53301.
- [184] Chan YC, Khanna S, Roy S, Sen CK. MiR-200b targets Ets-1 and is down-regulated by hypoxia to induce angiogenic response of endothelial cells. *Journal of Biological Chemistry* 2011;286:2047–56.
- [185] Camargo LDL, Babelova A, Mieth A, Weigert A, Mooz J, Rajalingam K, et al. Endo-PDI is required for TNF α -induced angiogenesis. *Free Radical Biology and Medicine* 2013;65:1398–407.
- [186] Yang K-C, Shih Y-C, Chen C-L, Zhang Y, Mellor RL, Kanter EM, et al. Endoplasmic Reticulum Protein TXNDC5 Augments Myocardial Fibrosis by Facilitating Extracellular Matrix Protein Folding and Redox-Sensitive Cardiac Fibroblast Activation. *Molecular Medicine* 2018;122:1052–68.
- [187] Lee TH, Yeh CF, Lee YT, Shih YC, Chen YT, Hung CT, et al. Fibroblast-enriched endoplasmic reticulum protein TXNDC5 promotes pulmonary fibrosis by augmenting TGF β signaling through TGFBR1 stabilization. *Nature Communications* 2020;11:4254.

Bibliografía

- [188] Chen YT, Jhao PY, Hung CT, Wu YF, Lin SJ, Chiang WC, et al. Endoplasmic reticulum protein TXNDC5 promotes renal fibrosis by enforcing TGF- β signaling in kidney fibroblasts. *The Journal of Clinical Investigation* 2021;131:e143645.
- [189] Hung C-T, Su T-H, Chen Y-T, Wu Y-F, Chen Y-T, Lin S-J, et al. Targeting ER protein TXNDC5 in hepatic stellate cell mitigates liver fibrosis by repressing non-canonical TGF β signalling. *Gut* 2021.
- [190] Wang L, Song G, Zheng Y, Wang D, Dong H, Pan J, et al. miR-573 is a negative regulator in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Celullar & Molecular Inmunology* 2016;13:839–48.
- [191] Lu Q, Wang J, Zhang X, Tian R, Qiao L, Ge L, et al. TXNDC5 protects synovial fibroblasts of rheumatoid arthritis from the detrimental effects of endoplasmic reticulum stress. *Intractable & Rare Diseases Research* 2020;9:23–9.
- [192] Li J, Xu B, Wu C, Yan X, Zhang L, Chang X. TXNDC5 contributes to rheumatoid arthritis by down-regulating IGFBP1 expression. *Clinical and Experimental Immunology* 2018;192:82–94.
- [193] Wang L, Dong H, Song G, Zhang R, Pan J, Han J. TXNDC5 synergizes with HSC70 to exacerbate the inflammatory phenotype of synovial fibroblasts in rheumatoid arthritis through NF- κ B signaling. *Cellular and Molecular Immunology* 2018;15:685–96.
- [194] Xu B, Li J, Wu C, Liu C, Yan X, Chang X. CXCL10 and TRAIL Are upregulated by TXNDC5 in rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes. *Journal of Rheumatology* 2018;45:335–40.
- [195] Zeng Y, Ma W, ma C, Ren X, Wang Y. Inhibition of TXNDC5 attenuates lipopolysaccharide-induced septic shock by altering inflammatory responses. *Laboratory Investigation* 2022;102:422–31.
- [196] Yeh CF, Cheng SH, Lin YS, Shentu TP, Huang RT, Zhu J, et al. Targeting mechanosensitive endothelial TXNDC5 to stabilize eNOS and reduce atherosclerosis in vivo. *Science Advances* 2022;8:8096.
- [197] Trichopoulou A, Costacou T, Bamia C, Trichopoulos D. Adherence to a Mediterranean diet and survival in a Greek population. *N Engl J Med* 2003;348:2599–608.
- [198] Lou-Bonafonte JM, Martínez-Beamonte R, Sanclemente T, Surra JC, Herrera-Marcos L v., Sanchez-Marco J, et al. Current Insights into the Biological Action of Squalene. *Molecular Nutrition & Food Research* 2018;62:1800136.
- [199] Miettinen TA, Vanhanen H. Serum concentration and metabolism of cholesterol during rapeseed oil and squalene feeding. *The American Journal of Clinical Nutrition* 1994;59:356–63.
- [200] Hoang TMH, Nguyen CH, Le TT, Hoang THQ, Ngo THT, Hoang TLA, et al. Squalene isolated from *Schizochytrium mangrovei* is a peroxisome proliferator-activated receptor- α agonist that regulates lipid metabolism in HepG2 cells. *Biotechnol Lett* 2016;38:1065–71.

