Tesis de Maestría Ciencias Biológicas, Biología Celular y Molecular

Rol de la proteína DBC1 en la fisiopatología de la obesidad

Laboratorio de Patologías del Metabolismo y Envejecimiento Institut Pasteur Montevideo

Estudiante: María Natalia Bobba Alves

Orientador: Carlos Escande Co-Orientador: Victoria Prieto

> Universidad de la República - Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas Julio, 2017 - Montevideo, Uruguay

Índice

1. Resumen	
2. Introducción	4
2.1. La obesidad como patología	4
2.1.1. Breve reseña histórica	4
2.1.2. Definición y diagnóstico	5
2.1.2.1. Índice de Masa Corporal	6
2.1.2.2. Pliegues Cutáneos	9
2.1.2.3. Circunferencia abdominal	10
2.1.3. Prevalencia	10
2.1.3.1. Prevalencia en el mundo	10
2.1.3.2. Prevalencia en Uruguay	15
2.1.4. Etiología	17
2.1.5. Patogenia	20
2.1.5.1. Composición y organización estructural del tejido adiposo	20
2.1.5.2. Modificación del tejido adiposo durante la obesidad	23
2.1.5.2.1. Hipertrofia e hiperplasia de los adipocitos	23
2.1.5.2.2. Modificación de la vasculatura	25
2.1.5.2.3. Modificación de la matriz extracelular	25
2.1.5.2.4. Infiltración de células inmunes	26
2.1.5.3. Gluco-lipotoxicidad y el rol protector del tejido adiposo	27
2.2. La proteína <i>Deleted in Breast Cancer 1</i> (DBC1)	
2.2.1. Breve aclaración respecto a su nombre	28
2.2.2. Organización estructural	29
2.2.3. Actividad biológica	31
2.2.3.1. Interacción con factores de transcripción y co-reguladores	33
2.2.3.2. Interacción con modificadores post-traduccionales	33
2.2.3.3. Dominios involucrados en las interacciones	34
2.2.3.3. Participación en los diferentes procesos celulares	36
2.2.3.4. Participación en patologías metabólicas	37

3. Objetivos	42
3.1. Objetivo General	42
3.2. Objetivo Específico	42
4. Materiales y métodos	43
4.1. Experimentación con cultivos celulares	43
4.1.1. Crecimiento y mantenimiento de células	43
4.1.2. Tratamientos farmacológicos	45
4.1.3. Inducción de arresto celular	46
4.2. Experimentación con tejidos	47
4.2.1 Tejidos derivados de ratón	47
4.2.1.1. Tejido hepático	47
4.2.1.2. Tejido adiposo	48
4.2.2. Tejidos derivados de humano	49
4.3. Técnicas analíticas	49
4.3.1. Western blot	49
4.3.1.1. Procesamiento de muestras	49
4.3.1.2. Preparación de muestras	50
4.3.1.3. SDS-PAGE y Western blot	50
4.3.3. Parámetros metabólicos	52
4.3.3.1. Glicemia	52
4.3.3.2. Enzimas hepáticas	52
4.4. Análisis estadístico	52
5. Resultados y discusión	53
6. Conclusiones y perspectivas	73
7. Anexo	77
8. Referencias bibliográficas	79
9. Agradecimientos	01

1. Resumen

La obesidad es uno de los problemas sanitarios más relevantes de nuestra época, perjudicando gravemente la salud y calidad de vida de más de 600 millones de personas a nivel mundial. Siendo así, resulta de gran importancia comprender los mecanismos que subyacen su etiología y patogenia, para eventualmente contribuir al desarrollo de nuevas terapias tanto preventivas como paliativas. La proteína Deleted in Breast Cancer 1 (DBC1) interactúa con diversos factores de transcripción y modificadores post-traduccionales, regulando sus respectivas actividades. DBC1 participa en una vasta cantidad de procesos biológicos, dentro de los que se incluyen la homeostasis del tejido adiposo. La evidencia generada en los últimos años demuestra que DBC1 presenta un rol clave en el desarrollo de la obesidad y las patologías típicamente asociadas a esta. Aunque las bases que subyacen dicho fenómeno aún no han sido elucidadas, algunas de ellas podrían implicar un rol regulador sobre la vía clásica de NFkB, fundamental en el desarrollo del fenotipo proinflamatorio observado en la obesidad. Efectivamente, en este trabajo encontramos que la expresión de DBC1 regula positivamente los niveles de ARNm y proteína de la subunidad de NF κ B p65/RelA. A su vez, encontramos que el estado del ciclo celular regula la expresión de una isoforma de DBC1, carente de una porción del extremo N-terminal de la proteína. Específicamente, encontramos que mientras en estado proliferativo predomina la isoforma completa, en estado de arresto celular en G₀ predomina la isoforma de menor peso molecular, hecho que a su vez coincide con una disminución en la expresión de p65/ReIA. Lo anterior fue observado tanto en modelos celulares como en modelos in vivo, sugiriendo que este fenómeno presenta una fuerte relevancia fisiológica y que podría estar participando del control del ciclo celular mediado por la vía clásica de NFkB. En concordancia con lo anterior, encontramos que los ratones DBC1 KO presentan una menor expresión de p65/RelA y una alteración en la expresión de marcadores de ciclo celular que son regulados por dicho factor; lo cual parece traducirse en un enlentecimiento en la transición desde el estado de arresto celular en G_0 al estado proliferativo *in vivo*. Finalmente, encontramos que en tejido adiposo subcutáneo y visceral de pacientes obesos de dos cohortes diferentes predomina la isoforma de menor peso molecular y que se mantiene la correlación entre la expresión de la isoforma completa y p65/RelA. Lo anterior no solo refuerza la noción de que este fenómeno presenta una fuerte relevancia fisiológica, sino que además coloca a DBC1 como un potencial blanco terapéutico para la obesidad y las patologías típicamente asociadas a esta.

2. Introducción

2.1. La obesidad como patología

2.1.1. Breve reseña histórica

El concepto de *obesidad* como condición patológica data de los inicios de la práctica médica de culturas tan diversas como la egipcia, babilónica, china, india, meso-americana, y grecoromana (1). Ya establecida la práctica occidental como la conocemos hoy, surgen los primeros estudios descriptivos de individuos obesos. En el siglo XVII, a cargo de Bonnet (2); en el siglo XVIII, a cargo de Haller (3) y Morgagni (4); y en el siglo XIX, a cargo de Wadd (5). También en el siglo XIX, y en base a los avances en el campo de la histología, Hassal y Hoggan identificarían al adipocito como un tipo celular especifico de la grasa corporal, e incluso establecerían las primeras asociaciones de éste con la obesidad (6, 7).

A fines del siglo XIX e inicios del siglo XX, se imponía la noción de la obesidad como disparador de otras patologías y de muerte prematura. Esto representaba una preocupación para la comunidad biomédica y pronto se transformó en una preocupación para las agencias de seguros de vida. Fueron estas últimas que impulsaron los primeros estudios epidemiológicos de gran alcance, demostrando la noción recién mencionada, y pautando los primeros esbozos del diagnóstico de obesidad (1, 8). En siglo XX comenzaron a desarrollarse una amplia gama de técnicas para medir el contenido y distribución de la grasa corporal, así como estudios para determinar las causantes de la obesidad (1). La introducción de modelos animales de obesidad, sea a través de modificaciones a nivel genético (9–11) o de daños a nivel del Sistema Nervioso Central (12–14), proporcionó información muy valiosa sobre la regulación normal de la homeostasis energética y la etiología de ciertos tipos de obesidad. No obstante, dichos casos representaban la minoría de los documentados.

La causa preponderante de obesidad involucraba en ese entonces, así como hoy en día, a los hábitos de alimentación y de actividad física adoptados por los individuos. Esta premisa siempre fue tomada en cuenta (15–17), pero fue a partir de mediados del siglo XX que tomó especial relevancia en el mundo occidental. La industrialización de la mayor parte de los sectores laborales condujo a un aumento significativo en la cantidad de personas ocupando puestos de trabajo en los que la actividad física es mínima o nula, al tiempo que las

4

actividades recreativas también se volvieron de tipo sedentario (1). Sumado a lo anterior, la industria alimenticia comenzó a hacerse paso en el sector comercial, demandando una mayor optimización en los costos de producción. Se transformaron los modos de manufactura y venta, que resultaron en un cambio profundo en los hábitos alimenticios de la población. Ahora los productos se ofrecían listos para su consumo y a un menor costo, pero también con un mayor contenido calórico y en porciones de mayor tamaño, y no según la necesidad del individuo (18). No es sorprendente que la prevalencia en la obesidad comenzara a incrementarse de forma cada vez más acentuada y alcanzara las cifras actuales (1), que la colocan como una epidemia global según la Organización Mundial de la Salud (19). Thomas Short, quien publicaría el primer manuscrito sobre obesidad en 1727 (20), planteaba en el mismo: *"creo que ninguna época ha concedido la ocurrencia de tantos casos de obesidad como la nuestra"*. Desafortunadamente, dicha frase seguiría siendo válida con el paso los años, y lo es hoy más que nunca.

2.1.2. Definición y diagnóstico

El término *obesidad* hace referencia a aquella condición en la cual el contenido de grasa corporal es excesivo, al punto que supone un riesgo para la salud del individuo (21). En un *"individuo normal"* en términos de distribución Gaussiana, el contenido de grasa corporal corresponde a un 14% del peso corporal total en el hombre, y un 24% del peso corporal total en la mujer (22). Esto es, en un hombre de 70 kg de peso corporal y 1.70 m de estatura, se estima alrededor de 10 kg de grasa corporal; y en una mujer de 58 kg de peso corporal y 1.60 m de estatura, se estima alrededor de 14 kg de grasa corporal (22). El diagnóstico de obesidad se lleva a cabo comparando el contenido de grasa corporal del individuo con los valores recién mencionados.

El contenido de grasa corporal puede estimarse mediante diferentes métodos. Algunos de ellos son métodos cuya aplicación es más bien impráctica y costosa, y se restringen a contextos de investigación biomédica. Entre ellos se incluyen el Conteo de ⁴⁰K (23), Análisis por Activación Neutrónica (24, 25), Hidrometría (26, 27), Hidrodensitometría (28), Pletismografía por Desplazamiento de Aire (29, 30), Escaneo Biofotónico en 3D (31, 32), Absorciometría Dual de Rayos X (33, 34), Resonancia Magnética Cuantitativa (35–37), Tomografía Computarizada (38–40) y Resonancia Magnética (41–43). Por otro lado, existen otros métodos cuya aplicación es simple y de bajo o ningún costo, y son los utilizados a nivel clínico para el diagnóstico diario. Entre ellos se incluyen el Análisis de Bioimpedancia

Eléctrica (44) y los métodos basados en medidas antropométricas. Estos últimos miden parámetros corporales que se asocian con el contenido de grasa corporal, según lo establecido mediante métodos más precisos, principalmente Absorciometría Dual de Rayos X, Tomografía Computarizada y Resonancia Magnética. A pesar de que las medidas antropométricas no requieren equipos complejos, si requieren personal calificado para llevarse a cabo de forma metódica y bajo los estándares establecidos (45, 46), ya que en ellos se basan el diagnóstico diario y la mayoría de los estudios epidemiológicos (1). Entre este tipo de métodos se incluyen el Índice de Masa Corporal, la medida de pliegues cutáneos y la medida de circunferencias corporales. Dada su relevancia en el diagnóstico a nivel poblacional, se describen a continuación cada uno de ellos.

2.1.2.1. Índice de Masa Corporal

El Índice de Masa Corporal (IMC) es un parámetro que se determina a partir de la masa (peso corporal) y la estatura del individuo, según la fórmula *IMC = masa (Kg) / estatura² (m)*. A principios del siglo XIX, Adolphe Quetelet, quien fuera pionero en el análisis estadístico de medidas antropométricas, propone que el peso corporal y el cuadrado de la estatura de un individuo adulto, expresadas en kilogramos y metros respectivamente, presentan una relación proporcional entre sí (47). Ya hacia el siglo XX, la noción de que las personas obesas presentaban una mayor predisposición al desarrollo de otras patologías y muerte prematura se volvió un preocupación para la comunidad médica y para las agencias de seguros de vida. Ante esto surgió un gran interés en establecer medidas antropométricas, o índices derivados de estas, que facilitaran el diagnóstico de obesidad y sus riesgos asociados (8, 48, 49). La relación propuesta por Quetelet tomó entonces especial relevancia y fue validada en diversos estudios epidemiológicos (48, 49). Finalmente, fue definida como índice de Masa Corporal, una medida relativa de masa corporal, independiente de la estatura, y que presenta una fuerte correlación con el contenido de grasa corporal del individuo (49).

La correlación del IMC con el contenido de grasa corporal fue validada por diversos estudios hacia fines del siglo XX, cuando las técnicas disponibles permitían resultados más precisos. Dicha correlación mostró no ser lineal, sino con una tendencia curvilínea; pero aún así adecuada para el diagnóstico de obesidad y sus riesgos asociados (50–52). En la *Figura 2.1.* puede observarse cómo dicha correlación se mantiene tanto en mujeres como en hombres.



Figura 2.1. Correlación del contenido de grasa corporal con el IMC. Porcentaje de grasa corporal estimado mediante Absorciometría Dual de Rayos X (ADX) vs. IMC (Adaptado de 52, 53).

A partir de este tipo de correlaciones se establecerían rangos del IMC para categorizar a los individuos según su estado de peso corporal. A saber, valores de IMC menores a 18.5 kg/m² se consideran como *bajo peso*; entre 18.5 y 24.9 kg/m², como *normopeso*; entre 25 y 29.9 kg/m² como *sobrepeso*; y mayores a 30 kg/m² como *obesidad* (54–56). Muchas veces el estado de obesidad se subdivide para categorizar a los individuos según los riesgos asociados. Valores de IMC entre 30-34.9 se consideran como *obesidad clase I*; entre 35-39.9 como *obesidad clase II*; y mayores a 40 como *obesidad clase III*, siendo esta última la de mayor riesgo asociado (54). En la *Tabla 2.1*. se muestran los valores de IMC para diferentes pesos corporales y estaturas, en kilogramos y metros, respectivamente, y la categorización mencionada.

Cabe destacar que a pesar de tratarse de una herramienta de gran utilidad, el IMC también presenta sus limitaciones. En primera instancia, el IMC no hace distinción entre la masa corporal que se deriva de la grasa y la que no. Por tanto, puede sobreestimar el contenido de grasa corporal en individuos que presentan masa muscular aumentada –como aquellos dedicados ocupaciones que requieran cierto entrenamiento o al deporte profesional–, al tiempo que puede subestimar el contenido de grasa corporal en personas que presentan una masa muscular disminuida –como aquellos de edad avanzada– (57). Por otro lado, individuos de diferente origen racial y étnico presentan diferencias a nivel del contenido de grasa corporal, de modo que los rangos normalmente utilizados suelen no ser adecuados para la totalidad de poblaciones mundial, y en cambio es necesario establecer rangos específicos para cada caso (58–60). La *Figura 2.2* muestra un ejemplo de las diferencias que pueden encontrarse entre individuos de mismo sexo, pero diferente edad u origen racial y étnico.

Tabla 2.1. Valores de IMC (kg/m²) según peso corporal y estatura. Valores de IMC calculados según la fórmula: IMC = masa (kg) / estatura² (m). El código de colores establece las categorías de bajo peso, normopeso, sobrepeso, y obesidad clases I, II y III.





Figura 2.2. Porcentaje de grasa corporal en los umbrales estándar de IMC. Porcentaje de grasa corporal estimado mediante Absorciometría Dual de Rayos X (ADX) en los umbrales estándar de IMC 18.5, 25 y 30 kg/m², evaluados en mujeres y hombres de rangos etarios de 20-39 años, 40-59 años y 60-79 años, de origen afroamericano, asiático y caucásico (Adaptado de 52, 53).

Por último, en niños y jóvenes el contenido de grasa corporal varía de forma constante hasta que el individuo ha concluido su etapa de crecimiento y maduración, y lo hace de distinta forma según el género (55, 61). Por tanto, en niños y jóvenes no es correcto considerar los porcentajes de contenido de grasa corporal ni los valores de IMC reportados para individuos adultos. En particular, se ha demostrado que en niños y jóvenes, solo los valores muy altos de IMC presentan una buena correlación con el contenido de grasa corporal, mientras que los valores medios y bajos arrojan datos poco confiables (55, 62). Dado lo anterior, ha sido necesario generar datos de referencia para evaluar la variación del IMC según la edad y el género y en contextos diversos (61, 63–67). Ejemplos de esto son las gráficas generadas por los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades de Estados Unidos (Centers for Disease Control and Prevention, CDC) (63), las generadas por el Grupo de Trabajo Internacional sobre Obesidad (International Obesity Task Force, IOTF) (65) y las generadas por la Organización Mundial de la Salud (OMS) (66, 67). Mientras la primera se basa exclusivamente en datos obtenidos en Estados Unidos, las últimas dos se basan en datos obtenidos en poblaciones de diversas partes del mundo y pretenden ser de uso común en todos los países. No obstante, cada uno de estos estudios se basan en métodos diferentes para diagnosticar la obesidad, y por tanto produce diferentes estimaciones de su prevalencia. Por ejemplo, según la IOTF, el diagnóstico se basa un valor absoluto de IMC que varía según la edad y el género (65). Por otro lado, según la OMS, el diagnóstico de se basa en cuán alejado de la media se encuentra el IMC del individuo; y se consideran como casos de obesidad a los niños y jóvenes con valores de IMC alejados al menos 3 y 2 desviaciones estándar, de 0 a 5 años, y de 5 a 19 años, respectivamente (66, 67). Ante estas dificultades, suele recomendarse la adición de otras medidas antropométricas como métodos complementarios al IMC, como lo son los pliegues cutáneos y la circunferencia abdominal (68).

2.1.2.2. Pliegues Cutáneos

Los pliegues cutáneos pueden ser utilizados como indicadores del contenido de grasa corporal subcutánea del individuo, la cual representa la mayor parte del contenido de grasa corporal total (69). Los diferentes pliegues cutáneos del cuerpo presentan un valor de espesor específico y guardan una correlación muy fuerte con el contenido de grasa corporal subcutánea del individuo. Así, mayores valores de espesor de los pliegues cutáneos reflejan una mayor cantidad de contenido de grasa corporal subcutánea, y por ende, de grasa corporal total (45, 70). Los pliegues cutáneos relevantes para el diagnóstico de obesidad

9

incluyen el subescapular, el tricipital, el bicipital, el axilar, el pectoral, el suprailíaco, el abdominal, el de muslo frontal y el de pierna medial (45). Es necesario destacar que el espesor de estos pliegues varía según el género, la edad y la etnia, por lo que ha sido necesario establecer parámetros diferentes para cada uno de estos casos (71, 72). Además, también existen grandes limitaciones al momento de evaluar individuos con estados muy graves de obesidad (73). No obstante, la medida de pliegues cutáneos suele ser muy útil en el diagnóstico de obesidad en niños y jóvenes (74–76).

2.1.2.3. Circunferencia abdominal

Las circunferencia abdominal puede utilizarse como un indicador del contenido de grasa visceral del individuo, el cual ha sido relacionado con los riesgos asociados a la obesidad (77–81). La circunferencia abdominal presenta un valor específico y guarda una correlación muy fuerte con el contenido de grasa visceral del individuo (82–84). Así, mayores valores de circunferencia abdominal reflejan un mayor contenido de grasa visceral, y por ende, mayores riesgos asociados. No obstante, la medida de circunferencia debe ser llevada a cabo de forma precisa. Existen cuatro sitios estándar para ello; a saber, a nivel del margen inferior del esternón, a nivel del margen inferior de la última costilla palpable, a nivel del ombligo, y a nivel de la cresta ilíaca (46, 85). A pesar de que la correlación entre estos cuatro valores es fuerte, los valores absolutos varían de forma significativa, por lo que es necesario especificar el sitio de medida para que la comparación de datos sea viable (86–88).

2.1.3. Prevalencia

2.1.3.1. Prevalencia en el mundo

En los últimos 30 años, la obesidad pasó de considerarse un problema menor que afectaba esencialmente a países desarrollados, a ser definida como epidemia global (89–94). Lo anterior queda plasmado en uno de los estudios epidemiológicos más importantes con el que contamos hoy en día. Se trata de un estudio llevado a cabo por la OMS, en el se procesaron datos provenientes de 1769 estudios para establecer la evolución de la prevalencia del sobrepeso y la obesidad en el mundo desde 1980 hasta 2013 (94). Los datos muestran que en esos 33 años, la prevalencia de **sobrepeso y obesidad en conjunto** aumentó un 27.5% en adultos y un 47.1% en niños y jóvenes. En cifras absolutas, esto significa que la cantidad de personas con sobrepeso u obesidad aumentó de 921 millones en 1980 a 2100

millones en 2013. Estas cifras dejan en evidencia la magnitud del problema con el que estamos tratando. La *Figura 2.3.* muestran la evolución de la prevalencia de sobrepeso y obesidad desde 1980 a 2013, para adultos y niños y jóvenes, a nivel global y según el nivel de desarrollo del país de proveniencia.



Figura 2.3. Evolución de la prevalencia de sobrepeso y obesidad entre 1980 y 2013. Se muestra prevalencia de sobrepeso y obesidad, globalmente o según el nivel de desarrollo de su país de procedencia. A. Prevalencia de sobrepeso y obesidad en conjunto (IMC \geq 25 kg/m², izquierda) y de obesidad (IMC \geq 30 kg/m², derecha) en hombres y mujeres (\geq 20 años). B. Prevalencia de sobrepeso y obesidad en conjunto (criterio de diagnóstico definido por la IOTF, izquierda) y de obesidad (criterio de diagnóstico definido por la IOTF, derecha) en niños y niñas (< 20 años hombres y mujeres (\geq 20 años) (Adaptado de 94).

Según la OMS, la prevalencia actual de obesidad en adultos (IMC \ge 30 kg/m², \ge 18 años) en el mundo es de 11% para los hombres y 15% para las mujeres. En cifras absolutas, esto significa que la cantidad de individuos adultos obesos ronda hoy en los 600 millones (19). A pesar de que aún existen regiones del mundo y sectores de la sociedad donde las prevalencias son mayores, la distribución es cada vez más homogénea (19). La *Figura 2.4.* muestra la prevalencia de obesidad en las diferentes regiones geográficas y según desarrollo económico en el mundo. Las *Figuras 2.5 a 2.8* muestran la prevalencia de obesidad en adultos y niños y jóvenes en los diferentes países en el mundo.



Figura 2.4. Prevalencia de obesidad en adultos en las diferentes regiones del mundo en 2014. Se muestra la prevalencia de obesidad en las diferentes regiones del mundo (AFR: África; AMR: América; SEA: Sudeste Asiático; EUR: Europa; RM: Región Mediterránea; PO: Pacífico Oeste; arriba), y según el nivel de desarrollo del país de procedencia (Bajo, Medio-Bajo, Medio-Alto, Alto; abajo) (Adaptado de 19).



Figure 2.5. Prevalencia de obesidad en mujeres en el mundo en 2014. Se muestra según código de colores la prevalencia de obesidad (IMC \ge 30 kg/m²) en mujeres (\ge 20 años) en los distintos países del mundo (Adaptado de 93).



Figura 2.6. Prevalencia de obesidad en hombres en el mundo en 2014. Se muestra según código de colores la prevalencia de obesidad (IMC ≥ 30 kg/m²) en hombres (≥ 20 años) en los distintos países del mundo (Adaptado de 93).



Figura 2.7. Prevalencia de obesidad en niñas y jóvenes en el mundo en 2014. Se muestra según código de colores la prevalencia de obesidad (valores de IMC definidos según criterio de IOFT) en niñas y jóvenes (< 20 años) en los distintos países del mundo (Adaptado de 93).



