PAPEL DE FABP4 EN LA ADIPOGÉNESIS Y LA INFLAMACIÓN DEL TEJIDO ADIPOSO EN LA OBESIDAD

Trabajo de final de grado

Autora: Eva Plaza Montané

Grado: Biotecnología

Tutora profesional y académica: Neus Martínez Micaelo

01/06/2018

Universidad Rovira y Virgili, Tarragona

ÍNDICE

1. DATOS DEL CENTRO 3

2. RESUMEN Y PALABRAS CLAVE 4

3. INTRODUCCIÓN 5

3.1. Obesidad y tejido adiposo 5

3.1.1. Adipocitos 6

3.1.2. Adipogénesis 7

3.2. Proteínas de unión a ácidos grasos (FABPs) 8

3.2.1. Clasificación 9

3.2.2. Estructura 10

3.3. FABP4 11

3.3.1. Funciones intracelulares 11

3.3.2. Funciones extracelulares 12

3.4. FABP4 como diana terapéutica 13

4. HIPÓTESIS Y OBJETIVO/S 15

4.1. Hipótesis 15

4.2. Objetivo 15

5. METODOLOGÍA 16

5.1. Cultivos celulares 16

5.1.1. Descongelación 16

5.1.2. Condiciones de mantenimiento 16

5.1.3. Diferenciación de los adipocitos 17

5.2. Silenciamiento de FABP4 mediante siRNA en modelos celulares 17

5.3. Inhibición de FABP4 mediante BMS309403 en modelos animales 18

5.4. Western blot 19

5.4.1. Extracción de proteína 19

5.4.2. Cuantificación de proteína 19

5.4.3. Western Blot 20

5.5. Extracción de RNA, RT-PCR y Real-time PCR 22

5.5.1. Extracción de RNA 22

5.5.2. Cuantificación de RNA 23

5.5.3. RT-PCR 23

5.5.4. Real-time PCR 24

6. RESULTADOS 26

6.1. Adipogénesis de las células 3T3-L1 26

6.2. Niveles de RNAm y proteína de FABP4, Perilipina y IL6 durante la adipogénesis 26

6.3. Inhibición de FABP4 en modelo celular 31

6.4. Inhibición de FABP4 en modelo animal 33

7. DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN 35

8. REFERENCIAS 37

9. AUTOEVALUACIÓN 40

1. DATOS DEL CENTRO

Unitat de recerca en lípids i arteriosclerosi (URLA)

Área de investigación de Nutrición y Metabolismo

Universidad Rovira y Virgili

Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud

C/ Sant Llorenç, 21

43201 Reus

2. RESUMEN Y PALABRAS CLAVE

La obesidad está altamente asociada a las enfermedades cardiovasculares, diabetes mellitus tipo 2, arteriosclerosis y cáncer, entre otros. Se caracteriza por la acumulación excesiva de lípidos y por una inflamación crónica de baja intensidad, estas condiciones son causa de la hipertrofia del tejido adiposo. La acumulación de lípidos en el interior de los adipocitos, principales componentes del tejido adiposo, se realiza mayoritariamente por un proceso mediado por proteínas. Entre las diferentes proteínas transportadoras se encuentra *Fatty acid binding protein* (FABP4), proteína que se expresa mayoritariamente en los adipocitos. Hay evidencias científicas que asocian FABP4 con las patologías derivadas de la obesidad mencionadas anteriormente.

El objetivo de este trabajo es estudiar el papel de FABP4 en los procesos de inflamación y resistencia a la insulina derivados de la obesidad en el tejido adiposo, debido a que las investigaciones actuales no son concluyentes.

Nuestra hipótesis es que FABP4 participa directamente en la regulación de la expresión de genes clave en la diferenciación de los adipocitos y en la inflamación de bajo grado asociada a la resistencia a la insulina.

Para testar la hipótesis se realizaron experimentos de diferenciación adipocitaria en los que se midieron los niveles de RNAm y proteína de FABP4, Perilipina y IL6. También se silenció la expresión de FABP4 en modelos celulares e inhibió en modelos animales para determinar de forma más específica su papel en los procesos mencionados.

Los resultados obtenidos son muy prometedores ya que corroboran la hipótesis de que FABP4 parece tener un papel en la regulación de las alteraciones metabólicas asociadas a la obesidad. De modo que FABP4 podría ser en un futuro una buena diana terapéutica para revertir los efectos de las patologías metabólicas asociadas a la obesidad.

Palabras clave: *tejido adiposo, células 3T3-L1, obesidad, inflamación, resistencia a la insulina, FABP4, Perilipina, IL-6, diana terapéutica.*

3. INTRODUCCIÓN

3.1. Obesidad y tejido adiposo

La obesidad constituye un problema de salud mundial responsable de 2,8 millones de muertes cada año y cuya prevalencia casi se ha duplicado en los últimos treinta años (OMS, 2017). Esta afección se caracteriza por una acumulación excesiva de grasa, acompañada por una inflamación crónica de bajo grado y resistencia a la insulina. La obesidad está relacionada con enfermedades metabólicas que incluyen diabetes tipo 2, dislipidemia, aterosclerosis o hipertensión, que son los principales componentes del síndrome metabólico.

Cabe destacar que el tejido adiposo juega un papel clave en la patogénesis de la obesidad y las complicaciones asociadas.

Los estudios de las últimas dos décadas han establecido el tejido adiposo como un órgano dinámico que lleva a cabo varios procesos fisiológicos importantes (Martínez-Fernández *et al.*, 2015). Por una parte, es el principal órgano de almacenamiento del exceso de energía en forma de triglicéridos. Además, el tejido adiposo actúa como un importante órgano endocrino que libera una amplia gama de moléculas entre las que se encuentran las adipocinas, las citosinas y quimiocinas. Estos factores intervienen en funciones tan relevantes como la presión sanguínea, la homeostasis vascular, la homeostasis de los carbohidratos y la sensibilidad a la insulina, el metabolismo energético, el desarrollo celular, el metabolismo lipídico, la angiogénesis y la respuesta inmunitaria (Esteve *et al.*, 2014).

Es necesario un control en la secreción de estos factores ya que alteraciones en la concentración de adipocinas causan modificaciones en la homeostasis corporal como ocurre en condiciones de obesidad, diabetes mellitus de tipo 2 y síndrome metabólico.

Aumentar la adiposidad normalmente está asociado a una inflamación crónica de bajo grado, ya que los adipocitos hipertrofiados presentan un patrón de secreción alterado que da como resultado un aumento en la secreción de adipocinas pro-inflamatorias, citoquinas y quimiocinas (IL6, TFN) y producción reducida de adipocinas

antinflamatorias (Martínez-Fernández *et al.*, 2015). Además, abundantes investigaciones han demostrado que se produce una infiltración y activación progresivas de los macrófagos y las células T hacia el tejido adiposo.

Esta expansión disfuncional del tejido adiposo, juntamente con la movilización de células inmunitarias, conducen a la activación de cascadas inflamatorias que tienen un impacto negativo en la señalización de la insulina y la captación de glucosa, favoreciendo el desarrollo de resistencia a la insulina. Entre las citoquinas pro-inflamatorias secretadas por el tejido adiposo, una de las más importantes asociada a la resistencia a la insulina derivada de la obesidad es la interleuquina 6 (IL6) (Kajimoto *et al.*, 2012).

Así pues, estudiar el papel de las adipocinas se convierte en un objetivo importante para aliviar la inflamación sistémica y reducir el desarrollo de patologías asociadas con la obesidad, como la diabetes tipo 2 o la dislipidemia.

3.1.1. Adipocitos

El tejido adiposo está formado por una variedad de tipos de células que incluyen células endoteliales, células sanguíneas, fibroblastos, pre-adipocitos, macrófagos y otras células inmunes. Sin embargo, las células predominantes presentes en el tejido adiposo son adipocitos maduros.

Los adipocitos son células esféricas de entre 20-200µm de diámetro especializadas en la acumulación de lípidos, de hecho, contienen gotas lipídicas que equivalen prácticamente al 70-80% de su citoplasma (Ali *et al.*, 2013). Estos adipocitos son los encargados de realizar la lipogénesis, es decir, la síntesis de triglicéridos, los cuales una vez sintetizados son almacenados en la gota lipídica. También realizan la lipólisis, proceso mediante el cual los triglicéridos son convertidos en glicerol y ácidos grasos, que pasan al torrente sanguíneo donde son dirigidos hacia los tejidos que demandan un aporte de energía.

3.1.2. Adipogénesis

La adipogénesis es el proceso mediante el cual los pre-adipocitos con morfología de fibroblastos se diferencian a adipocitos, cuya principal característica es la presencia en su citoplasma de múltiples vacuolas de lípidos y gran número de mitocondrias.

El proceso de adipogénesis (ver **Figura 1**) consta de varias etapas secuenciales y ordenadas que incluyen la inducción de cambio de linaje celular por un estímulo, la expansión clonal y la diferenciación del adipocito (Esteve *et al., 2014*).

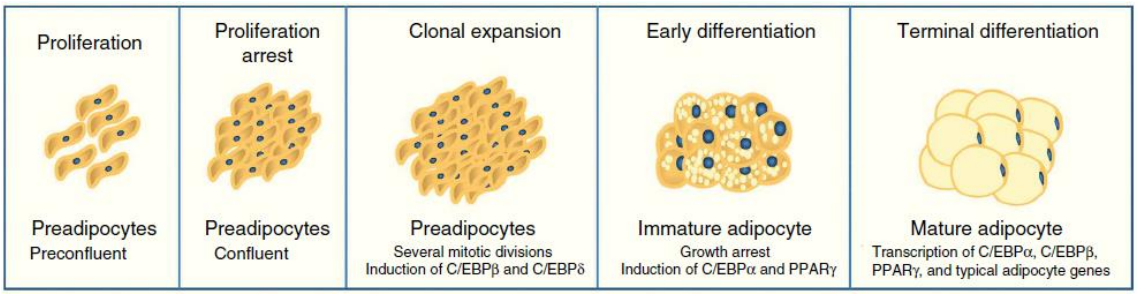

***Figura 1**: Pasos que conforman el proceso de diferenciación de los adipocitos (adipogénesis)*

Figura adaptada de: Esteve *et al*., 2014

Los factores de transcripción *Peroxisome proliferator-activated receptor γ* (PPARγ) y *CCAAT/enhancer binding protein α* (C/EBPα) son considerados los reguladores clave de la adipogénesis ya que su activación da como resultado la expresión de genes responsables de la formación de los adipocitos maduros. Entre los genes que determina el fenotipo adipocitaria destacan la chaperona lipídica FABP4, Perilipina, acetil-CoA carboxilasa, adiponectina, entre otros (Ali *et al.,* 2013; Moseti *et al.,* 2016).