Bibliografía

- [201] Sancho-Knapik S, Gabas-Rivera C, Gascon S, Romanos E, Martinez-Beamonte R, Navarro MA, et al. Diet and sexual hormones regulate hepatic synaptotagmin 1 mRNA in mice. *Front Biosci (Elite Ed)* 2016;8:129–42.
- [202] Myoung SH, Sun YP, Shinzawa K, Kim S, Kun WC, Lee JH, et al. Lysophosphatidylcholine as a death effector in the lipoapoptosis of hepatocytes. *J Lipid Res* 2008;49:84–97.
- [203] Martínez-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;74:531–8.
- [204] Gabás-Rivera C, Jurado-Ruiz E, Sánchez-Ortiz A, Romanos E, Martínez-Beamonte R, Navarro MA, et al. Dietary Squalene Induces Cytochromes Cyp2b10 and Cyp2c55 Independently of Sex, Dose, and Diet in Several Mouse Models. *Molecular Nutrition & Food Research* 2020;64:2000354.
- [205] Bidooki SH, Alejo T, Sánchez-Marco J, Martínez-Beamonte R, Abuobeid R, Burillo JC, et al. Squalene Loaded Nanoparticles Effectively Protect Hepatic AML12 Cell Lines against Oxidative and Endoplasmic Reticulum Stress in a TXNDC5-Dependent Way. *Antioxidants* 2022;11:581.
- [206] Dunham I, Kundaje A, Aldred SF, Collins PJ, Davis CA, Doyle F, et al. An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature* 2012;489:57–74.
- [207] Montoliu L. Gene Transfer Strategies in Animal Transgenesis. <Https://HomeLiebertpubCom/Clo> 2004;4:39–46.
- [208] McCreath KJ, Howcroft J, Campbell KHS, Colman A, Schnleke AE, Kind AJ. Production of gene-targeted sheep by nuclear transfer from cultured somatic cells. *Nature* 2000;405:1066–9.
- [209] Rémy S, Tesson L, Ménoret S, Usal C, Scharenberg AM, Anegon I. Zinc-finger nucleases: a powerful tool for genetic engineering of animals. *Transgenic Res* 2010;19:363–71.
- [210] Sommer D, Peters AE, Baumgart AK, Beyer M. TALEN-mediated genome engineering to generate targeted mice. *Chromosome Res* 2015;23:43–55.
- [211] Hsu PD, Lander ES, Zhang F. Development and Applications of CRISPR-Cas9 for Genome Engineering. *Cell* 2014;157:1262.
- [212] Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, Richards M, Boyaval P, Moineau S, et al. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science* 2007;315:1709–12.
- [213] Gasiunas G, Barrangou R, Horvath P, Siksnys V. Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012;109:E2579–86.
- [214] Fu Y, Foden JA, Khayter C, Maeder ML, Reyne D, Joung JK, et al. High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. *Nat Biotechnol* 2013;31:822–6.
- [215] Labun K, Montague TG, Krause M, Torres Cleuren YN, Tjeldnes H, Valen E. CHOPCHOP v3: expanding the CRISPR web toolbox beyond genome editing. *Nucleic Acids Research* 2019;47:W171–4.