Figura 2.8. Prevalencia de obesidad en niños y jóvenes en el mundo en 2014. Se muestra según código de colores la prevalencia de obesidad (valores de IMC definidos según criterio de IOFT) en niños y jóvenes (< 20 años) en los distintos países del mundo (Adaptado de 93).

2.1.3.2. Prevalencia en Uruguay

En Uruguay, el sobrepeso y la obesidad han sido reconocidos desde la comunidad biomédica y desde el propio gobierno como un problema sanitario preponderante sobre el cual han de tomarse medidas. Según los datos de la OMS, la prevalencia de sobrepeso y obesidad en Uruguay no ha presentado un aumento significativo desde 1980; no obstante, las cifras ya eran preocupantes en ese entonces y lo siguen siendo hoy en día (94). Las *Tablas 2.2 y 2.3.* muestran los datos de prevalencia de sobrepeso y obesidad en Uruguay desde 1980 a 2013, para adultos y niños y jóvenes.

Tabla 2.2. Prevalencia de Sobrepeso y Obesidad en conjunto en Uruguay. Se muestran los porcentajes de sobrepeso y obesidad en conjunto (IMC ≥ 25 kg/m² para adultos ≥ 20 años; IMC definido según el criterio de IOTF para niños y jóvenes < 20 años), en Uruguay en los años 1980, 1990, 2000 y 2013 (Adaptado de 93).

	1980	1990	2000	2013
Mujeres	52.1	50.1	52.2	53.1
Hombres	58.3	56.3	58.6	59.6
Niñas	37.0	34.9	36.9	37.7
Niños	29.8	28.0	30.1	31.2

Tabla 2.3. Prevalencia de Obesidad en Uruguay. Se muestran los porcentajes de obesidad (IMC ≥ 30 kg/m² para adultos; IMC definido según el criterio de IOTF para niños y jóvenes < 20 años), en Uruguay en los años 1980, 1990, 2000 y 2013 (Adaptado de 93).</p>

	1980	1990	2000	2013
Mujeres	24.7	23.3	24.7	25.4
Hombres	22.5	21.2	22.7	23.3
Niñas	17.3	16.3	17.5	18.1
Niños	9.2	8.6	9.4	9.7

Los datos más recientes de la OMS plantean que en Uruguay la prevalencia de **sobrepeso y obesidad en conjunto** en adultos (IMC $\ge 25 \text{ kg/m}^2$, $\ge 18 \text{ años}$) es de 60.9% en mujeres y de 62.4% en hombres, lo cual representa el 61.7% de la población adulta total. Por otra parte, la prevalencia de **obesidad** en adultos (IMC $\ge 30 \text{ kg/m}^2$, $\ge 18 \text{ años}$) es de 30.6% en mujeres y 22.5% en hombres, lo cual representa el 26.7% de la población adulta total. En cifras absolutas, de los 2.4 millones de adultos uruguayos, alrededor de 1.5 millones presentan un peso mayor al recomendado, y de ellos, alrededor de 650 mil son obesos (19, 95)

Por último, cabe destacar que la situación de obesidad en niños es de las más preocupantes de la región. Los datos de la OMS plantean que la prevalencia de **sobrepeso y obesidad en conjunto** en niños y jóvenes en Uruguay (IMC definido según el criterio de IOTF, < 20 años) es de 37.7% en niñas y de 31.2% en niños, lo cual representa el 34.4% de la población de niños y jóvenes total. Por otra parte, la prevalencia de **obesidad** en niños y jóvenes (IMC definido según el criterio de IOTF, < 20 años) es de 18.1% en niñas y de 9.7% en niños, lo cual representa el 13.9% de la población de niños y jóvenes total. En cifras absolutas, de los casi 1 millón de niños y jóvenes menores de 20 años uruguayos, alrededor de 350 mil presentan un peso mayor al recomendado, y de ellos, alrededor de 140 mil son obesos (94, 95)

Particular importancia se le está dando al estado nutricional de la llamada *primera infancia* – etapa comprendida desde el nacimiento hasta los 5 años–. Según los datos de la OMS, la prevalencia de **sobrepeso y obesidad en conjunto** para los niños menores a 5 años en el mundo ha venido aumentando desde un 5% en el año 2000, a un 6% en 2010, a un 6.3% en 2013, y se estima que alcanzará el 11% hacia 2025. En cifras absolutas, los niños menores de 5 años con sobrepeso u obesidad en el mundo pasarían de ser 42 millones en 2013 a 73 millones en 2025 (19). A destacar, Uruguay no es ajeno a esta problemática. Según los datos de la Primera Encuesta Nacional de Salud, Nutrición y Desarrollo Infantil, la prevalencia de **sobrepeso y obesidad en conjunto** (definidos según criterio de OMS) es de un 10% para los niños menores de 2 años, y un 11.1% para los niños de entre 2 y 4 años. Esto representa en conjunto el 10.5% de los niños menores de 4 años, y coloca a Uruguay como el país con mayor prevalencia de sobrepeso y obesidad en la primera infancia entre los países de la región (96).

En base a los datos epidemiológicos reportados y dada la fuerte asociación con el desarrollo de diversas patologías y muerte prematura, debemos considerar a la obesidad como uno de los problemas sanitarios más relevantes de nuestra época, que perjudica gravemente la salud y calidad de vida de los individuos a nivel mundial. La obesidad es responsable de alrededor de 90 millones de bajas laborales por discapacidad y 3.4 millones de muertes prematuras por año (19), representando uno de los pilares del gran costo asociado a la salud pública. Siendo así, resulta urgente adoptar medidas intersectoriales para revertir esta situación. A nivel de las organizaciones mundiales se están desarrollando planes de prevención y paliación (97), y se ha realizado un pedido formal para llevar a cabo un seguimiento minucioso de los cambios en la prevalencia de obesidad en cada país (55, 98, 99). A nivel de la comunidad biomédica, es de vital relevancia realizar un esfuerzo conjunto para comprender los mecanismos que subyacen su etiología y patogenia, para eventualmente contribuir al desarrollo de nuevas terapias tanto preventivas como paliativas.

2.1.4. Etiología

La obesidad se desarrolla ante la presencia de un excedente energético crónico, que el organismo almacena en forma de triglicéridos en la grasa corporal. Dicho excedente energético se genera debido a un desbalance entre la ingesta y gasto energético realizado por el individuo, sea por un aumento en la ingesta, una disminución en el gasto, o ambas a la vez (1). Las causas que determinan dicho desbalance pueden ser diversas y suelen actuar de modo concertado. Entre estas se incluyen la presencia de determinado *background* genético o epigenético, la presencia de determinadas patologías, tanto orgánicas como psicológicas, el consumo de determinados medicamentos, y la adopción de determinados hábitos de alimentación y de actividad física. El estudio detallado de las mismas excede los objetivos de este trabajo, pero puede encontrarse en diversos libros y revisiones (1)(100). A continuación, se explican brevemente las bases de la ingesta y gasto energético y su implicancia en el desarrollo de la obesidad.

La *ingesta energética* de un individuo viene definida por la cantidad, calidad y eficacia energética de los alimentos que ingiere. La cantidad y calidad de alimentos ingeridos están asociadas a factores biológicos, como la sensación de hambre y saciedad, y socio-económicos, como el acceso a alimentos, la periodicidad de ingestas, y las preferencias gustativas (1, 101–105). La eficacia energética de los alimentos ingeridos está asociada a su composición, es decir, la proporción de proteínas, carbohidratos y grasas que estos

contienen. Las proteínas representan aproximadamente el 15% de la ingesta energética diaria y aportan un promedio de 4 kcal/g. Los carbohidratos representan aproximadamente el 50% de la ingesta energética diaria y aportan un promedio de 4 kcal/g. Por último, las grasas representan aproximadamente el 30% de la ingesta energética diaria y aportan un promedio de 9 kcal/g (106, 107). Las eficacias mencionadas varían ligeramente de un individuo a otro, principalmente según la edad. Las mismas suelen ser altas cuando el individuo se encuentra en las etapas de crecimiento y desarrollo, y disminuyen progresivamente mientras se alcanza la adultez (108).

El gasto energético de un individuo viene definido por su Tasa Metabólica de Reposo y por su actividad física. La Tasa Metabólica de Reposo (TMR) viene dada por los procesos necesarios para mantener la homeostasis del organismo y suele representar un 50-80% del gasto energético total (109). No obstante, esta puede variar de un individuo a otro según el género, la edad, la proporción de masa magra respecto al contenido de grasa corporal (109), y la actividad del sistema nervioso autónomo (110-112). La actividad física de un individuo viene dada por la actividad espontánea y la actividad asociada a actividades laborales o recreativas. La actividad espontánea representa actividad de muy baja intensidad sin un verdadero propósito -cambiar de posición, mover las piernas o las manos-, y representa un 8-15% del gasto energético total (109). La actividad asociada a fines laborales o recreativos varía enormemente de un individuo a otro, y puede representar un porcentaje muy bajo en personas mayormente sedentarias, a un porcentaje muy alto en personas dedicadas a ocupaciones que requieran cierto entrenamiento o al deporte profesional. Algunos estudios muestran que el nivel de actividad física realizada por el individuo parece tener un componente genético, pero se cree que depende mayormente de hábitos adquiridos (113-115).

La ingesta y el gasto energético realizado por el individuo no suelen ser idénticos y en cambio existe diariamente un ligero desbalance. Cuando existe un *balance energético negativo*, se activan procesos compensatorios como un aumento de la sensación de hambre, una disminución en la actividad física y un mayor acoplamiento entre el metabolismo de los nutrientes y la generación de energía a nivel mitocondrial (116). Cuando el balance energético negativo es prolongado, se activa el catabolismo de las reservas energéticas del organismo. Las reservas de proteínas constituyen una mínima parte de las reservas de carbohidratos también constituyen una mínima parte de las reservas de carbohidratos también constituyen una mínima parte de las reservas de las reservas de carbohidratos también constituyen una mínima parte de las reservas de las reservas de las reservas de carbohidratos también constituyen una mínima parte de las reservas de carbohidratos también constituyen una mínima parte de las reservas de las reser

corto plazo. Las mismas existen en forma de glucógeno muscular y hepático; el primero es utilizado exclusivamente por el músculo, y el segundo es utilizado para mantener el nivel de glucosa en sangre dentro del rango fisiológico, agotándose luego de las 12-18 horas de ayuno (106). Las reservas de triglicéridos constituyen la mayor parte de las reservas energéticas totales y son las capaces de sobrellevar un balance energético negativo prolongado (106, 117). En caso de ayuno prolongado, los triglicéridos son escindidos en ácidos grasos libres y volcados al torrente sanguíneo, quedando disponibles para su oxidación directa en órganos como el músculo esquelético, músculo cardíaco, corteza renal e hígado, o para la generación de glucosa y cuerpos cetónicos en el hígado, imprescindibles para el funcionamiento normal del resto del organismo. Un adulto normopeso presenta entre 10-20 kg de triglicéridos almacenados en la grasa corporal, lo cual equivale a 90000-180000 kcal de reserva capaces de sobrellevar un ayuno de 60-70 días. A destacar, en individuos obesos el contenido de triglicéridos almacenados en la grasa corporal puede ser tal que dicho plazo se extiende a 90-100 días (118).

Cuando existe un balance energético positivo, se activan también procesos compensatorios, como la disminución de la sensación de hambre y el aumento de la TMR (119). No obstante, este tipo de procesos no son capaces de prevenir completamente el excedente energético, que es entonces destinado a la síntesis de proteínas o almacenado en forma de triglicéridos en la grasa corporal. Cuando el individuo se encuentra en las etapas de crecimiento y desarrollo, el excedente energético es mayormente destinado a la síntesis de proteínas y sólo si aún existe energía remanente, esta es almacenada en forma de triglicéridos en la grasa corporal. A medida que el individuo alcanza la adultez, el excedente energético destinado a la síntesis de proteínas disminuye y, por ende, el almacenado en forma de triglicéridos en la grasa corporal aumenta. Finalmente, cuando el individuo ya ha alcanzado la adultez, el excedente energético es mayormente almacenado en forma de triglicéridos en la grasa corporal (106, 117). Independientemente del mecanismo que cause el excedente energético, cuando este es suficiente como para ser almacenado en forma de triglicéridos en la grasa corporal, y ocurre de forma prolongada, el individuo acumula suficiente cantidad de esta como para alcanzar una condición de sobrepeso o eventualmente obesidad.

2.1.5. Patogenia

En virtualmente todas las especies eucariotas, el excedente energético es almacenado en forma de triglicéridos. En organismos superiores, esto es llevado a cabo por un tejido especializado: el tejido adiposo blanco (120). Este es el protagonista en la fisiopatología de la obesidad; por tanto, a continuación se describe brevemente su composición y organización estructural, y posteriormente las modificaciones que sufre durante el desarrollo de la patología.

2.1.5.1. Composición y organización estructural del tejido adiposo

El tejido adiposo blanco es un tejido de tipo conectivo, compuesto por adipocitos y una fracción estromal-vascular. Los adipocitos son las células que llevan a cabo la función del tejido adiposo per se, tanto endócrina como metabólica. La función endócrina incluye la secreción de diversos hormonas, factores de crecimiento y citoquinas -muchas de ellas específicas del tejido adiposo-, entre las que se destacan la leptina, adiponectina, resistina, nefastina, PEDF y RBP4. La función metabólica incluye la síntesis y almacenamiento de triglicéridos, así como también su metabolización en ácidos grasos libres que son entonces volcados al torrente sanguíneo, imprescindibles para el funcionamiento normal del organismo cuando existe un balance energético negativo (118, 121). La fracción estromal-vascular incluye preadipocitos, fibroblastos, células estromales, células endoteliales, macrófagos, mastocitos, células Natural Killer, linfocitos T y linfocitos B, y son responsables de la homeostasis del tejido en su conjunto, posibilitando la funcionalidad de los adipocitos. Además, cada adipocito se encuentra rodeado de una fina capa de matriz extracelular, compuesta principalmente por fibras de colágeno de tipo IV, que es fundamental para la supervivencia de la célula y también es responsable de la homeostasis del tejido en su conjunto (122).

El tejido adiposo blanco se encuentra organizado en dos grandes depósitos que presentan diferencias tanto estructurales como funcionales: el tejido adiposo subcutáneo y el tejido adiposo visceral. El **tejido adiposo subcutáneo** constituye alrededor del 80% del tejido adiposo blanco y se encuentra por debajo de la piel y por encima del peritoneo (121). Puede diferenciarse a su vez en tejido subcutáneo fibroso, compuesto por adipocitos pequeños y una gruesa matriz extracelular, y localizado en áreas que sufren estrés mecánico; tejido subcutáneo estructural, compuesto por adipocitos pequeños y una vasta fracción estromal-vascular, y localizado en áreas de gran contenido muscular, como muslos, caderas, brazos,

20

pectorales y mamas; y tejido subcutáneo de depósito, compuesto por adipocitos de gran tamaño y escasa matriz extracelular, y localizado en el área abdominal (69). Este tejido presenta una gran capacidad de expansión y es el que está más estrechamente asociado a la homeostasis energética del individuo (123). Por otro lado, el tejido adiposo visceral constituye alrededor del 20% del tejido adiposo blanco y se encuentra en la cavidad peritoneal, tanto a nivel torácico como abdominal. A nivel torácico se distinguen el tejido adiposo mediastínico, localizado en la parte superior y posterior del mediastino; y el tejido adiposo epicárdico, localizado en diferentes regiones del corazón. A nivel abdominal se distinguen el tejido adiposo mesentérico, localizado entre el tejido conectivo del intestino; el tejido adiposo omental, localizado en el omentum mayor; el tejido adiposo retroperitoneal, localizado a lo largo de la pared dorsal del abdomen; el tejido adiposo pararenal, localizado sobre la fascia renal; y el tejido perirenal, localizado dentro de la fascia renal (121). A destacar, la expansión del tejido adiposo visceral se encuentra fuertemente asociada a los efectos adversos de la obesidad, incluyendo resistencia a la insulina, Diabetes Tipo 2, dislipidemia, hipertensión, aterosclerosis, esteatosis hepática, diversos tipos de cáncer y muerte prematura (77-81). De hecho, una mayor cantidad de tejido adiposo visceral respecto al subcutáneo ha sido relacionada a un mayor riesgo de desarrollo de Diabetes Tipo 2 y muerte prematura en individuos normopeso (124), reforzando la idea que este es un tejido fundamental en la fisiopatología de la obesidad y el desarrollo de las patologías típicamente asociadas a esta.

A destacar, los depósitos del tejido adiposo blanco humano presentan un nivel muy alto de homología con los murinos, sobre los cuales se han llevado a cabo la mayoría de los trabajos de investigación. La *Figura 2.9.* muestra un esquema de la distribución de los diferentes depósitos en humano y ratón.

HUMANO



RATÓN



Figure 2.9. Depósitos del tejido adiposo blanco en humano y ratón. Se muestra un esquema de la distribución de los diferentes depósitos de tejido adiposo blanco subcutáneo y visceral en humano y ratón (Adaptado de 119).

2.1.5.2. Modificación del tejido adiposo durante la obesidad

2.1.5.2.1. Hipertrofia e hiperplasia de los adipocitos

Cuando un individuo presenta un excedente energético crónico, en los adipocitos ocurre la activación de las vías involucradas en la síntesis y el almacenamiento de triglicéridos (125, 126). A medida que estos sintetizan y almacenan los nuevos triglicéridos en su gota lipídica, aumentan de tamaño. Se ha propuesto que cuando los adipocitos alcanzan un tamaño determinado –llamado *tamaño crítico*–, comienzan a secretar factores de crecimiento que promueven el reclutamiento, proliferación y diferenciación de preadipocitos en adipocitos (127, 128). En concordancia con lo anterior, se ha observado que el tamaño de los adipocitos aumenta a medida que el BMI aumenta, pero eventualmente alcanza un *plateau*; al tiempo que el número de adipocitos aumenta (118, 129, 130).

Diversos estudios han demostrado que la expansión del tejido adiposo mediante hipertrofia aumento en tamaño de los adipocitos- o hiperplasia -aumento en el número de los adipocitos- conllevan a un fenotipo metabólico muy diferente. Por un lado, la expansión hipertrófica del tejido adiposo ha sido relacionada con su eventual disfunción y el desarrollo de las patologías típicamente asociadas a la obesidad. Los adipocitos hipertróficos presentan un fenotipo de resistencia a la insulina, mostrando una inhibición de los receptores GLUT4 e IRS-1 (131), así como una activación del proceso de lipólisis y una mayor liberación de ácidos grasos libres al espacio circundante (132), los cuales conducen a la activación de los macrófagos residentes (133). Los adipocitos hipertróficos también suelen presentar un fenotipo tipo-necrótico, liberando componentes celulares internos que también conducen a la activación de los macrófagos residentes (134, 135). A su vez, la hipertrofia de los adipocitos puede llegar a ser tal que dificulte su oxigenación así como la de células vecinas, generando zonas de hipoxia en el tejido (136, 137). La hipoxia conduce a la expresión de HIF1- α , que promueve la expresión de factores angiogénicos (138), pero también de proteínas asociadas a la remodelación de la matriz extracelular y el desarrollo de fibrosis (139), así como de citoquinas proinflamatorias que también conducen a la activación de los macrófagos residentes (137, 140-142). En suma, la resistencia a la insulina, la necrosis y la hipoxia favorecen en conjunto a la activación de los macrófagos residentes y la mayor expresión de citoquinas proinflamatorias. Efectivamente, los adipocitos hipertróficos presentan una mayor expresión de citoquinas proinflamatorias como TNF- α, IL-6, IL-8 y MCP-1 (143), las cuales promueven la infiltración de células inmunes que favorecen aún más el contexto proinflamatorio y cada una de sus consecuencias (144).

Al contrario, la expansión hiperplásica del tejido ha sido relacionada con un modo más saludable de almacenar el excedente energético, pues implica un aumento en el número de adipocitos de que conservan su tamaño y fisiología normal (145–147). La *Figura 2.10.* resume las características de una expansión del tejido adiposo mediante hipertrofia o hiperplasia.



Figura 2.10. Expansión del tejido adiposo. Se muestran las características de la expansión del tejido adiposo mediante hipertrofia e hiperplasia de los adipocitos (Adaptado de 146)

Diversos estudios han demostrado que la hipertrofia e hiperplasia de los adipocitos es acompañada por mecanismos adaptativos. Estos incluyen cambios a nivel de la vasculatura, de la matriz extracelular y de las células inmunes que componen el tejido (148, 149, 150).

2.1.5.2.2. Modificación de la vasculatura

La expansión del tejido adiposo plantea una mayor demanda de oxígeno, nutrientes, factores de crecimiento y hormonas, lo cual exige una remodelación a nivel de la vasculatura del tejido (151). La angiogénesis es un proceso complejo que requiere de la producción de diferentes factores que afectan la matriz extracelular, la proliferación, migración y función de las células endoteliales, y el reclutamiento de pericitos. El tejido adiposo es capaz de producir muchos de estos factores que promueven la angiogénesis, así como también muchos otros que inhiben la angiogénesis y favorecen la finalización del proceso de neovascularización (152, 153). Los estímulos que favorecen la angiogénesis durante la expansión del tejido adiposo son la propia hipertrofia (138) e hiperplasia de los adipocitos (152, 154, 155). No obstante, cabe destacar que en el caso de la primera ocurre más que nada debido al fenómeno de hipoxia observado que como ya se mencionó, también involucra una mayor expresión de proteínas asociadas a la remodelación de la matriz extracelular y el desarrollo de fibrosis (139), así como de citoquinas proinflamatorias (137, 140–142).

2.1.5.2.3. Modificación de la matriz extracelular

Como se mencionó anteriormente, cada adipocito se encuentra rodeado de una fina capa de matriz extracelular, compuesta principalmente por fibras de colágeno de tipo IV, que es fundamental para la supervivencia de la célula y también es responsable de la homeostasis del tejido en su conjunto (122). No obstante, la expansión del tejido adiposo, y particularmente aquella que es de tipo hipertrófica, conduce a una remodelación de la matriz extracelular. Específicamente, el aumento de tamaño de los adipocitos, sumado al fenómeno de hipoxia y el aumento en la secreción de citoquinas proinflamatorias provoca la desregulación entre los procesos de degradación y síntesis de las proteínas que componen la matriz extracelular, dando lugar a haces gruesos de colágeno tipo I, III y VI, que no solo rodean cada adipocito sino que también corren a lo largo del tejido; al tiempo que aumenta la presencia de fibroblastos, macrófagos y mastocitos (125, 134, 156, 157). En conjunto, la matriz extracelular desarrolla un fenotipo fibrótico que impide la mayor hipertrofia de los adipocitos y la diferenciación de preadipocitos, contribuyendo a la disfunción del tejido adiposo (156, 158)

2.1.5.2.4. Infiltración de células inmunes

Como se mencionó anteriormente, la fracción estromal-vascular del tejido adiposo incluye diversas células inmunes, incluyendo macrófagos, mastocitos, células Natural Killer, linfocitos T y linfocitos B. De estas, las más numerosas son los macrófagos tipo M2, que se caracterizan por secretar citoquinas anti-inflamatorias como IL-10, IL-1Ra y Arg1, al tiempo que promueven el remodelamiento y la reparación del tejido (159, 160). No obstante, la expansión del tejido adiposo, y particularmente aquella de tipo hipertrófica, conduce a un aumento en la infiltración y activación de células inmunes de tipo proinflamatorio. En tal proceso son fundamentales el fenotipo de resistencia a la insulina, con la consecuente mayor actividad lipolítica y el aumento de los ácidos grasos libres (133); la muerte tipo-necrótica, con la consecuente liberación de componentes celulares internos (135); y el fenómeno de hipoxia, con la consecuente expresión de citoquinas proinflamatorias tanto en los adipocitos como en los propios macrófagos residentes (161, 162). Lo anterior conduce a una rápida infiltración de neutrófilos (163), células Natural Killer (164) y mastocitos (165), al tiempo que disminuye la población de linfocitos T CD4⁺ y Reguladores para predominar los CD8⁺ (166, 167). En suma, estos fenómenos conducen a una infiltración sustancial de monocitos de tipo CD14+CD16- y CD14+CD16+, que finalmente dan lugar a macrófagos tipo M1, que llegan a representar hasta un 50% de la población celular total de la fracción estromal vascular del tejido (159, 168–171). Los macrófagos tipo M1 se disponen en forma de corona alrededor de los adipocitos hipertróficos, y principalmente de aquellos tipo-necróticos, sugiriendo que su propósito es el de fagocitar sus detritos así como metabolizar sus ácidos grasos, y así evitar la toxicidad asociada (135, 172). A su vez, mediante la secreción de factores como PDGF, son capaces de promover la angiogénesis en el tejido, y así revertir el fenómeno de hipoxia (173). No obstante, los macrófagos tipo M1 también se caracterizan por secretar citoquinas proinflamatorias como TNF-a, IL-6, IL-1b, IL-12 e IL-23 (160), hecho que afecta negativamente la fisiología del tejido. Por un lado, promueven la remodelación de la matriz extracelular y el desarrollo de fibrosis (174). Por otro lado, inhiben la diferenciación de los preadipocitos, que entonces se vuelven proliferativos (175) o senescentes, fenotipo que también es acompañado por la secreción de citoquinas proinflamatorias (176). Por ultimo, activan numerosas serina-treonina-quinasas como mTOR, p70S6, ERK, JNK, e IKK β , que fosforilan IRS-1 e IRS-2 y conducen a la desensibilización de la vía de insulina. De esta manera, refuerzan el fenotipo de resistencia a la insulina ya presente, con la consecuente mayor actividad lipolítica y el aumento de los ácidos grasos libres, y entonces la activación de los macrófagos tipo M1; resultando en un loop parácrino de retroalimentación positiva que acentúa el fenómeno proinflamatorio y cada una de sus consecuencias (177-179).

