

LAURA GUINOVART MARTÍN

**L'EFECTE DE LA METFORMINA EN EL DESENVOLUPAMENT DE
LA MALTIA METABÒLICA DEL FETGE GRAS**

TREBALL DE FI DE GRAU

Dirigit pel Dr. Jorge Joven

Grau de Nutrició Humana i Dietètica - URV



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Tarragona 2021

AGRAÏMENTS

Voldria agrair al Dr. Joven per donar-me la oportunitat de poder realitzar el meu Treball de Fi de Grau i el Programa d'Alumne Intern en la Unitat de Recerca Biomèdica.

També vull agrair especialment al Gerard Baiges per haver-me guiat en tot aquest procés, gràcies a la seva dedicació i als seus coneixements he après molt i he crescut com a professional. A més a més, volia agrair a la resta de l'equip de l' Unitat de Recerca Biomèdica per la seva ajuda i amabilitat. Gràcies per l'experiència.

ÍNDEX

1. ABSTRACT	4
1.1 Abstract (Català)	4
1.2 Abstract (Castellà)	5
1.3 Abstract (Anglès)	6
2. INTRODUCCIÓ	7
2.1 L'obesitat	7
2.1.1 El paper del teixit adipós	7
2.1.2 Comorbiditats associades a l'obesitat	8
2.2 Obesitat i MAFLD	9
2.3 MAFLD i l'autofàgia	9
2.3.1 L'eix AMPK/mTORc1: Reguladors del metabolisme	9
2.4 Tractaments terapèutics de l'obesitat	10
3. HIPÒTESIS I OBJECTIUS	11
4. MATERIALS I MÈTODES	11
4.1 Animals i intervenció dietètica	11
4.2 Test de tolerància de glucosa	12
4.3 Anàlisi bioquímic	13
4.4 Anàlisi histològic i d'imatge	13
4.5 Anàlisi Western Blot	13
4.6 Anàlisi estadístic	14
5. RESULTATS	15
5.1 La metformina no millora els efectes causats per una dieta HF-HSD.	15
5.2 La metformina produeix un efecte dual a nivell de teixit adipós depenent la dieta administrada.....	17
5.3 La metformina no és capaç d'activar l'autofàgia en un model obesogènic amb esteatohepatitis.....	19
6. DISCUSSIÓ	21
7. LIMITACIONS	22
8. CONCLUSIONS	23
9. BIBLIOGRAFIA	24
10. ANNEX	27
9.1 Annex I	28
9.2 Annex II	29

1. ABSTRACT

1.1 Abstract (Català)

Introducció: L'obesitat és una malaltia metabòlica que es troba en constant augment en tot el món paral·lelament a la malaltia metabòlica-associada al fetge gras (de l'anglès, Metabolic Associated Fatty Liver Disease, MAFLD). La MAFLD és una malaltia progressiva que s'inicia davant una acumulació de greix anomenada esteatosis hepàtica (NAFL), avança cap un estat inflamatori anomenat esteatohepatitis (NASH, de l'anglès Non Alcoholic SteatoHepatitis) i quan empitjora pot progressar cap a cirrosi o un hepatocarcinoma humà. A nivell molecular, la NASH es relaciona amb la inhibició de la proteïna quinasa AMPK, que podria ser activada per l'administració de la metformina, fàrmac comunament utilitzat com antidiabètic. Per aquesta raó, l'objectiu de l'estudi es va centrar en observar si l'administració del fàrmac metformina era capaç de prevenir l'aparició de la NASH en un model animal obesogènic.

Metodologia: A les cinc setmanes de vida, 32 ratolins mascles (C57BL/6J) van ser aleatoritzats per a rebre una dieta estàndard (CD, n=8), o una dieta alta en greixos i sacarosa (HF-HSD, n=8) amb (n=8) o sense (n=8) l'administració del fàrmac metformina durant 20 setmanes. Dues setmanes prèvies al sacrifici es va realitzar el test de tolerància a la glucosa. Després del sacrifici, es van obtenir mostres de sang per a l'anàlisi de paràmetres bioquímics (glucosa, colesterol total, triglicèrids i alanina aminotransferasa) i diferents òrgans metabòlics (fetge i teixits adiposos) per anàlisis histològics i d'extracció de proteïna.

Resultats: L'administració de 300 mg/kg/dia del fàrmac metformina en una dieta obesogènica durant 20 setmanes va ser insuficient per millorar els paràmetres bioquímics i histològics. A més, els ratolins alimentats amb una dieta HF-HSD presentaven una inhibició de l'autofàgia independentment de l'administració de la metformina. Per tant, podem concloure que la dosi i/o la via utilitzada per a subministrar la metformina, podrien no ser efectives per a millorar les complicacions metabòliques associades a la dieta.

1.2 Abstract (Castellà)

Introducción: La obesidad es una enfermedad metabólica que se encuentra en constante aumento en todo el mundo paralelamente a la enfermedad metabólica del hígado graso (del inglés, Metabolic Associated Fatty Liver Disease, MAFLD). La MAFLD es una enfermedad progresiva que se inicia con un cúmulo de grasa llamado esteatosis hepática (NAFL), progresando hacia un estado inflamatorio llamado esteatohepatitis (NASH, del inglés Non Alcoholic SteatoHepatitis) y cuando empeora puede progresar hacia una cirrosis o un hepatocarcinoma humano. A nivel molecular, la NASH se relaciona con la inhibición de la proteína quinasa AMPK, que puede ser activada gracias a la metformina, fármaco utilizado como antidiabético. Por esta razón, el objetivo del estudio se centró en observar si la administración del fármaco metformina era capaz de prevenir la aparición de la NASH en un modelo animal obesogénico.

Metodología: A las cinco semanas de vida 32 ratones macho (C57BL/6J) fueron aleatorizados para recibir una dieta estándar (CD, n=8), o una dieta alta en grasas y sacarosa (HF-HSD, n=8) con (n=8) o sin (n=8) la administración del fármaco metformina durante 20 semanas. Dos semanas previas al sacrificio se realizó la prueba de tolerancia a la glucosa. Después del sacrificio, se obtuvieron muestras de sangre para el análisis de los parámetros bioquímicos (glucosa, colesterol total, triglicéridos y alanina aminotransferasa) i diferentes órganos metabólicos (hígado y tejidos adiposos) para el análisis histológico y de extracción de proteína.

Resultado: La administración de 300 mg/kg/día del fármaco metformina en una dieta obesogénica durante 20 semanas fue insuficiente para mejorar los parámetros bioquímicos e histológicos. Los ratones alimentados con una HF-HSD presentaban una inhibición de la autofagia independientemente de la administración de la metformina. Por lo tanto, podemos concluir que la dosis y/o la vía utilizada para la administración de la metformina, pueden no ser efectivas para mejorar las complicaciones metabólicas asociadas a la dieta.

1.3 Abstract (Anglès)

Introduction: Obesity is a metabolic disease that is steadily increasing worldwide in parallel with Metabolic Associated Fatty Liver Disease (MAFLD). MAFLD is a progressive disease that starts with a fatty accumulation called hepatic steatosis (NAFL), progresses to an inflammatory state called steatohepatitis (NASH) and when it worsens can progress to cirrhosis or human hepatocarcinoma. At the molecular level, NASH is related to the inhibition of the protein kinase AMPK, which can be activated by metformin, a drug used as an antidiabetic. For this reason, the objective of the study was to observe if the administration of the metformin was able to prevent the appearance of NASH in an obesogenic animal model.

Methodology: At five weeks of age 32 male mice (C57BL/6J) were randomized to receive a standard diet (CD, n=8), or a high fat, high sucrose diet (HF-HSD, n=8) with (n=8) or without (n=8) administration of the drug metformin for 20 weeks. Two weeks prior to sacrifice, glucose tolerance test was done. After sacrifice, blood samples were obtained for analysis of biochemical parameters (glucose, total cholesterol, triglycerides and alanine aminotransferase) and different metabolic organs (liver and adipose tissues) for histological and protein extraction analysis.

Results: Administration of 300 mg/kg/day of the drug metformin on an obesogenic diet for 20 weeks was insufficient to improve biochemical and histological parameters. Mice fed a HF-HSD exhibited inhibition of autophagy independently of metformin administration. Therefore, we can conclude that the dose and/or via used for administration of metformin, may not be effective in improving diet-associated metabolic complications.

2. Introducció

2.1 L'obesitat

La prevalença de sobrepès ($\text{IMC} \geq 25 \text{ kg/m}^2$) i d'obesitat ($\text{IMC} \geq 30 \text{ kg/m}^2$) ha incrementat en les últimes dècades, afectant aproximadament a dos mil milions de persones a nivell mundial. D'acord a l'Organització Mundial de la Salut (OMS), actualment, l'obesitat afecta a un 11% dels homes i un 15% de les dones [1,2]. No obstant, els homes presenten major risc de desenvolupar comorbiditats associades a l'obesitat com ara la hipertensió, la diabetis tipus 2 (DMT2) i la síndrome metabòlica en general. Aquestes diferències són degudes, principalment, a canvis en la distribució del teixit adipós. Les dones tendeixen a incrementar la adipositat a nivell subcutani (gluti-femoral). En canvi, en els homes l'acumulació es localitza a nivell del teixit adipós visceral. Aquest dimorfisme sexual en l'expansió del teixit adipós produeix que els homes siguin més propensos a desenvolupar comorbiditats associades a causa del caràcter inflamatori que posseeix el del teixit adipós visceral [3,4].