Bibliografía

- [216] Bae S, Park J, Kim JS. Cas-OFFinder: a fast and versatile algorithm that searches for potential off-target sites of Cas9 RNA-guided endonucleases. *Bioinformatics* 2014;30:1473–5.
- [217] Nishimasu H, Ran FA, Hsu PD, Konermann S, Shehata SI, Dohmae N, et al. Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA. *Cell* 2014;156:935–49.
- [218] Vakulskas CA, Dever DP, Rettig GR, Turk R, Jacobi AM, Collingwood MA, et al. A high-fidelity Cas9 mutant delivered as a ribonucleoprotein complex enables efficient gene editing in human hematopoietic stem and progenitor cells. *Nat Med* 2018;24:1216–24.
- [219] Kleinstiver BP, Pattanayak V, Prew MS, Tsai SQ, Nguyen NT, Zheng Z, et al. High-fidelity CRISPR–Cas9 nucleases with no detectable genome-wide off-target effects. *Nature* 2016;529:490–5.
- [220] ATCC. AML12 n.d. <https://www.atcc.org/products/crl-2254> (accessed May 26, 2022).
- [221] Ministerio de Agricultura P y A. Informe sobre usos de animales en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia en 2020. Madrid: 2021. https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/produccion-y-mercados-ganaderos/bienestanimal/en-la-investigacion/Informes_y_publicaciones.aspx (accessed April 28, 2022).
- [222] The Jackson Laboratory. 000664 - B6 Strain Details n.d. <https://www.jax.org/strain/000664> (accessed April 28, 2022).
- [223] Tröder SE, Ebert LK, Butt L, Assenmacher S, Schermer B, Zevnik B. An optimized electroporation approach for efficient CRISPR/Cas9 genome editing in murine zygotes. *PLOS ONE* 2018;13:e0196891.
- [224] Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M, et al. Primer3--new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res* 2012;40:e115.
- [225] Santa Cruz Biotechnology. ERp46 CRISPR Knockout and Activation Products n.d. <https://www.scbt.com/es/p/erp46-crispr-knockout-and-activation-products-m?requestFrom=search> (accessed May 25, 2022).
- [226] Aviner R. The science of puromycin: From studies of ribosome function to applications in biotechnology. *Comput Struct Biotechnol J* 2020;18:1074–83.
- [227] Kumar P, Nagarajan A, Uchil PD. Analysis of Cell Viability by the MTT Assay. *Cold Spring Harb Protoc* 2018;2018:469–71.
- [228] Pertea M, Pertea GM, Antonescu CM, Chang T-C, Mendell JT, Salzberg SL. StringTie enables improved reconstruction of a transcriptome from RNA-seq reads. *Nature Biotechnology* 2015;33:290–5.
- [229] Trapnell C, Roberts A, Goff L, Pertea G, Kim D, Kelley DR, et al. Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks. *Nature Protocols* 2012;7:562–78.
- [230] Shen S, Park JW, Lu Z, Lin L, Henry MD, Wu YN, et al. rMATS: Robust and flexible detection of differential alternative splicing from replicate RNA-Seq data. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2014;111:E5593–601.

Bibliografía

- [231] Langmead B, Salzberg SL. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature Methods* 2012;9:357–9.
- [232] Li B, Dewey CN. RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. *BMC Bioinformatics* 2011;12:1–16.
- [233] Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, et al. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clinical Chemistry* 2009;55:611–22.
- [234] 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;25:402–8.
- [235] Guillen N, Acín S, Surra JC, Arnal C, Godino J, García-Granados A, et al. Apolipoprotein E determines the hepatic transcriptional profile of dietary maslinic acid in mice. *J Nutr Biochem* 2009;20:882–93.
- [236] Suvarna KS, Layton C, Bancrof JD. *Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques*. 8th Edition. Elsevier; 2012.
- [237] Folch J, Less 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.
- [238] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 1976;72:248–54.
- [239] McIlwain S, Mathews M, Bereman MS, Rubel EW, MacCoss MJ, Noble WS. Estimating relative abundances of proteins from shotgun proteomics data. *BMC Bioinformatics* 2012;13:308.
- [240] 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;76:4350–4.
- [241] Wang Z, Gerstein M, Snyder M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat Rev Genet* 2009;10:57.
- [242] Kim M-S, Pinto SM, Getnet D, Nirujogi RS, Manda SS, Chaerkady R, et al. A draft map of the human proteome. *Nature* 2014;509:575–81.
- [243] Flicek P, Amode MR, Barrell D, Beal K, Brent S, Carvalho-Silva D, et al. Ensembl 2012. *Nucleic Acids Research* 2012;40:D84–90.
- [244] Hwang C, Sinskey AJ, Lodish HF. Oxidized Redox State of Glutathione in the Endoplasmic Reticulum. *Science* 1992;257:1496–502.
- [245] Okumura M, Kadokura H, Inaba K. Structures and functions of protein disulfide isomerase family members involved in proteostasis in the endoplasmic reticulum. *Free Radical Biology and Medicine* 2015;83:314–22.
- [246] Saibil H. Chaperone machines for protein folding, unfolding and disaggregation. *Nature Reviews Molecular* 2013;14:630–42.