En concreto, el objetivo del estudio realizado por Ullah *et al.*, 2013 era determinar aquellos genes específicos de la adipogénesis analizando la expresión de un grupo de genes durante la diferenciación y durante la de-diferenciación. Los resultados describen que FABP4 y PPARγ son genes específicos de la adipogénesis ya que su expresión aumenta durante la diferenciación y disminuye durante la de-diferenciación.

FABP4 y Perilipina son dos proteínas que juegan un papel importante en la movilización y la acumulación de lípidos durante la adipogénesis, FABP4 es una chaperona lipídica

asociada a la acumulación de lípidos en el interior de los adipocitos, mientras que Perilipina forma una capa protectora alrededor de los lípidos para evitar la acción de las lipasas. Así pues, en el estudio de Takahashi *et al.,* 2013 se demuestra que FABP4 y Perilipina son marcadores de adipogénesis importantes ya que durante el proceso de diferenciación de los adipocitos se observa un aumento progresivo de dichas proteínas. Otra investigación lo corrobora, Palominos *et al., 2015* estudiaron los efectos inhibitorios de Angiotensina II en la diferenciación de los adipocitos mediante la evaluación de la expresión de dos marcadores típicos de adipocitos, FABP4 y Perilipina. Después del tratamiento se observa que los niveles de RNAm de FABP4 y Perilipina se redujeron drásticamente, inhibiéndose también el proceso de diferenciación.

Aunque el proceso de diferenciación de los adipocitos esté muy estudiado, muchos de los detalles moleculares de la adipogénesis actualmente son desconocidos. De modo que es de gran relevancia seguir investigando para entender el proceso de diferenciación de los adipocitos. Ya que como se ha comentado previamente, una mala homeostasis lipídica es el paso previo a obesidad y a sus patologías asociadas.

3.2. Proteínas de unión a ácidos grasos (FABPs)

Como ya se ha comentado anteriormente la familia *Fatty acid binding protein (*FABP) tienen un papel muy importante en la adipogénesis, ya que son las principales responsables del transporte de ácidos grasos al interior de los adipocitos durante su maduración. A su vez la adipogénesis del tejido adiposo está asociada a la obesidad, la resistencia a la insulina y la inflamación. Por este motivo las FABPs son una buena diana de estudio para controlar dichos procesos.

Podemos diferenciar dos grupos de FABPs en función de su localización celular. $FABP_{PM}$ son proteínas FABP asociada a la membrana plasmática, mientras que $FABP_C$ son proteína que se encuentra de forma intracelular.

3.2.1. Clasificación

Las proteínas que forman parte de la familia $FABP_C$ se clasifican en función del tejido o tipo celular donde se expresan mayoritariamente, ya que la expresión de FABP es especifica de tejido (ver **Tabla 1**).

***Tabla 1**: Clasificación de las proteínas FABP*

Proteína	Nombre alternativo	Localización cromosómica	Principal expresión
FABP1	L-FABP	2q11	Hígado
FABP2	I-FABP	4q28-q31	Intestino
FABP3	H-FABP	1q32-p33	Corazón, músculo esquelético, riñón, cerebro, glándula suprarrenal
FABP4	A-FABP	8q21	Tejido adiposo
FABP5	E-FABP	8q21.13	Piel, lengua, tejido adiposo, glándula mamaria, intestino, cerebro, riñón, hígado
FABP6	Il-FABP	5q23-q35	Ovario, íleon
FABP7	B-FABP	6q22-q23	Cerebro
FABP8	MP2	8q21.3-q22.1	Sistema nervioso periférico
FABP9	T-FABP	8q21.13	Testículos

Tabla adaptada de: Smatherns et al., 2011

También se pueden clasificar en tres grupos en función de sus ligandos (Smatherns *et al., 2011)*. El grupo 1 está formado por FABP1 y 6 (son capaces de unir AG ligandos voluminosos como sales biliares y colesterol); el grupo 2 está formado por FABP3, 4, 5, 7, 8 y 9 (son capaces de unir AG, retinoides y eicosanoides); y el grupo 3 está formado por FABP2 (exclusivamente puede unir AG, pero en una conformación diferente a otras FABP).

3.2.2. Estructura

$FABP_C$ es una familia de 9 proteínas transportadoras de AG de aproximadamente 15 kDa. La estructura génica está altamente conservada entre las diferentes FABPs y consiste en 4 exones separados por 3 intrones (Smatherns *et al., 2011*). Aun así, la estructura primaria de las proteínas de las diferentes isoformas solo tiene un 15-70% de homología. A diferencia de la estructura primaria, la estructura terciaria coincide entre las diferentes FABPs y consiste en 10 tiras-β antiparalelas seguidas de un motivo hélix-lazo-hélix N-terminal (ver **Figura 2**).

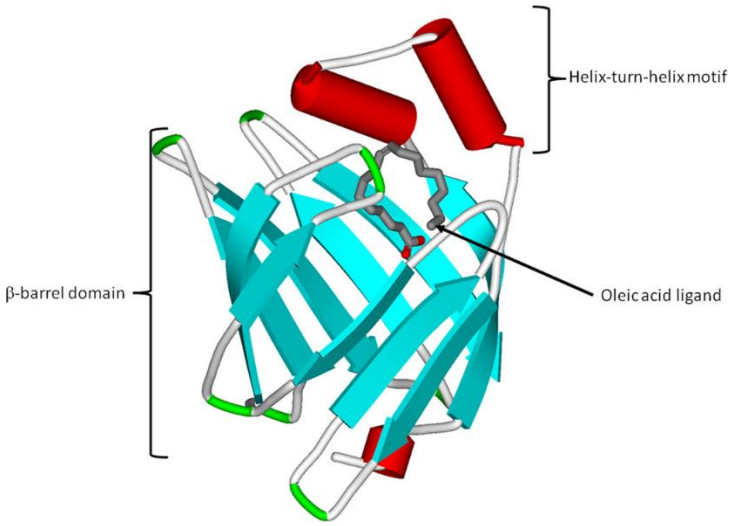

Figura 2: *Estructura terciaria de la familia FABP*

Fuente: Storch et al., 2010

La región de unión al AG está delimitada por los aminoácidos que contienen las tiras β 3-4, 5-6 y la hélice α II.

Cabe destacar que el volumen de la mayoría de ligandos es mayor que la apertura de entrada a la cavidad central, por este motivo se ha postulado la hipótesis del portal. Esta hipótesis sugiere que las proteínas FABP tienen que hacer un cambio conformacional transitorio para permitir la entrada/salida del AG (Hotamisligil, *et al., 2015*). Además, aunque la cavidad central es 2-3 veces más grande que el volumen de un AG, las FABP solo pueden unir un AG, a excepción de FABP01 que tiene la capacidad de unirse simultáneamente a 2 ligandos.

3.3. FABP4

La proteína FABP4, también conocida como aP2, es el miembro más bien caracterizado de la familia FABP y se le asocia un papel importante en la adipogénesis, la homeostasis metabólica y en las enfermedades metabólicas.

3.3.1. Funciones intracelulares

FABP4 es una chaperona lipídica intracelular que se expresa principalmente en adipocitos, aunque también la pueden expresarse en macrófagos, células dendríticas, células endoteliales, músculo esquelético, entre otros (Furuhashi *et al., 2015*).

Su función principal es acelerar la captación de los AG y coordinar la respuesta lipídica de las células, transportando los AG a enzimas y compartimentos celulares específicos (Furuhashi *et al., 2018*; Furuhashi *et al., 2018*). Transporta los AG a las mitocondrias y peroxisomas para la oxidación; al retículo endoplasmático (RE) para los procesos de señalización y síntesis de las membranas; a las *droplets* lipídicos para el almacenamiento; al citosol para regular su actividad; al núcleo para el control transcripcional mediado por lípidos a través de receptores de hormonas nucleares (NHR); o incluso fuera de la célula para una señalización autocrina y/o paracrina (ver **Figura 3**).

Se ha visto que las FABPs también están relacionadas con el metabolismo y los procesos de inflamación, siendo potenciales dianas terapéuticas para el tratamiento de enfermedades asociadas a la obesidad, la diabetes y la arteriosclerosis.

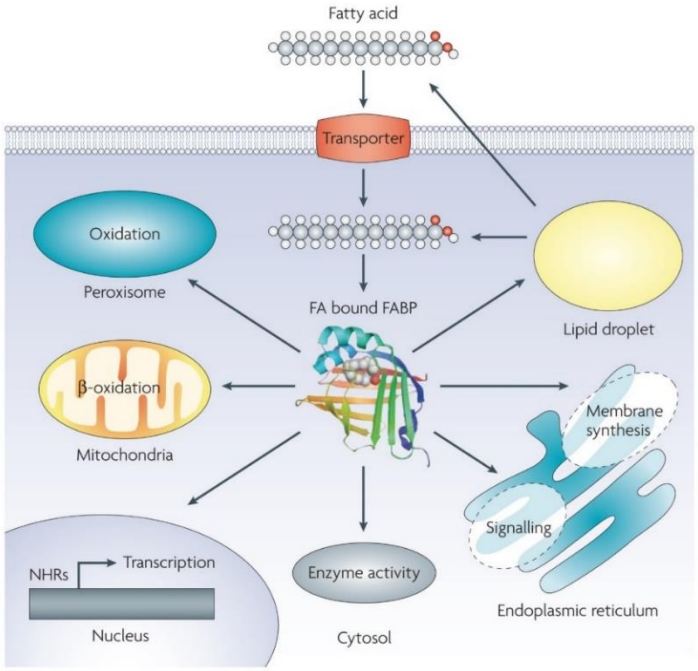

***Figura 3**: Principales funciones de FABP4*

Fuente: Furuhashi et al., 2008

3.3.2. Funciones extracelulares

Además de la función intracelular ampliamente estudiada de FABP4, se ha descrito que esta proteína también puede ser secretada por los adipocitos a la circulación (Furuhashi *et al., 2008*). Sus niveles en plasma se ven aumentados en modelos de obesidad, y estudios transversales han demostrado que la FABP4 circulante se asocia de forma positiva e independiente con otros marcadores de síndrome metabólico y otras variables relacionadas con obesidad, como son la resistencia a la insulina, la Diabetes mellitus tipo 2, la disfunción cardíaca, la hipertensión y la arteriosclerosis (Hotamisligil *et al., 2015*; Furuhashi *et al., 2008*).