2.1.1 El paper del teixit adipós

La principal funció del teixit adipós és emmagatzemar i alliberar àcids grassos d'acord les necessitats energètiques del moment. No obstant, també presenta un paper important a nivell immunològic, endocrí, termogènic i regeneratiu. Tots aquests processos difereixen en funció de la regió anatòmica on es localitza i també entre adipòcits d'una mateixa regió. Segons la localització anatòmica són classificats com a teixit adipós visceral, localitzat a nivell intra-abdominal (omental i mesentèric) o bé com a teixit adipós subcutani que es localitza en la part del tronc inferior (gluteal, femoral i intra-muscular) i en la part del tronc superior (abdominal) [5].

Tot i que el nombre d'adipòcits és determinat durant la etapa prenatal o els primers mesos de vida el teixit adipós blanc té la capacitat d'expandir-se per tal d'emmagatzemar l'excés d'energia en forma de triglicèrids. El creixement es pot dur a terme de dos formes diferents 1) per incrementar la mida dels adipòcits existents (hipertrofia) o bé 2) per reclutar nous adipòcits (hiperplàsia). El tipus de creixement no només dependrà segons la regió anatòmica sinó que també en funció de cada individu. No obstant, alguns estudis d'experimentació animal suggereixen que el teixit adipós visceral (epididimal o perigonadal) té preferència pel creixement hipertrofic, mentre que el teixit adipós subcutani (inguinal) hi predomina la hiperplàsia. Aquesta capacitat del teixit

adipós subcutani d'incrementar el nombre d'adipòcits permet emmagatzemar aproximadament el 80% de les reserves energètiques [6].

D'altra banda, cal destacar que el teixit adipós no només està caracteritzat pel teixit adipós blanc sinó que també existeixen altres tipus de teixits adiposos. Entre ells, trobem el teixit adipós marró (caracteritzat per tenir un alt contingut de mitocondries), el teixit adipós rosa (es troba majoritàriament en el teixit mamari durant l'embaràs) i el teixit adipós *beige*. Concretament, aquest últim s'origina com a resultat de la diferenciació dels adipòcits blancs en un procés anomenat "*browning*". Aquest fet confereix al teixit adipós una complexitat metabòlica important i amb una vinculació directa amb les comorbiditats associades a l'obesitat [7,8].

2.1.2 Comorbiditats associades a l'obesitat

L'obesitat és una malaltia metabòlica que està clarament associada amb un increment del risc de patir la síndrome metabòlica (SM). Aquesta està caracteritzada per la presència de la resistència a la insulina, la DMT2, la hipertensió i la dislipèmia. No obstant, aquestes característiques de la síndrome metabòlica sovint són acompanyades per complicacions metabòliques com la malaltia metabòlica-associada al fetge gras (de l'anglès, Metabolic Associated Fatty Liver Disease, MAFLD), l'arteriosclerosi o càncer [9,10].

La SM promou un empitjorament del metabolisme de la glucosa i dels lípids en diferents òrgans incloent el teixit adipós i el fetge. Aquest estat patològic conjuntament amb un excés de nutrients de forma continua i crònica condueix a la desregulació d'aquests dos sistemes culminant amb l'acumulació de greix en el fetge [11].

2.2 Obesitat i MAFLD

La prevalença de la MAFLD ha anat augmentant paral·lelament amb l'obesitat i que segons estudis epidemiològics mostren que la seva prevalença està al voltant del 24% a nivell mundial. Actualment la tècnica per excel·lència per al diagnòstic de la MAFLD és a través de l'anàlisi histològic a partir d'una biòpsia prèviament inclosa amb parafina. No obstant, existeixen altres proves menys invasives que poden detectar la presència de greix en el fetge com ara la ressonància magnètica nuclear (RMN) però difícilment poden detectar l'estadi concret de la malaltia [12,13].

La MAFLD es caracteritza per ser una malaltia progressiva que comença amb l'acumulació de greix en el fetge també anomenada esteatosis hepàtica (NAFL). A mesura que la inflamació i la fibrosis apareixen es desenvolupa la esteatohepatitis (de l'anglès, Non-Alcoholic SteatoHepatitis).

Quan empitjora la malaltia pot progressar cap a cirrosi o un hepatocarcinoma humà. Concretament, la esteatohepatitis (NASH) és un estadi de la malaltia reversible i, molts esforços de la comunitat científica es centren a entendre els mecanismes moleculars que estan involucrats en la seva aparició. Entre aquests es troba el procés d'autofàgia que es caracteritza per estar inhibit en condicions de NASH i intentar regular el procés podria millorar el curs de la malaltia[14].

2.3 MAFLD i l'autofàgia

L'autofàgia és un terme genèric que engloba tres processos diferents: la micro-autofàgia, la macro-autofàgia i l'autofàgia induïda per xaperones. En aquest treball ens centrarem en la macro-autofàgia ja que està millor caracteritzada i és la principal via d'incorporació de material no funcional al lisosoma [15].

La macro-autofàgia és un mecanisme que actua com a control de qualitat de proteïnes i orgànuls que estan dintre de la cèl·lula. El procés de formació de l'auto-fagosoma està dividit en diferents fases. 1) El procés d'iniciació comença amb l'activació del complex Unc-51-Like Kinase 1 (ULK1) (format per ULK1, ULK2, ATG13 i FIP200) i del complex PI3K classe III (format per VPS34, ATG14 i UV). L'activació d'aquests complexos donarà lloc al procés 2) de formació i nucleació de la membrana. Durant aquest procés la proteïna LC3-I és conjugada amb un *phosphatidyl-ethanolamine* (PE) per a formar la LC3-II que serà incorporada a la membrana per tal d'ajudar en el procés de nucleació. Simultàniament, la proteïna P62 actuarà com una proteïna segrestadora del material (proteïnes, orgànuls, etc.) que s'hagi d'eliminar i el guiarà dintre del auto-fagosoma. 3) Finalment, el auto-fagosoma ja format es fusionarà amb el lisosoma, formant el auto-lisosoma. En aquesta última fase el contingut del auto-fagosoma és degradat pels enzims (lipases, proteases, glucosidases, etc.) del lisosoma incloent les proteïnes LC3-II i la P62 [16,17].

2.3.1 L'eix AMPK/mTORc1: Reguladors del metabolisme

L'autofàgia és un procés altament regulat i que la seva activació dependrà en certa manera de l'activitat de la AMPK i mTORC1. En primer lloc, la AMPK està composta per una subunitat catalítica α i dos subunitats reguladores β i γ . El complex AMPK incrementa la seva activitat quan és fosforilat al residu d'aminoàcid Thr172 de la subunitat catalítica α . Aquesta activació normalment es produeix davant situacions d'estrès d'energia, és a dir, quan la relació AMP/ATP incrementa [18]. Davant aquesta situació es genera una reprogramació metabòlica ja que s'inhibeixen les principals vies anabòliques (síntesis de lípids, glicogen, hexosamines, etc.) per a prioritzar les vies catabòliques

(glicòlisis, lipòlisis, autofàgia, etc.) i garantir els requeriments energètics cel·lulars del moment. L'activació de l'autofàgia per part de la AMPK la produeix en diferents nivells. Per una banda, activa a ULK1 per a que es pugui iniciar el procés d'iniciació de l'autofàgia [19]. Per altra banda, activa a la proteïna TSC2 i la subunitat RAPTOR de la proteïna mTORC1 per tal de mantenir-la inhibida ja que és el principal regulador negatiu de l'autofàgia. En canvi, quan la situació metabòlica canvia , és a dir, quan hi ha un excés de nutrients (aminoàcids) la proteïna mTORC1 incrementa la seva activitat i per contra AMPK s'inhibeix [20,21]. Durant la seva activació promou totes aquelles vies metabòliques anabòliques (síntesis de proteïnes, lípids, nucleòtids, etc.) per tal d'afavorir el creixement cel·lular i la seva proliferació. La regulació de l'autofàgia per part de mTORC1 es realitza a través de la inhibició dels complexos d'iniciació de l'autofàgia i a nivell transcripcional també inhibeix el factor de transcripció EB (TFEB), un regulador transcripcional lisosomal i de gens involucrats en l'autofàgia [22].

2.4 Tractaments terapèutics de la obesitat

L'obesitat és una malaltia metabòlica on la majoria de tractaments utilitzats fins al moment no mostren una milloria a llarg termini. Concretament, el tractament dietètic provoca una pèrdua de pes en pacients amb obesitat , no obstant, a llarg termini la seva eficàcia es perd a causa dels canvis en la conducta alimentària que afavoreixen a l'efecte rebot del pes corporal. En canvi, quan el tractament dietètic s'utilitza conjuntament amb activitat física la pèrdua de pes ocasionada per la dieta es manté més estable en el temps i disminueix l'efecte rebot dels tractaments exclusivament dietètics [23]. D'altra banda, la cirurgia bariàtrica (CB) reservada en l'obesitat més extrema o en situacions amb complicacions metabòliques importants no només és capaç de reduir i mantenir el pes corporal a curt i mitjà termini ,sinó que també, és capaç de revertir la NASH i en molts casos curar la DMT2 [24,25,26].

Actualment, no existeix cap tractament específic per a la MAFLD i més concretament per a la NASH. No obstant, la metformina és un fàrmac molt utilitzat en el control de la DMT2 que actua en la inhibició de certes vies metabòliques (lipogènesi de novo, lipòlisis del teixit adipós) que poden ser útils per a controlar el curs de la malaltia de la MAFLD i per tant en disminuir els casos de NASH [27,28].