Bibliografía

- [247] Sato Y, Inaba K. Disulfide bond formation network in the three biological kingdoms, bacteria, fungi and mammals. *The FEBS Journal* 2012;279:2262–71.
- [248] Xu B, Li J, Liu X, Li C, Chang X. TXNDC5 is a cervical tumor susceptibility gene that stimulates cell migration, vasculogenic mimicry and angiogenesis by down-regulating SERPINF1 and TRAF1 expression. *Oncotarget* 2017;8:91009–24.
- [249] Couasnay G, Bon N, Devignes CS, Source S, Bianchi A, Véziers J, et al. PiT1/SIc20a1 Is Required for Endoplasmic Reticulum Homeostasis, Chondrocyte Survival, and Skeletal Development. *Journal of Bone and Mineral Research* 2019;34:387–98.
- [250] Zang H, Li Y, Zhang X, Huang G. Circ_0000517 contributes to hepatocellular carcinoma progression by upregulating TXNDC5 via sponging mir-1296-5p. *Cancer Management and Research* 2020;12:3457–68.
- [251] Wang H, Yang X, Guo Y, Shui L, Li S, Bai Y, et al. HERG1 promotes esophageal squamous cell carcinoma growth and metastasis through TXNDC5 by activating the PI3K/AKT pathway. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research* 2019;38:324.
- [252] Duivenvoorden WCM, Hopmans SN, Austin RC, Pinthus JH. Endoplasmic reticulum protein ERp46 in prostate adenocarcinoma. *Oncology Letters* 2017;13:3624–30.
- [253] Hedrick E, Mohankumar K, Lacey A, Safe S. Inhibition of NR4A1 promotes ROS accumulation and IL24-dependent growth arrest in rhabdomyosarcoma. *Molecular Cancer Research* 2019;17:2221–32.
- [254] Hedrick E, Lee SO, Kim G, Abdelrahim M, Jin UH, Safe S, et al. Nuclear receptor 4A1 (NR4A1) as a drug target for renal cell adenocarcinoma. *PLoS ONE* 2015;10:e0128308.
- [255] Wu Z, Zhang L, Li N, Sha L, Zhang K. An immunohistochemical study of thioredoxin domain-containing 5 expression in gastric adenocarcinoma. *Oncology Letters* 2015;9:1154–8.
- [256] Tan F, Zhu H, He X, Yu N, Zhang X, Xu H, et al. Role of TXNDC5 in tumorigenesis of colorectal cancer cells: In vivo and in vitro evidence. *International Journal of Molecular Medicine* 2018;42:935–45.
- [257] Ao N, Yang J, Wang X, Du J. Glucagon-like peptide-1 preserves non-alcoholic fatty liver disease through inhibition of the endoplasmic reticulum stress-associated pathway. *Hepatology Research* 2016;46:343–53.
- [258] Tsuchiya Y, Saito M, Kadokura H, Miyazaki J ichi, Tashiro F, Imagawa Y, et al. IRE1-XBP1 pathway regulates oxidative proinsulin folding in pancreatic β cells. *Journal of Cell Biology* 2018;217:1287–301.
- [259] Ibrahim N 'Izzah, Fairus S, Zulfarina MS, Mohamed IN. The Efficacy of Squalene in Cardiovascular Disease Risk-A Systematic Review. *Nutrients* 2020;12:414.
- [260] Fabbrini E, Magkos F. Hepatic Steatosis as a Marker of Metabolic Dysfunction. *Nutrients* 2015;7:4995.
- [261] Schuster S, Cabrera D, Arrese M, Feldstein AE. Triggering and resolution of inflammation in NASH. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* 2018;15:349–64.

Bibliografía

- [262] Rodríguez-Calvo R, Guadall A, Calvayrac O, Navarro MA, Alonso J, Ferrán B, et al. Overexpression of Neuron-derived Orphan Receptor-1 (NOR-1) exacerbates neointimal hyperplasia after vascular injury. *Human Molecular Genetics* 2013;22:1949–59.
- [263] Herrera-Marcos L v., Sancho-Knapik S, Gabás-Rivera C, Barranquero C, Gascón S, Romanos E, et al. Pgc1a is responsible for the sex differences in hepatic Cidec/Fsp27 β mRNA expression in hepatic steatosis of mice fed a Western diet. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 2020;318:E249–61.
- [264] Abuobeid R, Herrera-Marcos L, Navarro MA, Arnal C, Martínez-Beamonte R, Surra J, et al. Dietary Erythrodol Modifies Hepatic Transcriptome in Mice in a Sex and Dose-Dependent Way. *International Journal of Molecular Sciences* 2020;21:7331.
- [265] Herrera-Marcos L v., Martínez-Beamonte R, Macías-Herranz M, Arnal C, Barranquero C, Puente-Lanzarote JJ, et al. Hepatic galectin-3 is associated with lipid droplet area in non-alcoholic steatohepatitis in a new swine model. *Scientific Reports* 2022;12:1–17.
- [266] Lou-Bonafonte JM, Gabás-Rivera C, Navarro MA, Osada J. PON1 and Mediterranean Diet. *Nutrients* 2015;7:4068–92.
- [267] Martínez-Beamonte R, Navarro MA, Acín S, Guillén 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:e55231.
- [268] Navab M, Hama SY, Hough GP, Subbanagounder G, Reddy ST, Fogelman AM. A cell-free assay for detecting HDL that is dysfunctional in preventing the formation of or inactivating oxidized phospholipids. *Journal of Lipid Research* 2001;42:1308–17.
- [269] Arbonés-Mainar JM, Navarro MA, Guzmán MA, Arnal C, Surra JC, Acín S, et al. Selective effect of conjugated linoleic acid isomers on atherosclerotic lesion development in apolipoprotein E knockout mice. *Atherosclerosis* 2006;189:318–27.
- [270] Asimakopoulou A, Weiskirchen S, Weiskirchen R. Lipocalin 2 (LCN2) Expression in Hepatic Malfunction and Therapy. *Frontiers in Physiology* 2016;0:430.
- [271] Fukuda K, Okuda A, Yusa K, Shinkai Y. A CRISPR knockout screen identifies SETDB1-target retroelement silencing factors in embryonic stem cells. *Genome Research* 2018;28:846–58.
- [272] Marhaug G, Dowton SB. Serum amyloid A: An acute phase apolipoprotein and precursor of AA amyloid. *Baillière's Clinical Rheumatology* 1994;8:553–73.
- [273] Stearman RS, Lowell CA, Peltzman CG, Morrow JF. The sequence and structure of a new serum amyloid a gene. *Nucleic Acids Research* 1986;14:797–809.
- [274] Mori M, Tian G, Ishikawa A, Higuchi K. Diversity and Complexity of the Mouse Saa1 and Saa2 genes. *Experimental Animals* 2014;63:99.
- [275] Rio D del, Stewart AJ, Pellegrini N. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases* 2005;15:316–28.