26

2.1.5.3. Gluco-lipotoxicidad y el rol protector del tejido adiposo

Como se mencionó anteriormente, el tejido adiposo es el encargado de lidiar con el excedente energético. Cuando dicho excedente energético es crónico, el tejido adiposo comienza un proceso de expansión, inicialmente mediante hipertrofia y eventualmente también mediante hiperplasia. No obstante, cuando la expansión del tejido llega a determinado punto, esta comienza a acompañarse por fenómenos nocivos, incluyendo la resistencia a la insulina, la hipoxia, el desarrollo de fibrosis y la infiltración de células inmunes que determinan un contexto extremadamente proinflamatorio. La funcionalidad de los adipocitos y preadipocitos se ve fuertemente comprometida y el tejido se vuelve disfuncional. En una situación como la recién descrita, el individuo se encuentra sometido al eventual desarrollo de la patología sistémica. Por un lado, la función endócrina del tejido se encuentra completamente alterada, ya que no solo secreta niveles aberrantes de las diferentes hormonas y factores de crecimiento, sino que además secreta niveles excesivos de citoquinas proinflamatorias. De manera similar, la función metabólica del tejido se encuentra completamente alterada, ya que no solo se ve impedida la captación de glucosa y de ácidos grasos y el almacenamiento de nuevos triglicéridos, sino que además existe una mayor actividad lipolitica y una mayor liberación de ácidos grasos. En suma, esto conduce a que los niveles de glucosa y ácidos grasos libres en el torrente sanguíneo se vuelvan muy elevados, y extremadamente nocivos para el resto del organismo. La glucosa circulante conduce al desarrollo de retinopatías, nefropatías, neuropatías, diabetes y aterosclerosis (180); mientras que los lípidos circulantes comienzan a depositarse en tejidos como el músculo esquelético y cardíaco, páncreas, hígado, y riñón; lo cual se traduce en resistencia a la insulina, cardiomiopatías, diabetes, esteatosis hepática y falla renal (181, 182). El punto de inflexión en este periplo patológico es precisamente la transición entre un tejido adiposo funcional y uno disfuncional; hecho que queda explícitamente reflejado en aquellos individuos que presentan un fenotipo de obesidad saludable. Estos son individuos que a pesar de ser extremadamente obesos, presentan parámetros metabólicos comparables al de individuos normopeso; y lo que los distingue de sus contrapartidas no saludables es, justamente, la preservación de un tejido adiposo funcional y con capacidad expansiva (147, 183, 184). Las bases moleculares que subyacen dicho fenómeno aún no han sido elucidadas, pero diversos estudios señalan que la proteína DBC1 podría estar involucrada.

2.2. La proteína Deleted in Breast Cancer 1 (DBC1)

2.2.1. Breve aclaración respecto a su nombre

Hacia el año 2000, el grupo liderado por Michael H. Wigler realizó un trabajo en el cual se propusieron identificar los genes presentes en la región 21 del brazo corto del cromosoma 8 humano (8p21), frecuentemente suprimida en el cáncer de mama. De los seis genes identificados, dos no habían sido descritos aún y decidieron nombrarlos Deleted in Breast Cancer 1 (DBC1) y Deleted in Breast Cancer 2 (DBC2) (185). La evidencia generada en este estudio mostró que de estos genes, el único cuya expresión se encontraba suprimida en el cáncer de mama era DBC2 y fue entonces señalado como un gen supresor de tumores (185). Por otro lado, mostró que la expresión del gen DBC1 sí se encontraba parcialmente suprimida en líneas celulares derivadas de cáncer de pulmón y cáncer de colon (185), dejando planteada la hipótesis de que podía tratarse de un gen supresor de tumores en otros tipo de cáncer (186). Al día de hoy, existen múltiples estudios que relacionan al gen DBC1 con procesos tumorigénicos, tanto en cáncer de mama (187-191), de pulmón (192), y de colon (193, 194), como también de esófago (195), de estómago (196–198), de hígado (199, 200), de vesícula biliar (201), de riñón (202), de ovario (203), linfoma de tipo no Hodking (204) y diversos tipos de sarcoma (205). No obstante, si el gen DBC1 se halla efectivamente suprimido en cáncer de mama, así como si su participación es de tipo supresor de tumores o de tipo oncogén, es un tema de intenso debate, y excede los objetivos de este trabajo.

Años después de su descubrimiento, varios estudios demostraron que el gen *DBC1* se trata de un gen parálogo al gen *cell cycle and apoptosis regulator 1 (CCAR1)* (206, 207), y entonces fue renombrado *cell cycle and apoptosis regulator 2 (CCAR2)*. Se ha demostrado que las proteínas codificadas por los genes *CCAR1* y *DBC1 (CCAR2)* no solo presentan un alto nivel de homología estructural (207) sino que además participan en procesos celulares del mismo tipo (208–216) e incluso de forma conjunta (214). La denominación *CCAR2* resulta ventajosa porque evita su asociación con el gen *DBC2*, con el cual guarda una relación solo de cercanía topológica, con el cáncer de mama, con el cual guarda una relación que aún es motivo de controversia (185, 187–191), y con el gen *Deleted in Bladder Cancer 1*, con el cual gen y a la proteína con su denominación inicial, *Deleted in Brest Cancer 1* y su abreviación **DBC1**.

2.2.2. Organización estructural

Lamentablemente, aún no se cuenta con información detallada sobre la organización estructural de la proteína DBC1. Estudios de la secuencia primaria de la proteína humana predicen que consta de 923 aminoácidos, y presenta una estructura globular con alto grado de desorden intrínseco y seis dominios de diferente tipo. Del extremo N-terminal al C-terminal, hallamos un dominio tipo S1 *(S1-Like)*, un dominio cierre de leucina (*Leucine Zipper*, LZ), un dominio tipo Nudix (*Nudix-Like*), un dominio Mano EF (*EF-Hand*) y un dominio de hélice superenrrollada (*Coiled Coil*, CC) (207, 209). Hacia el extremo N-terminal, la proteína presenta una señal de localización nuclear (*Nuclear Localization Signal*, NLS), responsable de que su localización sea principalmente nuclear (207, 209), hecho que tiene relevancia para su actividad biológica. La *Figura 2.11.* muestra un esquema de la estructura lineal de la proteína DBC1 humana con los dominios y la NLS mencionados.



Figura 2.11. Estructura lineal de la proteína DBC1. A. Esquema de la estructura lineal de la proteína DBC1 humana, mostrando el rango aminoacídico que comprende cada uno los dominios y la secuencia de localización nuclear. **B.** Grado de desorden de la proteína DBC1 humana predicho por PONDR-FIT (línea verde) y PONDR VLXT (línea púrpura) y error estimado (sombra gris). Valores de *score* mayores a 0.5 corresponden a regiones de alto grado de desorden, valores de *score* menores a 0.5 corresponden a regiones estructuradas. Los rectángulos coloreados corresponden a cada uno de los dominios presentados en A y presentan el mismo código de colores (Adaptado de 207).

A destacar, la proteína DBC1 humana presenta un nivel muy alto de homología con la proteína murina, sobre la cual se han llevado a cabo muchos de los trabajos de investigación. El alineamiento de las secuencias aminoacídicas de ambas proteínas muestra que los dominios arriba mencionados se encuentran completamente conservados o con cambios aminoacídicos menores. Específicamente, los dominios *S1-Like*, LZ y la NLS son completamente idénticos; mientras que los dominio Nudix, *EF-Hand y Coiled Coil* presentan 10, 1 y 11 sustituciones aminoacídicas, respectivamente. Hasta el momento, no hay reportes de que dichas sustituciones afecten de algún modo la actividad biológica de la proteína, y su estudio excede los objetivos de este trabajo. La *Figura 2.12* muestra el alineamiento de secuencias de la proteína DBC1 humana y murina, resaltando los dominios y la NLS presentes y las sustituciones aminoacídicas mencionadas.

El **dominio** *S1-Like* se encuentra entre los residuos 55-112 de la proteína humana y murina, y presenta homología con el dominio de unión a ARN S1 (207), observado en ribonucleoproteínas y otras proteínas de unión a ARN (217, 218). Este dominio podría concederle a DBC1 capacidad de unión a ARN y explicar su participación en procesos de elongación y corte y empalme de moléculas de ARNm (207, 219).

El **dominio LZ** se encuentra entre los residuos 243-264 de la proteína humana y murina, y presenta la estructura típica para dimerización y unión al ADN (207, 220). Este dominio podría concederle a DBC1 capacidad de unión al ADN, pero aún no existen registros de este tipo de función. En cambio, se ha demostrado que es fundamental para la interacción de DBC1 con varias proteínas (214, 221–223).

El dominio *Nudix* se encuentra entre los residuos 340-461 de la proteína humana y murina, y presenta homología con el dominio Nudix observado en las hidrolasas Nudix (210), que catalizan la hidrólisis de una amplia gama de sustratos, incluyendo nucleósidos di- y trifosfatos, dinucleósidos polifosfato, pentosas nucleotídicas y caperuzas 5' de ARNm (224). Se ha demostrado que el dominio Nudix presente en DBC1 carece de ciertos residuos fundamentales para la actividad catalítica, pero sí conserva residuos fundamentales para la unión a sustratos (210). Lo anterior resulta relevante en cuanto a una de las interacciones más estudiadas de DBC1. Se trata de su interacción con SIRT1 (221, 223), una enzima que cataliza la deacetilación de lisinas utilizando dinucleósido de adenina y nicotinamida (NAD) y liberando O-acetil adenosín difosfato ribosa (OAAR) y nicotinamida (NAA) en el proceso (225). Dado que tanto NAD como OAAR son sustratos de hidrolasas Nudix (224), se ha propuesto que DBC1 podría estar detectando los niveles de dichas moléculas y así regulando su interacción con SIRT1 (210). La unión de este tipo de sustratos también resulta relevante en cuanto a la identificación de DBC1 en complejos de proteínas asociados a polimerasas de poli-ADP-ribosa (226, 227), encargadas de añadir cadenas de poli-ADP-ribosa sobre proteínas asociadas a la cromatina (228).

El **dominio** *EF-hand* se encuentra entre los residuos 704-748 de la proteína humana y entre los residuos 703-747 de la proteína murina, y presenta la estructura típica para la unión a iones de calcio (207, 229). Este dominio podría concederle a DBC1 capacidad de unión a iones de calcio, pero aún no existen registros de este tipo de función. En cambio, se ha propuesto que este dominio podría dimerizar con motivos EF-Hand de otras proteínas y así participar en la interacción de DBC1 con estas (210).

El **dominio** *Coiled-Coil* se encuentra entre los residuos 794-918 de la proteína humana y entre los residuos 793-917 de la proteína murina, y presenta la estructura típica de α -hélices enrolladas una sobre la otra formando una estructura tridimensional compleja que se mantiene estable mediante fuerzas hidrofóbicas (207, 230). Este tipo de estructuras suelen participar en interacciones entre proteínas y se ha demostrado que es fundamental para la interacción de DBC1 con varias proteínas (215, 231).

2.2.3. Actividad biológica

El hecho que DBC1 presente una estructura globular con alto grado de desorden intrínseco y seis dominios de diferente tipo concuerdan con el tipo de actividad biológica que se le ha asignado, a saber, la interacción con otras proteínas y la modulación de su respectiva actividad. La presencia de una NLS y la consecuente localización principalmente nuclear también concuerdan con el tipo de proteínas con las que interactúa. Hasta el momento, se han descrito más de una decena, e incluyen factores de transcripción y algunos de sus co-reguladores, y modificadores post-traduccionales de localización nuclear. A continuación se desarrolla brevemente sobre la interacción de DBC1 con ambos tipos de proteínas.

Score		Ex	pect	Method			Identiti	es	Positives	Gaps
1579	bits(40	88) 0.	0	Compos	itional ma	trix adjus	t. 844/92	3(91%)	872/923(94%) 1/923(0%)
Query	1	MSQFK	RORI	NPLPGGR	NFSGTAST	SLLGPPPG	LLTPPVAT	ELSQNAF	HLQGGEKORVFT	G 60
Sbjct	1	MSQFK	RORI	NPLPGGR	NFSGAAST	SLLGPPPG	LLTPPVAT	DLSQNAF	HLQSGERORVFT	G 60
Query	61	IVTSI	HDYP	GVVDEEV	FFQLSVVK	GRLPQLGE	KVLVKAAYI KVLVKAAYI	NPGQAVE	WNAVKVQTLSNQ	P 120
Sbjct	61	IVTSI	HDYF	GVVDEEV	FFQLSVVK	GRLPQLGE	KVLVKAAYI	NPGQAVE	WNAVKVQTLSNQ	P 120
Query	121	LLKSF	APPI	LHVAALG	QKQGILGA	QPQLIFQP OPOLIFOP	HRIPPLFP	OKPLSLE	QTSHTLHLSHLN OTSHTLHLSHLN	R 180 R
Sbjct	121	LLKSF	APPI	LHVAALG	QKQGILGA	QPQLIFQP	HRIPPLFP	OKPLSLE	QTSHTLHLSHLN	R 180
Query	181	FPARG	PHGE	RLDQGRSD	DYDSKKRK DYDSKKRK	QRAGGEPW ORAGGEPW	GAKKPRHDI GAKKPRHDI	LPPYRVE	LTPYTVDSPICD	F 240
Sbjct	181	FPARC	PHGF	RLDQGRSD	DYDSKKRK	QRAGGEPW	GAKKPRHD	LSPYRVE	LTPYTVDSPTCD	F 240
Query	241	LELOR	RYRS	SLLVPSDF	LSVHLSWL	SAFPLSQP	FSLHHPSR:	IQVSSER	EAAPDAGAEPIT	A 300
Sbjct	241	LELQF	RYRS	LLVPSDF	LSVHLSWL	SAFPLGQP	FSLHHPSR	IQVSSEP	EAAPDTGAEPSP	E 300
Query	301	DSDPA	YSSE	VLLLSSP	GLEELYRC	CMLEVDDM	AEPRETPE	HPLKOI	FLLGRKEEEAVL	V 360
Sbjct	301	DSDPT	YSSI	VLLLSSP	GLEEFYRC	CMLFVDDM	AEPRETPE	HPLKOL	FLLGRKEEEAVL	v 360
Query	361	GGEWS	PSLE	GLDPOAD	POVLVRTA	IRCAQAQT	GIDLS CT	KWWRFAE	FOYLOPGPPERL	2 420
Sbjct	361	GGEWS	PSLI	GLDPQAD	PQVLVRTA	IRCAQAQT	GIDLSTCT	KWWRFAE	FQYLQPGPPRQL	H 420
Query	421	TVVVY	LPD	WTIMPTL	EEWEALCO	OKAAEAAF	PTQEAQGE	E TEOR	PDALEQAADTSR	R 480
Sbjct	421	TVVVY	LPDV	WTIMPTL	EEWEALCQ	QKATEAAP	QPHEASGE	AEATEQ	PDVSEQ-ADTSK	Q 479
Query	481	NAETF	EATT	COCT DTD	LPEAPPPP	LEPAVIAR	PGCVNLSL	HGIVEDE	RPKERISFEVMV	L 540
Sbjct	480	NTETM	EATI	QODVDTD	LPEAPPPP	LEPAVMAR	PRCVNLSL	YGIVEDR	RPKERISFEVVV	L 539
Query	541	AELFI	EMLO	RDFGYRV	YKMLLSLP	EKVVSPPE	PEKEEAAK	EEATKER	EAIKEEVVKEPK	D 600
Sbjct	540	AELFV	EML	RDFGYRI	YKTLLSLP	EKVVSPPE	PEKEEAAK	EDAVKER	EAVKEEAVKVSK	D 599
Query	601	EAQNE E ONE	GPAT	ESTAPLK	EDGLLPKP	LSSGGEEE	EKPRGEAS	EDLCEMA	LDPELLLLRDDG	E 660
Sbjct	600	EVQNE	GTAP	ESDSPLK	EDGLLPKR	PSSGGEEE	EKARGEAA	EDLCEMA	LDPDLLLLRDDG	E 659
Query	661	EEFAG	AKLE	DSEVRSV	ASNOSEME	FSSLQDMP	KELDPSAV	LPLDCLI	AFVFFDANWCGY	L 720
Sbjct	660	DEFAC	AKLE	ETEVRSV	ASNQSEME	YSSLQDMP	KELDPSTV	LPLDCLI	AFVFFDANWCGY	L 719
Query	721	HRRDI	ERI	LTLGIRL	SAEQAKQL	VSRVVTQN	ICOVESLO	YSRQEGI	DGGLPEEVLFGN	L 780
Sbjct	720	HRRDI	ERVI	LTLGIRL	SAEQAKQL	VSRVVAQN	ICQYRSLQ	YSRAEVI	DDGLPEDVLFGN	L 779
Query	781	DLLPP	PGKS	TKPGAAP	TEHKALVS	HNGSLINV	GSLLORAE	ODSGRI	YLENKIHTLELK	L 840
Sbjct	780	DLLPF	SGKS	STKPGAAP	TEHRGLVP	HNGSLINV	GSLLQRAE	QQDSGRI	YLENKIHTLELK	L 839
Query	841	EESHN	RFSA	TEVTNKT	LAAEMQEL	RVRLAEAE	ETARTAER	OKSOLOF	LLOELRRRLTPL	900
Sbjct	840	EESHN	RFSA	TEVTNKT.	LAAEMQEL	RARLAEAE	ETARTAER	QKNQLQF	QMQDFRRRLTPL	H 899
Query	901	LEIQE	VVER	ADSWVEK	EEPAPSN	923				
Sbjct	900	LEMOR	IVER	ADSWVEK	EEPTPSN	922				
	S1-Like	•		NLS		LZ [Nud	ix [EF-Hand	cc

t

Figura 2.12. Proteínas DBC1 humana y murina. Alineamiento de secuencias aminoacídicas de las proteínas DBC1 humana (*Query*, NCBI, Nro. Acceso NP_066997.3) y murina (*Sbjct*, NCBI, Nro. Acceso NP_666167.3), mostrando el rango aminoacídico que comprende cada uno los dominios y la secuencia de localización nuclear, y las sustituciones aminoacídicas presentes en estos (destacadas mediante recuadros rojos).

2.2.3.1. Interacción con factores de transcripción y co-reguladores

La interacción de DBC1 con factores de transcripción ha mostrado ser tanto de tipo coactivadora como co-represora. Entre los factores de transcripción que son activados por DBC1 se encuentran **c-MYC** (232, 233), producto del proto-oncogén *c-MYC* e involucrado en la regulación del ciclo celular, los procesos de diferenciación y competencia celular (234, 235); COUP-TF1 y su co-represor NCoR (236), que participan en la regulación de neurogénesis y angiogénesis durante el desarrollo embrionario (237) ; el receptor de andrógeno (Androgen receptor, AR) (215), que media los efectos de los andrógenos en el desarrollo y mantenimiento de funciones reproductivas masculinas (238); el receptor de estrógeno a (Estrogen receptor a, ER a) y sus co-activadores CCAR1 y CoCoA (214, 239), que median los efectos de los estrógenos en el desarrollo y mantenimiento de la funciones reproductivas femeninas (240); **RevErb** α (231), considerado como uno de los mayores reguladores del ciclo circadiano (241-244); y p53 (245), producto del gen supresor de tumores p53 e involucrado en el control del ciclo celular, y extensamente estudiado por el hecho de estar suprimido en casi la mitad de los tipos de cáncer en humanos (246, 247). Entre los factores de transcripción que son reprimidos por DBC1 se encuentran el receptor de estrógeno β (*Estrogen receptor* β , ER β) (248), que junto al ER α media los efectos de los estrógenos en el desarrollo y mantenimiento de la funciones reproductivas femeninas (240, 249); BRCA1 (250), que participa en la regulación de la recombinación homóloga, la replicación de centrosomas, las respuesta de daño al ADN, y el control del ciclo celular, y extensamente estudiado por el hecho de estar suprimido en casi un 5% de casos de cáncer de mama y más de un 80% de los cáncer de mama hereditarios (251–254); FOXOP3 (255), que participa en la diferenciación y función de linfocitos T Reguladores (256, 257); el receptor hepático X alfa (Liver X receptor a, LXRa) (258), que participa en la homeostasis de colesterol (259) y con ReIB y p52 (260, 261), subunidades del complejo NFκB esenciales en la vía de activación alternativa de la respuesta inflamatoria mediadas por dicho complejo (262, 263).

2.2.3.2. Interacción con modificadores post-traduccionales

La interacción de DBC1 con modificadores post-traduccionales ha mostrado ser tanto de tipo activadora como represora. Entre los modificadores post-traduccionales que son activados por DBC1 se encuentran las quinasas IKK β (261, 264) e IKK α (261), involucradas en las respuestas inflamatorias mediadas por el complejo NF κ B al ser componentes esenciales de la vía de activación clásica y alternativa, respectivamente (265–270); y PARP1 (226), una

polimerasa poli-ADP-ribosa que cataliza la poli-ADP-ribosilación de sí misma y diversas proteínas y es fundamental en la respuestas de daño al ADN (271). Entre los modificadores post-traduccionales que son reprimidos por DBC1 se encuentran SUV39H1 (272), una metiltransferasa que cataliza la tri-metilación de la lisina 9 de la histona H3 y es fundamental en el proceso de armado de heterocromatina para la segregación de cromosomas y el silenciamiento génico (273-275); HDAC3 (222), una desacetilasa de histonas de clase I cuya actividad se encuentra fuertemente vinculada al silenciamiento génico (276-278); y SIRT1 (221), una deacilasa dependiente de NAD+ que cataliza deacilación de lisinas en histonas (279, 280), factores de transcripción (281–285) y otras proteínas (286–288). Siendo así, la actividad de SIRT1 se encuentra vinculada con procesos celulares tan diversos como la estabilidad genómica (289), la respuesta al estrés celular (290)(282), la respuesta inflamatoria (291) y la homeostasis del metabolismo (292). Específicamente, SIRT1 está involucrada en los procesos de secreción de insulina (287, 293, 294), sensibilidad a insulina (295, 296), gluconeogénesis (287, 293), oxidación de ácidos grasos (297), adipogénesis (298–300), expresión de adipoquinas (301) y browning (286, 302, ver Anexo). SIRT1 resulta especialmente relevante, porque es debido a su involucramiento en el metabolismo que se planteó la hipótesis de que DBC1 también pudiese estar jugando algún tipo de rol en este.