Sin embargo, si FABP4 actúa como una adipocina participando en los procesos de resistencia a la insulina e inflamación en tejidos periféricos; o si sus elevados niveles en circulación son resultado de las alteraciones metabólicas mencionadas no está completamente descrito.

En la investigación llevada a cabo por Bosquet *et al., 2018* demostró que el tratamiento con el inhibidor de FABP4, BMS309403, disminuía el estrés de retículo y la inflamación asociada a la acumulación lipídica en el músculo esquelético.

Por otro lado, Cao *et al., 2013* demostró que la inhibición de FABP4 en los hepatocitos reduce la producción de glucosa y corrige el fenotipo diabético del modelo de obesidad murino.

Estas evidencias apoyan que FABP4 tiene una acción directa en la regulación de la inflamación y la resistencia a la insulina en músculo esquelético y células hepáticas, entre otros. Pero el papel de la FABP4 en la regulación del metabolismo y la inflamación en el tejido adiposo no se encuentra completamente caracterizado.

3.4. FABP4 como diana terapéutica

En los apartados anteriores se han mencionado evidencias de que FABP4 tiene un importante papel en la aparición de patologías como por ejemplo la obesidad, la Diabetes mellitus tipo 2 y la arteriosclerosis. También se ha descrito como la pérdida de función de la proteína FABP4 da lugar a efectos protectores sobre dichas alteraciones metabólicas. Por ese motivo en los últimos años se han estudiado diferentes estrategias para inhibir farmacológicamente FABP4 con objetivo terapéutico (ver **Figura 4**).

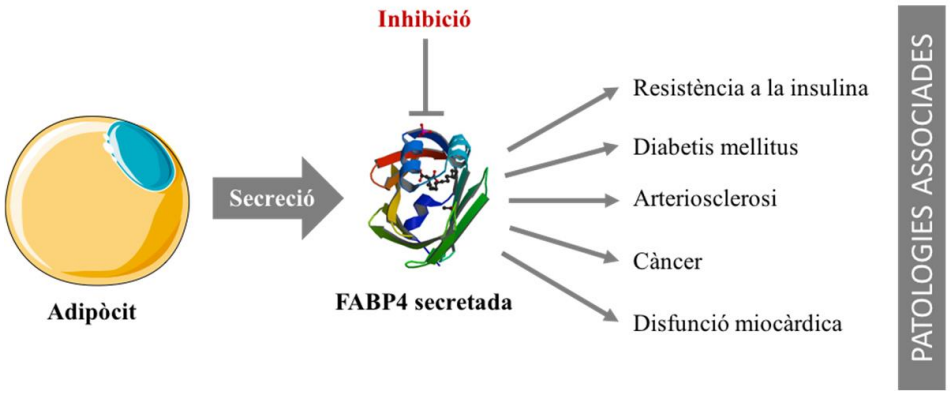

***Figura 4**: Estrategia terapéutica para disminuir las patologías asociadas a los niveles circulantes de FABP4*

Figura adaptada de: Furuhashi et al., 2015

La estrategia se basa en la búsqueda de moléculas capaces de interaccionar con FABP4 de forma homologa a como lo hacen los AG, evitando la interacción FABP4-AG.
En los últimos años se han descubierto gran diversidad de inhibidores de FABP4 con un potencial prometedor entre los que se encuentran el carbazol y sus derivados, HTS01037, el medicamento uricosúrico benzbromarona (Smatherns *et al., 2011*), oxazol, imidazol, indol y sus respectivos derivados, entre otros.

Cabe destacar que, entre los actuales inhibidores de FABP4, el BMS309403 (bifenilo azole) es el inhibidor más potente. Su alta afinidad y selectividad por la FABP4 se debe a las interacciones específicas de la molécula con los residuos clave de la cavidad de FABP (Ser53, Arg106, Arg126 y Tyr128) (Bosquet *et al., 2018*).
Diferentes estudios han demostrado los efectos beneficiosos de BMS309403 sobre la resistencia a la insulina, la diabetes mellitus, la enfermedad del hígado graso y la aterosclerosis en modelos experimentales. Por ejemplo, en el estudio de Furuhashi *et al.,* 2007 se demostró que el tratamiento con BMS309403 de modelos murinos de obesidad mejoraba la homeostasis de la glucosa y la sensibilidad a la insulina.

Los estudios de inhibición de FABP4 en modelos animales han proporcionado grandes avances en las posibilidades terapéuticas de FABP4. Aun así, la falta de estudios clínicos en humanos hace que sean necesarias futuras investigaciones para determinar la seguridad y eficiencia de los inhibidores de FABP4 en el tratamiento de las enfermedades metabólicas y cardiovasculares.

4. HIPÓTESIS Y OBJETIVO/S

4.1. Hipótesis

La proteína FABP4 es una proteína transportadora de ácidos grasos que se expresa mayoritariamente en adipocitos, pero también puede ser secretada a la circulación. Sus niveles en circulación se asocian a síndrome metabólico, bajo grado de inflamación y resistencia a la insulina.

La literatura científica demuestra que FABP4 participa en la regulación de procesos como la resistencia a la insulina o la inflamación en tejidos periféricos como por ejemplo el músculo esquelético y el hígado. Pero no hay suficientes evidencias científicas de que FABP4 tenga el mismo efecto en el tejido adiposo.

Por este motivo la hipótesis de este trabajo es que la FABP4 participa directamente en la regulación de la expresión de genes clave en la diferenciación de los adipocitos y también en los procesos de inflamación de bajo grado asociados a la resistencia a la insulina en el tejido adiposo.

4.2. Objetivo

El primer objetivo de este trabajo es caracterizar a nivel de expresión génica y de proteína los adipocitos 3T3-L1 durante su proceso de diferenciación. Se determinó la presencia de marcadores asociados con la adipogénesis (FABP4 y Perilipina) y de uno de los principales marcadores de inflamación relacionado con la resistencia a la insulina (IL6).

Como segundo objetivo se pretende estudiar la implicación de FABP4 en la regulación de Perilipina y IL6, y por tanto en la regulación del proceso de diferenciación de los adipocitos y la resistencia a la insulina respectivamente.

Para hacerlo se silenció la expresión de FABP4 en adipocitos diferenciados y paralelamente se inhibió farmacológicamente FABP4 en un modelo animal.

5. METODOLOGÍA

5.1. Cultivos celulares

5.1.1. Descongelación

Se descongeló un vial de pre-adipocitos 3T3-L1, obtenidos de la *American Type Culture Collection* (ATCC) y conservados en el contenedor de nitrógeno líquido.

La muestra se resuspendió en 5ml de medio de mantenimiento (ver **Apartado 5.1.2**), se centrifugó a 500g durante 5 minutos para separar las células del medio. Finalmente se descartó el medio y se añadieron 10ml de medio de mantenimiento. Este paso se realiza para evitar que las células 3T3-L1 sigan en contacto con dimetilsulfóxido (DMSO), suplemento que lleva el medio para evitar daño celular durante el proceso de congelación.

5.1.2. Condiciones de mantenimiento

Se cultivaron los pre-adipocitos en frascos Nunc de 75ml y medio de mantenimiento. El medio de mantenimiento contiene medio completo *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM), suero fetal bovino (FBS) al 10% y anticuerpo penicilina-estreptomicina (P/S) al 1%. El cultivo se mantiene a 37ºC y 5% de CO2. Se cambió el medio cada 2 días.

Aproximadamente a los 2-3 días de la siembra inicial, cuando el cultivo llegó al 70-80% de confluencia se procedió a tripsinizar. Primero se eliminó el medio de mantenimiento y se lavó 3 veces con *Phosphate Buffered saline* (PBS) para eliminar posibles restos del medio de mantenimiento ya que inhibe la acción de la tripsina. Posteriormente se añadió 1ml de Tripsina y se incubaron las células a 25ºC durante aproximadamente 2 minutos, de este modo se favorece la acción de la tripsina y se evita la degradación celular por parte de la tripsina al darse la reacción de forma más rápida. Cuando en el microscopio se observó que la morfología de las células era redondeada y estaban movimiento, quería decir que ya estaban en suspensión. En este momento se eliminó la tripsina y se añadió medio de mantenimiento para inactivar posibles restos de tripsina en contacto con las células.

A continuación, se contaron las células en la Cámara Neubauer (se añade 10µl de la suspensión celular y 10µl de *Tripan Blue*). Tripan Blue es un colorante que se usa para ensayos de viabilidad ya que permite diferenciar células vivas de células muertas. Las células con la membrana celular intacta no se colorean debido a que la membrana celular es selectiva respecto a qué compuestos pueden atravesarla, mientras que las células muertas quedan teñidas de color azul.

Finalmente, se sembraron 15000 células/ml en multiplacas Nunc de 6 pocillos.

5.1.3. Diferenciación de los adipocitos

El medio de diferenciación para que los pre-adipocitos se diferencien a adipocitos está formado por el medio de mantenimiento, 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX) 0'5mM, insulina 1'7µM y dexametasona 1µM.

El medio de diferenciación también se cambió cada dos días hasta haber llegado al día de diferenciación deseado, que en nuestro caso fueron: día de diferenciación 0, 2, 4, 6 y 8. En ese momento se eliminó el medio, se lavaron los pocillos con PBS y se conservaron las muestras en el congelador hasta los posteriores estudios.

Así pues, al final del proceso de cultivos celulares tuvimos 15 multiplacas con células 3T3-L1 a diferentes días de diferenciación en 3 de sus pocillos y 3 multiplacas con células 3T3-L1 totalmente diferenciadas en los 6 pocillos.

5.2. Silenciamiento de FABP4 mediante siRNA en modelos celulares

Se transfectaron 3 multiplacas con adipocitos 3T3-L1 totalmente diferenciados en los 6 pocillos con el kit *Lipofectamina RNAiMax* (Invitrogen).