Bibliografía

- [276] Shunmoogam N, Naidoo P, Chilton R. Paraoxonase (PON)-1: a brief overview on genetics, structure, polymorphisms and clinical relevance. *Vascular Health and Risk Management* 2018;14:137–43.
- [277] Huang Y, Wu Z, Riwanto M, Gao S, Levison BS, Gu X, et al. Myeloperoxidase, paraoxonase-1, and HDL form a functional ternary complex. *The Journal of Clinical Investigation* 2013;123:3815.
- [278] Stafforini DM. Plasma PAF-AH (PLA2G7): Biochemical Properties, Association with LDLs and HDLs, and Regulation of Expression. *Enzymes (Essen)* 2015;38:71–93.
- [279] Buck M, Gouwy M, Wang J, Snick J, Opdenakker G, Struyf S, et al. Structure and Expression of Different Serum Amyloid A (SAA) Variants and their Concentration-Dependent Functions During Host Insults. *Current Medicinal Chemistry* 2016;23:1725–55.
- [280] Chait A, den Hartigh LJ, Wang S, Goodspeed L, Babenko I, Altemeier WA, et al. Presence of serum amyloid A3 in mouse plasma is dependent on the nature and extent of the inflammatory stimulus. *Scientific Report* 2020;10:1–10.
- [281] Fukuda K, Okuda A, Yusa K, Shinkai Y. A CRISPR knockout screen identifies SETDB1-target retroelement silencing factors in embryonic stem cells. *Genome Research* 2018;28:846–58.
- [282] Price AJ, Manjegowda MC, Kain J, Anandh S, Bochkis IM. Hdac3, Setdb1, and Kap1 mark H3K9me3/H3K14ac bivalent regions in young and aged liver. *Aging Cell* 2020;19:e13092.
- [283] Yagnik D, Hills F. Urate crystals induce macrophage PAF-AH secretion which is differentially regulated by TGF β 1 and hydrocortisone. *Molecular Medicine Reports* 2018;18:3506–12.
- [284] Nakamura MT, Yudell BE, Loor JJ. Regulation of energy metabolism by long-chain fatty acids. *Progress in Lipid Research* 2014;53:124–44.
- [285] Ao N, Yang J, Wang X, Du J. Glucagon-like peptide-1 preserves non-alcoholic fatty liver disease through inhibition of the endoplasmic reticulum stress-associated pathway. *Hepatology Research* 2016;46:343–53.
- [286] Yu J, Yang M, Zhou B, Luo J, Zhang Z, Zhang W, et al. CircRNA-104718 acts as competing endogenous RNA and promotes hepatocellular carcinoma progression through microRNA-218-5p/TXNDC5 signaling pathway. *Clinical Science* 2019;133:1487–503.
- [287] HA C, Q Y, H J, Q W. A critical role of the thioredoxin domain containing protein 5 (TXNDC5) in redox homeostasis and cancer development. *Genes Dis* 2018;5:312–22.
- [288] Seo E, Kang H, Choi H, Choi W, Jun HS. Reactive oxygen species-induced changes in glucose and lipid metabolism contribute to the accumulation of cholesterol in the liver during aging. *Aging Cell* 2019;18:e12895.
- [289] Stonik JA, Remaley AT, Demosky SJ, Neufeld EB, Bocharov A, Brewer HB. Serum Amyloid a promotes ABCA1-dependent and ABCA1-independent lipid efflux from cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2004;321:936–41.