2.2.3.3. Dominios involucrados en las interacciones

Respecto a las interacciones entre DBC1 y las proteínas arriba mencionadas, tanto factores de transcripción como modificadores post-traduccionales, el análisis topológico de las mismas señala que la mayoría de ellas involucran a la región N-terminal de DBC1 (214, 215, 221, 222, 245, 248, 250, 272). De hecho, el único caso reportado en que la región C-terminal de DBC1 está involucrada en la interacción es el del factor de transcripción RevErb α (231). Lo anterior tiene fuertes implicancias en cuanto a la simultaneidad de las interacciones entre DBC1 y sus interactores. Por una lado, algunos de los modificadores post-traduccionales que interactúan con DBC1 actúan sobre algunos de los factores de transcripción que interactúan con DBC1; es el caso de SIRT1, que actúa sobre AR (303), c-MYC (233) y p53 (281); y de IKK α , que actúa sobre ER α (304). Siendo así, en caso de estar interaccionando a la vez y en la misma región de la proteína, podría verse favorecida la actividad de tales enzimas sobre sus respectivos blancos. Por otro lado, si las proteínas que interactúan con DBC1 presentan el mismo sitio de unión o muy cercanos entre sí, la interacción de varias de estas podría verse impedida por limitaciones estéricas, dando lugar a respuestas celulares diferentes. En este sentido, son varios los casos de "competencia" entre interactores de

34

DBC1 que han sido reportados (214, 222, 226, 233, 258, 272). Por último, el hecho que la mayoría de las interacciones descritas involucren a la región N-terminal de DBC1 toma especial relevancia ante la aparición de una isoforma de la proteína que carece de parte de su extremo N-terminal. Lo anterior ha sido descrito por varios grupos (209, 305, 306) y también en este trabajo, y será desarrollado más adelante. La *Figura 2.13.* muestra un esquema de la estructura lineal de la proteína y el sitio de interacción de algunos de los factores de transcripción y modificadores post-traduccionales previamente descritos.



Figura 2.13. Regiones de interacción en la proteína DBC1. Esquema de la estructura lineal de la proteína DBC1 humana, mostrando algunos de sus interactores y señalando la región de interacción descrita para cada uno de ellos. Las líneas con punta de flecha corresponden un efecto activador por parte de DBC1. Las líneas con extremo romo corresponden un efecto represor por parte de DBC1. Los interactores que no se muestran en la figura son aquellos de los cuales se desconoce la región de interacción (Adaptado de 207, 307).
2.2.3.3. Participación en los diferentes procesos celulares

Dadas las características de las proteínas con las cuales DBC1 interactúa y modula su actividad, podemos decir que nos encontramos ante un regulador a gran escala del proteoma celular. Cada factor de transcripción es responsable de cambios en la expresión de una amplia gama de genes (308, 309), y cada modificador post-traduccional es responsable de cambios en la actividad de una amplia gama de proteínas (310), de las cuales varias resultan estar involucradas en la regulación de la expresión génica. En suma, cambios en la expresión y/o actividad biológica de DBC1 se traducen en cambios en la expresión y/o actividad biológica de una vasta cantidad de proteínas y por ende, cambios en una vasta cantidad de procesos celulares. Las proteínas descritas páginas atrás, son solo aquellas sobre las cuales existe un estudio lo suficientemente detallado para evaluar el efecto que DBC1 ejerce sobre estas. No obstante, los avances en estudios proteómicos de gran alcance mediante el uso de espectrometría de masa han derivado en la identificación de una enorme cantidad de nuevos potenciales interactores (307, 311). A pesar de que cada una de estas interacciones y su relevancia biológica han de ser confirmadas, desde ya pueden brindarnos una noción preliminar más amplia sobre la implicancia de DBC1 en los diferentes procesos celulares. Recientemente, el grupo liderado por lleana M. Cristea publicó un trabajo en el cual mediante inmunoprecipitación y posterior análisis por espectrometría de masa, identificaron el interactoma completo de DBC1 en dos tipos celulares. La evidencia generada en este estudio, junto a la generada en los estudios previamente descritos, demuestra que DBC1 a través de sus interacciones, estaría potencialmente regulando el remodelamiento de la cromatina y la condensación y segregación de cromosomas, la replicación de ADN, la transcripción de ARNm, la traducción de proteínas, el tráfico intracelular, la transducción de señales, la respuesta al daño de ADN, las respuestas inflamatorias, el control del ciclo celular, entre otras (311). Además, el hecho de que las interacciones de DBC1 puedan ser tanto compartidas como específicas entre diferentes tipos celulares (311), sugiere que la totalidad de los procesos celulares en los que puede estar involucrada requerirá estudios aún más minuciosos y queda entonces por determinarse.

2.2.3.4. Participación en patologías metabólicas

El hecho de que DBC1 se tratase de un represor de SIRT1, planteó la hipótesis de que también estuviese involucrada en la homeostasis del metabolismo. Varios grupos de investigación comenzaron a estudiar su participación en el desarrollo y progresión de diversas patologías metabólicas, destacándose los trabajos llevados a cabo por el Investigador Principal de nuestro laboratorio y Orientador de esta tesis, Dr. Carlos Escande. En dichos trabajos gueda demostrado que DBC1 no solo se encuentra involucrada en la homeostasis del metabolismo, sino que tiene un rol clave en la obesidad y el desarrollo de las patologías típicamente asociadas a esta (312-314). Cuando ratones C57BL/6 WT y DBC1 KO son sometidos a una dieta hipercalórica como la dieta Western (DW), los ratones DBC1 KO desarrollan una obesidad más pronunciada que sus contrapartidas WT. Sin embargo, a pesar de ser más obesos, presentan un fenotipo metabólico más saludable, y hasta comparable al de ratones mantenidos en dieta normal (DN). A saber, 1. Presentan niveles normales de ácidos grasos libres en plasma; 2. No presentan signos de resistencia a la insulina, mostrando una buena performance ante tests de tolerancia a la insulina y activación normal de la vía de insulina tanto en tejido adiposo como en músculo esquelético; 3. No presentan signos de esteatosis hepática ni esteatohepatitis, mostrando escasa acumulación de lípidos en el hígado y niveles normales de enzimas hepáticas asociadas a daño, como la glutamato-piruvato transaminasa y glutamato-oxalacetato transaminasa; y 4. Presentan menor grado de aterosclerosis, mostrando un menor porcentaje de área total de la aorta cubierta por placas de ateroma, un menor número de placas de ateroma por aorta, y una menor expresión de marcadores de inflamación y daño como p21, p65/ReIA, MCP-1, VCAM-1 y F4/80 (312, 314). La Figura 2.14. muestra una breve selección de resultados de estos trabajos que ilustran lo recién mencionado.

El hecho de que los ratones DBC1 KO presenten niveles normales de ácidos grasos libres en plasma resulta clave, porque es indicativo de un estado saludable y funcional del tejido adiposo, que conserva su capacidad expansiva. De hecho, la mayor ganancia de peso de los ratones DBC1 KO se debe específicamente a un aumento en la masa total de los diferentes depósitos de tejido adiposo, tanto subcutáneo como visceral. Dicho aumento puede deberse tanto a una disminución en la actividad lipasa como a un aumento en la capacidad de síntesis y almacenamiento de lípidos. El tejido adiposo derivado de los ratones DBC1 KO no presentan cambios significativos en la expresión de las principales lipasas ATGL y HSL, ni tampoco en otras proteínas directamente asociadas a la lipólisis, como la caveolina 1. Por el

37

contrario, sí presenta un aumento en la expresión de proteínas y en la activación de vías asociadas a la esterificación de ácidos grasos en triglicéridos. Específicamente, se registra un aumento en la expresión de la enzima PEPCK, fundamental en el procesos de gliceroneogénesis, y un aumento en la capacidad de gliceroneogénesis evaluada *ex vivo*; así como también un aumento en la expresión de la proteína Lipin-1. Lo anterior queda reflejado en una mayor hipertrofia de los adipocitos, que pueden alcanzar tamaños de 3-10 veces mayor que el de los derivados de ratones WT. No obstante, el mayor aumento en la masa total de los diferentes depósitos de tejido adiposo también podría deberse a un proceso de hiperplasia, ya que los preadipocitos derivados de ratones DBC1 KO presentan una mayor capacidad de diferenciación, con un aumento en la expresión de proteínas asociadas a la adipogénesis (312). La *Figura 2.15*. muestra una breve selección de resultados de este trabajo que ilustran lo recién mencionado.

Por último, el tejido adiposo derivado de ratones DBC1 KO presenta menor grado de senescencia, mostrando una menor actividad de la enzima SA- β Gal, y una menor expresión de las proteínas p16^{lnk4a} y p21. Lo anterior se condice además con un fenotipo menos proinflamatorio, con una menor expresión de MCP1, TNF- α e IL-6 (312, 313). La *Figura 2.16.* muestra una breve selección de resultados de estos trabajos que ilustran lo recién mencionado.

La evidencia generada en los trabajos recién mencionados demuestra que la proteína DBC1 efectivamente se encuentra involucrada en la homeostasis del metabolismo, y que además tiene un rol clave en el desarrollo de la obesidad y las patologías típicamente asociadas a esta. De hecho, resultados similares fueron hallados en tejidos derivados de pacientes (315, 316), reforzando la noción de que la proteína DBC1 se trate de un potencial blanco terapéutico. Nuestro grupo de investigación considera que el estudio de DBC1 puede colaborar en el entendimiento de los mecanismos celulares y moleculares que subyacen el desarrollo de las patologías típicamente asociadas a la obesidad. Específicamente, en este trabajo se pretende profundizar sobre el rol de DBC1 en el desarrollo del fenotipo proinflamatorio observado durante la obesidad, e identificar los estímulos fisiológicos que se encuentren modulándolo.

38



Figura 2.14. Fenotipo metabólico de los ratones DBC1 KO. A. Foto representativa de ratones WT (izquierda) y DBC1 KO (derecha) luego de 4 semanas bajo DW, y gráfico de ganancia de peso expresado como porcentaje de su peso inicial, durante 20 semanas bajo DW. **B.** Nivel de ácidos grasos en plasma en ratones WT y DBC1 KO luego de 12 semanas bajo dieta normal (DN) o DW. **C.** *Test* de tolerancia a la insulina en ratones WT y DBC1 KO luego de 20 semanas bajo DW. **D.** Tinción de hematoxilina-eosina de secciones de hígado de ratones WT y DBC1 KO luego de 20 semanas bajo DN o DW. **E.** Tinción con *Oil-RedO* de aortas de ratones WT y DBC1 KO luego de 20 semanas bajo DW, y gráfico de porcentaje de área total de la aorta cubierta por placas de ateroma y número de placas por aorta. *Aclaración: el background genético de los ratones de la figura E es ApoE^{-/-}/DBC1^{+/+} (WT) y ApoE^{-/-}/DBC1^{-/-} (<i>DBC1 KO*), porque el background ApoE^{-/-} es el más adecuado para estudiar procesos de aterosclerosis en ratón (317) . Se consideran diferencias estadísticamente significativas aquellas que presentan un valor de p < 0.05 y se indica con un asterisco (Adaptado de 312, 314)



Figura 2.15. Capacidad expansiva de tejido adiposo de ratones DBC1 KO. A. Gráfico de ganancia de peso de grasa expresado como porcentaje de su peso inicial, en ratones WT y DBC1 KO durante 20 semanas bajo DW (Izquierda); y gráfico de peso de los diferentes depósitos de tejido adiposo expresado como porcentaje del peso corporal total, en ratones WT y DBC1 KO luego de 12 semanas bajo DW. B. Foto representativa de adipocitos de tejido adiposo perigonadal de ratones WT y DBC1 KO luego 20 semanas bajo DW; y gráfico de área celular expresado en μm². **C.** Foto representativa de preadipocitos aislados de tejido adiposo perigonadal de ratones WT y DBC1 KO luego de cultivados son inducidos a diferenciarse en adipocitos; y gráfico de expresión de ARNm de marcadores de adipogenesis FABP4, CEBP-α y PPAR-γ. Se consideran diferencias estadísticamente significativas aquellas que presentan un valor de p < 0.05 y se indica con un asterisco (Adaptado de 312).



Figura 2.16. Fenotipo proinflamatorio en tejido adiposo de ratones DBC1 KO. A. Gráfico porcentaje de células β-Gal positivas en tejido adiposo inguinal de ratones WT y DBC1 KO luego 12 semanas bajo DW. B. Expresión de ARNm de marcadores de senescencia p16^{lnk4a} y p21 y marcadores de moléculas proinflamatorias MCP1, TNF-α y IL-6 en tejido adiposo inguinal de ratones WT y DBC1 KO luego 12 semanas bajo DW. Se consideran diferencias estadísticamente significativas aquellas que presentan un valor de p < 0.05 y se indica con un asterisco (Adaptado de 313).

3. Objetivos

3.1. Objetivo General

Comprender los mecanismos celulares y moleculares que subyacen el vínculo entre la obesidad y las patologías típicamente asociadas a esta. Establecer el rol de la proteína DBC1 en dichos mecanismos y evaluar su potencial como blanco terapéutico.

3.2. Objetivo Específico

 Establecer el rol de la proteína DBC1 en el desarrollo del fenotipo proinflamatorio observado en la obesidad e identificar los estímulos fisiológicos que se encuentren modulándolo.

4.1. Experimentación con cultivos celulares

4.1.1. Crecimiento y mantenimiento de células

El crecimiento y mantenimiento de células fue llevado a cabo en condiciones estándar, en cámara húmeda a 37°C y CO₂ al 5%. A menos de ser especificado de otra manera, el medio de cultivo utilizado es *Dulbecco's Modified Eagle Medium* con glucosa 4.5 g/L (DMEM – Thermo Fisher Scientific, Nro. Catálogo 61965026), suplementado con suero fetal bovino al 10% (*Fetal Bovine Serum*, FBS –Thermo Fisher Scientific, Nro. Catálogo 16000044), Glutamina 2 mM (Thermo Fisher Scientific, Nro. Catálogo 15630080), Penicilina 10000 U/mL y Estreptomicina 10000 µg/mL (Thermo Fisher Scientific, Nro. Catálogo 15140122); y los lavados se realizan con *Phosphate-Buffered Saline* (PBS – Thermo Fisher Scientific, Nro. Catálogo 14190094).

La obtención de Fibroblastos Embrionarios de Ratón (Mouse Embryonic Fibroblasts, MEFs) fue llevada a cabo según lo descrito en la literatura (318) y bajo el Protocolo Nro. 014-14 aprobado por la Comisión de Ética en el Uso de Animales del Institut Pasteur Montevideo. Brevemente, hembras C57BL/6 wild type (WT) y DBC1 knock out (KO) con 14 días de preñez son anestesiadas mediante inyección intraperitoneal de ketamina-xilacina (120 y 16 mg/kg, respectivamente) y eutanasiadas mediante dislocación cervical. Utilizando material quirúrgico estéril se procede a realizar una incisión longitudinal en el abdomen para dejar expuesta la cavidad peritoneal. Se procede entonces a seccionar y extraer el útero, que es entonces transferido a un tubo Falcon de polietileno de 50 mL estéril conteniendo PBS. A partir de este momento, se procede a trabajar en Cámara de Flujo Laminar para mantener las condiciones de esterilidad. El útero es transferido a una placa de cultivo conteniendo PBS, donde se lleva a cabo la disección de la pared uterina y extracción de los embriones individuales, y luego la disección de cada saco vitelino y extracción de los fetos individuales. Los fetos son transferidos a una nueva placa de cultivo conteniendo PBS, donde se lleva a cabo la disección y extracción de la cabeza, corazón e hígado. El resto de cada feto es lavado con abundante PBS para remover la sangre remanente y luego transferido a una nueva placa de cultivo conteniendo Tripsina-EDTA 0.25% (Thermo Fisher Scientific, Nro. Catálogo 25200056), donde se lleva a cabo su corte en trozos pequeños. La suspensión es

transferida a tubos Falcon de polietileno de 15 mL estéril conteniendo Tripsina-EDTA 0.25% fría a razón de 3 mL por feto, y se incuban durante toda la noche a 4°C. A la mañana siguiente, se conserva el tejido acumulado en el fondo del tubo y parte de la solución de Tripsina-EDTA 0.25%, y se incuba durante 30 minutos a 37°C. Posteriormente se añade medio de cultivo y se procede a disgregar mecánicamente las células mediante el uso de micropipeta hasta lograr una suspensión homogénea. Dicha suspensión es entonces transferida a placas de cultivo y el crecimiento y mantenimiento de las células es llevado a cabo en condiciones estándar.

La obtención de Macrófagos Derivados de Médula Ósea (Bone Marrow Derived Macrophages, BMDM) fue llevada a cabo según lo descrito en la literatura (319) y bajo el Protocolo Nro. 012-14, aprobado por la Comisión de Ética en el Uso de Animales del Institut Pasteur Montevideo. Brevemente, ratones C57BL/6 WT y DBC1 KO son anestesiados mediante inyección intraperitoneal de ketamina-xilacina (120 y 16 mg/kg, respectivamente) y eutanasiados mediante dislocación cervical. Utilizando material quirúrgico estéril se procede a realizar una incisión transversal en el abdomen y a remover la piel de las extremidades, para su posterior disección y extracción. Las extremidades son transferidas a tubo Falcon de polietileno de 50 mL estéril conteniendo PBS. A partir de este momento, se procede a trabajar en Cámara de Flujo Laminar para mantener las condiciones de esterilidad. Se procede a remover completamente el tejido muscular circundante y a desgarrar las articulaciones para conservar húmero, tibia y peroné de forma individual. Los mismos son transferidos a una placa de cultivo conteniendo medio de cultivo, donde son cortados en ambos extremos, para dejar expuesta la médula ósea. Utilizando una jeringa 25G estéril, se procede a inyectar medio de cultivo en uno de los extremos abiertos, para que el contenido de medular salga expulsado a través del otro extremo abierto. Posteriormente, se procede a disgregar mecánicamente el contenido medular mediante el uso de la jeringa hasta lograr una suspensión homogénea. Dicha suspensión es entonces transferida a placas de cultivo y el crecimiento y mantenimiento de las células es llevado a cabo en condiciones estándar. A destacar, el medio de cultivo utilizado en este caso es DMEM con glucosa 4.5 g/L, suplementado con medio condicionado de células L929 al 30%, FBS al 20%, Glutamina 2 mM, HEPES 10 mM, Penicilina 10000 U/mL y Estreptomicina 10000 µg/mL.

El crecimiento y mantenimiento de las líneas celulares **3T3-L1** (ATCC, Nro. Catálogo. CL-173), **HEPG2** (ATCC, Nro. Catálogo HB-8065) e **IMR-90** (ATCC, Nro. Catálogo CCL-186) fue llevado a cabo en condiciones estándar.

44

4.1.2. Tratamientos farmacológicos

El silenciamiento transitorio de proteínas fue llevado a cabo en células MEF, BMDM y 3T3-L1 crecidas y mantenidas en condiciones estándar. Brevemente, una vez que las células alcanzan una confluencia de 70-80%, el medio de cultivo es remplazado por medio de cultivo sin antibióticos. Se prepara una mezcla de Lipofectamine RNAiMax (Thermo Fisher Scientific, Nro. Catálogo 13778075) y el ARN pequeño de interferencia (small interfering RNA, siRNA) a utilizar, en medio Opti-MEM (Thermo Fisher Scientific, Nro. Catálogo 51985034). Dicha mezcla es añadida al medio de cultivo por goteo y se procede a incubar las células durante 6-24 horas en condiciones estándar. Posteriormente el medio de cultivo conteniendo la mezcla es reemplazado por medio de cultivo fresco con antibióticos y se procede a incubar las células durante 48-72 horas en condiciones estándar, para lograr el silenciamiento óptimo de la proteína de interés. Finalmente, se procede a colectar las células para su posterior procesamiento y análisis mediante Western blot (véase sección 4.3.1 Western blot). Los siRNA utilizados fueron siRNA Control Negativo (Thermo Fisher Scientific, Nro. Catálogo 4390846), siRNA DBC1 (Thermo Fisher Scientific, Oligo ID MSS211964), siRNA SIRT1 (Thermo Fisher Scientific, Oligo ID MSS234959), y siRNA FSTL1 (Thermo Fisher Scientific, Oligo ID MSS204432). Todos los siRNA fueron utilizados en concentración 30 nM respecto al volumen de medio de cultivo.

Los tratamientos con **Insulina** (Merck, Nro. Catálogo 91077C), **Factor de Crecimiento Semejante a la Insulina 1** (*Insulin Growth Factor 1*, IGF1 –Merck, Nro. Catálogo I3769 y I8779), **Factor de Necrosis Tumoral alfa** (*Tumor Necrosis Factor alpha*, TNF- α –Merck, Nro. Catálogo T0157 y T7539) y **Lipopolisacárido** (LPS –Merck, Nro. Catálogo L4391), fueron llevados a cabo en células 3T3-L1 y HEPG2 crecidas y mantenidas en condiciones estándar. Brevemente, una vez que las células alcanzan una confluencia de 50-60%, el medio de cultivo es reemplazado por medio de cultivo con FBS al 1% y se procede a incubar las células durante 24 horas en condiciones estándar. Posteriormente, se procede a añadir el estímulo correspondiente por goteo y a incubar las células durante 24 horas en condiciones estándar. Finalmente, se procede a colectar las células para su posterior procesamiento y análisis mediante Western blot. Las concentraciones utilizadas fueron 0, 100, 300, 500, 700 y 1000 ng/mL para los estímulos de Insulina e IGF1; y 0, 10, 30, 50, 70 y 100 ng/mL para los estímulos de TNF- α y LPS.

4.1.3. Inducción de arresto celular

La inducción de arresto celular mediante inhibición por contacto fue llevada a cabo en células 3T3-L1, HEPG2 e IMR-90 crecidas y mantenidas en condiciones estándar. Una vez que las células alcanzan una confluencia del 100%, el medio de cultivo es reemplazado por fresco y se procede a incubar las células en condiciones estándar, sin reposición de medio. Se procede a colectar las células 1-9 días después de alcanzar el 100% de confluencia, según lo indicado en cada experimento, para su posterior procesamiento y análisis mediante Western blot. El **reingreso al ciclo celular** se lleva a cabo mediante la recuperación de las células con Tripsina-EDTA 0.25%, su re-plaqueo en dilución 1:2 en una nueva placa de cultivo, y su incubación durante 24-48 horas en condiciones estándar. Finalmente, se procede a colectar las células para su posterior procesamiento y análisis mediante Western blot.

La inducción de arresto celular mediante privación de suero fue llevada a cabo en células IMR-90 crecidas y mantenidas en condiciones estándar. Una vez que las células alcanzan una confluencia del 50-60%, el medio de cultivo es reemplazado por medio de cultivo con FBS al 0.2% y se procede a incubar las células durante 24 horas en condiciones estándar, sin reposición de medio. Finalmente, se procede a colectar las células para su posterior procesamiento y análisis mediante Western blot. El **reingreso al ciclo celular** se lleva a cabo mediante el reemplazo del medio de cultivo por medio de cultivo con FBS al 10% y la incubación de las células durante 24-48 horas en condiciones estándar. Finalmente, se procede a colectar las células mediante Western blot.