Para hacerlo primero se preparó el mix Lipofectamina RNAiMAX-OptiMEM (100µl de OptiMEM/pocillo y 7,5µl de Lipofectamina RNAiMAX/pocillo) y el mix de siRNA (100µl de OptiMEM y siRNA 50nM). Cabe destacar que se utilizó siFABP4 para el estudio y siRandom como control.

A continuación, se añadieron 650µl de mix Lipofectamina RNAiMAX-OptiMEM al mix siRNA y se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos. Posteriormente se añadieron 200µl de mix a cada pocillo gota a gota y se incubaron las células durante 24-48 horas a 37ºC.

5.3. Inhibición de FABP4 mediante BMS309403 en modelos animales

Para este estudio se usaron ratones machos de la cepa C57BL/6J de 6 semanas de edad que se mantuvieron en condiciones estándar de ciclo luz/oscuridad (12 horas luz/ 12 horas oscuridad) y de temperatura (21 ± 1°C) con *ad libitum*.

Los animales se distribuyeron al azar en 2 primeros grupos experimentales en función de la dieta con la que se alimentaron durante 6 semanas. El primer grupo (n=10) se alimentó con una dieta estándar (STD: 10 kcal procedentes de grasas); y el segundo grupo (n=20) se alimentó con una dieta en alto contenido graso (HFD: 60% kcal procedentes de grasas).

Después de las 6 semanas el grupo 2 se dividió en dos grupos (n=10 respectivamente). A los animales del grupo STD y 1 grupo HFD se les administró de forma oral PBS diariamente; mientras que a los animales de 1 grupo HFD se le administró de forma oral 15mg/kg*día el inhibidor de FABP4 BMS309403 (grupo HFD+BMS). Este tratamiento duró 6 semanas.

Después de este período, los ratones fueron sacrificados bajo anestesia con 75 mg/kg de ketamina y 1mg/kg de medetomidina, y el tejido adiposo blanco se congeló inmediatamente en nitrógeno líquido y almacenado a -80 °C.

Estos experimentos se ajustaron a la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio publicada por el Instituto Nacional de Salud de EEUU (Publicación nº 85-23, revisada en 1996). Todos los procedimientos se aprobaron por el Comité de Bioética de la Universidad Rovira y Virgili, tal como se establece en la Ley 5/21 de julio de 1995 aprobada por la Generalitat de Catalunya.

5.4. Western blot

5.4.1. Extracción de proteína

Se lisaron en tampón RIPA las células 3T3-L1 de 5 multiplacas de 6 pocillos, placas correspondientes a los días de diferenciación 0, 2, 4, 6 y 8. El tampón RIPA está formado por Tris-HCL 50mM, NaCl 150mM, SDS al 0'1%, Nonidet al 1%, *Sodium Deoxycholic acid* al 0'5% e inhibidores de proteasas.

Se añadieron 100µl de tampón RIPA a cada pocillo y se rascó la superficie de cada pocillo con la ayuda de una espátula, posteriormente se introdujo la solución de cada pocillo en un eppendorf y para terminar de romper la membrana celular se usó una jeringuilla de insulina. Los eppendorfs se dejaeon en hielo durante 30 minutos y se vortearon cada 5 minutos. Finalmente se centrifugó durante 10 minutos a 4ºC y 16000g para separar las proteínas de los restos celulares del pelet. Hay que destacar que las multiplacas de 6 pocillos se mantuvieron durante todo el proceso en hielo para evitar degradación proteica.

5.4.2. Cuantificación de proteína

A continuación, se determinó la concentración de proteína en cada muestra por el método Bradford. Es un ensayo colorimétrico que se basa en el cambio de absorbancia del colorante Coomassie Brilliant Blue G-250 (Bradford). En condiciones ácidas, la forma catiónica del reactivo Bradford (marrón) forma un complejo fuerte con el grupo carboxilo de la proteína por la fuerza de Van der Waals y el grupo amino a través de interacciones electrostáticas y se convierte en su forma aniónica (azul). La forma catiónica del reactivo Bradford absorbe a 465nm mientras que la forma aniónica absorbe a 595. El aumento de absorbancia a 595nm es directamente proporcional a la concentración de Bradford unido a proteínas y, por tanto, a la concentración de proteína en la muestra.

Así pues, se añadió en una cubeta 2µl de muestra, 200µl de reactivo Bradford y 798µl de agua destilada. Posteriormente se homogeneizó, se incubó durante 5 minutos y se midió la absorbancia a 595nm con el espectrofotómetro *GeneQuant pro* RNA/DNA

Calculator. Este paso es muy importante ya que para realizar el Western Blot se tiene que asegurar que en cada posición se carga la misma concentración de proteína.

5.4.3. Western Blot

Para obtener 30mg de proteína total en el Western Blot se prepararon las muestras según la plantilla de la **Tabla 2**, se hizo un pulso en la centrifuga para asegurar que todo queda en el pelet del eppendorf y se calientaron las muestras durante 10 minutos a 70ºC en el *Thermomixer comfort*.

***Tabla 2**: Plantilla para preparar las muestras con un contenido de 30g de proteina*

Muestra	[Proteína] (µg/µl)	µl Muestra	µl LDS buffer 4X	µl Sample reducing 10X	µl H2O
DIA 0.1	4,287	7,0	5,5	2,2	7,3
DIA 0.2	3,791	7,9	5,5	2,2	6,4
DIA 0.3	4,57	6,6	5,5	2,2	7,7
DIA 2.1	5,832	5,1	5,5	2,2	9,2
DIA 2.2	5,693	5,3	5,5	2,2	9,0
DIA 2.3	6,359	4,7	5,5	2,2	9,6
DIA 4.1	8,179	3,7	5,5	2,2	10,6
DIA 4.2	7,565	4,0	5,5	2,2	10,3
DIA 4.3	6,996	4,3	5,5	2,2	10,0
DIA 6.1	4,09	7,3	5,5	2,2	7,0
DIA 6.2	4,167	7,2	5,5	2,2	7,1
DIA 6.3	3,186	9,4	5,5	2,2	4,9
DIA 8.1	4,668	6,4	5,5	2,2	7,9
DIA 8.2	6,021	5,0	5,5	2,2	9,3
DIA 8.3	4,827	6,2	5,5	2,2	8,1

Se cargaron 22µl de cada muestra en un gel de NuPAGE Bis-Tris al 10% previamente lavado con agua destilada, se añadieron 5µl de marcador *SeeBlue* a cada lado del gel y 500µl de antioxidante entre los dos geles. A la cubeta de electroforesis se le añadió el buffer (40ml de MES y 760ml de agua miliQ) y se separaron las proteínas mediante electroforesis (200V, 0'22A, 50W, 45minutos).

Los geles se lavaron en agitación y durante 5 minutos en etanol al 20% para fijar las proteínas, posteriormente se transfirieron a membranas de PVDF usando iBlot® Dry Blotting. Las membranas se incubaron en agitación y durante 1 hora en tampón de bloqueo al 2% (ECL *Blocking Agent* y TBS 1X Tween 0,1%).

Las membranas se incubaron con el anticuerpo primario en agitación, en frio y overnight. Los anticuerpos usados se representan en la **Tabla 3**:

***Tabla 3**: Anticuerpos primarios usados en el estudio, su peso molecular y anticuerpo secundario correspondiente*

Anticuerpo primario	Peso Molecular	Anticuerpo secundario
FABP4	15 kDa	Anti-goat
Perilipina	63 kDa	Anti-rabbit
Actina	42 kDa	Anti-goat

Al día siguiente las membranas se lavaron 4 veces con TBS 1X Tween 0,1% durante 5 minutos y agitación. Posteriormente se incubaron con el anticuerpo secundario conjugado apropiado durante 1 hora, se lavaron 4 veces con TBS 1X Tween 0,1% durante 5 minutos y agitación, posteriormente se lavaron 2 veces con TBS 1X durante 10 minutos y agitación.

Finalmente, las bandas se visualizaron usando ECL *Select Wetern Blotting Detection Reagent* con *Amesrsham Imager* 600. Y se cuantificaron con el programa Image J.

Los niveles relativos de proteína se obtuvieron al calcular el ratio entre la proteína y el *housekeeping protein*, que en nuestro caso se usó α-Actina.

5.5. Extracción de RNA, RT-PCR y Real-time PCR

5.5.1. Extracción de RNA

Se realizaron dos métodos diferentes de extracción de RNA para los cultivos celulares (kit PureLink RNA Mini Kit) y para el tejido (Reactivo TRI de Sigma).

5.5.1.1. *Kit PureLink RNA Mini Kit*

Se transfirieron las células 3T3-L1 de cada pocillo en un eppendorf con 600µl de Lysis buffer y 2-mercaptoetanol (por cada 1ml de Lysis buffer se añadieron 10µl de 2-mercaptoetanol) y 600µl de etanol al 70%.

Posteriormente se añadieron 600µl de cada muestra en las columnas. Se centrifugaron las columnas a 12000g durante 15 segundos y se descartó la solución del tubo colector. Se añadieron los 600µl restantes de cada muestra en las columnas, se centrifugaron las columnas a 12000g durante 15 segundos y se descartaron las soluciones de los tubos colectores.

Se añadieron 700µl de Wash Buffer I en las columnas, se centrifugaron las columnas a 12000g durante 15 segundos, se descartaron las soluciones de los tubos colectores y se añadieron nuevos tubos colectores. Se añadieron 2 veces 500µl de Wash Buffer II con etanol en las columnas, se centrifugaron las columnas a 12000g durante 15 segundos y se descartaron las soluciones de los tubos colectores. Se centrifugaron las columnas a 12000g durante 1-2 minutos para secar las membranas con el RNA unido, se descartaron las soluciones de los tubos colectores y se añadieron nuevos tubos de recuperación. Se añadieron 30µl de agua libre de RNA en el centro de las columnas, se centrifugaron a 12000g durante 2 minutos para eludir el RNA de las membranas a los tubos de recuperación.

5.5.1.2. Reactivo TRI (Sigma)

La extracción de RNA se obtuvo usando el reactivo TRI (Sigma). Se lisaron las células en 1ml de trizol mediante un repetido pipeteo para obtener un lisado homogéneo. Posteriormente se centrifugaron a 12000g durante 10 minutos para eliminar el material

insoluble (membranas extracelulares, polisacáridos y ADN de alto peso molecular) que se depositó en el pelet.