3. Hipòtesis i objectius

El nostre estudi es planteja si l'administració del fàrmac metformina pot prevenir l'aparició de la NASH en un model amb obesitat.

Els principals objectius de l'estudi són:

- Observar l'efecte de la dieta i la metformina sobre l'estat metabòlic
- Avaluar l'efecte de la dieta i/o la metformina sobre la l'afectació hepàtica i la mida dels adipòcits de diferents regions anatòmiques.
- Determinar el grau d'activació l'eix AMPK/mTORC1 i com afecta en el procés d'autofàgia.

4. Materials i mètodes

4.1 Animals i intervenció dietètica

Els ratolins C57BL/6J de quatre setmanes de vida es van obtenir de ENVIGO (Barcelona, Espanya). Acte seguit, van ser distribuïts en gàbies amb capacitat per a 4 ratolins i es van allotjar en una sala amb temperatura controlada ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$) i amb un cicle de llum/obscuritat de 12 hores, amb l'inici lumínic a les 8 del matí. Tots els ratolins eren mascles i es van aclimatar a l'estabulari durant una setmana amb una dieta estàndard amb la següent composició: 58% d'hidrats de carboni, 24% de proteïnes i 18% de greixos del total de les calories.

Al cap de 5 setmanes d'edat els ratolins van ser assignats aleatòriament a rebre una dieta estàndard (SD, n=8), SD amb metformina (SD+M, n=8), dieta alta en greix i sacarosa (HF-HSD, n=8), i HF-HSD amb metformina (HF-HSD + M, n=8) durant 20 setmanes. Després de les 20 setmanes els ratolins van ser sacrificats. (*Figura 1*)

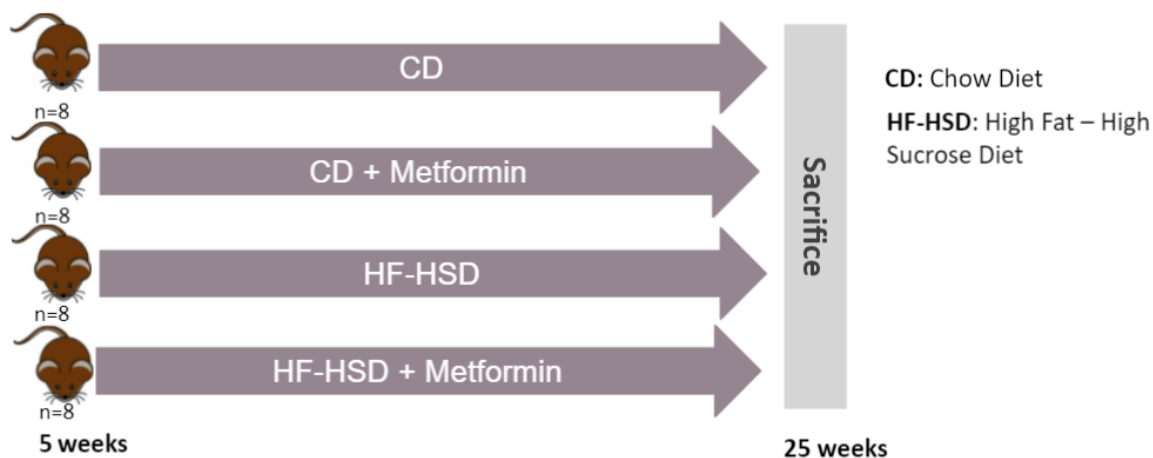


Figura 1: Disseny de l'estudi.

La dieta estàndard (TD.2014, Teklad) es va administrar durant l'estudi i va consistir en: 67 % d'hidrats de carboni, 20% proteïnes i un 13% de greixos del total de les calories. La dieta HF-HSD (TD.08811, Teklad) contenia: 40,7% d'hidrats de carboni (29% de sacarosa), 14,7% de proteïnes i un 44,6% de greixos del total de les calories.

Els ratolins van ser controlats diàriament per comprovar el seu benestar general, els signes de malestar i angoixa. El pes corporal, la ingesta d'aliments i d'aigua van ser controlats setmanalment amb l'administració diària de metformina (300 mg/kg/dia).

Finalment durant el sacrifici es va realitzar una extracció de sang mitjançant una punció cardíaca. A més, es va realitzar l'extracció del fetge i del teixit adipós originari de diferents zones anatòmiques. Es van pesar i dividir per a la seva posterior fixació en formol o congelat amb nitrogen líquid i posteriorment emmagatzemat a - 80°C.

4.2 Test de tolerància de glucosa

Els ratolins van estar en dejú durant 14 hores, des de les 18:00 h fins a les 8:00 h del matí següent. Es va injectar via intraperitoneal una solució de glucosa (2 g de glucosa per kg de pes corporal). Es van realitzar diferents mesures (15, 30, 60 i 120 minuts post injecció) a través d'un glucòmetre manual (Accu-Check, Roche).

4.3 Anàlisi bioquímic

Les concentracions sèriques de la glucosa, el colesterol, els triglicèrids i de l'alanina aminotransferasa es van determinar mitjançant proves estàndard en l'analitzador Cobas Mira (Roche Diagnostics, Rotkreuz, Suïsa).

4.4 Anàlisis histològic i d'imatge

Les mostres de teixit hepàtic i adipós es van fixar en formol i van ser submergides en parafina per la seva posterior tinció amb hematoxilina i eosina. El grau de empitjorament hepàtic es va estimar mitjançant la puntuació de *NAFLD Activity Score*. Aquest sistema de puntuació es basa en les característiques histològiques classificades en tres categories: Grau d'esteatosi (de 0 a 3), grau d'inflamació lobular (de 0 a 2) i grau de ballooning hepatocel·lular (de 0 a 2). Es va considerar que les mostres histològiques presentaven NASH quan la puntuació NAS era ≥ 5 .

La mida mitjana dels adipòcits del teixit adipós visceral i subcutani es va mesurar mitjançant el programa informàtic ImageJ 1.51 (National Institutes of Health, Bethesda, MD, EE.UU.) amb l'eina d'adipòcits de la macro *MRI's adipocyte tool*.

Les seccions es van observar mitjançant microscopía òptica (Eclipse E600, Nikon) i les imatges van ser realitzades amb el software NIS-Elements F 4.00.00.

4.5 Anàlisis Western Blot

La solució de lisis utilitzada per l'obtenció de l'homogenat de mostres hepàtiques contenien un còctel d'inhibidors de proteases i fosfatases. La concentració proteica dels homogenats es van analitzar mitjançant el kit d'assaig de proteïnes BCA (Sigma). Es van carregar 50 µg de proteïna total per igual i posteriorment es van separar mitjançant electroforesis en el gel de SDS-poliacrilamida i es van transferir a membranes de nitrocel·lulosa utilitzant el sistema Trans-Blot Turbo Transfer (Bio-Rad). Posteriorment les membranes es van bloquejar durant 30 minuts en llet desgreixada al 5% en una solució salina tamponada amb Tris suplementada amb Tween 20 (TBS-T) al 0.1% a temperatura ambient i es va incubar durant tota la nit a 4°C agitant-se suaument amb l'anticòs primari (Annex I). L'anticòs primari es va detectar utilitzant un anticòs secundari associat a l'enzim horseradish peroxidase (HRP). Finalment es va utilitzar el substrat quimioluminescent SuperSignal West Femto (ThermoFisher) per a la seva detecció. Les imatges es van capturar digitalment utilitzant el sistema ChemiDoc MP (Bio-Rad) i les bandes es van quantificar utilitzant el software Image Lab (Bio-Rad).

L'expressió de la proteïna es va normalitzar respecte una proteïna control (FAH). Les membranes utilitzades per a cada proteïna poden ser observades al Annex II

4.6 Anàlisi estadístic

Els resultats i els gràfics obtinguts dels grups es van analitzar i comparar estadísticament amb el test estadístic U de Mann Whitney (test no paramètric) fent servir els programes informàtics RStudio, SPSS 25 i Graphpad prism 9.0.1.

Els valors de $p < 0.05$ es van considerar estadísticament significatius.

5. Resultats

5.1 La metformina no millora els efectes causats per una dieta HF-HSD.

Durant les primeres setmanes de l'estudi vam observar que l'administració de la metformina davant una dieta alta en greixos i sacarosa (HF-HSD) era capaç de moderar l'increment de pes dels ratolins. No obstant això, un cop finalitzat les 20 setmanes de tractament els grups alimentats amb una dieta HF-HSD presentaven un pes similar, suggerint una pobre eficàcia de l'administració de la metformina a llarg termini (*Figura 1A*). Per altra banda, vam observar que l'administració d'una dieta HF-HSD promovia un estat obesogènic en comparació a una dieta control. Aquest increment en el pes corporal davant una dieta HF-HSD va ser acompanyat per un augment de la ingesta calòrica, independentment de l'administració de metformina (*Figura 1B*). Malgrat això, quan la metformina va ser administrada en una dieta control es va observar una disminució en la ingesta calòrica.