La inducción de arresto celular mediante senescencia fue llevada a cabo en células IMR-90 según lo descrito en la literatura (320, 321). Brevemente, células IMR-90 de bajo pasaje (*Population Doubling Level*, PDL entre 25-36) son cultivadas en condiciones estándar. 24-48 horas luego de ser plaqueadas, las células son transducidas con lentivirus conteniendo un plásmido de expresión para H-RAS G12V –sustitución de la glicina 12 por una valina– y resistencia a Puromicina, para la posterior selección de las células infectadas. Dos semanas después de la transducción, las células presentan un fenotipo senescente y se procede a colectarlas para su posterior procesamiento y análisis mediante Western blot.

4.2. Experimentación con tejidos

4.2.1 Tejidos derivados de ratón

Los ratones utilizados fueron criados y alojados en el Bioterio libre de patógenos específicos (*Specific Pathogen Free*, SPF) de la Unidad de Animales Transgénicos y de Experimentación del Institut Pasteur Montevideo. Todos los procedimientos se llevaron a cabo bajo protocolos aprobados por la Comisión de Ética en el Uso de Animales del Institut Pasteur Montevideo y cumplen con las normativas locales e internacionales respecto a la experimentación animal. Se utilizaron ratones C57BL/6 WT y DBC1 KO, machos y hembras, de edad comprendida en el rango de 1 semana a 2 años, mantenidos bajo dieta normal (ración *ad líbitum* –LabDiet, Nro. Catálogo 5K67; agua *ad líbitum*) bajo el Protocolo Nro. 014-14 aprobado por la Comisión de Ética en el Uso de Animales del Institut Pasteur Montevideo, según se especifica en cada experimento.

4.2.1.1. Tejido hepático

La **disección de hígado** fue llevado a cabo bajo el protocolo Nro. 014-14 aprobado por la Comisión de Ética en el Uso de Animales del Institut Pasteur Montevideo. Brevemente, los ratones son anestesiados mediante inyección intraperitoneal de ketamina-xilacina (120 y 16 mg/kg, respectivamente) y eutanasiados mediante dislocación cervical o exanguinación, en caso de requerirse una muestra significativa de sangre. Utilizando material quirúrgico estéril se procede a realizar una incisión longitudinal en el abdomen, hasta la altura del el apófisis xifoides, para dejar expuesta la cavidad peritoneal y el hígado con sus cuatro lóbulos, o sus dos lóbulos remanentes, en caso de haberse practicado hepatectomía parcial. Se procede entonces a seccionar y extraer dichos lóbulos para su posterior procesamiento y análisis mediante Western blot.

La hepatectomía parcial de hígado fue llevada a cabo según lo descrito en la literatura (322) y bajo el Protocolo Nro. 09-16 aprobado por la Comisión de Ética en el Uso de Animales del Institut Pasteur Montevideo. Brevemente, ratones C57BL/6 WT o DBC1 KO mantenidos en dieta normal son anestesiados de forma transitoria; específicamente, el ratón es colocado en cámara de anestesia inhalatoria con flujo de oxígeno de 1 L/min e isoflurano al 3% durante 2 minutos. Una vez alcanzada el plano anestésico profundo, este se preserva durante todo el transcurso de la cirugía mediante el uso de un cono nasal con flujo de

oxígeno de 0.5 L/min e isoflurano al 1.5 - 2.5%. Utilizando material quirúrgico estéril se procede a realizar una incisión longitudinal en el abdomen, hasta la altura del el apófisis xifoides, para dejar expuesta la cavidad peritoneal y el hígado con sus cuatro lóbulos, a saber, lóbulo derecho, lóbulo medio, lóbulo izquierdo y lóbulo caudal. Primeramente, se procede a seccionar el ligamento que conecta el lóbulo medio con la vena cava y la membrana que une el lóbulo caudal y el lóbulo izquierdo. Posteriormente, se procede a desplegar el hígado de modo tal que el lóbulo medio e izquierdo permanezcan retirados hacia el diafragma. Utilizando hilo de sutura de seda 4/0 se realiza un lazo alrededor de la base del lóbulo medio y otro alrededor de la base del lóbulo izquierdo. Segundos después, la interrupción del flujo sanguíneo hacia los mencionados lóbulos se reflejará en su cambio de coloración. Se procede entonces a seccionar ambos lóbulos justo por debajo de los lazos y luego a cerrar el peritoneo mediante hilo de sutura de seda 5/0 y la piel mediante clips quirúrgicos. Los ratones control (no hepatectomizados) comparten género y edad de los hepatectomizados y son sometidos al mismo procedimiento pero solo hasta la incisión longitudinal en el abdomen. Una vez realizada esta, se procede a cerrar el peritoneo mediante hilo de sutura de seda 5/0 y la piel mediante clips quirúrgicos. La disección de hígado se lleva cabo a las 24, 36, 48, 72 horas o 1 semana post cirugía, según lo especificado en cada experimento.

4.2.1.2. Tejido adiposo

La disección de tejido adiposo fue llevado a cabo según lo descrito en la literatura (323) y bajo el Protocolo Nro. 014-14. aprobado por la Comisión de Ética en el Uso de Animales del Institut Pasteur Montevideo. Brevemente, ratones C57BL/6 WT y DBC1 KO son anestesiados mediante inyección intraperitoneal de ketamina-xilacina (120 y 16 mg/kg, respectivamente) y eutanasiados mediante dislocación cervical. Utilizando material quirúrgico estéril se procede a realizar una incisión longitudinal en el abdomen para dejar expuesta la cavidad peritoneal. Se procede entonces a seccionar y extraer el tejido adiposo visceral para su posterior procesamiento y análisis mediante Western blot.

4.2.2. Tejidos derivados de humano

Se utilizó tejido adiposo visceral y subcutáneo de dos cohortes diferentes. La primer cohorte son mujeres y hombres obesos con Diabetes Tipo 2 (BMI > 30 kg/m², n = 10, Rango etario: 26-48 años, Media etaria: 37.2 años), gentileza del Dr. Steen Bønløkke Pedersen, del Departamento de Endocrinología y Metabolismo de la Universidad de Aarhus, Dinamarca. La segunda cohorte son mujeres obesas (BMI > 30 kg/m²) con Diabetes Tipo 2 (n = 6, Rango etario: 29-57 años, Media etaria: 45.5 años) y metabólicamente saludables (n = 6, Rango etario: 38-59 años, Media etaria: 47.2 años), gentileza del Dr. José Manuel Fernández-Real, del Departamento de Diabetes, Endocrinología y Nutrición del Hospital de Girona 'Dr. Josep Trueta', Barcelona, España.

4.3. Técnicas analíticas

4.3.1. Western blot

4.3.1.1. Procesamiento de muestras

Todas las muestras generadas para el análisis mediante Western blot fueron procesadas de modo similar. El buffer de lisis utilizado consta de buffer NTEN (Tris-HCl pH 7.4 20 mM, NaCl 100 mM, EDTA 1 mM, IGEPAL al 0.5% –Merk, Nros. Catálogo T1503, S3014, E6758, I8896, respectivamente) suplementado con NaF 5 mM (Merk, Nro. Catálogo S6776), Nicotinamida 5 mM (Merk, Nro. Catálogo N0632), β-glicerofosfato 50 mM (Merk, Nro. Catálogo G9422) y *cocktail* de inhibidor de proteasas a 1.4 mg/mL (Merk, Nro. Catálogo S8830). A continuación se detalla el tipo de procesamiento según el tipo de muestra.

Respecto a las **muestras de derivadas de cultivos celulares**, una vez finalizado el experimento se retira el medio de cultivo y se lo remplaza por PBS en volumen suficiente para remover detritos u otros componentes presentes. Posteriormente, las células son cubiertas con 1 mL de PBS y colectadas raspando el fondo de la placa utilizando un *scraper*. Las mismas son transferidas a tubo Eppendorf de 1.5 mL y centrifugadas durante 1 min a 800 g a 4°C. El pellet de células obtenido es resuspendido en buffer de lisis (a razón volumen de pellet : volumen de buffer de lisis igual a 1:10). Se procede a incubar la suspensión durante 20-30 a 4°C en agitación constante, para luego centrifugar durante 10 minutos a 10000 g a 4°C. Finalmente, se conserva el sobrenadante, correspondiente a la fracción de proteínas solubles, para la posterior preparación de muestra.

Respecto a las **muestras derivadas de tejidos**, una vez realizada su disección, se transfieren 100 mg (en caso de tejido hepático) o 200 mg (en caso de tejido adiposo) a tubo Eppendorf de 1.5 mL y se lleva a cabo su corte en trozos pequeños. Posteriormente, se añaden *beads* de óxido de zirconio de 0.5 mm (a razón de volumen de tejido : volumen de *beads* igual a 1:1) y buffer de lisis (a razón de volumen de tejido : volumen de buffer de lisis igual a 1:2). Se coloca el tubo Eppendorf en el homogeneizador Bullet Blender (Next Advance, Nro. Serie BBY24M) y se establecen los parámetros de velocidad (Nro. 8 en caso de tejido hepático y Nro. 10 en caso de tejido adiposo) y de tiempo en (Nro. 3 en caso de tejido hepático y tejido adiposo). Finalizado el procedimiento, se procede a incubar el homogenado durante 20-30 a 4°C en agitación constante, para luego centrifugar durante 10 minutos a 10000 g a 4°C. Finalmente, se conserva el sobrenadante, correspondiente a la fracción de proteínas solubles, para la posterior preparación de muestra. En el caso del tejido adiposo, el sobrenadante debe ser succionado mediante jeringa 25G para evitar la contaminación de la fracción de proteínas solubles con la grasa presente en la muestra.

4.3.1.2. Preparación de muestras

Una vez obtenida la fracción proteica de las muestras de cada experimento, se procede con la cuantificación de proteínas mediante reacción de Bradford (AppliChem, Nro. Catálogo A6932). Una vez realizada la cuantificación de proteínas, las muestras son resuspendidas en buffer Laemmli 5x (Tris-HCl pH 6.8 1M, SDS al 10%, Glicerol al 25%, β-mercaptoetanol al 25%, Azul de bromofenol al 0.005% –Merk, Nros. Catálogo T1503, L3771, G5516, M3148, 114391, respectivamente). Finalmente, las muestras son calentadas durante 1 min a 100 °C.

4.3.1.3. SDS-PAGE y Western blot

Una vez preparadas las muestras, se procede con la electroforesis en gel desnaturalizante de poliacrilamida (*Sodium Dodecyl Sulfate - Polyacrylamide Gel Electrophoresis*, SDS-PAGE). Los geles utilizados presentan un porcentaje de entrecruzamiento de 5% para porción concentradora y de entre 8.5-15% para la porción resolutiva, determinado según el peso molecular de las proteínas a analizar. La corrida se lleva a cabo en buffer de corrida TGS (Tris Base 33.3 g, Glicina 144 g, SDS 10 g, agua miliQ para volumen final de 1L –Merk, Nros. Catálogo T1503, G8898, L3771, respectivamente), con amperaje constante de 30 mA por gel. Una vez finalizada la corrida, se procede con la transferencia de proteínas a una membrana de polifluoruro de vinilideno (*Polyvinylidene fluoride*, PVDF), en buffer de

transferencia (buffer de corrida TGS suplementado con 20% etanol), con amperaje constante de 400 mA durante 45-75 minutos, determinado según el peso molecular de las proteínas a analizar. Posteriormente, se procede con el bloqueo de la membrana mediante incubación en buffer de bloqueo (TBS-T, Tris-HCl pH 8 50 mM, NaCl 150 mM, Tween-20 al 0.5% -Merk, Nros. Catálogo T1503, S3014, P1379, respectivamente, suplementado con leche descremada al 5%) durante 1 hora a temperatura ambiente. Se realizan 3 lavados de 5 min con TBS-T, y se procede a incubar la membrana en solución de anticuerpo primario (TBS-T suplementado con albúmina de suero bovino al 2%, azida de sodio al 0.01% y anticuerpo primario correspondiente en concentración recomendada por fabricante) durante toda la noche a 4°C en agitación constante. Se realizan 3 lavados de 5 min con TBS-T, y se procede a incubar la membrana en solución de anticuerpo secundario (TBS-T suplementado con anticuerpo secundario correspondiente en concentración recomendada por fabricante) durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación constante. Se realizan 3 lavados de 5 min con TBS-T, y se procede con el revelado por quimioluminiscencia utilizando SuperSignal West Pico Chemiluminescent Kit (Pierce, Nro. Catálogo 34080). En caso de querer evaluar la presencia de otra proteína en una membrana ya utilizada, se procede con el protocolo de stripping de membrana: la membrana se incuba en solución de Guanidina 7M durante 15 minutos a temperatura ambiente en agitación constante. Posteriormente, se lava con abundante agua miliQ y se continúa con el protocolo recién descrito desde el paso de bloqueo de la membrana.

Los anticuerpos primarios utilizados fueron anti-DBC1 C-terminal y N-terminal (Bethyl, Nros. Catálogo A300-434 y A300-432, respectivamente), anti-p65/ReIA (Cell Signalling, Nro. Catálogo 8242), anti-p27 Kip1 (Cell Signalling, Nro. Catálogo 3688), anti-Ciclina D1 (Abcam, Nro. Catálogo ab137875), anti Ciclina E1 (Abcam, Nro. Catálogo ab52189), anti-β actina (Merk, Nro. Catálogo A5441), y anti-GAPDH (Abcam Nro. Catálogo ab9485). Los anticuerpos secundarios utilizados son todos IgG conjugados a Peroxidasa de rábano (*Horseradish peroxidase*, HRP); específicamente, anti IgG de conejo, de ratón y de cabra (Merk, Nros. Catálogo A0545, A9044 y A8919, respectivamente). los resultados son cuantificados mediante densitometría con el *software* ImageJ (Rasband, W.S., Bethesda, Maryland, Estados Unidos).

4.3.3. Parámetros metabólicos

4.3.3.1. Glicemia

Ratones C57BL/6 WT y DBC1 KO son sometidos a punción de la vena lateral de la cola, para extracción de volumen de sangre suficiente para evaluar glicemia mediante glucómetro (Accu-Chek Active, Roche).

4.3.3.2. Enzimas hepáticas

La actividad de las enzimas hepáticas glutamato-piruvato transaminasa (GPT) y glutamatooxalacetato transaminasa (GOT) es cuantificada mediante los kits GPT IFCC mod. liquiUV y GOT IFCC mod. liquiUV (Human Diagnostics Worldwide, Nro. Catálogos 12012 y 12011, respectivamente). En ambos casos, se lleva a cabo el mismo protocolo. Brevemente, la sangre extraída de ratones C57BL/6 WT y DBC1 KO se transfiere a tubo Eppendorf de 1.5 mL conteniendo heparina para evitar coagulación. Se centrifuga durante 15 minutos a 1000 g a 4°C y se conserva el sobrenadante, correspondiente a la fracción plasmática. Por otro lado, se prepara una mezcla de solución de sustrato (2-oxoglutarato 90 mmol/L, NADH 0.9 mmol/L para GTP y 2-oxoglutarato 60 mmol/L, NADH 0.9 mmol/L para GOT) y solución enzimática (Tris-HCI pH 7.5 150 mmol/L, L-alanina 750 mmol/L, LDH \ge 1.2 kU/I para GPT y Tris-HCI pH 7.9 100 mmol/L, L-aspartato 300 mmol/L, MDH \ge 0.6 kU/I para GOT), y se la calienta a 37°C. Se coloca en una cubeta 10 µL de plasma y 100 µL de la mezcla mencionada. Finalmente, se procede a medir la absorbancia a 340 nm 1, 2, 3 y 4 minutos después. Los datos de Δ Absorbancia/min son entonces transformados a datos de U/I a partir de datos de referencia.

4.4. Análisis estadístico

Las gráficas y el análisis estadístico son realizadas con el *software* GraphPad Prism 6.0 (La Jolla, California, EEUU). Las condiciones experimentales cuantificadas comprenden un $n \ge 3$, según lo especificado en cada experimento. Las gráficas exhiben los valores de media \pm error estándar de la media (EEM). La significancia estadística es analizada mediante test T de Student de variables no pareadas. Se consideran diferencias estadísticamente significativas aquellas que presentan un valor de p < 0.05, y se indica con un asterisco.

5. Resultados y discusión

Como se mencionó anteriormente, cuando ratones DBC1 KO son sometidos a una dieta hipercalórica, desarrollan una obesidad más pronunciada que sus contrapartidas WT. Sin embargo, a pesar de ser más obesos, presentan un fenotipo metabólico más saludable, y particularmente menos proinflamatorio (312, 313). Las bases que subyacen dicho fenómeno aún no han sido elucidadas, pero la evidencia apunta hacia DBC1 y un rol regulador sobre la vía clásica de NFkB, clave en el desarrollo del fenotipo proinflamatorio observado en la obesidad (324). NFκB es una familia de factores de transcripción y en mamíferos incluyen a p65/ReIA, ReIB, c-ReI, p50/p105 y p52/p100. Estos funcionan en forma de homo u heterdímeros regulando la expresión de genes que incluyen elementos kB en sus promotores o secuencias reguladoras, y por ende, participando en una vasta cantidad de procesos celulares que incluyen las respuestas inflamatorias, las respuestas de estrés y el control del ciclo celular. La vía clásica de NFkB involucra al heterodimero p65/RelA-p50, que normalmente se encuentra secuestrado en el citoplasma mediante su unión a $I \kappa B \alpha$, uno de los miembros de la familia de inhibidores kB. No obstante, ante la activación de los receptores TLR, los receptores de citoquinas proinflamatorias, entre otros, el complejo de quinasas llamado IKK es activado; la subunidad IKK β de este complejo cataliza la fosforilación de las serinas 32 y 36 de IkB a; este entonces es ubiquitinado y posteriormente degradado mediante el proteasoma 26S. Dicha degradación libera al heterodímero p65/RelAp50, que entonces se transloca al núcleo y lleva a cabo su actividad transcripcional (267). La Figura 5.1. muestra un esquema de la vía clásica de NFkB



Figura 5.1. Esquema de la vía clásica de NFkB.

Por un lado, se ha descrito que DBC1 interactúa con la fracción nuclear de la quinasa ΙΚΚβ y promueve su actividad catalítica. La fracción nuclear de la quinasa ΙΚΚβ ha mostrado fosforilar la serina 536 de la subunidad de p65/ReIA, lo cual conlleva a un aumento en su actividad a nivel transcripcional (264, 268). De esta manera, al promover la actividad de IKKβ, DBC1 se encuentra promoviendo la activación de la vía clásica de NFκB. Por otro lado, se ha descrito que DBC1 interactúa con las desacetilasas HDAC3 y SIRT1, y reprime su actividad catalítica (221, 222). HDAC3 y SIRT1 ha mostrado desacetilar diversas lisinas de p65/ReIA; específicamente, la desacetilación de las lisinas 218 y 221 por HDAC3 promueve la unión de p65/RelA a la fracción nuclear del factor $I \kappa B \alpha$ y su re-translocación al citoplasma; mientras que la desacetilación de la lisina 310 por HDAC3 o SIRT1 inhibe la unión de p65/RelA a sus sitios blanco en el ADN. En ambos casos, el efecto de estas desacetilasas sobre p65/ReIA es una disminución en su actividad a nivel transcripcional (291, 325). De esta manera, al reprimir la actividad de HDAC3 y SIRT1, DBC1 también se encuentra promoviendo la activación de la vía clásica de NFkB. Curiosamente, las tres interacciones mediante las cuales DBC1 estaría promoviendo la activación de la vía clásica de NFKB involucran cambios post-traduccionales en p65/RelA. Siendo así, surge la interrogante de si DBC1 se encuentra regulando la actividad de dicho factor de alguna otra manera. Efectivamente, encontramos que tanto la expresión como la modificación post-traduccional de DBC1 regulan la expresión de p65/RelA. A continuación se desarrolla la evidencia que soporta tal apreciación.

La expresión de DBC1 regula la expresión de p65/RelA

En concordancia con el fenotipo menos proinflamatorio observado *in vivo* (312, 313), encontramos que tanto macrófagos (BMDM) como fibroblastos (MEF) derivados de ratones DBC1 KO presentan menor expresión de p65/RelA que sus contrapartidas WT (*Figura 5.2 A*). Además, encontramos que tanto preadipocitos (3T3-L1) como hepatocitos (HEPG2) a los cuales se le induce la menor expresión de DBC1 mediante silenciamiento transitorio, presentan menor expresión de p65/RelA que sus contrapartidas control, lo cual demuestra una relación de causalidad entre uno y otro fenómeno (*Figura 5.2. B*). A destacar, pudimos comprobar que tanto en las células derivadas de ratones DBC1 KO como en aquellas a las cuales se le induce menor expresión de DBC1, la menor expresión de p65/RelA observada se corresponden con un menor expresión de su ARNm (*Figura 5.2., gráficos*).



Figura 5.2. Expresión de p65/RelA según expresión de DBC1. Se evalúan los niveles de ARNm y proteína de p65/RelA en condiciones donde la expresión de DBC1 es nula o disminuida. **A.** Células BMDM y MEF derivados de ratones WT y DBC1 KO. **B.** Células 3T3-L1 y HEPG2, en condiciones control y sometidas a silenciamiento transitorio de DBC1 mediante siRNA. La detección de DBC1 fue en todos los casos mediante anticuerpo que reconoce el extremo C-terminal de la proteína (residuos 875-923).

Los resultados recién mostrados señalan que la expresión de DBC1 regula positivamente los niveles de ARNm y proteína de p65/RelA, y sugieren una nueva vía mediante la cual DBC1 podría estar participando en el desarrollo del fenotipo proinflamatorio observado en la obesidad. Siendo así, decidimos evaluar diferentes estímulos fisiológicos típicamente alterados en la obesidad que pudiesen estar aumentando la expresión de DBC1, y por ende, la expresión de p65/RelA. Específicamente, evaluamos el efecto de insulina, IGF-1, TNF- α y LPS sobre la expresión de DBC1 y p65/RelA en células 3T3-L1 y HEPG2. Ninguno de los estímulos mencionados arrojó resultados claros, pero sí algunas observaciones: 1. La presencia constante de dos isoformas de DBC1 –una con el peso molecular esperado y otra de menor peso molecular-; 2. La aparente relación entre la expresión de la isoforma del peso molecular esperado de DBC1 y la expresión de p65/RelA en células 3T3-L1. 3. La aparente inmutabilidad de la expresión de una u otra isoforma de DBC1 y la expresión de p65/RelA en células HEPG2 (*Figura 5.3*).

3T3-L1



Figura 5.3. Expresión de DBC1 y p65/RelA ante estímulos típicamente alterados en la obesidad en células 3T3-L1 y HEPG2. Se evalúa la expresión de DBC1 y p65/RelA en células 3T3-L1 y HEPG2 en ante diferentes estímulos fisiológicos típicamente alterados en la obesidad, insulina, IGF-1, TNF- α y LPS. Los tratamientos con insulina e IGF-1 son en concentraciones de 0, 100, 300, 500, 700, y 1000 ng/L. Los tratamientos con TNF- α y LPS son en concentraciones de 0, 10, 30, 50, 70, y 100 ng/L. Se observa la presencia de dos isoformas de DBC1: una con el peso molecular esperado (banda superior) y otra de menor peso molecular (banda inferior). **A.** Células 3T3-L1. **B.** Células HEPG2. La detección de DBC1 fue en todos los casos mediante anticuerpo que reconoce el extremo C-terminal de la proteína (residuos 875-923).