Se transfirieron las fases acuosas a nuevos tubos, se añadieron 0,5ml de 2-propanol y se incubaron a temperatura ambiente durante 5-10 minutos. A continuación, se centrifugaron a 12000g durante 10 minutos, el ARN se depositó en el pelet. Para lavar el RNA precipitado se añadió 1ml de etanol al 75%, se vorteó y centrifugó a 7500g durante 5 minutos.

5.5.2. Cuantificación de RNA

La cuantificación de RNA de cada muestra se determina mediante el equipo NanoDrop.

5.5.3. RT-PCR

La RT-PCR se realiza con el kit Takara. Se prepara el mix para todas las muestras en un eppendorf según la **Tabla 4** y se preparan las muestras según la **Tabla 5**. Para optimizar el proceso primero se preparan el mix con un volumen final según el número de muestras y posteriormente se añade a cada muestra 9µl.

Los valores de la **Tabla 4** han sido calculados para 18µl de reacción (5 genes*3 muestras para cada gen) y 19 muestras; y los valores de la **Tabla 5** han sido calculados según la concentración de RNA de cada muestra para que la concentración final sea 0,5µg.

***Tabla 4**: Plantilla para preparar el mix*

Reactivo	Concentración	Concentración final	Volumen final (µl)	Volumen final según el número de muestras (µl)
Buffer	5X	1X	3,00	57
Oligo DT	25 mM	500 µM	0,75	14,25
Random hexamers	50 µM	2,5 µM	3	57
SuperScript II	200 U/µl	5 U/µl	0,75	14,25
Total			7,50	142,50

***Tabla 5**: Plantilla para preparar las muestras con una concentración de RNA de 0,5µg.*

Muestra	[RNA] (µg/µl)	Volumen muestra (µl)	Volumen agua (µl)
DIA 0.1	166,490	3	4,50
DIA 0.2	332,260	1,5	6,00
DIA 0.3	276,430	1,81	5,69
DIA 2.1	393,670	1,27	6,23
DIA 2.2	183,210	2,73	4,77
DIA 2.3	295,560	1,69	5,81
DIA 4.1	478,060	1,05	6,45
DIA 4.2	450,150	1,11	6,39
DIA 4.3	175,050	2,86	4,64
DIA 6.1	332,420	1,5	6,00
DIA 6.2	331,480	1,51	5,99
DIA 6.3	366,020	1,3	6,13
DIA 8.1	896,930	0,56	6,94
DIA 8.2	1245,060	0,4	7,10
DIA 8.3	898,920	0,56	6,94

5.5.4. Real-time PCR

Finalmente se realiza la Real-time PCR con el kit Appied Biosystems. Los cálculos para determinar el número de placas requeridas se especifican en la **Figura 5** y los cálculos para preparar el mix en la **Tabla 6**:

$$\frac{18\ muestras * 3\ (triplicados) * 4\ genes}{96\ pocillos} = 2{,}25 \sim 3\ placas$$

***Figura 5:** Cálculos para determinar el número de placas LightCycler 480 Multiwell Plate 96 necesarias*

Tabla 6: *Plantilla para preparar el mix para la Real-time PCR*

Reactivos	Volumen (µl)
TaqMan buffer	295
AoD	59
H2O	177

*Se ha calculado para 59 reacciones [(18muestras*3)+3placas+2]

Se prepara el mix para cada gen y posteriormente se añade 1µl de muestra y 9µl de mix en cada pocillo de las placas LightCycler 480 Multiwell Plate 96. Al final de cada placa se deja 1 pocillo por cada gen en el que se añade el mix y 1µl de agua (control negativo).

6. RESULTADOS

6.1. Adipogénesis de las células 3T3-L1

Durante el proceso de diferenciación de los adipocitos 3T3-L1 se puede observar como los pre-adipocitos con una morfología alargada de fibroblasto y sin acumulación de lípidos en su interior (***Figura 6*A, B y C**) empiezan a adoptar una morfología cada vez más circular y a acumular lípidos en su interior (***Figura 6*D**) hasta convertirse en adipocitos totalmente diferenciados con una morfología totalmente redondeada y con un contenido lipídico que representa el 95% de su masa celular (***Figura 6***E).

6.2. Niveles de RNAm y proteína de FABP4, Perilipina y IL6 durante la adipogénesis

Primero se corroboró que durante la adipogénesis los niveles de FABP4 aumentan. Posteriormente se evaluaron los niveles de RNAm y proteína para la Perilipina (marcador de adipogénesis) y RNAm de IL6 (marcador de resistencia a la insulina asociada a la obesidad) durante el proceso de diferenciación.

Según los resultados representados en la **Figura 7A**, **B** y **C** se observa un aumento gradual tanto en los niveles de proteína como en los niveles de RNAm de FABP4. Los niveles de proteína a día 4 de diferenciación aumentaron 2,57 veces ($p<0,01$); a día 6 de diferenciación 3,37 veces ($p<0,001$) y a día 8 de diferenciación 4,82 veces ($p<0,001$) respecto el día 0 de diferenciación. Por otro lado, los niveles de expresión génica a día 4 de diferenciación aumentaron 255,05 veces ($p<0,05$); a día 6 de diferenciación 628,23 veces ($p<0,001$) y a día 8 de diferenciación 858,97 veces ($p<0,001$) respecto el día 0 de diferenciación.

En la **Figura 8A** y **B** se observa como los niveles proteicos de Perilipina tienden a aumentar desde el 4º día de diferenciación de los adipocitos. Los niveles de proteína a día 6 de diferenciación aumentaron 0,99 veces ($p<0,001$) y a día 8 de diferenciación 1,30 veces ($p<0,001$) respecto el día 0 de diferenciación. En la **Figura 8C** se observa como los

niveles de RNAm de Perilipina se mantienen estables y sin diferencias significativas hasta el día 6 de diferenciación, con un valor de aproximadamente 1 (unidades arbitrarias). El nivel de RNAm a día 8 de diferenciación aumentaron 2,78 veces ($p<0,001$) respecto el día 0 de diferenciación.

En la **Figura 9** se representan los valores de expresión génica de IL6 durante el proceso de diferenciación de los adipocitos. Observamos una inducción de IL6 a día 2 de diferenciación, aumentando 2,01 veces ($p<0,001$) respecto el día 0 de diferenciación. Pero posteriormente se observa una disminución hasta el día 8 de diferenciación. El nivel de RNAm a día 4 de diferenciación disminuyo 0,36 veces ($p<0,01$) y a día 8 de diferenciación disminuyo 0,15 veces ($p<0,001$) respecto el día 0 de diferenciación.

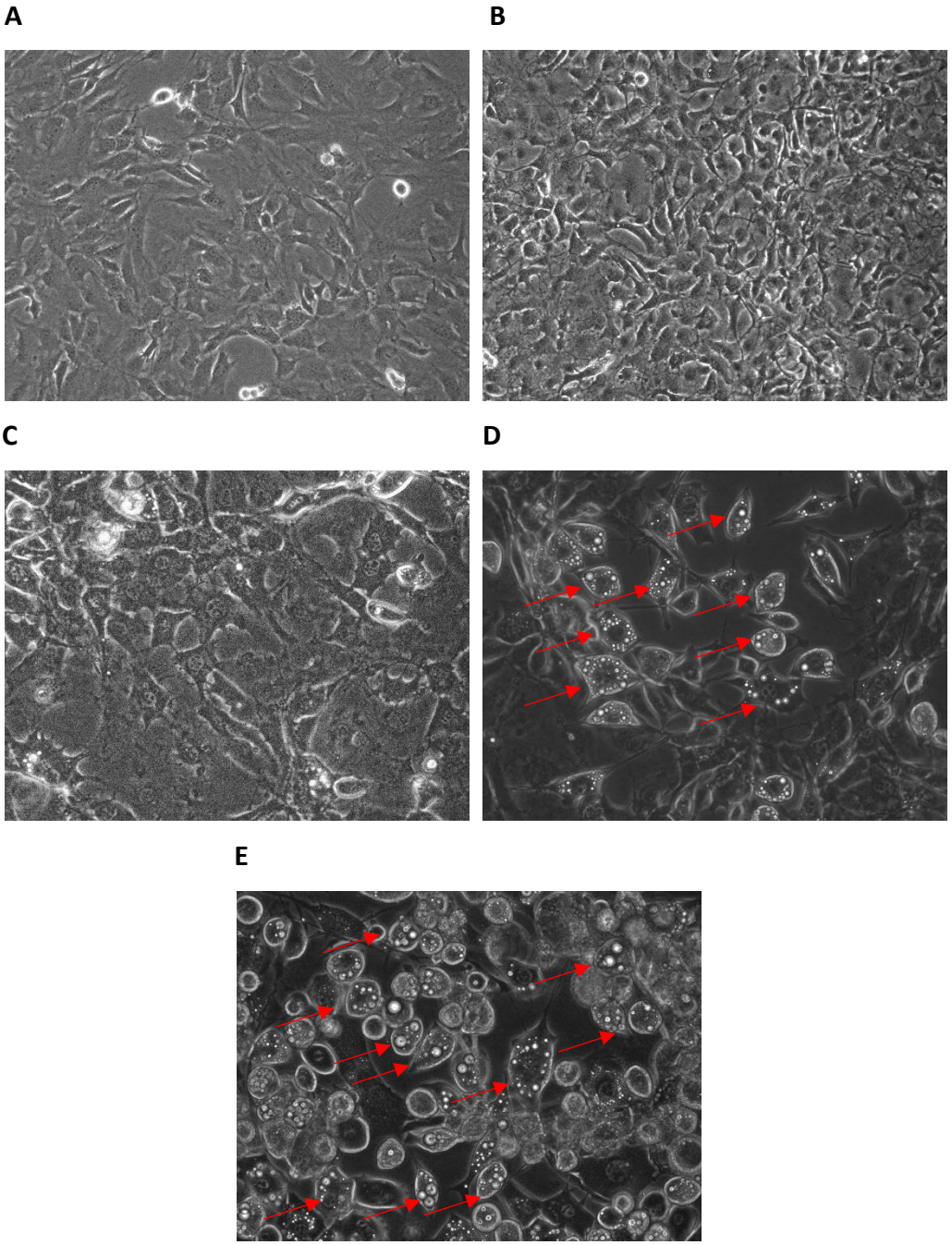

***Figura 6**: Proceso de diferenciación de los adipocitos 3T3-L1*

***A**: Pre-adipocitos a día de diferenciación 0; **B**: Pre-adipocitos a día de diferenciación 2; **C**: Adipocitos inmaduros a día de diferenciación 4; **D**: Adipocitos inmaduros a día de diferenciación 6 y **E**: Adipocitos maduros a día de diferenciación 8. Las imágenes de las figuras A y B se han tomado a 10X, mientras que las imágenes de las figuras C, D y E se han tomado a 20X. Las flechas de color rojo indican la acumulación de lípidos en el interior de los adipocitos durante el proceso de diferenciación.*