Els efectes de la dieta es van observar en el pes dels diferents òrgans metabòlics extrets (*Figura 1C*). Concretament, aquells grups alimentats amb una HF-HSD van mostrar un major pes del fetge i dels teixits adiposos marró, visceral i subcutani, però l'administració del fàrmac metformina en una dieta HF-HSD va augmentar el pes del teixit visceral perigonadal i va reduir el pes del teixit adipós marró. Per a valorar el metabolisme de la glucosa dels ratolins vam realitzar el test de tolerància a la glucosa dos setmanes prèvies al sacrifici. Els grups alimentats amb una dieta HF-HSD van presentar una àrea sota la corba (AUC) major i per tant presentaven una pitjor tolerància a la glucosa en comparació als grups control. Per altra banda, vam observar una millora significativa de la tolerància a la glucosa quan els ratolins alimentats amb una dieta HF-HSD se'ls hi administrava la metformina (*Figura 1D, Figura 1E*). Després de l'anàlisi bioquímica vam observar com una dieta HF-HSD incrementava les concentracions sèriques de la glucosa, el colesterol total i de la ALT, independentment de l'administració de la metformina. En canvi, els valors de triglicèrids dels grups alimentats amb una HF-HSD van mostrar uns nivells inferiors respecte als grups control, tot i que tots els grups dels ratolins presentaven uns valors dintre del rang de normalitat.

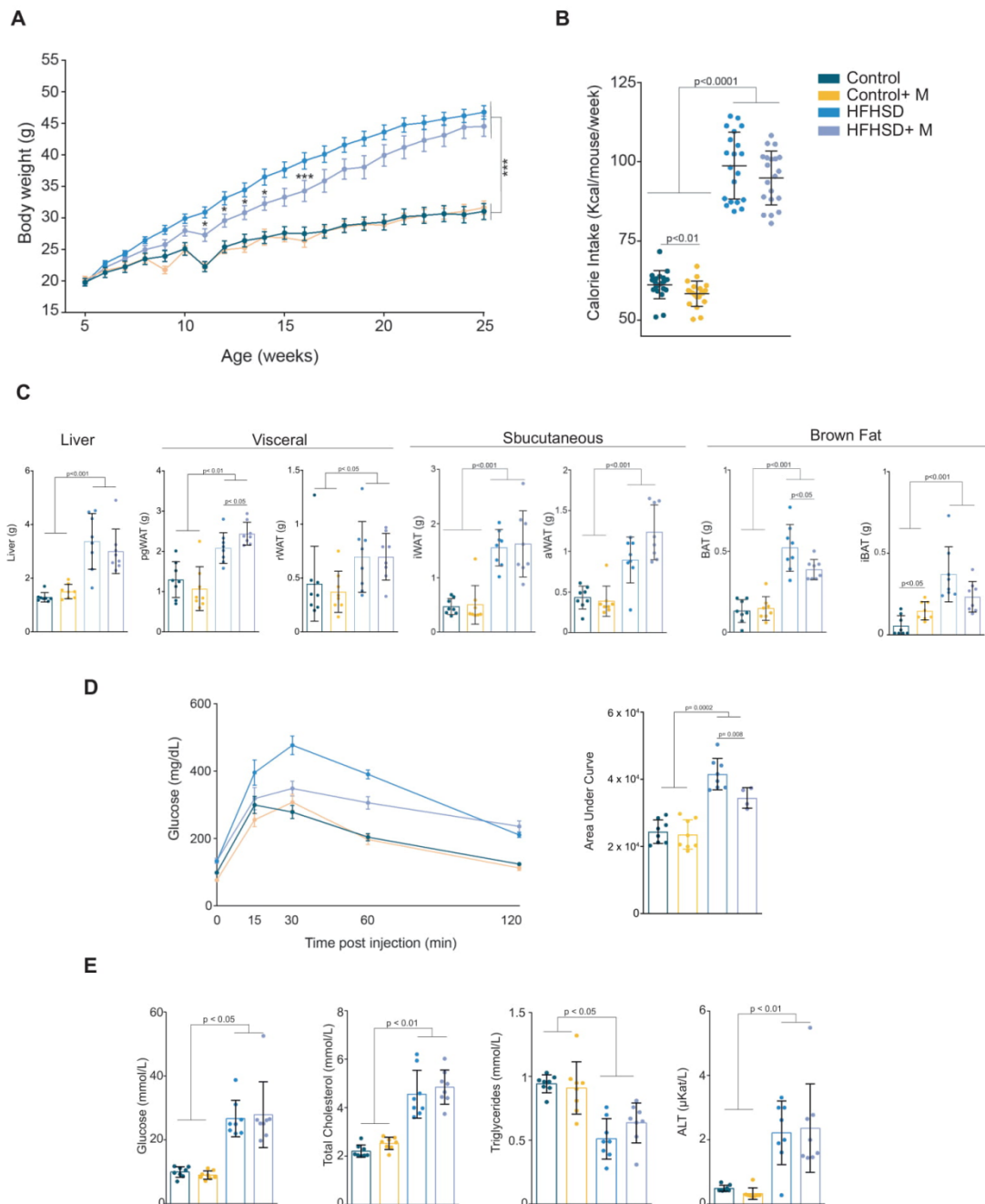


Figura 1. L'administració de la metformina no afecta al pes corporal ni als paràmetres bioquímics però sí al **metabolisme de la glucosa**. (A) Corba de pes dels ratolins al llarg de l'estudi (B) Ingesta calòrica total dels ratolins. (C) Pes dels teixits adiposos: Visceral, subcutani i marró (D) Test de tolerància a la glucosa (E) Paràmetres bioquímics: Glucosa, colesterol total, triglicèrids i alanina aminotransferasa (ALT).

5.2 La metformina indueix la disminució dels adipòcits del teixit adipós subcutani però únicament davant una dieta estàndard.

El fetge és un òrgan que està organitzat per diferents unitats funcionals hexagonals. Cada hexàgon pot ser dividit en tres zones diferents: periportal (Zona 1), intermitja (Zona 2) i perivenosa (Zona 3). Cal destacar que la sang oxigenada passa primer per la Zona 1 fins arribar a la Zona 3, on la sang està menys oxigenada. Per a determinar la gravetat de les diferents micrografies hepàtiques vam utilitzar el NAFLD Activity Score (*Figura 2A*). En primer lloc, vam observar que aquells grups que es van alimentar amb una HF-HSD presentaven un grau d'esteatosi similar. Concretament, la distribució i el tipus d'esteatosi diferia en funció la zona. La distribució de la esteatosi macrovesicular es localitzava principalment en la Zona 1, en canvi, la localització de la esteatosi microvesicular era homogènia entre la Zona 1 i Zona 2. Per altra banda, els grups alimentats amb una dieta estàndard no presentaven esteatosi, no obstant, en els hepatòcits es podia observar petites vacuoles de greix condició que es dona en situacions normals. A més, també vam determinar el grau de *ballooning* (deformació del hepatòcit) i vam observar que els grups alimentats amb una dieta obesogènica presentaven una major grau que els grups alimentats amb una dieta estàndard, independentment de l'administració de la metformina. Per tal d'observar la relació entre òrgans (fetge-teixit adipós) vam mesurar l'àrea dels adipòcits de quatre teixits adiposos de zones anatòmiques diferents (*Figura 2B*).

Generalment, vam observar que els grups alimentats amb una HF-HSD mostraven una major mida dels adipòcits (hipertròfia) a més d'una major presència d'estructures formades per macròfags en forma de corona (CLS, Crown like structures), suggerint una major mort cel·lular. Per una banda, en el teixit adipós visceral (perigonadal i retroperineal) vam observar com el teixit perigonadal presentava una major hipertròfia quan s'administrava la metformina en una dieta HF-HSD. En el cas del teixit retroperitoneal, no vam observar canvis entre els diferents grups, suggerint que és un teixit poc influenciable a la dieta. Per altra banda, en el teixit adipós subcutani (inguinal, anterior) vam observar que l'administració de la metformina promovia efectes diferents en funció de la dieta administrada. Concretament, en el teixit inguinal es produïa una reducció de la mida dels adipòcits en els models control, en canvi, la mida dels adipòcits va augmentar en els grups alimentats amb una HF-HSD. A més, vam observar que l'administració de metformina en una dieta estàndard promovia la disminució de l'àrea dels adipòcits. Aquests resultats estaven en línia amb l'augment de la freqüència de la població *beige*. En canvi, els efectes observats per la metformina van desaparèixer quan era administrada conjuntament amb una dieta HF-HSD.