Tres estudios independientes han reportado la presencia de dos isoformas de DBC1 similar a lo observado en los experimentos recién mencionados (209, 305, 306). No obstante, las condiciones evaluadas en cada estudio son diferentes y no queda claro si realmente se trata del mismo fenómeno. El primero de estos estudios reporta la aparición de una isoforma de menor peso molecular frente a estímulos pro-apoptóticos, y se propone que sería generada mediante un mecanismo dependiente de caspasas que estaría removiendo una porción del extremo N-terminal de la proteína. Se plantea que la porción removida podría incluir la señal de localización nuclear y, en concordancia con ello, se muestra que mientras la isoforma completa presenta una localización principalmente nuclear, la isoforma de menor peso molecular presenta una localización principalmente citoplasmática (209). El segundo de estos estudios reporta la aparición de una isoforma de menor peso molecular frente a un estímulo proinflamatorio, y se propone que sería generada mediante un mecanismo dependiente de caspasas, pero también del proteasoma. Los autores hacen referencia a la hipótesis sugerida en el primer estudio respecto a la remoción de la señal de localización nuclear y, en concordancia con ello, muestran que mientras la isoforma completa presenta una localización principalmente nuclear, la isoforma de menor peso molecular presenta una localización principalmente citoplasmática (306). El último de estos estudios reporta la aparición de una isoforma de menor peso molecular en condiciones de arresto celular en Go y muestra que el patrón de isoformas observado difiere en células normales respecto a células cancerosas (305).

La evidencia generada en los estudios mencionados nos detuvieron a reflexionar sobre los resultados obtenidos en los experimentos con insulina, IGF-1, TNF- α y LPS (*Figura 5.3*). Por una lado, estos experimentos requieren que durante las 24 horas previas al estímulo y durante las 24 horas del estímulo, las células sean mantenidas en condiciones de privación de suero, para evitar que los componentes del mismo –entre los que se incluyen la propia insulina y diversas citoquinas– interfieran con los estímulos a evaluar. A destacar, dicha privación de suero durante 48 horas podría estar induciendo el arresto celular en G₀ de las células (326). Si la isoforma de menor peso molecular es generada en condiciones de arresto celular en G₀ como habría sido planteado (305), las propias condiciones de los experimentos estarían explicando la presencia constante de las dos isoformas, independientemente del estímulo evaluado (*Figura 5.3*.). Por otro lado, gran cantidad de las proteínas que interactúan con DBC1 presentan localización exclusivamente nuclear, y tal interacción involucra el extremo N-terminal de DBC1. Si la isoforma de menor peso molecular carece de la señal de localización nuclear y otras regiones del extremo N-terminal como habría sido planteado

(209, 306), muchas de las interacciones descritas se verían impedidas, ya sea debido a la pérdida de co-localización subcelular o a la pérdida de dominios indispensables para la interacción. La actividad biológica de la isoforma de menor peso molecular podría entones presentar grandes diferencias respecto a la actividad biológica de la isoforma completa, lo cual podría estar explicando la aparente relación entre la expresión de la isoforma completa y no la de menor peso molecular con la expresión de p65/RelA (*Figura 5.3. A*).

El arresto celular en G_0 induce la aparición de la isoforma de menor peso molecular de DBC1, carente de una porción N-terminal de la proteína

A partir de las reflexiones recién descritas, decidimos evaluar la presencia de las isoformas de DBC1 en fibroblastos derivados de ratones WT y DBC1 KO en estado proliferativo y de arresto celular en G₀ inducido por privación de suero (326), y llevar a cabo la detección mediante un anticuerpo que reconociese el extremo C-terminal –residuos 875-923– o el extremo N-terminal –residuos 1-50– de la proteína. Encontramos que mientras en estado proliferativo predomina la isoforma completa, en estado de arresto celular en G₀ también se detecta la isoforma de menor peso molecular. Aún más, la detección de la isoforma de menor peso molecular solo fue posible cuando utilizamos el anticuerpo que reconoce el extremo C-terminal de la proteína (*Figura 5.4. A, panel superior*). Cuando utilizamos el anticuerpo que reconoce el extremo N-terminal de la proteína, solo fue posible observar la isoforma completa (*Figura 5.4. B, panel superior*). Los fibroblastos derivados de ratones DBC1 KO fueron indispensables para determinar cuáles de las señales detectadas correspondían realmente a la proteína DBC1 y cuáles eran inespecíficas. A destacar, no encontramos otras isoformas de DBC1 más allá de las recién mencionadas (*Figura 5.4., paneles inferiores*).

En suma, estos resultados sugieren que en condiciones de arresto celular en G₀ se genera una isoforma de menor peso molecular de DBC1 que carece de un porción del extremo N-terminal de la proteína. Además, contamos con datos preliminares que muestran que lo anterior ocurre mediante un mecanismo dependiente de caspasas, pero también del proteasoma. Actualmente estamos llevando a cabo el estudio detallado de dicho mecanismo, incluyendo la identificación del sitio específico de corte y de las enzimas involucradas, así como de los posibles cambios a nivel de localización subcelular y el efecto sobre interacciones ya descritas. Lo anterior excede los objetivos de este trabajo y por tanto, no se muestran resultados de ello.



Figura 5.4. Detección de isoformas de DBC1. Se evalúa la presencia de las dos isoformas de DBC1 en MEF derivadas de ratones WT y DBC1 KO, en estado proliferativo (P) y de arresto celular en G₀ inducido por privación de suero (recuperadas 48 h después de mantenimiento en FBS al 0.5%, G₀). Las flechas negra y roja indican el peso molecular de la isoforma completa y de menor peso molecular, respectivamente. A. Detección mediante anticuerpo que reconoce el extremo C-terminal de la proteína (residuos 875-923, DBC1 C-term.) en la región de pesos moleculares esperados (panel superior) y mayor exposición en un rango de pesos moleculares mayor (panel inferior). **B.** Detección mediante anticuerpo que reconoce el extremo N-terminal de la proteína (residuos 1-50, DBC1 N-term.) en la región de pesos moleculares esperados (panel superior) y mayor exposición en un rango de pesos moleculares mayor (panel inferior).

El arresto celular en G₀ induce la aparición de la isoforma de menor peso molecular de DBC1 y esto afecta la expresión de p65/ReIA

Habiendo confirmado que en condiciones de arresto celular en G₀ se genera una isoforma de menor peso molecular que carece de una porción del extremo N-terminal de la proteína, decidimos evaluar si esto afectaba la expresión de p65/ReIA. Siendo así, evaluamos la presencia de las isoformas de DBC1 y la expresión de p65/ReIA en células 3T3-L1 en estado proliferativo y de arresto celular en G₀ por privación de suero o inhibición por contacto (326,

327). Encontramos que mientras en estado proliferativo predomina la isoforma completa, en estado de arresto celular en G₀ se detecta también la isoforma de menor peso molecular, lo cual además coincide con una menor expresión de p65/RelA (*Figura 5.5. A*). Esto recuerda a lo observado en las células derivadas de ratones DBC1 KO o aquellas con menor expresión de DBC1 debido a su silenciamiento transitorio (*Figura 5.2. A y B*), reforzando la idea de que la actividad biológica de la isoforma de menor peso molecular podría presentar grandes diferencias respecto a la actividad biológica de la isoforma completa.

Por otro lado, si el arresto celular en G₀ es el estímulo que induce la aparición de la isoforma de menor peso molecular, presumimos que las células HEPG2 no representarían el mejor modelo para su estudio. Estas son células tumorales cuyo ciclo celular se encuentra intrínsecamente alterado y no responde de forma "normal" a la inducción del arresto celular en G₀ por privación de suero o por inhibición por contacto (328–330). En concordancia con lo anterior, cuando sometimos a estas células a privación de suero o a "inhibición por contacto", no encontramos mayores diferencias en la expresión de una u otra isoforma ni en la expresión de p65/RelA, respecto a lo observado en estado proliferativo (*Figura 5.5. B*).



Figura 5.5. Expresión de DBC1 y p65/RelA ante arresto celular en células 3T3-L1. Se evalúa la presencia de las dos isoformas de DBC1 y la expresión de p65/RelA en células 3T3-L1 (A) y HEPG2 (B) en estado proliferativo (P) y de arresto celular en G₀ inducido por privación de suero (recuperadas 24 h después de mantenimiento en FBS al 1%, G_{0(PS)}). o por inhibición por contacto (recuperadas 3, 5, 7 y 9 días después de haber alcanzado la máxima confluencia, G_{0 (IC)}). La detección de DBC1 fue en todos los casos mediante anticuerpo que reconoce el extremo C-terminal de la proteína (residuos 875-923).

Dado lo anterior, decidimos dejar de lado las células HEPG2 y profundizar en el fenómeno observado en las células 3T3-L1; específicamente, en estado de arresto celular en G₀ inducido por inhibición por contacto. Encontramos que la isoforma de menor peso molecular aumenta de forma progresiva a medida que se suceden los días bajo inhibición por contacto, y a esto le sigue una menor expresión de p65/ReIA. Además, cuando células en estado de arresto celular en G₀ son recuperadas y re-plaqueadas para inducir su re-ingreso al estado proliferativo, la isoforma de menor peso molecular desaparece. Cabe destacar que en esta situación la expresión de p65/ReIA no se recupera. No obstante, la cinética de disminución de la expresión de p65/ReIA respecto a la aparición de la isoforma de menor peso molecular nos sugiere que probablemente se requiera mayor cantidad de tiempo en el nuevo estado proliferativo para que esto ocurra (*Figura 5.6*.).



Figura 5.6. Expresión de DBC1 y p65/RelA ante arresto celular en células 3T3-L1. Se evalúa la presencia de las dos isoformas de DBC1 en células 3T3-L1 en estado proliferativo (P), de arresto celular G_0 inducido por inhibición por contacto (recuperadas 1-9 días después de haber alcanzado la máxima confluencia, G_0 (IC)), y de estado proliferativo por re-ingreso al ciclo (recuperadas 24 horas después de haber sido re-plaqueadas, luego de encontrarse en estado de arresto celular en G_0 , P'). La detección de DBC1 fue mediante anticuerpo que reconoce el extremo C-terminal de la proteína (residuos 875-923).

Los resultados obtenidos sugieren que la generación de la isoforma de menor peso molecular se trata de un proceso dinámico y finamente regulado según el estado del ciclo celular, y que a su vez conduce a cambios en la expresión de p65/RelA. Esto nos impulsó a evaluar el fenómeno en las células IMR-90, un modelo de fibroblastos primarios que conservan la regulación del ciclo celular intacta, y por ende es frecuentemente utilizado para su estudio (331–333). Siendo así, evaluamos la presencia de las isoformas de DBC1 y la expresión de p65/RelA en células IMR-90 en estado proliferativo y de arresto celular en G₀ inducido por pérdida de adherencia (334) o por inhibición por contacto. Encontramos que

mientras que en estado proliferativo predomina la isoforma completa, en estado de arresto celular en G₀, e independiente de cómo haya sido inducido, predomina la isoforma de menor peso molecular, y que además, esto coincide con una muy fuerte disminución de la expresión de p65/RelA (*Figura 5.7. A*). Por otro lado, también evaluamos la presencia de las isoformas de DBC1 y la expresión de p65/RelA en células IMR-90 en estado de arresto celular *no en* G₀, sino en G₁; específicamente, un modelo de senescencia inducido por sobreexpresión de H-Ras (320). A destacar, mientras que en estado de arresto celular en G₀ predomina la isoforma de menor peso molecular y una muy fuerte disminución de la expresión de p65/RelA, en estado de arresto celular en G₁ predomina la isoforma completa y no se observa una disminución en la expresión de p65/RelA (*Figura 5.7. B*). Lo anterior señala que la generación de la isoforma de menor peso molecular no se debe a cualquier tipo de estado de arresto celular, sino específicamente al estado de arresto celular en G₀; y además confirma que la menor expresión de p65/RelA observada en los casos de arresto celular en G₀ estudiados se deben al cambio observado en la expresión de las isoformas de DBC1.



Figura 5.7. Expresión de DBC1 y p65/RelA ante arresto celular en células IMR-90. Se evalúa la presencia de las dos isoformas de DBC1 en células IMR-90 en estado proliferativo y de arresto celular. **A.** Estados proliferativo (P) y de arresto celular en G_0 inducido por pérdida de adherencia (recuperadas pocas horas después de su plaqueo, G_0 (PA)) o por inhibición por contacto (recuperadas 24 horas después de haber alcanzado la máxima confluencia, G_0 (IC)). **B.** Estados proliferativo (P), de arresto celular en G_0 inducido por inhibición por contacto recuperadas 7 días después de haber alcanzado la máxima confluencia, G_0 (IC)), y de arresto celular en G_1 por sobreexpresión de H-Ras (recuperadas 7 días después de inducir la sobreexpresión de H-Ras, G_1). La detección de DBC1 fue en todos los casos mediante anticuerpo que reconoce el extremo C-terminal de la proteína (residuos 875-923).

El arresto celular en G_0 *in vivo* también induce la aparición de la isoforma de menor peso molecular de DBC1 y esta afecta la expresión de p65/RelA

Para confirmar la relevancia fisiológica del fenómeno que estamos observando, decidimos evaluarlo en un modelo in vivo en el cual los estados proliferativo y de arresto celular en Go pudiesen ser modulados: el hígado. El hígado está compuesto en un 80% por hepatocitos, y en un 20% por las llamadas células no parenquimatosas, que incluyen las células de Kupffer, las células epiteliales biliares, las células endoteliales fenestradas y las células de lto (335). Una vez que el hígado alcanza su tamaño adulto, los hepatocitos y la mayoría de las células no parenquimatosas entran en estado de arresto celular en G₀. No obstante, en caso de pérdida de masa hepática, estas son capaces de re-ingresar al estado proliferativo y dividirse hasta recuperar el tamaño original, sin la necesidad de reclutar células progenitoras (335). Dicho fenómeno ha sido extensamente estudiado mediante el modelo guirúrgico de hepatectomía parcial, descrito inicialmente por Higgins y Anderson en ratas (336) y luego adaptado para su práctica en ratones (322, 337-339). La hepatectomía parcial consiste en la remoción de los lóbulos medio e izquierdo del hígado, lo cual representa aproximadamente dos tercios de la masa hepática total. Minutos después de realizada la cirugía, ocurre la activación de los llamados genes de respuesta temprana, que promueven la salida de los hepatocitos y las células no parenquimatosas del estado de arresto celular en Go para reingresar al estado proliferativo (340-343). Las primeras células en proliferar son los hepatocitos, que hacia 36-42 horas después de realizada la cirugía ya se encuentran en fase S del ciclo celular, y llevarán a cabo una o dos rondas de división. Se cree que los hepatocitos en estado proliferativo generan los estímulos mitogénicos necesarios para las células no-parenquimatosas, que recién 24 horas después que los hepatocitos se las encuentra en fase S del ciclo celular (344). El mayor incremento de la masa hepática ocurre en los primeros 3 días después de realizada la cirugía; y normalmente la masa hepática total es recuperada a los 5-7 días (335). Ante esto, la proliferación de las células hepáticas se detiene y comienza la restauración de la arquitectura normal del órgano (345, 346).

Considerando que el estado proliferativo del hígado varía según si sigue en crecimiento o ya ha alcanzado su tamaño adulto, decidimos evaluar la presencia de las isoformas de DBC1 en tejido hepático de ratones de un amplio rango de edades. Encontramos que en el tejido hepático aún en crecimiento –células en estado proliferativo– se detectan las dos isoformas de DBC1, mientras que en el tejido hepático adulto –células en estado de arresto celular en G₀– predomina la isoforma de menor peso molecular (*Figura 5.8*). Lo anterior concuerda con

63

los resultados ya mostrados, según los cuales en estado proliferativo predomina la isoforma completa y en estado de arresto celular en G_0 predomina la isoforma de menor peso molecular. Curiosamente, encontramos que en el tejido hepático derivado de embriones de 14 días no hay niveles detectables de ninguna de las isoformas de DBC1. Cabe destacar que en ese momento del desarrollo embrionario, el hígado está compuesto principalmente por hepatoblastos y células hematopoyéticas, siendo el principal órgano responsable de la hematopoyesis en el embrión (347, 348). Considerando que los hepatoblastos juegan un rol fundamental en promover el ambiente necesario para la hematopoyesis, y que pierden dicha capacidad al diferenciarse en hepatocitos (349, 350), sería de interés investigar si la ausencia de DBC1 guarda algún tipo de relación con la conservación del estado no diferenciado de las células cuando es necesario.



Figura 5.8. Expresión de DBC1 según estado proliferativo *in vivo*. Se evalúa la expresión de DBC1 en tejido hepático derivado de ratones C57BL/6 WT en estado embrionario de 14 días (E14), y machos de 1 semana, 2 meses, 4 meses, 6 meses, 1 año y 2 años de edad. La detección de DBC1 fue mediante anticuerpo que reconoce el extremo C-terminal de la proteína (residuos 875-923).

Dado que el estado pro-inflamatorio del organismo se agudiza con el envejecimiento (351, 352), para evaluar si la presencia de las isoformas de DBC1 afecta la expresión de p65/RelA en el tejido hepático, era necesario analizar tejidos derivados de ratones de edades similares. Siendo así, evaluamos la expresión de p65/RelA en tejido hepático derivado de ratones de 2 y 4 meses de edad; edades similares pero que ya muestran diferencias en la presencia de las isoformas de DBC1. Encontramos que en el tejido hepático que predomina la isoforma de menor peso molecular, también presenta menor expresión de p65/RelA (*Figura 5.9. A*). Lo anterior concuerda con los resultados ya mostrados, pero además señala que la presencia de una u otra isoforma de DBC1 y los consecuentes cambios en la

expresión de p65/RelA tienen una fuerte relevancia fisiológica *in vivo*. Siendo así, decidimos evaluar si la presencia de una u otra isoforma de DBC1 en tejido hepático también es modulada ante el cambio del estado de ciclo celular inducido por hepatectomía parcial. Efectivamente, mientras que en el tejido hepático no hepatectomizado –células en estado de arresto celular en G₀– predomina la isoforma de menor peso molecular, en el tejido hepático 36 horas después de realizada la hepatectomía –células en estado proliferativo– se detectan las dos isoformas, lo cual además coincide con un aumento en la expresión de p65/RelA. Aún más, en el tejido hepático 7 días después de realizada la hepatectomía –uevamente en estado de arresto celular en G₀– predomina nuevamente la isoforma de menor peso molecular, y esto coincide con una disminución en la expresión de p65/RelA (*Figura 5.9. B*). En suma, estos resultados refuerzan la idea que la presencia de una u otra isoforma de DBC1 y los consecuentes cambios en la expresión de p65/RelA, presentan una fuerte relevancia fisiológica *in vivo*.



Figure 5.9. Expresión de DBC1 y p65/RelA según estado proliferativo in vivo. Se evalúa la expresión de DBC1 y p65/RelA en tejido hepático en diferente estado proliferativo. **A.** Tejido hepático derivado de ratones C57BL/6 WT machos de 2 meses y 4 meses de edad. **B.** Tejido hepático derivado de ratones C57BL/6 WT machos de 4 meses de edad, control, 36 horas y 7 días post-hepatectomía parcial. La detección de DBC1 fue en todos los casos mediante anticuerpo que reconoce el extremo C-terminal de la proteína (residuos 875-923).

El tejido hepático de los ratones DBC1 KO presenta menor expresión de p65/ReIA, y en concordancia con ello, una alteración en la transición Go/G1 y en la regeneración hepática *in vivo*

El hecho que el estado del ciclo celular se encuentre modulando la presencia de una u otra isoforma de DBC1 y la expresión de p65/RelA in vivo sugiere que este fenómeno presenta una fuerte relevancia fisiológica. Lo anterior resulta especialmente relevante por el rol que juega p65/RelA y la activación de la vía clásica de NFkB en el control del ciclo celular en general (353–359), y en el proceso de regeneración hepática en particular (335, 344, 360, 361). Existe una gran cantidad de evidencia que, directa o indirectamente, ha demostrado que la activación de la vía clásica de NFkB es uno de los eventos fundamentales para el inicio de la regeneración hepática. Dicha evidencia ha sido adecuadamente colectada y organizada en diversas revisiones (335, 344, 360, 361), que han permitido establecer un panorama global del proceso. Brevemente, una vez realizada la hepatectomía parcial, el tejido hepático remanente se encuentra ante un aumento en las concentraciones relativas de los diferentes componentes del plasma -considerando que el flujo sanguíneo no varía y la masa hepática es un tercio de lo que era originalmente-. Dentro de estos componentes se incluyen el LPS, que al unirse a receptores específicos en las células de Kupffer, las células endoteliales y las células de Ito, inducen la activación de la vía clásica de NFkB. Lo anterior promueve la producción y secreción de citoquinas como TNF- α, IL-1 e IL-6, que entonces generan un efecto autócrino en las células ya mencionadas, así como parácrino en los hepatocitos vecinos. Por una parte, la secreción de TNF- α e IL-1 conduce a la activación de la vía clásica de NFkB, mientras que la secreción de IL-6 a la activación de factores de transcripción como STAT3 y AP1, así como también de las vías de MAPK, PI3K y AKT. En conjunto, la activación de dichos factores de transcripción y vías de señalización celular conducen a la expresión de los llamados genes de respuesta temprana, que inician entonces el proceso de salida del estado de arresto celular en G₀ y la entrada al estado proliferativo en los hepatocitos, responsable de la posterior regeneración hepática.

En este trabajo mostramos que la ausencia de DBC1 conduce a una menor expresión de p65/RelA, que a su vez podría conducir a la disminución en la actividad de NF κ B. Siendo así, presumimos que los ratones DBC1 KO podrían presentar una menor expresión de p65/RelA, que podría conducir a la disminución en la actividad de NF κ B ya reportada en el modelo (312–314), y a su vez traducirse en una alteración en la transición desde el arresto celular en G₀ al estado proliferativo inducido por hepatectomía parcial. Para confirmar dicha hipótesis,

llevamos a cabo el procedimiento de hepatectomía parcial en ratones WT y DBC1 KO, y en el tejido hepático remanente evaluamos la expresión de p65/RelA y de marcadores de ciclo celular que se sabe son regulados por NFκB, y específicamente por p65/RelA: p27^{kip1}, Ciclina D1 y Ciclina E1.

La proteína p27^{kip1} forma parte del grupo Kip/Cip de la familia de inhibidores de quinasas dependientes de Ciclina (*Cyclin-Dependent Kinases*, CDKs), que inhibe la transición G₁/S al unirse e inhibir la actividad de los complejos Ciclina E-CDK2 (362) y Ciclina D-CDK4 (363). Su expresión se encuentra aumentada en células en estado de arresto celular en G₀ y disminuye drásticamente una vez que las células re-ingresan al estado proliferativo (364). Respecto a la regulación por p65/ReIA, se ha demostrado que este favorece la estabilidad y por tanto aumenta los niveles de expresión de p27^{kip1} (357).

Ciclina D1, en asociación con CDK4 y CDK6, promueve la transición G₁/S al favorecer la fosforilación de pRb, y la consecuente liberación del factor de transcripción E2F, necesario para la activación de los genes específicos de fase S (365). La expresión de Ciclina D1 aumenta progresivamente desde el re-ingreso al estado proliferativo en fase G₁, se hace máxima en la transición G₁/S, y a partir de allí disminuye abruptamente; se mantiene baja durante toda la fase S y recién vuelve a aumentar durante la fase G2, para mantenerse así durante la fase mitótica y posterior re-ingreso a fase G₁ (366, 367). Cabe destacar que su alta expresión en la transición G₁/S es indispensable para que esta ocurra (368), así como también su baja expresión durante la fase S es indispensable para que esta progrese (369). Respecto a la regulación por p65/ReIA, se ha demostrado que este favorece tanto la transcripción del ARNm como la estabilidad de la proteína, y por tanto, aumenta los niveles de expresión de Ciclina D1 (356, 358, 370).

Ciclina E1, en asociación con CDK2, promueve la transición G₁/S al favorecer la fosforilación de pRb (365), pero también lo hace de forma independiente a este (371). La expresión de Ciclina E1 aumenta abruptamente haciéndose máxima en la transición G₁/S, y a partir de allí disminuye; se mantiene baja durante toda la fase S y recién vuelve a aumentar previo a una nueva transición G₁/S (372). Al igual que Ciclina D1, su alta expresión en la transición G₁/S es indispensable para que esta ocurra (368), y su baja expresión durante la fase S es indispensable para que esta progrese de forma normal (373, 374). Respecto a la regulación por p65/RelA, se ha demostrado que este inhibe la transcripción del ARNm, y por tanto, disminuye los niveles de expresión de Ciclina E1 (359).