Bibliografía

- [290] Mayer FJ, Binder CJ, Krychtiuk KA, Schillinger M, Minar E, Hoke M. The prognostic value of serum amyloid A for long-term mortality among patients with subclinical carotid atherosclerosis. *European Journal of Clinical Investigation* 2019;49:e13095.
- [291] Kosuge M, Ebina T, Ishikawa T, Hibi K, Tsukahara K, Okuda J, et al. Serum Amyloid A is a Better Predictor of Clinical Outcomes than C-Reactive Protein in Non-ST-Segment Elevation Acute Coronary Syndromes. *Circulation Journal* 2007;71:186–90.
- [292] de Beer MC, Wroblewski JM, Noffsinger VP, Rateri DL, Howatt DA, Balakrishnan A, et al. Deficiency of endogenous acute phase serum amyloid A does not affect atherosclerotic lesions in apolipoprotein E-deficient mice. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 2014;34:255–61.
- [293] Chen DL, Xiang JN, Yang LY. Role of ERp46 in β-cell lipoapoptosis through endoplasmic reticulum stress pathway as well as the protective effect of exendin-4. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2012;426:324–9.
- [294] Lin SH, Liu CM, Liu YL, Shen-Jang Fann C, Hsiao PC, Wu JY, et al. Clustering by neurocognition for fine mapping of the schizophrenia susceptibility loci on chromosome 6p. *Genes, Brain and Behavior* 2009;8:785–94.
- [295] Jeong KH, Shin MK, Uhm YK, Kim HJ, Chung JH, Lee MH. Association of TXNDC5 gene polymorphisms and susceptibility to nonsegmental vitiligo in the Korean population. *British Journal of Dermatology* 2010;162:759–64.
- [296] Sánchez-Marco J, Martínez-Beamonte R, Diego A de, Herrero-Continent T, Barranquero C, Arnal C, et al. Thioredoxin Domain Containing 5 Suppression Elicits Serum Amyloid A-Containing High-Density Lipoproteins. *Biomedicines* 2022;10:709.
- [297] Lampropoulou E, Lymeropoulou A, Charonis A. Reduced expression of ERp46 under diabetic conditions in β-cells and the effect of liraglutide. *Metabolism: Clinical and Experimental* 2016;65:7–15.
- [298] Li AH, Morrison AC, Kovar C, Cupples LA, Brody JA, Polfus LM, et al. Analysis of loss-of-function variants and 20 risk factor phenotypes in 8,554 individuals identifies loci influencing chronic disease. *Nature Genetics* 2015;47:640–2.
- [299] Morand JPF, Macri J, Adeli K. Proteomic Profiling of Hepatic Endoplasmic Reticulum-associated Proteins in an Animal Model of Insulin Resistance and Metabolic Dyslipidemia. *Journal of Biological Chemistry* 2005;280:17626–33.
- [300] Burchfield JG, Kebede MA, Meoli CC, Stöckli J, Whitworth PT, Wright AL, et al. High dietary fat and sucrose result in an extensive and time-dependent deterioration in health of multiple physiological systems in mice. *Journal of Biological Chemistry* 2018;293:5731–45.
- [301] Lopez-Yus M, Lopez-Perez R, Garcia-Sobreviela MP, del Moral-Bergos R, Lorente-Cebrian S, Arbones-Mainar JM. Adiponectin overexpression in C2C12 myocytes increases lipid oxidation and myofiber transition. *Journal of Physiology and Biochemistry* 2021;1–9.
- [302] Wang Y, Kwon H, Su X, Wondisford FE. Glycerol not lactate is the major net carbon source for gluconeogenesis in mice during both short and prolonged fasting. *Molecular Metabolism* 2020;31:36.