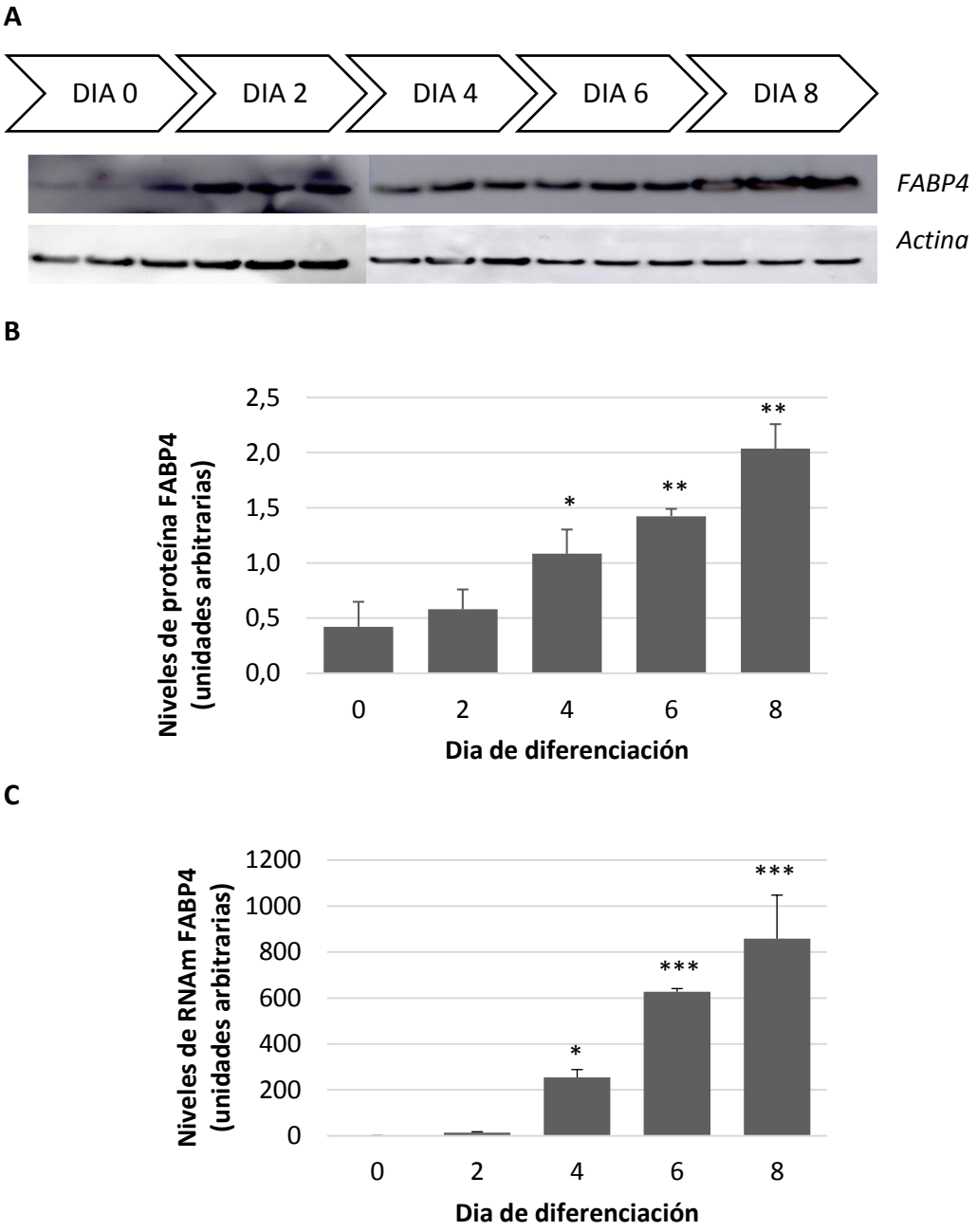

***Figura 7**: Estudios de FABP4 durante el proceso de diferenciación de los adipocitos 3T3-L1*

***A**: Línea de tiempo del proceso de diferenciación y Western Blot de FABP4; **B**: Cuantificación de los niveles de proteína y **C**: Cuantificación de los niveles de RNAm.*

*Los valores están expresados como media ± desviación estándar (*p<0'05, **p<0'01, ***p<0'001 respecto el día 0 donde las células se encuentran sin diferenciar).*

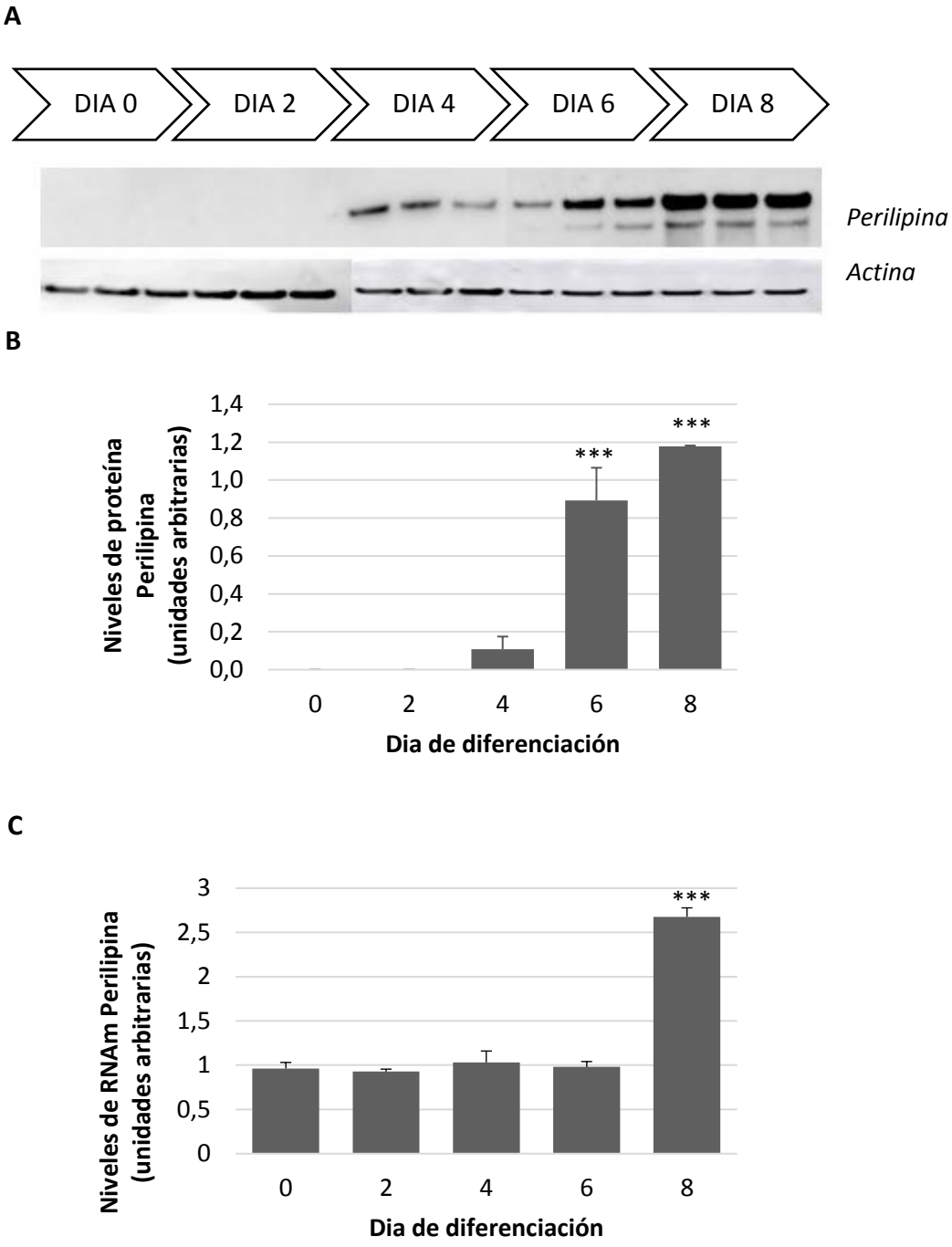

***Figura 8**:* Estudios de Perilipina durante *el proceso de diferenciación de los adipocitos 3T3-L1*

***A**: Línea de tiempo del proceso de diferenciación y Western Blot de Perilipina; **B**: Cuantificación de los niveles de proteína y **C**: Cuantificación de los niveles de RNAm.*

*Los valores están expresados como media ± desviación estándar (***p<0'001 respecto el día 0 donde las células se encuentran sin diferenciar).*

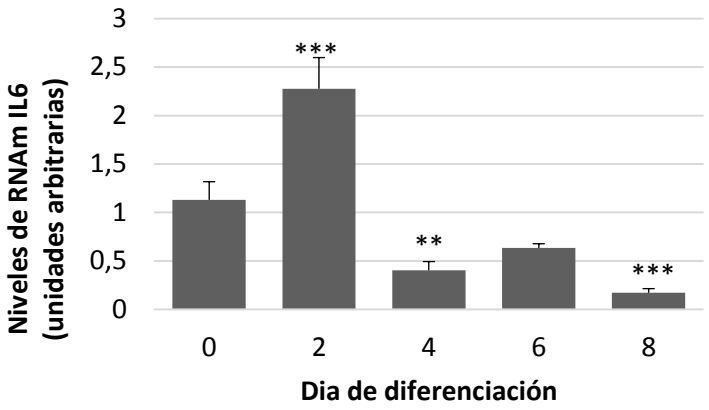

Figura 9: Estudio de IL6 durante *el proceso de diferenciación de los adipocitos 3T3-L1, cuantificación de los niveles* de RNAm.