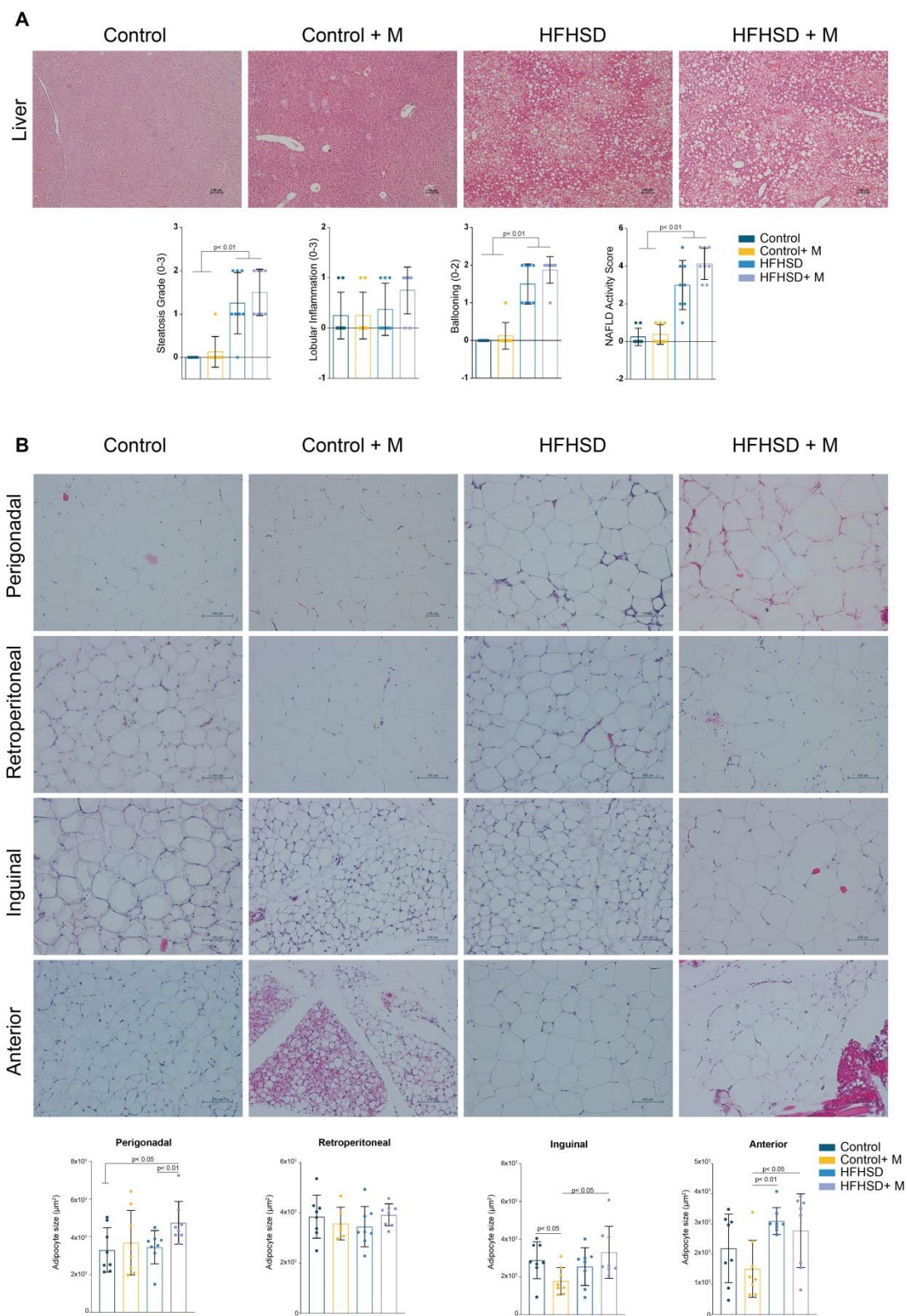


Figura 2. La metformina no afecta a nivell hepàtic, però sí en el teixit adipós. (A) NAFLD Activity Score: Grau d'esteatosi, Inflamació lobular i Ballooning. (B) Mida dels adipòcits del teixit adipós Visceral (Retroperitoneal, Perigonadal) i Subcutani(Anterior, Inguinal) .

5.3 La metformina no és capaç d'activar l'autofàgia en un model obesogenic amb esteatohepatitis

L'autofàgia és un procés destinat a reciclar tot el material (proteïnes, orgànuls) biològic afectat per tal d'evitar la pèrdua de la homeòstasis intracel·lular. Una pèrdua de la funció de l'autofàgia està relacionada amb nombroses complicacions metabòliques, no obstant, l'ús de la metformina en diferents models in-vitro i in-vivo indica que podria ser útil per mantenir-la activa. Els nostres resultats, demostren que una dieta obesogènica alta en greixos i sacarosa inhibeix l'activitat de la proteïna AMPK encarregada d'activar el procés de l'autofàgia (Figura 3B i 3C). A més, aquesta inhibició de la AMPK va estar associada amb l'augment de la fosforilació de la proteïna S6K, suggerint l'activació de la proteïna mTORC1 que actua com a principal factor d'inhibició de l'autofàgia. Després d'observar quina implicació tenia la dieta en els principals factors d'activació/inhibició de l'autofàgia vam observar com afectava en les principals proteïnes involucrada en el procés de vesiculació de l'autofagosoma i la fusió en el lisosoma. (Figura 3A) Vam observar que la proteïna LC3-II involucrada en el procés de vesiculació del fagosoma estava incrementat en els grups alimentats amb una dieta obesogènica. Aquest increment suggereix un augment en el nombre d'autofagosomes pendents a ser fusionats amb el lisosoma per a la seva posterior degradació. Per a observar si aquests autofagosomes es fusionaven amb els lisosomes vam determinar els nivells de la proteïna P62. Aquesta proteïna està involucrada en la captació de material afectat i no funcional per a la seva posterior incorporació en l'autofagosoma i eliminació en el lisosoma. Els nostres resultats, van demostrar que els nivells de la proteïna P62 estava incrementada en els grups alimentats amb una dieta obesogènica, indicant que els autofagosomes no es fusionaven en el lisosoma o bé que la degradació en el lisosoma no era efectiva. Finalment, vam determinar si la metformina era capaç de mantenir activada l'autofàgia en un model amb obesitat. Els nostres resultats van observar que l'activitat de l'AMPK estava inhibida i activada la mTORC1. A més, les proteïnes involucrades en l'autofàgia presentaven les mateixes alteracions que el grup únicament alimentat amb una HF-HSD. Aquests resultats, demostren que la metformina no era un tractament efectiu per mantenir l'autofàgia activada en un estudi de 20 setmanes.

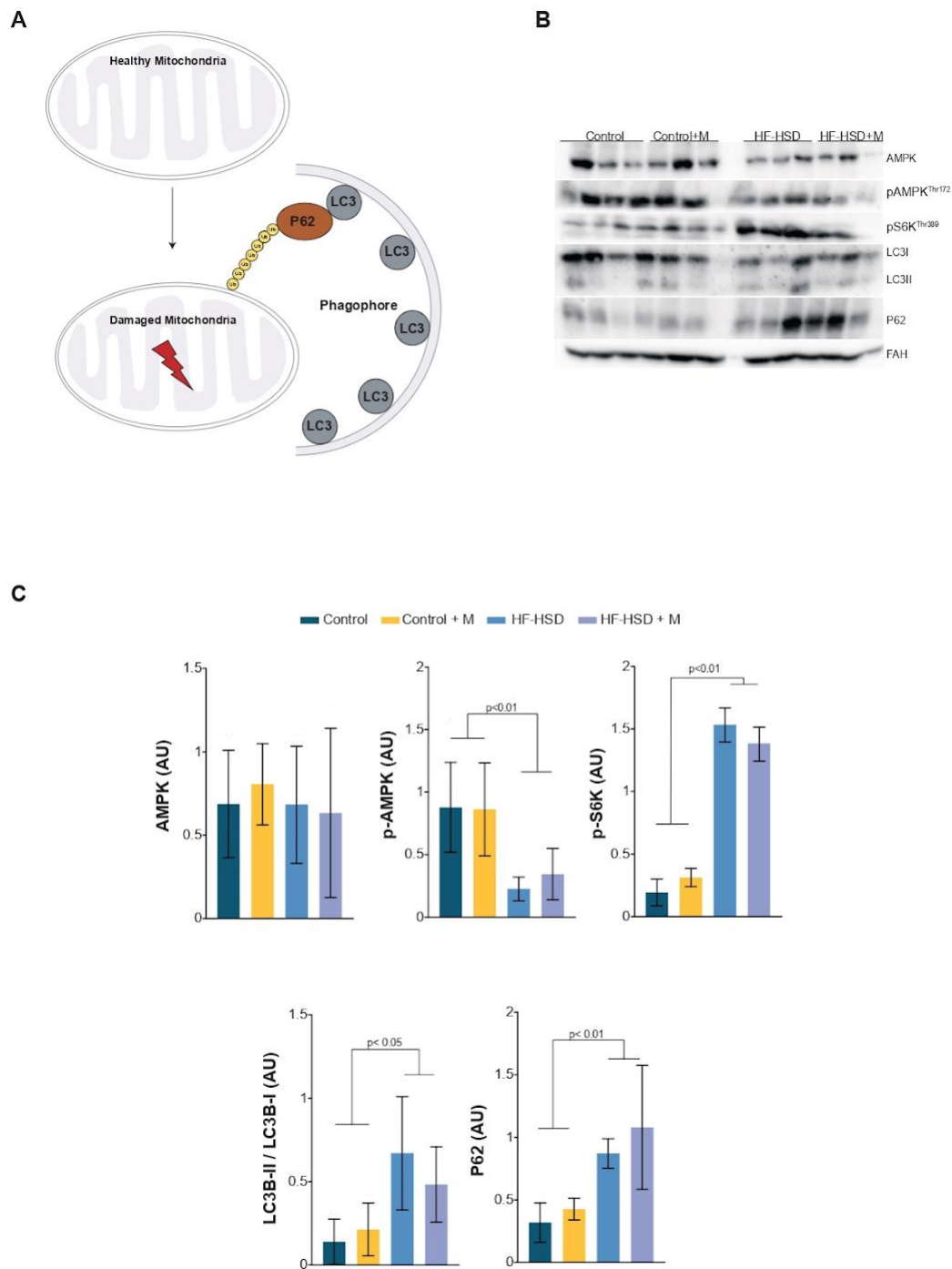


Figura 3: La metformina no és un tractament efectiu per a l'activació de l'autofàgia. (A) *Procés de vesiculació del fagosoma* (B) *Panell de les proteïnes del Western Blot* (C) *Representació gràfica dels resultats de Western Blot de les comparatives entre els grups.*