En concordancia con nuestra hipótesis, encontramos que 36 horas después de realizada la hepatectomía parcial, los ratones DBC1 KO presentan una menor expresión de p65/RelA (*Figura 5.10. A*), y a su vez, una menor expresión de p27^{kip}, una menor expresión de Ciclina D1 y una mayor expresión de Ciclina E1 (*Figura 5.10. B*). Cabe destacar que la menor expresión de p65/RelA no resultó estadísticamente significativa (p = 0.06); no obstante, los resultados mostrados a lo largo de este trabajo y los recién descritos para p27^{kip}, Ciclina D1 y Ciclina E1, nos hace creer que pueda estar relacionado al tamaño de los cohortes evaluados.



Figure 5.10. Expresión de p65/RelA y de marcadores de ciclo celular según expresión de DBC1 *in vivo*. Se evalúa la expresión de p65/RelA (A) y los marcadores de ciclo celular p27kip1, Ciclina D1 y Ciclina E1 (B), en tejido hepático derivado de ratones C57BL/6 WT (n =5) y DBC1 KO (n=7) machos de 2 meses de edad, control y 36 horas post-hepatectomía parcial. Las gráficas exhiben los valores de media ± EEM. La detección de DBC1 fue en todos los casos mediante anticuerpo que reconoce el extremo C-terminal de la proteína (residuos 875-923).

El hecho de contar con un solo punto temporal después de realizada la hepatectomía parcial nos impide establecer de qué modo se encuentra afectada la transición desde el arresto celular en G₀ al estado proliferativo en los ratones DBC1 KO. Siendo así, decidimos evaluar distintos parámetros que nos permitieran establecer de qué modo se encuentra afectada la regeneración hepática en estos. Encontramos que los ratones DBC1 KO presentan un retraso en la recuperación de la masa hepática (*Figura 5.11. A*), y también de la funcionalidad hepática. Por un lado, los ratones DBC1 KO no son capaces de recuperar los valores de glicemia normales en el rango de tiempo en que lo hacen los ratones WT (*Figura 5.11. B*), al tiempo que presentan mayores niveles en plasma de las enzimas glutamato-

piruvato transaminasa (GPT) y glutamato-oxalacetato transaminasa (GOT), indicativo de mayor daño hepático. En conjunto, estos resultados nos llevan a especular que en ausencia de DBC1, las células podrían estar llevando a cabo la transición de G_0 al estado proliferativo de forma más abrupta, pero podrían estar presentando un enlentecimiento en la transición G_1/S , lo cual determinaría entonces el enlentecimiento en la capacidad regenerativa del hígado.



Figura 5.11. Parámetros metabólicos post-hepatectomía parcial según expresión de DBC1. Se evalúan parámetros metabólicos en ratones C57BL/6 WT y DBC1 KO machos de 4-5 meses de edad, 24 (n = 3 y n = 2), 36 (n = 4 y n = 4), 48 (n = 6 y n = 4) y 72 (n = 3 y n = 3) horas post-hepatectomía. A. Recuperación de masa hepática calculada como peso de hígado remanente / peso corporal inicial, expresada en valores de porcentaje respecto al valor inicial. B. Valores de glicemia a las 24 y 40 horas post-hepatectomía (n = 3 y n = 3), expresada en valores de porcentaje respecto al valor inicial. C. Actividad de GPT expresada en U/I. D. Actividad de GOT expresada en U/I. Las gráficas exhiben los valores de media \pm EEM.

La correlación entre la expresión de DBC1 y p65/RelA también se observa en

el tejido adiposo de pacientes obesos

El objetivo de este trabajo era establecer el rol de la proteína DBC1 en el desarrollo del fenotipo proinflamatorio observado en la obesidad, e identificar los estímulos fisiológicos que estuviesen modulándolo. Efectivamente, pudimos determinar que la expresión de una u otra isoforma de DBC1 se encuentra regulando la expresión de p65/RelA, hecho que podría estar modificando la actividad de la vía clásica de NFkB. Inicialmente, nuestro foco estaba en la regulación de la respuesta proinflamatoria; sin embargo, nuestros resultados nos han conducido a incorporar la regulación del ciclo celular. Es necesario recordar que el control del ciclo celular se encuentra estrechamente relacionado a la fisiopatología de la obesidad. Por un lado, la expansión del tejido adiposo resulta en un fenotipo más saludable cuando se ve involucrada la hiperplasia de los adipocitos, hecho que ocurre principalmente a nivel del tejido adiposo subcutáneo, que debido a su localización carece virtualmente de restricciones espaciales (147, 183, 184). Por otro lado, el fenómeno de senescencia observado en las células de la fracción estromal-vascular del tejido adiposo como células endoteliales y preadipocitos, se encuentra estrechamente relacionada con un fenotipo no saludable y que este hecho ocurre principalmente a nivel de tejido adiposo visceral (176). En esta última sección, mostramos que la correlación entre la expresión de DBC1 y p65/RelA también se observa en tejido adiposo de pacientes obesos de dos cohortes diferentes.

Por un lado, gracias a la colaboración del Dr. Steen Bønløkke Pedersen obtuvimos muestras de tejido adiposo subcutáneo y visceral de una cohorte de pacientes obesos con Diabetes Tipo 2, en los cuales encontramos una correlación positiva entre la expresión de la isoforma completa de DBC1 y la expresión de p65/RelA (*Figura 5.12.*). Lo anterior no solo refuerza la relevancia fisiológica de los resultados mostrados hasta el momento, sino que además incita a profundizar en el estudio de DBC1 en la fisiopatología de la obesidad. En línea con lo anterior y gracias a la colaboración del Dr. José Manuel Fernández-Real obtuvimos muestras de tejido adiposo subcutáneo y visceral de pacientes obesos con Diabetes Tipo 2 o metabólicamente saludables. A destacar, en ambos tejidos, e independientemente si se trate de pacientes obesos con Diabetes Tipo 2 o metabólicamente presenta un relevancia fisiológica *in vivo*. Además, y en concordancia con lo observado en la primer cohorte de pacientes, observamos una correlación positiva entre la expresión de la isoforma completa de DBC1 y la expresión de DBC1 y la expresión de p65/RelA (*Figura 5.13.*).

Curiosamente, aunque siempre manteniendo la correlación positiva, la expresión de la isoforma completa de DBC1 y de p65/RelA se comporta de modo opuesto según si se trata del tejido adiposo subcutáneo o del tejido adiposo visceral. Por un lado, el tejido adiposo subcutáneo de pacientes obesos saludables presenta mayor expresión de la isoforma completa de DBC1 y de p65/RelA, que el de pacientes obesos con Diabetes tipo 2 (Figura 5.13. A). En este trabajo mostramos que la expresión de la isoforma completa de DBC1 y de p65/RelA se encuentra asociada a células en estado proliferativo; y cabe recordar que el fenotipo de obesidad saludable ha sido asociado a la expansión hiperplásica del tejido adiposo subcutáneo (147, 183, 184). Siendo así, podríamos pensar que la mayor expresión de la isoforma completa de DBC1 y de p65/RelA se encuentren regulando el control del ciclo celular en procesos fundamentales en la hiperplasia del tejido adiposo subcutáneo, y el consecuente fenotipo de obesidad saludable, como lo son la generación de nuevos preadipocitos a partir de células madre mesenquimales pluripotentes, y la expansión clonal que sufren los preadipocitos previo a su diferenciación en adipocitos (375, 376). Por otro lado, el tejido adiposo visceral de pacientes con Diabetes Tipo 2 presenta mayor expresión de la isoforma completa de DBC1 y mayor expresión de p65/RelA, que el de pacientes obesos saludables (Figura 5.13. B). Cabe recordar que el tejido adiposo visceral se encuentra fuertemente asociado a los efectos adversos de la obesidad, incluyendo Diabetes Tipo 2 (78, 79), y que uno de sus pilares resulta el fenotipo senescente de sus células (176). En este trabajo mostramos que las células con fenotipo senescente mantienen la expresión de la isoforma completa de DBC1 y de p65/RelA, a pesar de encontrarse en estado de arresto celular. Siendo así, podríamos pensar que la mayor expresión de la isoforma completa de DBC1 y de p65/RelA se encuentren mediando el fenotipo senescente de los preadipocitos y células endoteliales del tejido adiposo visceral, su consecuente disfunción y la ocurrencia de Diabetes Tipo 2. Por supuesto, lo anterior se encuentra en el plano de especulación y requiere de mayor investigación para determinar si efectivamente se corresponde con la realidad. Por último, cabe aclarar que de los resultados descritos en pacientes, muchos de ellos resultan en tendencias y no diferencias estadísticamente significativas. No obstante, también es importante tener en cuenta que este tipo de muestras presentan una gran variabilidad, y que el número de muestras analizadas por grupo fue particularmente bajo (n = 9 en los grupos de la primer cohorte; n = 6 en los grupos de la segunda cohorte). Siendo así, y basándonos en los resultados obtenidos en modelos animales y celulares, podría pensarse de que dichas tendencias se volverán diferencias estadísticamente significativas al evaluar cohortes de mayor tamaño.


Figura 2.12. Correlación entre expresión de DBC1 y p65/RelA en pacientes obesos. Se evalúa la expresión de la isoforma completa de DBC1 y p65/RelA en tejido adiposo de pacientes obesos con Diabetes tipo 2 (BMI > 30 kg/m², n = 9) mediante Western Blot. La detección de DBC1 fue en todos los casos mediante anticuerpo que reconoce el extremo C-terminal de la proteína (residuos 875-923). Los gráficos de correlación exhiben los valores de expresión de la isoforma completa de DBC1 y p65/RelA, la línea de tendencia (línea continua) y la región de confianza (95%, líneas punteadas). **A.** Tejido adiposo subcutáneo. **B.** Tejido adiposo visceral.



Figura 5.13. Expresión de DBC1 y p65/RelA en pacientes obesos. Se evalúa la expresión de DBC1 y p65/RelA en tejido adiposo de pacientes obesos (BMI > 30 kg/m2) metabólicamente saludables (n = 6) y con Diabetes tipo 2 (DT2, n = 6). Las gráficas exhiben los valores de media \pm EEM. **A.** Tejido adiposo subcutáneo. **B.** Tejido adiposo visceral. La detección de DBC1 fue en todos los casos mediante anticuerpo que reconoce el extremo C-terminal de la proteína (residuos 875-923).

6. Conclusiones y perspectivas

La evidencia generada en los últimos años demuestra que la proteína DBC1 se trata de un regulador a gran escala del proteoma celular que estaría potencialmente regulando una vasta cantidad de procesos celulares. De nuestro particular interés, DBC1 se encuentra involucrada en la homeostasis del metabolismo y además parece tener un rol clave en el desarrollo de la obesidad y las patologías típicamente asociadas a esta; hecho que la posiciona como un potencial blanco terapéutico (312–316). En este trabajo se intentó profundizar sobre el rol de DBC1 en el desarrollo del fenotipo proinflamatorio observado durante la obesidad, haciendo énfasis en la regulación de la vía clásica de NF κ B, clave en el desarrollo del fenotipo proinflamatorio observado en la obesidad (324). Hasta el momento, lo anterior podía ser vinculado a la modificación post-traduccional de la subunidad de NF κ B p65/RelA por parte de varios de sus interactores (221, 222, 264, 268, 291, 325); no obstante, en este trabajo introducimos una nueva variante: la expresión de p65/RelA.

Inicialmente, encontramos que la expresión de DBC1 regula positivamente los niveles de ARNm y proteína de p65/ReIA, planteando una nueva vía mediante la cual DBC1 podría estar participando en el desarrollo del fenotipo proinflamatorio observado en la obesidad. Siendo así, decidimos evaluar diferentes estímulos fisiológicos típicamente alterados en la obesidad que pudiesen estar aumentando la expresión de DBC1, y por ende, la expresión de p65/ReIA. No obstante, lo que encontramos fue que el estado del ciclo celular regula la expresión de la isoforma completa de DBC1, o en su defecto de una isoforma de menor peso molecular, y que la expresión de una u otra se encuentra regulando la expresión de p65/ReIA. Específicamente, encontramos que en estado proliferativo predomina la isoforma completa de DBC1, y que esto a su vez conduce a una disminución en la expresión de p65/ReIA.

Este fenómeno fue observado en diversos modelos celulares así como también en modelos *in vivo* en el cual los estados proliferativo y de arresto celular en G₀ pudiesen ser modulados. Por una lado, encontramos que en el tejido hepático aún en crecimiento –células en estado proliferativo– se detectan las dos isoformas de DBC1, mientras que en el tejido hepático adulto –células en estado de arresto celular en G₀– predomina la isoforma de menor peso molecular, y que esto a su vez coincide con una menor expresión de p65/ReIA. Por otro lado

73

encontramos que en el tejido hepático de hígados no hepatectomizados –células en estado de arresto celular en G₀– predomina la isoforma de menor peso molecular, mientras que en el tejido hepático recuperado 36 horas después de realizada la hepatectomía –células en estado proliferativo– se detectan las dos isoformas, y que esto a su vez coincide con una mayor expresión de p65/RelA. Aún más, encontramos que en el tejido hepático recuperado 7 días después de realizada la hepatectomía –células nuevamente en estado de arresto celular en G₀– predomina nuevamente la isoforma de menor peso molecular; y que esto a su vez coincide con una mayor expresión de los niveles iniciales de p65/RelA.

El hecho que el estado del ciclo celular se encuentre modulando la presencia de una u otra isoforma de DBC1 y la expresión de p65/RelA in vivo sugiere que este fenómeno presenta una fuerte relevancia fisiológica. Especialmente, por el rol que juega p65/RelA y la activación de la vía clásica de NFkB en el control del ciclo celular en general y particularmente en el proceso de regeneración hepática. Dado lo anterior, decidimos evaluar de qué modo podrían verse afectado el control del ciclo celular y el proceso de regeneración hepática en ratones DBC1 KO. En concordancia con los resultados anteriores, encontramos que después de realizada la hepatectomía parcial, los ratones DBC1 KO presentan una menor expresión de p65/ReIA. Esto además se acompaña con una alteración en la expresión de marcadores de ciclo celular que se sabe se encuentran bajo la regulación de NFkB, y concretamente por p65/RelA. Específicamente, encontramos que los ratones DBC1 KO presentan una menor expresión de p27kip, una menor expresión de Ciclina D1 y una mayor expresión de Ciclina E1. El hecho de contar con un solo punto temporal después de realizada la hepatectomía parcial nos impide establecer de qué modo lo anterior se encuentra afectando la transición desde el arresto celular en G₀ al estado proliferativo. No obstante, encontramos que los ratones DBC1 KO presentan un retraso en la recuperación tanto de la masa como de la funcionalidad hepática, lo cual nos permite especular que la ausencia de DBC1, y consecuente menor expresión de p65/ReIA, podría estar provocando un enlentecimiento en la transición desde el estado de arresto celular en G0 al estad proliferativo, lo cual determinaría entonces el enlentecimiento en la capacidad regenerativa del hígado.

Finalmente, encontramos que la correlación entre la expresión de la isoforma completa de DBC1 y p65/RelA también se observa en tejido adiposo subcutáneo y visceral de pacientes obesos de dos cohortes diferentes. Curiosamente, aunque siempre manteniendo la correlación positiva, la expresión de DBC1 y de p65/RelA en pacientes obesos con Diabetes Tipo 2 y metabólicamente saludables se comporta de modo opuesto según si se trata del

74

tejido adiposo subcutáneo o del tejido adiposo visceral. Siendo así, resulta de gran interés investigar de qué modo esto se encuentra afectando procesos relacionados con el control del ciclo celular en la fracción estromal-vascular del tejido adiposo, como lo son la generación de nuevos preadipocitos a partir de células madre mesenquimales pluripotentes, y la expansión clonal que sufren los preadipocitos previo a su diferenciación en adipocitos, fundamental para la expansión hiperplásica del tejido adiposo; así como la transformación de preadipocitos y células endoteliales a un fenotipo senescente, fundamental en el establecimiento de la fisiología patológica del tejido adiposo.

Cabe destacar que en ambos tejidos, e independientemente si se trate de pacientes obesos con Diabetes Tipo 2 o metabólicamente saludables, encontramos que predomina la isoforma de menor peso molecular de DBC1. Lo anterior sugiere que esta isoforma presenta un relevancia fisiológica *in vivo*, lo cual incita a profundizar su estudio. En este trabajo demostramos que la generación de esta isoforma se trata de un proceso dinámico y finamente regulado según el estado del ciclo celular. Su generación ocurre en condiciones de arresto celular en G₀, como las inducidas por privación de suero, inhibición por contacto o pérdida de adherencia; pero no en condiciones de arresto celular en G₁, como las inducidas por senescencia celular. En este trabajo, el modelo de senescencia celular estudiado corresponde al inducido por sobreexpresión de H-Ras; no obstante, actualmente nos encontramos llevando a cabo otros modelos de senescencia, incluyendo los inducidos por tratamiento con Doxociclina y peróxido de hidrógeno, que nos permitirán si efectivamente se trata de un fenómeno específico de arresto celular en G₀ y no en G₁.

Por otro lado, en este trabajo mostramos que la isoforma de menor peso molecular carece de un porción del extremo N-terminal de la proteína, y contamos con datos preliminares que muestran que su generación ocurre mediante un mecanismo dependiente de caspasas, pero también del proteasoma. Actualmente nos encontramos llevando a cabo el estudio detallado de dicho mecanismo, incluyendo la identificación del sitio específico de corte y de las enzimas involucradas. Cabe recordar que una gran cantidad de las proteínas que interactúan con DBC1 presentan localización exclusivamente nuclear, y tal interacción involucra el extremo N-terminal de DBC1. Siendo así, la identificación del sitio específico de corte resulta de extrema relevancia, porque si esta isoforma carece de la señal de localización nuclear y otras regiones del extremo N-terminal, muchas de las interacciones descritas se verían imposibilitadas, ya sea debido a la pérdida de co-localización subcelular o a la pérdida de dominios indispensables para la interacción. La actividad biológica de la isoforma de menor

75

peso molecular podría entonces presentar grandes diferencias respecto a la actividad biológica de la isoforma completa; quizás implicando una pérdida de función respecto a ciertas interacciones, o una ganancia de función respecto a otras. Por lo pronto, en lo que respecta a la expresión de p65/ReIA, la expresión de la isoforma de menor peso molecular provoca un efecto análogo al observado a la ausencia o disminución de la expresión de DBC1; lo cual sugiere que en este caso, estaría representando una pérdida de función. En concordancia con lo anterior, contamos con datos preliminares que muestran que la regulación de los niveles de ARNm y proteína de p65/ReIA por parte de DBC1 es mediada por su interacción con SIRT1, unas de las proteínas cuya interacción con DBC1

Por último, debido a la aproximación experimental utilizada, nos es imposible distinguir si las isoformas completa y de menor peso molecular de DBC1 se encuentran coexistiendo dentro de la célula o si son mutuamente excluyentes, y su aparición simultánea es en realidad un reflejo de distintas poblaciones celulares. Resolver dicha incógnita puede arrojar luz sobre algunas particularidades observadas durante este trabajo, como el hecho que en determinados casos encontremos ambas isoformas y en otros solo una u otra; variando entre modelos celulares y también en los diferentes casos *in vivo*. En suma, creemos que el esclarecimiento de este tipo de preguntas en conjunto con los datos obtenidos durante este trabajo, nos permitirán establecer de forma más certera el rol de DBC1 en la fisiopatología de la obesidad.

7. Anexo

Nøhr, M. K., <u>Bobba, N</u>., Richelsen, B., Lund, S., and Pedersen, S. B. (2017) Inflammation downregulates UCP1 expression in brown adipocytes potentially via SIRT1 and DBC1 interaction. *Int. J. Mol. Sci.* 10.3390/ijms18051006





Article Inflammation Downregulates UCP1 Expression in Brown Adipocytes Potentially via SIRT1 and DBC1 Interaction

Mark K. Nøhr^{1,2,*}, Natalia Bobba³, Bjørn Richelsen^{1,2}, Sten Lund^{1,2} and Steen B. Pedersen^{1,2}

- ¹ Institute of Clinical Medicine, Aarhus University, 8000 Aarhus C, Denmark; bjoern.richelsen@aarhus.rm.dk (B.R.); sl@dadlnet.dk (S.L.); steen.pedersen@clin.au.dk (S.B.P.)
- ² Department of Endocrinology and Internal Medicine, Aarhus University Hospital, 8000 Aarhus C, Denmark
- ³ Laboratory of Metabolic Diseases and Aging, Institut Pasteur Montevideo, Mataojo 2020, 11400 Montevideo, Uruguay; mnbobba@gmail.com
- * Correspondence: mark.nohr@uhnresearch.ca; Tel.: +1-647-643-9036

Academic Editor: Denis Girard Received: 11 April 2017; Accepted: 2 May 2017; Published: 8 May 2017

Abstract: Brown adipose tissue thermogenesis at the cost of energy is not only important for the development of obesity, but also possesses great promise in anti-obesity treatment. Uncoupling protein 1 (UCP1) expression has been reported to be under control of the intracellular deacetylase SIRT1. Here, we investigated the effect and mechanism of inflammation and sirtuin-1 (SIRT1) activation on the induction of thermogenic genes in immortalized brown adipocytes incubated with LPS or IL1 β and mice with elevated inflammatory tone. In vitro stimulation of brown adipocytes with dibutyryl cyclic adenosine monophosthate (dbcAMP) reduced the expression of deleted in breast cancer-1 (Dbc1) (SIRT1 inhibitor) and increased the Ucp1 expression. Silencing of SIRT1 attenuated dbcAMP induction of *Ucp1*. In contrast, IL1β increased the expression of *Dbc1* and greatly reduced the induction of *Ucp1*. Similarly, in vivo studies revealed decreased expression of *Ucp1* in brown adipose tissue (BAT) in mice chronically infused with LPS. Resveratrol, a known SIRT1 activator, partly rescued the *Ucp1* downregulation by inflammation in both the cell cultures and mice. Here, we describe how the expression of Ucp1 in BAT is controlled via SIRT1 and is reduced under inflammation and can be rescued by SIRT1 activation by resveratrol. We suggest the reduced UCP1 expression under inflammation is mediated by the increased expression of DBC1, which inhibits SIRT1 activity.

Keywords: IL1_β; LPS; BAT; UCP1; DBC1; obesity; SIRT1

1. Introduction

Obesity is, today, a major health concern affecting millions of people worldwide. With obesity, a number of disorders, such as low-grade inflammation, insulin resistance, and type 2 diabetes, are seen [1].

Obesity-associated low-grade inflammation is a potential contributor of insulin resistance [2–4]. However, the eliciting factor of low-grade inflammation is not currently known, though adipose tissue hypoxia [5], free fatty acids [6,7], and metabolic endotoxemia [8] have been mentioned. Metabolic endotoxemia is presumably caused by "leaky" gut epithelium causing lipopolysaccharides (LPSs) originating from Gram-negative gut bacteria to enter the systemic circulation. LPS binds to Toll-like receptor 4 (TLR4) on innate immune cells and signals nuclear factor κ B (NF- κ B) translocation to the nucleus and transcription of proinflammatory cytokines [9]. White adipocytes express TLR4 [6] and are, as such, important immunomodulators. In recent reports, immortalized murine brown adipocytes were reported to express TLR4 and cytokine production when stimulated with LPS [10,11].