*Los valores están expresados como media ± desviación estándar (**p<0'01, ***p<0'001 respecto el día 0 donde las células se encuentran sin diferenciar).*

6.3. Silenciamiento de FABP4 en modelo celular

Para explorar la implicación de FABP4 en la regulación de Perilipina y IL6, responsables del proceso de adipogénesis y resistencia a la insulina respectivamente, se silenció la expresión génica de FAB4 mediante siRNA en adipocitos diferenciados y se determinaron los niveles de expresión génica de dichas moléculas.

En la **Figura 10A** se observa como el silenciamiento de FABP4 se ha conseguido de forma eficiente ya que la expresión génica de FABP4 en adipocitos diferenciados disminuye 0,03 veces ($p<0,001$) respecto siRd. En cuanto a los niveles de expresión de Perilipina (**Figura 10B**) también se observa una disminución significativa de 0,45 veces ($p<0,05$) respecto siRd. Y IL6 (**Figura 10C**) también se be disminuida 0,54 veces ($p<0,01$) respecto siRd.

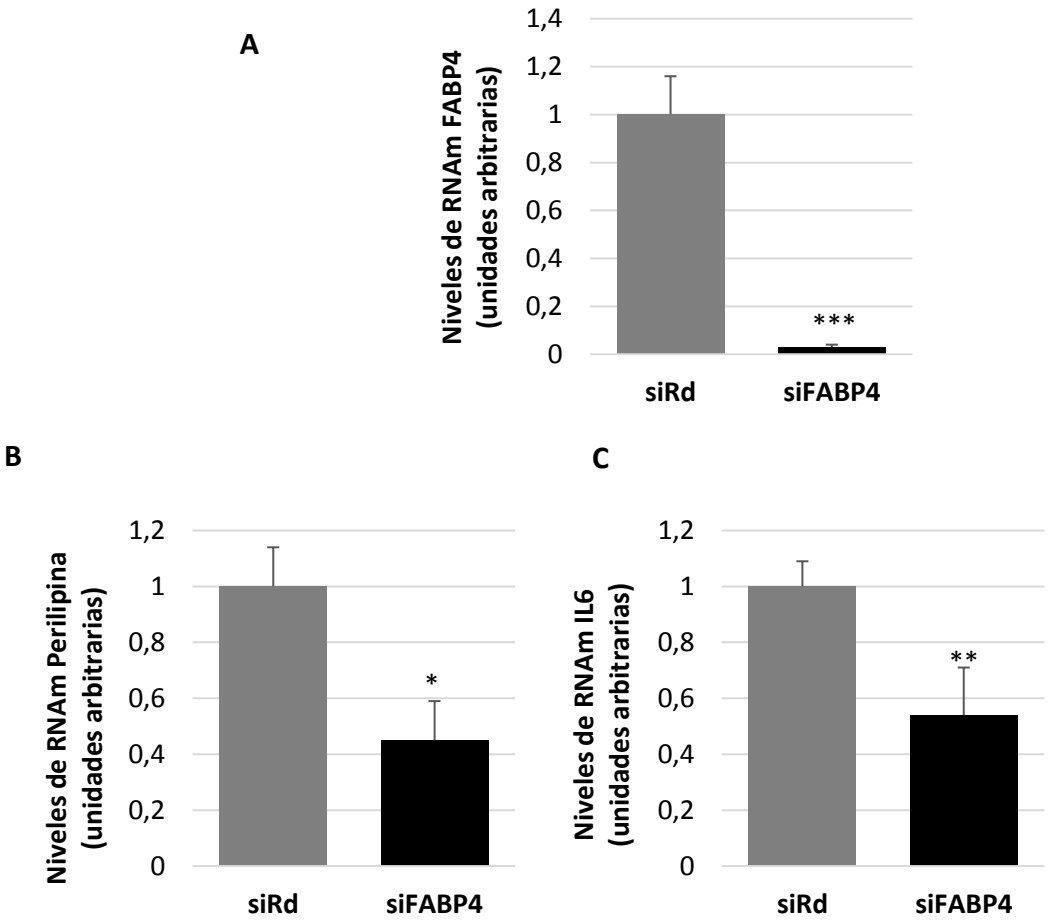

Figura 10: *Efecto de siFABP4 sobre la expresión génica de FABP4, Perilipina y IL6*

***A**: Cuantificación de los niveles de RNAm de FABP4 después de su silenciamiento; **B**: Cuantificación de los niveles de RNAm de Perilipina después del silenciamiento de FABP4 y **C**: Cuantificación de los niveles de RNAm de IL6 después del silenciamiento de FABP4.*

*Los valores están expresados como media ± desviación estándar (*p<0'05, **p<0'01, ***p<0'001 respecto el control, siRd).*

6.4. Inhibición de FABP4 en modelo animal

Para evaluar la inhibición farmacológica de FABP4 como potencial con aproximación terapéutica, se determinaron los niveles de RNAm de Perilipina y IL6 en 3 grupos de animales de experimentación: grupo control (STD), modelo de obesidad (HFD) y modelo de obesidad tratado con inhibidor de FABP4 (HFD+BMS). De este modo se podrá abordar con un objetivo terapéutico el papel de FABP4 en la obesidad y resistencia a la insulina.

Por una parte, en la **Figura 11** se observa que los valores de expresión génica de Perilipina y IL6 se ven aumentados significativamente en los modelos HFD (4,81 veces con $p<0,001$ y 6,34 veces con $p<0,001$ respectivamente) en comparación con los modelos STD.

También se observa que la inhibición de FABP4 disminuye de forma significativa la inducción tanto de Perilipina como de IL6 en los modelos HFD+BMS ya que se produce una disminución de 0,77 veces ($p<0,05$) y de 0,52 veces ($p<0,001$) respectivamente en comparación con el modelo HFD.

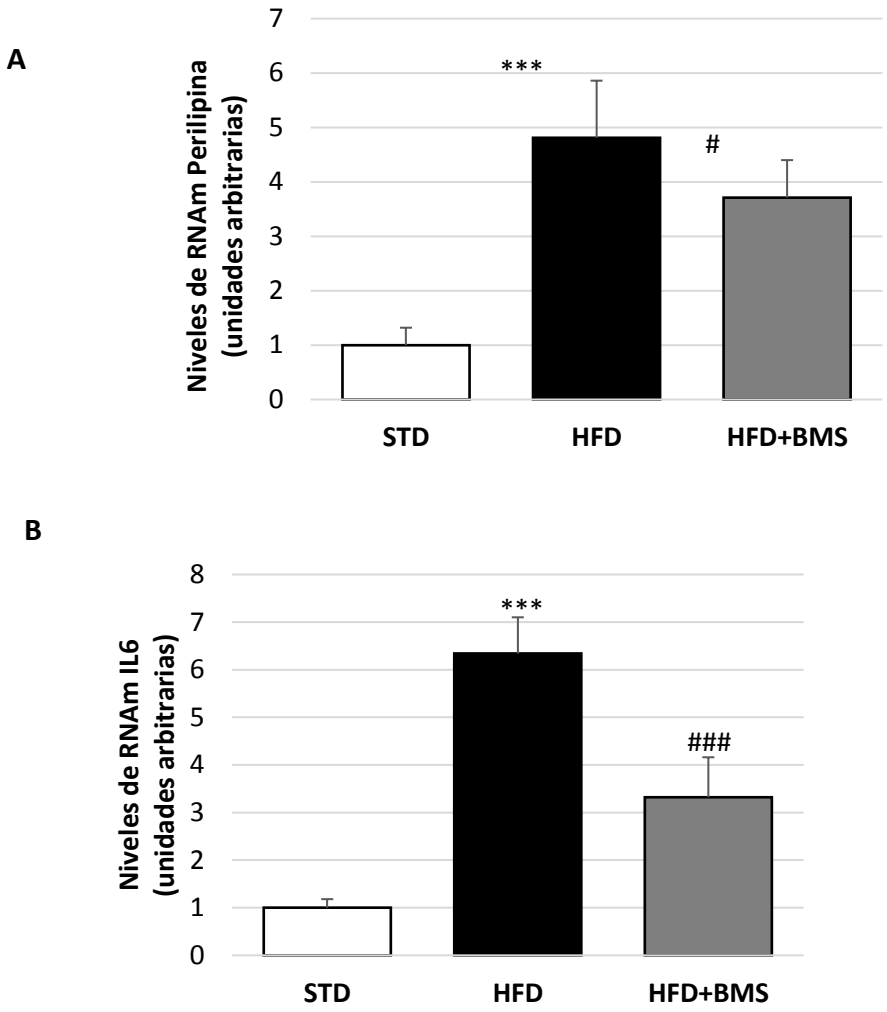

***Figura 11**:* Efecto de BMS309403 sobre la expresión génica de Perilipina y IL6.

***A**: Cuantificación de los niveles de RNAm de Perilipina después de la inhibición de FABP4 y **B**: Cuantificación de los niveles RNAm de IL6 después de la inhibición de FABP4.*
***STD** (Dieta estándar: 10% de kcal procedente de grasas), **HFG** (Dieta en alto contenido en grasas: 60% de kcal procedente de grasas) y **HFD+BMS** (Dieta en alto contenido en grasas suplementada con inhibidor de FABP4 BMS309403).*
*Los valores están expresados como media ± desviación estándar (***p<0'001 respecto el control, STD) y (###p<0'001 respecto HFD).*

7. DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN

El aumento progresivo tanto en los niveles de expresión génica cono en los niveles de proteína FABP4 durante el proceso de diferenciación de los adipocitos lleva a pensar que FABP4 tiene un papel importante como transportador lipídico en la adipogénesis. Y que está implicada de forma directa en la acumulación de ácidos grasos en el interior de los adipocitos. Estos resultados corroboran los resultados de otros estudios independientes (Ullah *et al., 2013*).

El proceso de adipogénesis está ampliamente asociado a síndrome metabólico, resistencia a la insulina y obesidad. La bibliografía científica asocia la FABP4 con las patologías mencionadas describe que FABP4 regula estos procesos en el musculo esquelético, hígado... (Bosquet *et al., 2018*). En este trabajo se ha podido demostrar que FABP4 parece tener también una función activa en el tejido adiposo y que podría contribuir en la regulación de dos marcadores: Perilipina (marcador de adipogénesis) y IL6 (marcador de resistencia a la insulina asociada a la obesidad).