6. Discussió

L'obesitat ha anat augmentant al llarg dels anys en tot el món, principalment a causa d'un estil de vida sedentari i d'un excessiu consum d'aliments d'elevat contingut calòric. Aquest desequilibri nutricional afavoreix el creixement hipertròfic del teixit adipós. Si la situació es manté crònicament començaran a aparèixer complicacions metabòliques com la DMT2, la hipertensió, la dislipèmia i acabant amb el fetge gras. Actualment, en experimentació animal existeixen una ampla gamma de dietes obesogèniques (ex: alta en greixos, alta en greixos i colesterol ,etc.) disponibles. No obstant això, la majoria d'elles no mimetitzen la dieta d'un humà (per contenir un alt % de greix o de colesterol) el que dificulta l'estudi de certes malalties dins d'un context amb obesitat [29]. La dieta utilitzada en aquest estudi presenta un alt contingut en greixos i sacarosa per tal de reproduir d'una forma més fidel el patró dietètic estàndard de la societat més occidental. Concretament, en un estudi publicat recentment en la nostra unitat va demostrar que una dieta alta en greixos i sacarosa durant 20 setmanes era suficient com per induir un model obesogènic amb esteatohepatitis [30]. Els resultats presentats aquí mostren que els efectes de la metformina desapareixen quan es administra conjuntament amb una dieta alta en greixos i sacarosa. Per una banda, els nostres resultats van mostrar que una dieta obesogènica incrementava el pes dels ratolins al llarg de les setmanes d'estudi en comparació amb els grups control i que l'administració de la metformina únicament moderava el increment de pes en les primeres setmanes. No obstant, nombrosos estudis realitzats en ratolins han mostrat que quan s'administra metformina és modera l'increment de pes almenys durant 12 setmanes. Aquestes diferències observades poden ser degut a la dosi administrada ja que mentre en un estudi va administrar 1000mg/kg/dia [31] nosaltres en vam administrar 300mg/kg/dia. Un altre estudi mostra com ratolins ob/ob alimentats amb una dieta estàndard conjuntament amb l'administració de metformina redueixen el pes de forma considerable. Aquestes diferències observades respecte al nostre estudi poden ser degudes tan al *background* genètic ja que són ratolins modificats genèticament com per la forma d'administració de la metformina. Concretament, en el nostre estudi la dosi administrada es va afegir conjuntament amb el biberó d'aigua, en canvi, en aquest estudi l'administració va ser a través d'una cànula a una concentració de 75mg/kg/dia [32]. D'acord als nostres resultats, la dieta obesogènica HF-HSD induïa un empitjorament del metabolisme de la glucosa , així com també, dels paràmetres bioquímics com ara la glucosa, el colesterol total i la ALT. Certament, quan es va administrar la metformina únicament es va observar una millora en el test de tolerància de la glucosa. Aquesta observació podria ser explicada per la capacitat que té d'induir la translocació del transportador de glucosa 4 (GLUT 4) i com a resultat millorar la tolerància a grans carregues de glucosa [33]. Com prèviament

vam descriure l'administració d'una dieta HF-HSD [34] incrementa el grau d'esteatosi, *ballooning* i d'inflamació lobular. Amb el present estudi, hem corroborat que aquesta observació es manté intacta encara que s'administri la metformina, mostrant que un tractament farmacològic per si sol difícilment pot ser eficaç a llarg termini i en una malaltia tant complexa com la MAFLD. Sorprenentment, tot i que no s'observa efectes significatius a nivell d'histologia del fetge vam observar que la metformina promou efectes significatius a nivell del teixit adipós subcutani. Considerant aquesta observació, és important destacar que la metformina està implicada en l'activació de la AMPK i per tant en afavorir la inhibició de la mTORC1. A nivell de teixit adipós pot ser contraproduent mantenir activada la AMPK ja que afavoreix a l'activació de la mitofàgia. Aquest fet, pot acompanyar-se amb la disminució de la població beige i que en condicions amb obesitat pot representar un problema greu degut a una menor capacitat oxidativa per part del teixit adipós, contribuint a la resistència a la insulina i a la acumulació de greix en el fetge [35,36]. Un cop observat els efectes de la dieta i de la metformina a nivell hepàtic i del teixit adipós vam voler observar si la metformina era capaç d'alterar a nivell mecanístic l'activació de l'autofàgia. Vam observar que cap dels marcadors involucrats amb l'autofàgia LC3 i P62 es va veure afectat per l'administració de la metformina. A més tampoc vam observar cap diferència a nivell d'activació de AMPK/mTORC1. En canvi, nombrosos estudis suggereixen que la metformina és capaç d'activar la AMPK a través d'inhibir el complex I mitocondrial i com a conseqüència incrementar el rati AMP/ATP i activar AMPK [37,38]. Com a resultats de l'administració de la dieta vam observar una activació de mTORC1 que va inhibir l'autofàgia. D'acord amb els nostres resultats, la proteïna LC3-II com la P62 van incrementar respecte els grups alimentats amb una dieta estàndard. Certament, aquest efecte pot ser explicat, almenys en part, per la incapacitat de l'autofagosoma de fusionar-se amb el lisosoma i ser degradat. Nombrosos estudis demostren que l'acumulació de l'autofagosoma pot ser com a resultats d'una inhibició en la fusió entre el autofagosoma i el lisosoma [39]. Una altra explicació podria ser a causa de la disminució de l'activitat proteolítica de les hidrolases lisosomals [40].

7. LIMITACIONS

Respecte les limitacions observades cal destacar que els animals seleccionats només eren macles i caldria realitzar el mateix experiment en ambdós sexes. També vam administrar la metformina oralment i la dosi podria variar segons el ratolí, per això s'hauria de contemplar la possibilitat d'administrar el fàrmac via intragastrica per minimitzar la diferència. A més, seria interessant observar els efectes de la metformina a diferents dosis. D'altra banda, per a confirmar els resultats

obtinguts s'hauria de realitzar el mateix experiment almenys 3 cops en intervals de temps diferents per a disminuir l'atzar. A més a més, també s'hauria de plantejar en aplicar aquest estudi amb humans, per evitar la possible variació dels efectes de la metformina en models animals.

8. Conclusió

La metformina per si sola no contribueix a la millora de la MAFLD a llarg termini. Un tractament dietètic és la millor estratègia per actuar preventivament en la malaltia.

9. BIBLIOGRAFÍA

- [1] NCD Risk Factor Collaboration. Trends in adult body-mass index in 200 countries from 1975 to 2014: a pooled analysis of 1698 population-based measurement studies with 19.2 million participants. *NCD-RisC*; 2016 ; *Lancet* 387, (1377–1396).
- [2] World health Organization (WHO).[Internet] Obesity and overweight;Facts about overweight and obesity;2021.
- [3] Lee, M. J., Wu, Y., & Fried, S. K. Adipose tissue heterogeneity: Implication of depot differences in adipose tissue for obesity complications. In *Molecular Aspects of Medicine*; Elsevier; 2012; Vol. 34, Issue 1, (1–11).
- [4] Bredella MA. Sex Differences in Body Composition. *Adv Exp Med Biol.* 2017;1043: (9-2)..
- [5] Mi-Jeong Lee, Yuanyuan Wu, Susan K. Fried;Adipose tissue heterogeneity: Implication of depot differences in adipose tissue for obesity complications; *Molecular Aspects of Medicine*; Volume 34, Issue 1; 2013, (1-11).
- [6] Ibrahim, M. M.Subcutaneous and visceral adipose tissue: Structural and functional differences. *Obesity Reviews*; 2010; 11(1), (11–18).
- [7] Longo, M., Zatterale, F., Naderi, J., Parrillo, L., Formisano, P., Raciti, G. A.,et al. Adipose tissue dysfunction as determinant of obesity-associated metabolic complications. *International Journal of Molecular Sciences*,2019, 20(9).
- [8] Song T, Kuang S. Adipocyte dedifferentiation in health and diseases. *Clin Sci (Lond).* 2019 Oct 30;133(20):(2107-2119).
- [9] Andolfi C, Fisichella PM. Epidemiology of Obesity and Associated Comorbidities. *J Laparoendosc Adv Surg Tech*, 2018; 28(8):(919–24).
- [10] Eslam M, Sanyal AJ, George J, International Consensus Panel. MAFLD: A Consensus-Driven Proposed Nomenclature for Metabolic Associated Fatty Liver Disease. *Gastroenterology*. 2020 May;158(7):(1999-2014).
- [11] Antunes C, Azadfar M, Hoilat GJ, Gupta M. Fatty Liver. *StatPearls. Treasure Island (FL)*: 2021 Jan.
- [12] Piazzolla VA, Mangia A. Noninvasive Diagnosis of NAFLD and NASH. *Cells*. 2020 Apr 17;9(4):1005
- [13] Younossi Z, Anstee QM, Marietti M, Hardy T, Henry L, Eslam M, et al. Global burden of NAFLD and NASH: Trends, predictions, risk factors and prevention. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* [Internet]. 2018;15(1):(11–20.2017.109).
- [14] Khan RS, Newsome PN. NAFLD in 2017: Novel insights into mechanisms of disease progression. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2018 Feb;15(2):(71-72).