Bibliografía

- [303] Wang L, Yu J, Zhou Q, Wang X, Mukhanova M, Du W, et al. TOX4, an insulin receptor-independent regulator of hepatic glucose production, is activated in diabetic liver. *Cell Metabolism* 2022;34:158–70.
- [304] Lampropoulou E, Lymeropoulou A, Charonis A. Reduced expression of ERp46 under diabetic conditions in β -cells and the effect of liraglutide. *Metabolism - Clinical and Experimental* 2016;65:7–15.
- [305] Gribble FM. A higher power for insulin. *Nature* 2005;434:965–6.
- [306] Holman GD. Structure, function and regulation of mammalian glucose transporters of the SLC2 family. *European Journal of Physiology* 2020;472:1155–75.
- [307] Iozzo P, Geisler F, Oikonen V, Mäki M, Takala T, Solin O, et al. Insulin Stimulates Liver Glucose Uptake in Humans: An 18F-FDG PET Study. *Journal of Nuclear Medicine* 2003;44:682.
- [308] Morimoto C, Tsujita T, Sumida M, Okuda H. Substrate-dependent lipolysis induced by isoproterenol. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;274:631–4.
- [309] Obici S, Lopes-Bertolini G, Curi R, Bazotte RB. Liver glycogen metabolism during short-term insulin-induced hypoglycemia in fed rats. *Cell Biochem Funct* 2008;26:755–9.
- [310] Backer JM, Kahn CR, White MF. Tyrosine phosphorylation of the insulin receptor is not required for receptor internalization: Studies in 2,4-dinitrophenol-treated cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989;86:3209–13.
- [311] Chen Y, Huang L, Qi X, Chen C. Insulin Receptor Trafficking: Consequences for Insulin Sensitivity and Diabetes. *International Journal of Molecular Sciences* 2019;20:5007.
- [312] Eckstein SS, Weigert C, Lehmann R. Divergent Roles of IRS (Insulin Receptor Substrate) 1 and 2 in Liver and Skeletal Muscle. *Current Medicinal Chemistry* 2017;24:1827–52.
- [313] Kubota N, Kubota T, Itoh S, Kumagai H, Kozono H, Takamoto I, et al. Dynamic Functional Relay between Insulin Receptor Substrate 1 and 2 in Hepatic Insulin Signaling during Fasting and Feeding. *Cell Metabolism* 2008;8:49–64.
- [314] Taniguchi CM, Ueki K, Kahn CR. Complementary roles of IRS-1 and IRS-2 in the hepatic regulation of metabolism. *The Journal of Clinical Investigation* 2005;115:718–27.
- [315] Dong X, Park S, Lin X, Copps K, Yi X, White MF. Irs1 and Irs2 signaling is essential for hepatic glucose homeostasis and systemic growth. *The Journal of Clinical Investigation* 2006;116:101–14.
- [316] Han HS, Kang G, Kim JS, Choi BH, Koo SH. Regulation of glucose metabolism from a liver-centric perspective. *Experimental & Molecular Medicine* 2016;48:e218.
- [317] Mues C, Zhou J, Manolopoulos KN, Korsten P, Schmoll D, Klotz LO, et al. Regulation of glucose-6-phosphatase gene expression by insulin and metformin. *Hormone and Metabolic Research* 2009;41:730–5.
- [318] Allard JB, Duan C. IGF-binding proteins: Why do they exist and why are there so many? *Frontiers in Endocrinology* 2018;9:117.

Bibliografía

- [319] Neacsu O, Cleveland K, Xu H, Tchkonia TT, Kirkland JL, Boney CM. IGF-I attenuates FFA-induced activation of JNK1 phosphorylation and TNF α expression in human subcutaneous preadipocytes. *Obesity* 2013;21:1843–9.
- [320] Biazi GR, Frasson IG, Miksza DR, de Moraes H, de Fatima Silva F, Bertolini GL, et al. Decreased hepatic response to glucagon, adrenergic agonists, and cAMP in glycogenolysis, gluconeogenesis, and glycolysis in tumor-bearing rats. *J Cell Biochem* 2018;119:7300–9.
- [321] Gaforio JJ, Vissoli F, Alarcón-De-la-Lastra C, Castañer O, Delgado-Rodríguez M, Fitó M, et al. Virgin Olive Oil and Health: Summary of the III International Conference on Virgin Olive Oil and Health Consensus Report, JAEN (Spain) 2018. *Nutrients* 2019;11:2039.
- [322] Covas M-I, Ruiz-Gutiérrez V, Torre R de la, Kafatos A, Lamuela-Raventós RM, Osada J, et al. Minor Components of Olive Oil: Evidence to Date of Health Benefits in Humans. *Nutrition Reviews* 2006;64:S20–30.
- [323] 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;56:1043–57.
- [324] M. Lou-Bonafonte J, Fito M, Covas M-I, Farras M, Osada J. HDL-related mechanisms of olive oil protection in cardiovascular disease. *Curr Vasc Pharmacol* 2012;10:392–409.
- [325] Martínez-Beamonte R, Sanclemente T, Surra JC, Osada J. Could squalene be an added value to use olive by-products? *J Sci Food Agric* 2020;100:915–25.
- [326] Gaforio JJ, Sánchez-Quesada C, López-Biedma A, Ramírez-Tortose M del C, Warleta F. Molecular Aspects of Squalene and Implications for Olive Oil and the Mediterranean Diet. *The Mediterranean Diet: An Evidence-Based Approach* 2015:281–90.
- [327] Lovászi M, Mattii M, Eyerich K, Gácsi A, Csányi E, Kovács D, et al. Sebum lipids influence macrophage polarization and activation. *Br J Dermatol* 2017;177:1671–82.
- [328] Sánchez-Quesada C, Gutiérrez-Santiago F, Rodríguez-García C, Gaforio JJ. Synergistic Effect of Squalene and Hydroxytyrosol on Highly Invasive MDA-MB-231 Breast Cancer Cells. *Nutrients* 2022;14:255.
- [329] Ramírez-Torres A, Barceló-Batllo S, Fernández-Vizcaya E, Navarro MA, Arnal C, Guillén N, 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;75:2563–75.
- [330] Gluchowski NL, Becuwe M, Walther TC, Farese R v. Lipid droplets and liver disease: from basic biology to clinical implications. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2017;14:343–55.
- [331] Olzmann JA, Carvalho P. Dynamics and functions of lipid droplets. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2019;20:137–55.
- [332] Scorletti E, Carr RM. A new perspective on NAFLD: Focusing on lipid droplets. *J Hepatol* 2022;76:934–45.
- [333] Kramer DA, Quiroga AD, Lian J, Fahlman RP, Lehner R. Fasting and refeeding induces changes in the mouse hepatic lipid droplet proteome. *J Proteomics* 2018;181:213–24.