Durante el proceso de diferenciación de los adipocitos se observa un aumento en los niveles de FABP4 previo al aumento de los niveles de Perilipina, hecho que hace pensar que Perilipina está regulada por FABP4. Pero en cuanto a los niveles de IL6 parecen no estar regulados por FABP4 ya que se observa un aumento el día 2 de diferenciación y posteriormente una disminución. Parece ser que IL6 durante la adipogénesis se encuentre regulada por otras vías, tal y como ya ha sido descrita por otros investigadores anteriormente (Poulain-Godefroy *et al.*, 2007).

Para poder estudiar de forma más específica si Perilipina y IL6 se encuentran regulados por FABP4 se silenció la expresión de FABP4 en adipocitos totalmente diferenciados. Los resultados sugieren que si hay una correlación entre los niveles de FABP4 con los niveles de Perilipina y IL6 ya que cuando se silencia FABP4, los niveles de Perilipina y IL6 disminuyen significativamente. De hecho, previamente a este trabajo, Kijimoto *et al., 2012* también demostraron que en adipocitos diferenciados FABP4 regulaba IL6.

Estos resultados llevan a pensar que efectivamente FABP4 regula los marcadores y que, por tanto, también regula los procesos de inflamación y resistencia a la insulina asociados a la obesidad.

Para corroborar los resultados obtenidos en los modelos celulares y determinar si FABP4 puede ser una buena diana terapéutica, se realizó la inhibición farmacológica de FABP4 en modelos animales complejo.

Los resultados son muy prometedores puesto que la inhibición farmacológica de FABP4 previene significativamente la inducción de Perilipina y IL6 en el modelo murino de resistencia a la insulina inducida por dieta grasa.

Aunque esta investigación sugiere que FABP4 es un factor que contribuye al desarrollo de estas patologías, todavía hay muchos mecanismos moleculares que se desconocen. De modo que, si se quiere abordar las alteraciones metabólicas asociadas a la obesidad con un objetivo terapéutico, aun es necesaria mucha más investigación para entender completamente que vías están implicadas y como se regulan. Además, se tendrá que determinar los posibles efectos de la inhibición de FAB4 a largo plazo.

8. REFERENCIAS

[1] Ali, A. T., Hochfeld, W. E., Myburgh, R. & Pepper, M.S. **Adipocyte and adipogenesi**. European Journal of Cell Biology 92(6-7): 229-236 (2013)
DOI: 10.1016/j.ejcb.2013.06.001

[2] Bosquet, A., Girona, J., Guaita-Esteruelas, S., Heras, M., Saavedra-García, P., Martínez-Micaelo, N., Masana, L. & Rodríguez-Calvo, R. **FABP4 inhibitor BMS309403 decreases saturated-fatty-acid-induced endoplasmic reticulum stress-associated inflammation in skeletal muscle by reducing p38 MAPK activation**. Biochimica et biophysica acta 186(6):604-613 (2018)
DOI: 10.1016/j.bbalip.2018.03.004.

[3] Cao, H., Sekiya, M., Erikci, M., Burak, M. F., Mayers, J. R., White, A., Inouye, K., Rickey, L. M., Ercal, B. C., Furuhashi, M., Tuncman, G. & Hotamisligil, G. S. **Adipocyte Lipid Chaperone aP2 Is a Secreted Adipokine Regulating Hepatic Glucose Production**. Cell Metabolism 7;17(5):768-778 (2013)
DOI: 10.1016/j.cmet.2013.04.012

[4] Esteve, M. **Adipose tissue: Cell heterogeneity and functional diversity**. Endocrinología y Nutrición 61(2): 100-112 (2014)
DOI: 10.1016/j.endonu.2013.03.011

[5] Furuhashi, M. & Hotamisligil, S. **Fatty acid-binding proteins: role in metabolic diseases and potential as drug targets**. Nature Reviews, Drug Discovery 7(6):489:503 (2008)
DOI: 10.1038/nrd2589.

[6] Furuhashi, M., Saitoh, S., Shimamoto, K. & Miure, T. **Fatty Acid-Binding Protein 4 (FABP4): Pathophysiological Insights and Potent Clinical Biomarker of Metabolic and Cardiovascular Diseases**. Clinical Medicine Insights, Cardiology. 2;8(Suppl3):23-33 (2015)
DOI: 10.4137/CMC.S17067

[7] Furuhashi, M., Tuncman, G., Görgün, C. Z. Makowski, L., Atsumi, G., Vaillancourt, E., Kono, K., Babaev, V. R., Fazio, S., Linton, M. F., Sulsky, R., Robi, J. A., Parker, R. A. &

Hotamisligil, G. S. **Treatment of diabetes and atherosclerosis by inhibiting fatty-acid-binding protein aP2**. Nature 21;447(7147):959-965 (2007)
DOI: 10.1038/nature05844

[8] Hotamisligil, G. S. & Bernlohr, D. A. **Metabolic functions of FABPs – mechanisms and therapeutic implications**. Nature Reviews. Endocrinology 11(10):592-605 (2015)
DOI: 10.1038/nrendo.2015

[9] Kajimoto, K., Takayanagi, S., Akita, H. & Harashima, H. **RNA Interference-Based Silencing Reveals the Regulatory Role of Fatty Acid-Binding Protein 4 in the Production of IL-6 and Vascular Endothelial Growth Factor in 3T3-L1 Adipocytes**. Endocrinology 153(11): 5629-5636 (2012)
DOI: 10.1210/en.2012-1456.

[10] Martínez-Fernández, L., Laiglesia, L. M., Huerta, A. E., Martínez, J. A. & Moreno-Aliaga, M. J. **Omega-3 fatty acids and adipose tissue function in obesity and metabolic syndrome**. Prostaglandins and Other Lipid Mediators 12(Pt A): 24-41 (2015)
DOI: 10.1016/j.prostaglandins.2015.07.003.

[11] Moseti, D., Regassa, A. & Kim, WK. **Molecular Regulation of Adipogenesis and Potential Anti-Adipogenic Bioactive Molecules**. International Journal of Molecular Sciences 17(1) (2016)
DOI: 10.3390/ijms17010124.

[12] Organización Mundial de la Salud. **Obesidad y sobrepeso**. (2017).
http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight.
Consultado el 03/05/2018

[13] Palominos, M. M., Dünner, N. H., Wabitsch, M. & Rojas, C. V. **Angiotensin II directly impairs adipogenic differentiation of human preadipose cells**. Molecular and cellular biochemistry 408(1-2):115-122 (2015)
DOI: 10.1007/s11010-015-2487-y

[14] Poulain-Godefroy, O. & Froguel, P. **Preadipocyte response and impairment of differentiation in an inflammatory environment**. Biochemical and Biophysical Research Communications 11;356(3):662-667 (2007)
DOI: 10.1016/j.bbrc.2007.03.053

[15] Rodríguez-Calvo, R., Girona, J., Alegret, J. M., Bosquet, A., Ibarretxe, D. & Masana, L. **Role of the fatty acid-binding protein 4 in heart failure and cardiovascular Disease**. Journal of Endocrinology 233(3):R173-R184 (2017)
DOI: 10.1530/JOE-17-0031

[16] Smatherns, R. L. & Petersen, D. R. **The human fatty acid-binding protein family: Evolutionary divergences and functions**. Human Genomics 5(3):170-191 (2011)
DOI: 10.1186/1479-7364-5-3-170

[17] Storch, J. & Thumser, A. E. **Tissue-specific Functions in the Fatty Acid-binding Protein Family**. The Journal of Biological chemistry. 22:285(43):32679-83 (2010).
DOI: 10.1074/jbc.R110.135210

[18] Takahashi, Y., Shinoda, A., Furuya, N., Harada, E., Arimura, N., Ichi, I., Fujiwara, Y., Inue, J. & Sato, R. **Perilipin-Mediated Lipid Droplet Formation in Adipocytes Promotes Sterol Regulatory Element-Binding Protein-1 Processing and Triacylglyceride Accumulation**. PLoS ONE 8(5): e64605 (2013)
DOI: 10.1371/journal.pone.0064605

[19] Ullah, M., Stich, S., Häupl, T., Eucker, J., Sittinger, M. & Ringe, J. **Reverse Differentiation as a Gene Filtering Tool in Genome Expression Profiling of Adipogenesis for Fat Marker Gene Selection and Their Analysis**. PLoS ONE 8(7): e69754 (2013)
DOI: 10.1371/journal.pone.0069754. Print 2013.

[20] Zhou, Y., Nie, T., Zhang, Y., Song, M., Li, K., Ding, M., Ding, K., Wu, D. & Xu, Y. **The discovery of novel and selective fatty acid binding protein 4 inhibitors by virtual screening and biological evaluation**. Bioorganic & medicinal chemistry 15;24(18):4310-4317 (2016)
DOI: 10.1016/j.bmc.2016.07.022.

9. AUTOEVALUACIÓN

La realización de este trabajo de final de grado sobre mi estancia de prácticas curriculares ha sido una experiencia muy enriquecedora tanto personal como profesionalmente.

Este trabajo de final de grado me ha proporcionado conocimientos muy interesantes sobre el mundo de la investigación y la sanidad, más en concreto sobre las enfermedades metabólicas y sus aproximaciones terapéuticas. Y ha hecho que me dé cuenta de lo importante que es realmente la investigación para mejorar la salud de las personas, y de lo frustrante que resulta cuando los resultados obtenidos no son los esperados.

Con mi trabajo en el laboratorio he aprendido muchas técnicas, trucos y también cosas que no debo hacer dentro de un laboratorio. Estoy totalmente segura de que todos los consejos que me han dado mis compañeros de laboratorio me ayudaran mucho para continuar mi camino profesional en el mundo de la ciencia.

Personalmente estoy muy orgullosa de mi misma por haber terminado mi etapa universitaria, haber descubierto gran cantidad de cualidades que desconocía y haber enriquecido mucho mis conocimientos sobre la ciencia. El esfuerzo, dedicación, horas de estudio… han dado sus frutos. Aun así, soy plenamente consciente de que este solo ha sido el primer paso y que todavía me quedan muchas cosas por aprender con la experiencia en la vida profesional.