- [15] Galluzzi L, Baehrecke EH, Ballabio A, Boya P, Bravo-San Pedro JM, Cecconi F, et al. Molecular definitions of autophagy and related processes. *EMBO J.* 2017 Jul 3;36(13):1811-1836.
- [16] Tomaipitina, L.; Mandatori, S.; Mancinelli, R.; Giulitti, F.; Petrunaro, S.; Moresi, V; et al The Role of Autophagy in Liver Epithelial Cells and Its Impact on Systemic Homeostasis. *Nutrients*; 2019, 11, 827.
- [17] Dikic I, Elazar Z. Mechanism and medical implications of mammalian autophagy. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2018 Jun;19(6):(349-364).
- [18] Li Y, Chen Y. AMPK and Autophagy. *Adv Exp Med Biol.* 2019;1206:85-108.
- [19] Kim J, Kundu M, Viollet B, Guan KL. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat Cell Biol.* 2011 Feb;13(2):(132-41).
- [20] Wang H, Liu Y, Wang D, Xu Y, Dong R, Yang Y: et al. The Upstream Pathway of mTOR-Mediated Autophagy in Liver Diseases. *Cells.* 2019 Dec 9;8(12):1597.
- [21] Wang Y, Zhang H. Regulation of Autophagy by mTOR Signaling Pathway. *Adv Exp Med Biol.* 2019;1206:(67-83).
- [22] Ueno, T., & Komatsu, M. (2017). Autophagy in the liver: functions in health and disease. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 14(3), (170–184).
- [23] Romero-Gómez M, Zelber-Sagi S, Trenell M. Treatment of NAFLD with diet, physical activity and exercise. *J Hepatol.* 2017 Oct;67(4):(829-846).
- [24] Lassailly G, Caiazzo R, Ntandja-Wandji LC, Gnemmi V, Baud G, Verkindt H, et al. Bariatric Surgery Provides Long-term Resolution of Nonalcoholic Steatohepatitis and Regression of Fibrosis. *Gastroenterology.* 2020 Oct;159(4):1290-1301.e5.
- [25] Sjöström L, Lindroos AK, Peltonen M, Torgerson J, Bouchard C, Carlsson B, et al. Lifestyle, diabetes, and cardiovascular risk factors 10 years after bariatric surgery. *N Engl J Med.* 2004 Dec 23;351(26):(2683-93)
- [26] Mingrone G, Panunzi S, De Gaetano A, Guidone C, Iaiconelli A, Nanni G, et al. Bariatric-metabolic surgery versus conventional medical treatment in obese patients with type 2 diabetes: 5 year follow-up of an open-label, single-centre, randomised controlled trial. *Lancet.* 2015 Sep 5;386(9997):(964-73)
- [27] Oliveira S, Houseright RA, Graves AL, Golenberg N, Korte BG, Miskolci V, et al. Metformin modulates innate immune-mediated inflammation and early progression of NAFLD-associated hepatocellular carcinoma in zebrafish. *J Hepatol.* 2019 Apr;70(4):(710-721).
- [28] Zhou J, Massey S, Story D, Li L. Metformin: An Old Drug with New Applications. *Int J Mol Sci.* 2018 Sep 21;19(10):2863.

- [29] Speakman JR. Use of high-fat diets to study rodent obesity as a model of human obesity. *Int J Obes (Lond)*. 2019 Aug;43(8):(1491-1492)
- [30] Baiges-Gaya G, Fernández-Arroyo S, Luciano-Mateo F, Cabré N, Rodríguez-Tomás E, Hernández-Aguilera A, et al. Hepatic metabolic adaptation and adipose tissue expansion are altered in mice with steatohepatitis induced by high-fat high sucrose diet. *J Nutr Biochem*. 2021.
- [31] Okishio S, Yamaguchi K, Ishiba H, Tochiki N, Yano K, Takahashi A, et al. PPAR α agonist and metformin co-treatment ameliorates NASH in mice induced by a choline-deficient, amino acid-defined diet with 45% fat. *Sci Rep*. 2020 Nov 11;10(1):19578.
- [32] Liu F, Wang C, Zhang L, Xu Y, Jang L, Gu Y, et al. Metformin prevents hepatic steatosis by regulating the expression of adipose differentiation-related protein. *Int J Mol Med*. 2014 Jan;33(1):51-8.
- [33] Lee JO, Lee SK, Kim JH, Kim N, You GY, Moon JW, et al. Metformin regulates glucose transporter 4 (GLUT4) translocation through AMP-activated protein kinase (AMPK)-mediated Cbl/CAP signaling in 3T3-L1 preadipocyte cells. *J Biol Chem*. 2012 Dec 28;287(53):(44121-9).
- [34] Baiges-Gaya G, Fernández-Arroyo S, Luciano-Mateo F, Cabré N, Rodríguez-Tomás E, Hernández-Aguilera A, et al. Hepatic metabolic adaptation and adipose tissue expansion are altered in mice with steatohepatitis induced by high-fat high sucrose diet. *J Nutr Biochem*. 2021 Mar;89:108559.
- [35] Mottillo EP, Desjardins EM, Crane JD, Smith BK, Green AE, Ducommun S, et al. Lack of Adipocyte AMPK Exacerbates Insulin Resistance and Hepatic Steatosis through Brown and Beige Adipose Tissue Function. *Cell Metab*. 2016 Jul 12;24(1):(118-29).
- [36] Auger C, Knuth CM, Abdullahi A, Samadi O, Parousis A, Jeschke MG. Metformin prevents the pathological browning of subcutaneous white adipose tissue. *Mol Metab*. 2019 Nov;29:(12-23).
- [37] Stein BD, Calzolari D, Hellberg K, Hu YS, He L, Hung CM, et al. Quantitative In Vivo Proteomics of Metformin Response in Liver Reveals AMPK-Dependent and -Independent Signaling Networks. *Cell Rep*. 2019 Dec 3;29(10):(3331-3348.e7).
- [38] Kola B, Boscaro M, Rutter GA, Grossman AB, Korbonits M. Expanding role of AMPK in endocrinology. *Trends Endocrinol Metab*. 2006 Jul;17(5):(205-15).
- [39] Masuda S, Mizukami S, Eguchi A, Ichikawa R, Nakamura M, Nakamura K, et al. Immunohistochemical expression of autophagosome markers LC3 and p62 in preneoplastic liver foci in high fat diet-fed rats. *J Toxicol Sci*. 2019;44(8):(565-574).
- [40] Liu WJ, Ye L, Huang WF, Guo LJ, Xu ZG, Wu HL, et al. p62 links the autophagy pathway and the ubiquitin-proteasome system upon ubiquitinated protein degradation. *Cell Mol Biol Lett*. 2016 Dec 13;21:29.

ANNEXOS

ANNEX I

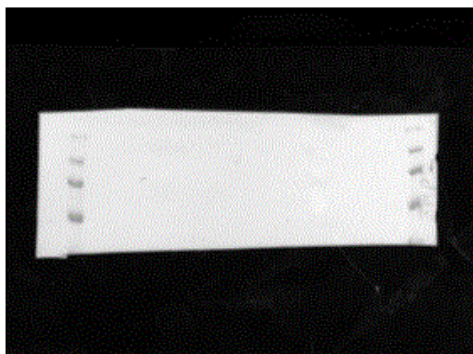
Proteïnes implicades en l'autofàgia seleccionades per l'estudi

Protein	Protein name	Primary antibody	Primary antibody dilution	Secondary antibody dilution
Immunoblotting				
pAMPK	phospho AMP-activated Protein Kinase	Anti-phospho-AMPK α (Thr172) antibody (#2531A, Cell signaling)	1/1000	1/5000
AMPK	AMP-activated Protein Kinase	Anti-AMPK α antibody (#2532, Cell signaling)	1/1000	1/5000
FAH	Fumarylacetoacetate hydrolase	FAH Polyclonal Antibody (PA5-30027, Invitrogen)	1/1000	1/5000
LC3B	Microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3B	Anti-LC3B antibody (#2775, Cell signaling)	1/1000	1/5000
P62	Sequestosome-1	p62/ SQSTM1 antibody (#5114, Cell signaling)	1/1000	1/5000
pS6K	Phospho-p70 S6 Kinase	Phospho-p70 S6 Kinase (Thr389) Antibody (#9205, Cell signaling)	1/1000	1/1000