Bibliografía

- [334] Ontko J. Isolation of hepatocellular lipid droplets: the separation of distinct subpopulations. *J Lipid Res* 1986;10:1097-103.
- [335] Khan SA, Wollaston-Hayden EE, Markowski TW, Higgins LA, Mashek DG. Quantitative analysis of the murine lipid droplet-associated proteome during diet-induced hepatic steatosis. *J Lipid Res* 2015;56:2260-72.
- [336] Liu M, Ge R, Liu W, Liu Q, Xia X, Lai M, et al. Differential proteomics profiling identifies LDPs and biological functions in high-fat diet-induced fatty livers. *Journal of Lipid Research* 2017;58:681-94.
- [337] Baumeier C, Kaiser D, Heeren J, Scheja L, John C, Weise C, et al. Caloric restriction and intermittent fasting alter hepatic lipid droplet proteome and diacylglycerol species and prevent diabetes in NZO mice. *Biochim Biophys Acta* 2015;1851:566-76.
- [338] Nerstedt A, Kurhe Y, Cansby E, Caputo M, Gao L, Vorontsov E, et al. Lipid droplet-associated kinase STK25 regulates peroxisomal activity and metabolic stress response in steatotic liver. *J Lipid Res* 2020;61:178-91.
- [339] Crunk AE, Monks J, Murakami A, Jackman M, MacLean PS, Ladinsky M, et al. Dynamic regulation of hepatic lipid droplet properties by diet. *PLoS One* 2013;8:e67631.
- [340] Krahmer N, Najafi B, Schueder F, Quagliarini F, Steger M, Seitz S, et al. Organellar Proteomics and Phospho-Proteomics Reveal Subcellular Reorganization in Diet-Induced Hepatic Steatosis. *Dev Cell* 2018;47:205-21.
- [341] Khodayari N, Oshins R, Alli AA, Tuna KM, Holliday LS, Krotova K, et al. Modulation of calreticulin expression reveals a novel exosome-mediated mechanism of Z variant 1-antitrypsin disposal. *Journal of Biological Chemistry* 2019;294:6240-52.
- [342] Ilhan A, Gartner W, Nabokikh A, Daneva T, Majdic O, Cohen G, et al. Localization and characterization of the novel protein encoded by C20orf3. *Biochem J* 2008;414:485-95.
- [343] Albrektsen T, Richter HE, Clausen JT, Fleckner J. Identification of a novel integral plasma membrane protein induced during adipocyte differentiation. *Biochem J* 2001;359:393-402.
- [344] Bullo M, Cozar-Torrell P, Salas-Salvado J. Dietary regulation of glucose metabolism in metabolic syndrome. *Curr Vasc Pharmacol* 2013;11:928-45.
- [345] Cazanave S, Podtelezhnikov A, Jensen K, Seneshaw M, Kumar DiP, Min HK, et al. The Transcriptomic Signature Of Disease Development And Progression Of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Sci Rep* 2017;7:17193.
- [346] Hardy T, Mann DA. Epigenetics in liver disease: from biology to therapeutics. *Gut* 2016;65:1895-905.
- [347] 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.
- [348] Dixon JL, Ginsberg HN. Hepatic synthesis of lipoproteins and apolipoproteins. *Semin Liver Dis* 1992;12:364-72.

Bibliografía

- [349] Zhong W, Zhang Y, Tan W, Zhang J, Liu J, Wang G, et al. Adipose specific aptamer adiponectin 8 recognizes and interacts with APMAP to ameliorates fat deposition in vitro and in vivo. *Life Sciences* 2020;251:117609.