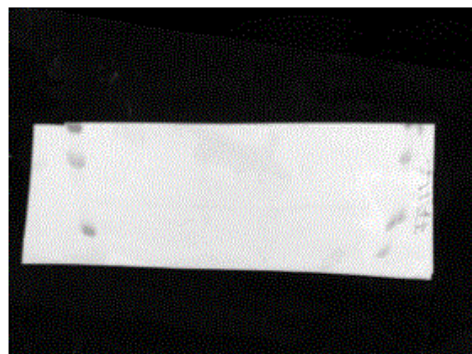
ANNEX II

Membranes senceres de la tècnica Imuno Blot

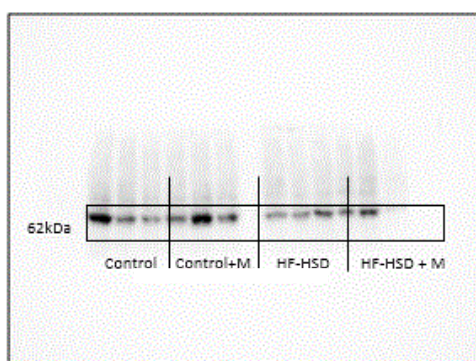
Colorimetric AMPK



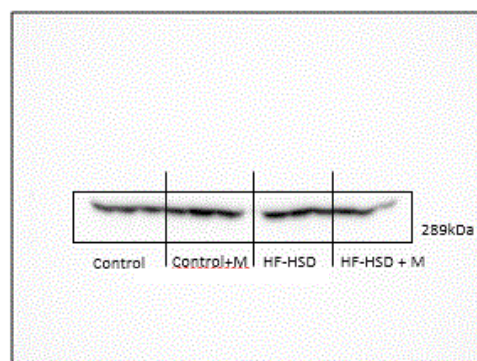
Colorimetric FAH



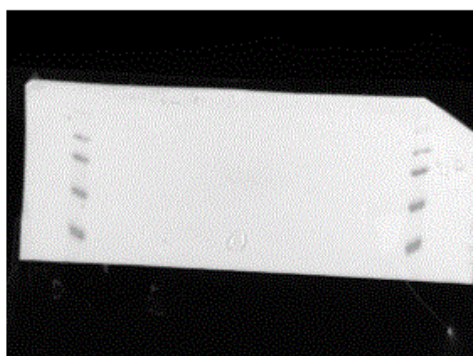
AMPK



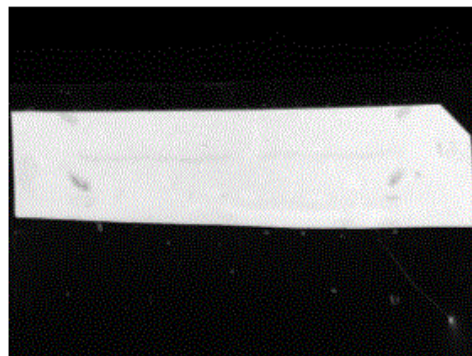
FAH



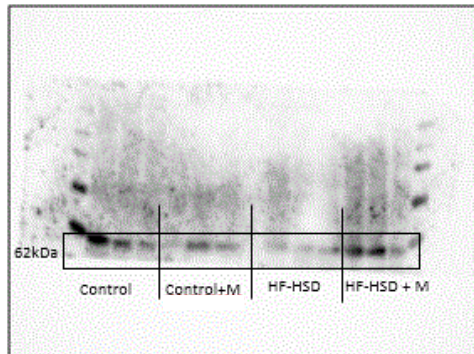
Colorimetric p-AMPK



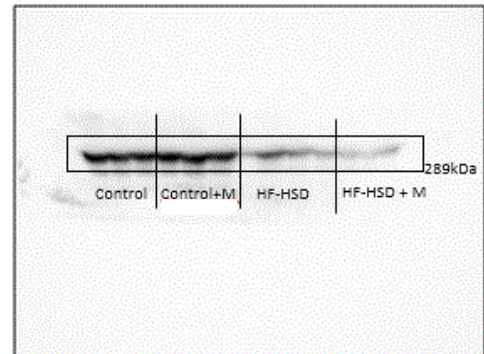
Colorimetric FAH



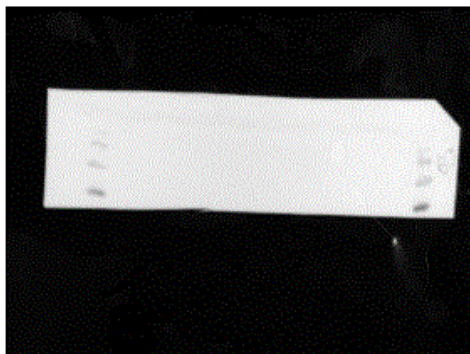
p-AMPK



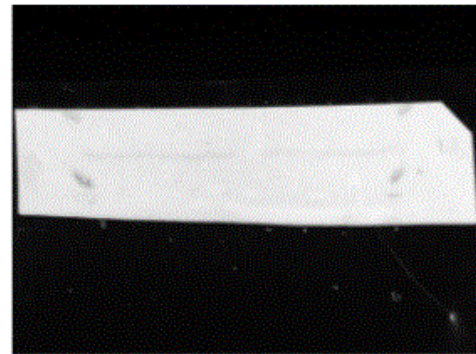
FAH



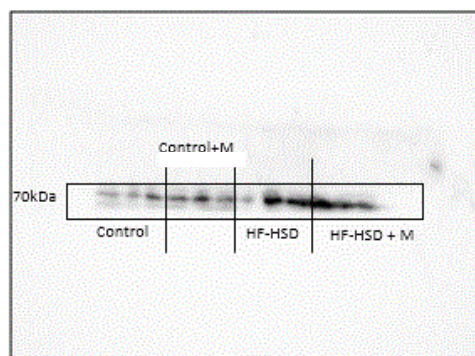
Colorimetric p-S6K



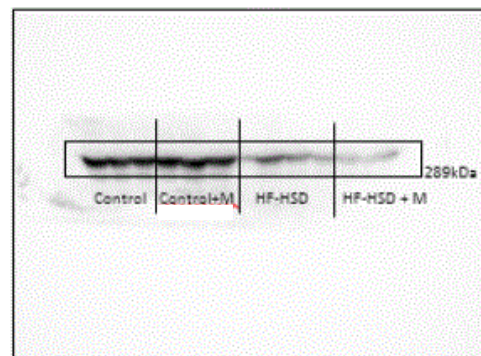
Colotimetric FAH



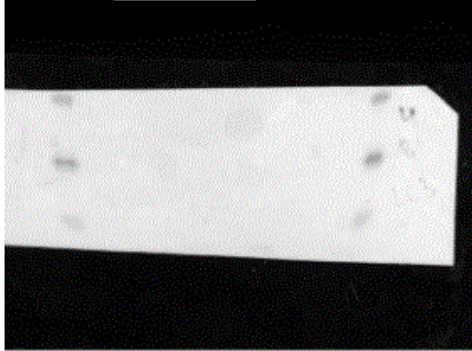
p-S6K



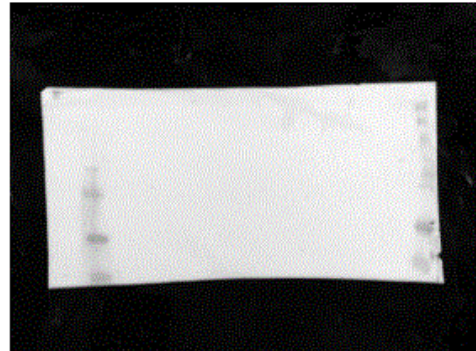
FAH



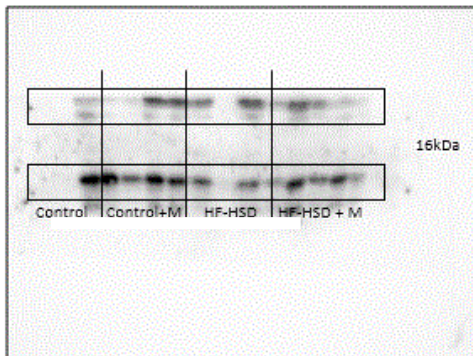
Colorimetric LC3 (I/II)



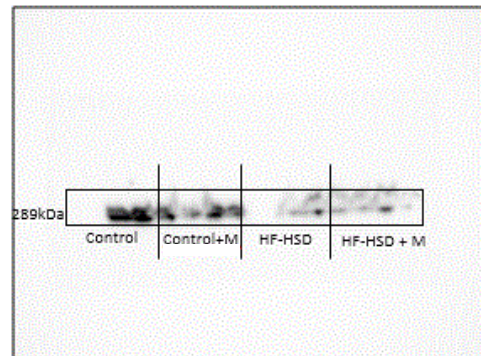
Colorimetric FAH



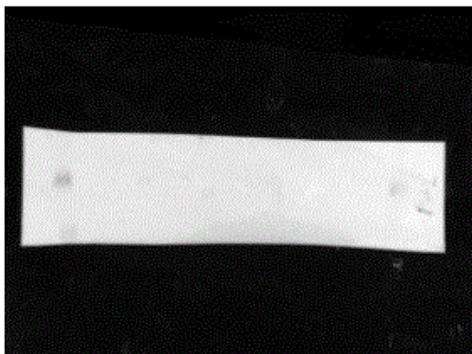
LC3 (I/II)



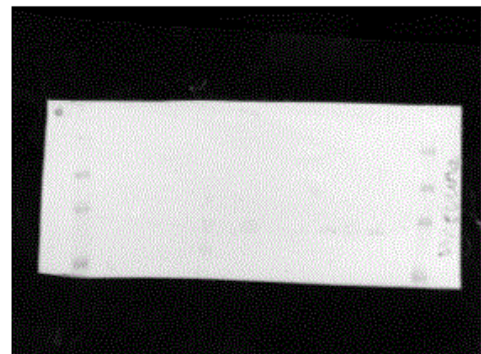
FAH



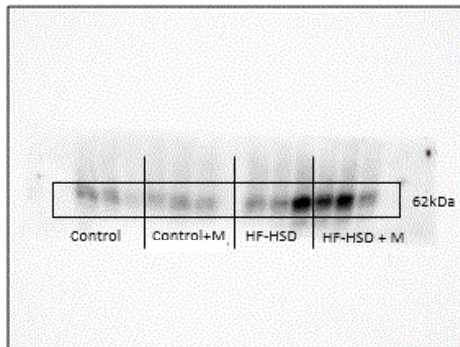
Colorimetric P62



Colorimetric Vinculina



P62



Vinculina