In the hunt for new effective anti-obesity treatments, brown adipose tissue (BAT) manipulation has become an attractive candidate. Brown adipocytes express the mitochondrial protein uncoupling protein 1 (UCP1) which uncouples the respiratory chain and thereby generates heat (non-shivering thermogenesis). Thus, instead of storing energy, as seen in white adipose tissue (WAT), BAT burns energy in a process which could be exploited therapeutically. Originally, BAT was believed to be present only in newborns, and gradually lost thereafter. However, later evidence identified areas in, e.g., the neck region of adult humans which were reported as BAT [12–14]. Despite the rather limited amount of BAT in adult humans, WAT has a high degree of plasticity and can undergo a "browning" process, i.e., increased expression of BAT-related genes, such as *Ucp1* [15].

Opposite to increasing the amount of BAT and UCP1 expression, having none, or reduced, BAT could also be a contributing factor in the development of obesity. Indeed, the probability of having BAT is inversely correlated with age and body weight [12]. Thus, efforts are being made to elucidate potential mechanisms by which the BAT activity is reduced. In the context of obesity, proinflammatory cytokines, such as interleukin-1 β (IL1 β) and tumor necrosis factor α (TNF α), or endotoxins (LPS) from the intestine, could influence the expression of thermogenic genes in BAT cells. Furthermore, it was recently shown that reduced browning of white adipose tissue is directly regulated by macrophages docking on adipocytes via integrin α_4 and its receptor vascular cell adhesion protein 1 [16]. Additionally, UCP1 was recently shown to be downregulated in brown adipocytes treated with LPS [10].

In WAT, the induction of BAT-associated genes (*Ucp1*, *Cidea*, *Dio2*) is under the control of sirtuin-1 (SIRT1)-dependent deacetylation of the transcription factor peroxisome proliferator-activated receptor- γ (PPAR γ) [17]. SIRT1 is a NAD⁺-dependent intracellular deacetylase with pleiotropic effects, such as inhibition of NF- κ B activity [18] and stimulation of PPAR γ co-activator 1 α (PGC1 α) activity [19] in addition to the already-mentioned PPAR γ deacetylation [17]. Additionally, the deletion of the endogenous intracellular SIRT1 inhibitor deleted in breast cancer-1 (DBC1) [20,21] resulted in significant upregulation of brown genes in WAT [17].

Despite the mechanism not being fully established [22–25], the naturally-occurring (found especially in red wine) polyphenol resveratrol enhances the activity of SIRT1. This results in increased UCP1 expression in HIB-1B brown adipocytes [17].

In the present study, we investigated the expression of brown genes in BAT harvested from a murine model of low-grade inflammation in which LPS was continuously infused via osmotic mini-pumps for 28 days. Furthermore, utilizing immortalized brown adipocytes, we studied regulatory mechanisms of brown genes during inflammation induced by IL1 β and low-dose LPS. In addition, resveratrol was tested for its effects on brown adipocyte activity.

2. Results

2.1. Inflammation Reduces Expression of Ucp1 in Mature Brown Adipocytes

To investigate inflammatory effects on *Ucp1* expression, we used immortalized brown adipocytes to test their ability to induce brown genes after incubation with low-dose LPS or IL1 β . As *Ucp1* expression is induced by cAMP in BAT, we stimulated cells 4 h with dibutyryl cyclic adenosine monophosthate (dbcAMP) to induce *Ucp1* [26]. Following stimulation with dbcAMP, *Ucp1* expression increased dramatically (Figure 1A). To mimic metabolic low-grade inflammation, we tested rather low concentrations of LPS. However, neither 2 nor 20 ng/mL of LPS affected the expression of *Ucp1* (Figure 1A). Oppositely, IL1 β at a concentration of 2 ng/mL greatly reduced the induction of *Ucp1* (Figure 1A). In addition, IL1 β reduced the induction of the brown genes *Prdm16* and *Cidea* together with *Pgc1a* important for mitochondrial biogenesis (Figure 1B). Additionally, there was a non-significant trend towards reduced *Dio2* expression by IL1 β (Figure 1B).



Figure 1. Effects of lipopolysaccharide (LPS) and interleukin 1 β (IL1 β) on the induction of brown genes in cultured immortalized brown adipocytes. (**A**) 4 h stimulation with dibutyryl cyclic adenosine monophosthate (dbcAMP) significantly induced *Ucp1* expression in mature brown adipocytes. Incubation with low-doses (2 and 20 ng/mL) of LPS did not affect the induction of *Ucp1*. Incubation with IL1 β (2 ng/mL) significantly reduced the induction of *Ucp1* (n = 6); (**B**) IL1 β incubation also affected the induction other brown adipose tissue (BAT)-associated genes such as *Pgc1a*, *Prdm16*, *Cidea*. *Dio2* showed a non-significant trend towards reduced expression by IL1 β (n = 6); (**C**) SIRT1 silencing by *Sirt1* siRNA significantly (Student's *t*-test) upregulated with additional IL1 β incubation. * denotes p < 0.05, ** denotes p < 0.01, *** denotes p < 0.001, **** denotes p < 0.001 according to one-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc analysis or Student's *t*-test.

+ +

2.2. Regulation of Ucp1 Expression (dbcAMP and SIRT1 Knock-down Experiments)

Ctr siRNA

IL16

Sirt1 siRNA

Ctr

siRNA

Sirt1

siRNA

In our experiments dbcAMP increased *Ucp1* expression \approx 120-fold (p < 0.0001). Previously, SIRT1 activity has been described to be an important regulator of brown remodeling in WAT, including increased expression of UCP1 [17]. In support of this view, we found that partial knock-down of *Sirt1* expression by *Sirt1* siRNA in mature brown adipocytes resulted in reduced induction of *Ucp1* (Figure 1C) by dbcAMP. As SIRT1 activity is regulated at the molecular enzymatic level rather than expressional level [27] by DBC1 [21], we investigated the expression of the endogenous SIRT1 inhibitor DBC1 in our system. When cells were stimulated with dbcAMP, there was a 50% reduction in *Dbc1* expression, which was partly reversed by IL1 β (Student's *t*-test; Figure 1D) resembling the reciprocal expression of *Ucp1* (Figure 1A).

(+) IL1β

(-)

(+)

2.3. Resveratrol Partly Rescues Ucp1 Downregulation by IL1B

Though the mechanism is not precisely known, resveratrol has been described to enhance the activity of SIRT1. We, therefore, wanted to investigate whether resveratrol could rescue the IL1 β -induced decline in *Ucp1* expression. Both 12.5 and 25 μ M of resveratrol partly reduced the downregulation of *Ucp1* induced by IL1 β (Figure 2A). The former concentration showed the highest effect. Resveratrol showed no rescuing effect of *Pgc1a* expression or the brown genes *Prdm16*, *Cidea*, and *Dio2* and 25 μ M resveratrol actually further downregulated *Pgc1a* (Figure 2B).



Figure 2. Resveratrol partly rescues IL1 β -induced downregulation of *Ucp1*. (**A**) Resveratrol at 12.5 and 25 μ M reduced IL1 β -mediated downregulation of *Ucp1* (n = 5 to 6); (**B**) Resveratrol showed no ameliorating effects on IL1 β -mediated downregulation of *Pgc1a*, *Prdm16*, *Cidea*, and *Dio2* (n = 5 to 6). Resveratrol at 25 μ M further downregulated the expression of *Pgc1a*. * denotes p < 0.05 ** denotes p < 0.01, **** denotes p < 0.0001 according to one-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc analysis.

2.4. Effects of Chronic Inflammation on Thermogenic Genes in BAT and WAT in Mice

To investigate LPS-mediated alterations of brown genes in BAT and subcutaneous WAT (scWAT), we used a murine model where LPS was infused for 28 days via osmotic mini-pumps [28]. Harvested

interscapular BAT showed decreased expression of *Ucp1* by LPS treatment, which was reversed by resveratrol (Figure 3A). Furthermore, LPS reduced the expression of *Cidea* (Figure 3C), but not *Prdm16* (Figure 3B) and *Dio2* (Figure 3D). Resveratrol showed no significant effect on *Prdm16*, *Cidea*, or *Dio2* expression (Figure 3B–D).



Figure 3. The effects of selected brown genes' expression in BAT in mice treated with LPS via osmotic mini-pumps and resveratrol through the diet for 28 day. (**A**) *Ucp1*; (**B**) *Prdm16*; (**C**) *Cidea*; and (**D**) *Dio2* expression in control, LPS-treated, or LPS- and resveratrol-treated mice (n = 14 to 15). * denotes p < 0.05, ** denotes p < 0.01 according to one-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc analysis.

In scWAT from mice treated with LPS, there was a similar inhibitory pattern on the thermogenic genes (Figure 4). The decrease in *Ucp1* (Figure 4A) and *Dio2* (Figure 4D) expression did not reach statistical significance, whereas the inhibition of *Prdm16* and *Cidea* after LPS treatment was significant (Figure 4B,C). For all thermogenic genes in WAT resveratrol seemed to attenuate the LPS induced inhibition (albeit not statistically significant) (Figure 4).

Α

Ucp1 (relative expression)

2.0

1.5

1.0

0.5

0.0

Ctr/s

aline Ctr/LPS

p = 0.25





Figure 4. Gene expression of thermogenic genes in subcutaneous white adipose tissue in mice treated with LPS via osmotic mini-pumps and resveratrol through the diet for 28 day. (**A**) *Ucp1*; (**B**) *Prdm16*; (**C**) *Cidea*; and (**D**) *Dio2* expression in control, LPS-treated, or LPS- and resveratrol-treated mice (n = 10). * denotes p < 0.05, ** denotes p < 0.01 according to one-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc analysis.

2.5. Expression of Tlr4 in Brown Adipocytes

As we found no effects of LPS on brown adipocyte induction in vitro, as opposed to our findings in vivo of *Ucp1*, we questioned whether brown adipocytes express TLR4, which is the receptor mediator of LPS-effects. Previously, white adipocytes have been reported to express TLR4 [6]. Thus, to get an impression of TLR4 gene expression in our brown adipocytes, we combined it with the expression in 3T3-L1 cells originally isolated from white adipose tissue. Brown adipocytes showed a higher *Tlr4* expression compared to white adipocytes (Avg. Ct: 26.6 (brown) vs. 27.1 (white); Figure 5A). Additionally, we compared the *Tlr4* expression of various tissues in normal C57BL/6 mice; epididymal (white) adipose tissue (eWAT) showed the highest expression compared to BAT, which had a higher expression than intestine (Figure 5B).



Figure 5. Expression of *Tlr4* in adipocytes and whole tissue. (**A**) Expression of *Tlr4* in mature immortalized brown adipocytes and white 3T3-L1 adipocytes (n = 6 to 7); (**B**) Expression of *Tlr4* in BAT, epididymal adipose tissue, and small intestine (ileum) of wild-type C57BL/6 mice (n = 10 to 17). * denotes p < 0.05, **** denotes p < 0.0001 according to one-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc analysis.

Despite the expression of *Tlr4*, we could not detect any inflammatory response of LPS treatment on expression of the NF- κ B target genes *ll1b* and *Tnfa* in BAT cells. However, LPS stimulation of 3T3-cells elicited an inflammatory response. Similarly, IL1 β stimulation induced a robust rise in the inflammatory status of 3T3-cells (TNF α and IL1 β mRNA levels), whereas IL1 β stimulation in BAT did not increase the mRNA levels of TNFa and IL1 β (data not shown).

3. Discussion

In this investigation, we showed the reduced expression of *Ucp1* and *Cidea* in mice continuously infused with LPS for 28 days. In immortalized brown adipocytes, incubation with low-dose LPS (2 and 20 ng/mL) did not affect the induction of brown genes. However, incubation with IL1 β greatly reduced the induction of *Ucp1* and other brown genes. SIRT1 is probably an important mediator of *Ucp1* induction as *Dbc1* (SIRT1 inhibitor) was upregulated by IL1 β incubation and co-incubation with resveratrol (SIRT1 activator) reduced the detrimental effects of IL1 β on *Ucp1* induction.

We found a reduced expression of brown genes in mice chronically infused with low-dose LPS (Figure 3) and, in agreement with a recent publication [10], we report the gene expression of the LPS sensing receptor TLR4 by brown adipocytes (Figure 5). Thus, brown adipocytes are probably capable of sensing LPS, but we did not find a direct effect of LPS in mature BAT cells in vitro. In contrast, we found that IL1 β reduces the expression of brown genes in mature BAT cells in vitro. This opens the possibility that the observed reduced *Ucp1* expression in vivo by LPS is not directly caused by LPS stimulation of adipocytes, but mediated indirectly via LPS stimulation of macrophages within the tissue to release catecholamines [29], a hypothesis that was recently challenged as macrophages seem to lack the rate-limiting enzyme tyrosine hydroxylase [30], or by LPS stimulating the inflammatory tone and, thus, eliciting other cell types, either locally or more distant to release IL1 that subsequently inhibits UCP1 expression. In support of the latter, recent reports have suggested an important role of macrophage-derived IL1 β in diminished browning of white adipocytes in an extracellular signal-regulated kinase-dependent manner [31,32]. Our study supports this notion as we found that chronic inflammation by LPS treatment of the mice generally resulted in a decreased expression of the

thermogenic genes in subcutaneous WAT and *Prdm16* (a marker of browning), indicating that LPS treatment diminish browning of WAT.

Surprisingly, treatment of BAT cells in vitro with either IL1 β or LPS did not result in transcription of NF- κ B target genes (*Il1b*, *Tnfa*) suggesting brown adipocytes are immunologically naïve and do not participate in the escalation of inflammatory responses. In white adipocytes, LPS and IL1 β treatment results in increased expression of proinflammatory markers such as monocyte chemoattractant protein-1, interleukin-6, and TNF α [33,34]. However, despite the lack of inflammatory response in brown adipocytes, IL1 β does modulate expression of *Ucp1*.

An interesting observation was the expression pattern of the endogenous SIRT1 inhibitor DBC1. Stimulation (with dbcAMP) of brown adipocytes resulted in downregulation of *Dbc1*, which was partly reversed by IL1 β . Previously, the expression of *Ucp1* has been described to be under influence of SIRT1 activity [17], which we also confirmed in mature brown adipocytes (Figure 1C). It is, therefore, intriguing to suggest that IL1 β might control the expression of UCP1 via altering the expression of DBC1 (Figure 6).



Figure 6. The suggested hypothesis of IL1 β -mediated regulation of UCP1 in brown adipocytes. IL1 β stimulation upregulates the expression of the SIRT1 inhibitor DBC1. SIRT1 has, here, and previously [17], been shown to be an important regulator of UCP1. Furthermore, enhancing the SIRT1 activity by, e.g., resveratrol, can upregulate the expression of UCP1. Arrow: stimulation; T bar: inhibition.

In support of SIRT1 as a regulator of UCP1 expression, we saw that resveratrol, a known SIRT1 activator, partly rescued the *Ucp1* gene expression following LPS and IL1 β treatment in either in vivo or in vitro experiments, respectively. Resveratrol has previously been described to increase energy expenditure in mice [35], which could be explained by the increased expression of *Ucp1*, as we report. Regulation of SIRT1 by resveratrol is a direct effect resulting in increased acetylase activity of the SIRT1 enzyme [23], whereas SIRT1 expression is not commonly regulated by resveratrol [27]. This is in accordance with our findings as we did not detect any effect of LPS or resveratrol on SIRT1 mRNA expression in vivo.

Here, we have shown that low-grade inflammation could be a potential mechanism behind reduced UCP1 expression, which could ultimately lead to obesity or worsen the consequences of obesity. In addition, we have provided data showing that the *Ucp1* expression is regulated by the SIRT1 activity, as DBC1 (SIRT1 inhibitor) and resveratrol (SIRT1 activator) showed opposing effects on *Ucp1* expression. We suggest the manipulation of the SIRT1 activity and its potentially-coupled regulation of UCP1 could be a possible future drug target in anti-obesity treatment.

4. Materials and Methods

4.1. Cell Cultures

Murine immortalized brown preadipocytes [26] (a kind gift from Bruce Spiegelman, Boston, MA, USA) were grown to approximately 80% confluence in growth medium consisting of Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM) supplemented with 20% fetal calf serum (FCS) and 1% pen/strep. The medium was changed every second day. For initiation of the differentiation into mature brown adipocytes, cells were changed to a differentiation medium (day 0) consisting of DMEM, 10% FCS, 1% pen/strep, 0.02 μ M insulin, 5 μ M dexamethasone, 125 μ M indomethacin, 1 nM T3, and 500 μ M isobutylmethylxanthine (IBMX) for 48 h after which the cells were changed (day 2) to the differentiation medium omitting dexamethasone, indomethacin, and IBMX. After five days of differentiation, the cells were ready for experiment procedure.

The incubation period with LPS (*Escherichia coli* serotype 0111:B4, Sigma, St. Louis, MO, USA), IL1 β (Sigma, St. Louis, MO, USA) and resveratrol (Evolva, Copenhagen, Denmark) was 24 h at 37 °C. After 20 h of treatment, and cells were supplemented with 500 μ M dbcAMP for 4 h to induce the thermogenic program. Concentrations of the used compounds were: LPS: 2 and 20 ng/mL, IL1 β : 2 ng/mL, and resveratrol: 12.5 and 25 μ M. Resveratrol was diluted in dimethyl sulfoxide.

3T3-L1 cells were grown and differentiated as previously published [33].

4.2. Gene Silencing

Silencing of SIRT1 gene expression was obtained with Lipofectamine 2000 Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) according to manufacturer's instructions. *Sirt1* (MSS234959) or control (4390843) siRNA (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) was added to the cells at day 2 of the differentiation process and incubated for 20 h. At day 3, the medium was changed and the cells were incubated for further 24 h (day 4) and subjected to the treatment protocol. Cells were harvested at day 5.

4.3. Animal Experiments

A murine model of low-grade inflammation was used to test the effect of inflammation and resveratrol on BAT. The procedures have previously been published [28]. Briefly, C57BL/6N mice were subcutaneously implanted with osmotic mini-pumps which infused either LPS (*Escherichia coli* serotype 055:B55, Sigma) at a dose of 600 μ g/kg/day or vehicle (saline) for 28 days. Mice had ad libitum access to water and control (Ctr) or resveratrol (Rsv) diet (24% protein, 12% fat, 64% carbohydrates) throughout this treatment period. The Rsv diet consisted of 4 g Rsv per kg chow diet. Interscapular BAT, eWAT, scWAT, and intestine (ileum) were harvested and frozen for gene expression analysis. Animal experiments were approved by the Danish Council for Animal Experiments (No.: 2013-15-2934-00899) and followed the guidelines given in the European Communities Directive of 24 November 1986 (86/609/ECC).

4.4. Gene Expression

For extraction of total RNA from cell cultures, cells were briefly incubated in Trizol reagent (Invitrogen), collected in tubes, and frozen for later RNA isolation. For tissue RNA extraction, tissues were homogenized in Trizol reagent with a mixer mill. RNA isolation, reverse transcription, and quantitative PCR (qPCR) followed the principles published previously [28]. Primer sequences for qPCR were designed with QuantPrime [36] and can be found in Table S1. Generally, *Rplp0* was used as a housekeeping gene except for Figure 3 (*Polr2a*) and Figures 4 and 5A (*Gapdh*).

4.5. Statistics

Data are presented as means \pm standard error of the mean (SEM). Differences of means were evaluated by Student's *t*-test or ANOVA, followed by a post hoc test where appropriate. Calculation of *p* values and the generation of figures were performed with GraphPad Prism v. 7.0B (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA).

Supplementary Materials: Supplementary materials can be found at www.mdpi.com/1422-0067/18/5/1006/s1.

Acknowledgments: We would like to thank Lenette Pedersen, Pia Hornbæk, and Trine Kristensen for technical assistance in the lab and in the animal facility. Mark K. Nøhr was supported by a Ph.D. scholarship from the Faculty of Health, Aarhus University. The study was supported by the Novo Nordisk Foundation and is part of the research program LIRMOI Research Center (www.LIRMOI.com), which is supported by the Danish Council for Strategic Research (Grant 10-093499).

Author Contributions: Mark K. Nøhr, Natalia Bobba, Bjørn Richelsen, Sten Lund and Steen B. Pedersen conceived and designed the experiments; Mark K. Nøhr performed the experiments; Mark K. Nøhr and Steen B. Pedersen analyzed the data; Natalia Bobba, Bjørn Richelsen, and Steen B. Pedersen contributed reagents/materials/analysis tools; and Mark K. Nøhr and Steen B. Pedersen wrote the paper.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Abbreviations

BAT	Brown adipose tissue
cAMP	Cyclic adenosine monophosphate
CIDEA	Cell death activator CIDE-A
DBC1	Deleted in breast cancer 1
dbcAMP	Dibutyryl cyclic adenosine monophosphate
DIO2	Type 2 iodothyronine deiodinase
IL1β	Interleukin 1 β
LPS	Lipopolysaccharide
NF-ĸB	Nuclear factor к В
PGC1a	PPAR γ co-activator 1 α
PPARγ	Peroxisome proliferator-activated receptor γ
PRDM16	PR domain containing 16
SIRT1	Sirtuin-1
TLR4	Toll-like receptor 4
TNFα	Tumor necrosis factor α
UCP1	Uncoupling protein 1
WAT	White adipose tissue

References

- 1. Gregor, M.F.; Hotamisligil, G.S. Inflammatory mechanisms in obesity. *Annu. Rev. Immunol.* **2011**, *29*, 415–445. [CrossRef] [PubMed]
- 2. Hotamisligil, G.S.; Shargill, N.S.; Spiegelman, B.M. Adipose expression of tumor necrosis factor-α: Direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* **1993**, *259*, 87–91. [CrossRef] [PubMed]
- 3. Klover, P.J.; Clementi, A.H.; Mooney, R.A. Interleukin-6 depletion selectively improves hepatic insulin action in obesity. *Endocrinology* **2005**, *146*, 3417–3427. [CrossRef] [PubMed]
- Lagathu, C.; Yvan-Charvet, L.; Bastard, J.P.; Maachi, M.; Quignard-Boulange, A.; Capeau, J.; Caron, M. Long-term treatment with interleukin-1 β induces insulin resistance in murine and human adipocytes. *Diabetologia* 2006, 49, 2162–2173. [CrossRef] [PubMed]
- Hosogai, N.; Fukuhara, A.; Oshima, K.; Miyata, Y.; Tanaka, S.; Segawa, K.; Furukawa, S.; Tochino, Y.; Komuro, R.; Matsuda, M.; et al. Adipose tissue hypoxia in obesity and its impact on adipocytokine dysregulation. *Diabetes* 2007, *56*, 901–911. [CrossRef] [PubMed]
- 6. Shi, H.; Kokoeva, M.V.; Inouye, K.; Tzameli, I.; Yin, H.; Flier, J.S. Tlr4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. *J. Clin. Investig.* **2006**, *116*, 3015–3025. [CrossRef] [PubMed]

- Nguyen, M.T.; Favelyukis, S.; Nguyen, A.K.; Reichart, D.; Scott, P.A.; Jenn, A.; Liu-Bryan, R.; Glass, C.K.; Neels, J.G.; Olefsky, J.M. A subpopulation of macrophages infiltrates hypertrophic adipose tissue and is activated by free fatty acids via toll-like receptors 2 and 4 and JNK-dependent pathways. *J. Biol. Chem.* 2007, 282, 35279–35292. [CrossRef] [PubMed]
- Cani, P.D.; Amar, J.; Iglesias, M.A.; Poggi, M.; Knauf, C.; Bastelica, D.; Neyrinck, A.M.; Fava, F.; Tuohy, K.M.; Chabo, C.; et al. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes* 2007, *56*, 1761–1772. [CrossRef] [PubMed]
- 9. Akira, S.; Uematsu, S.; Takeuchi, O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* **2006**, *124*, 783–801. [CrossRef] [PubMed]
- Bae, J.; Ricciardi, C.J.; Esposito, D.; Komarnytsky, S.; Hu, P.; Curry, B.J.; Brown, P.L.; Gao, Z.; Biggerstaff, J.P.; Chen, J.; et al. Activation of pattern recognition receptors in brown adipocytes induces inflammation and suppresses uncoupling protein 1 expression and mitochondrial respiration. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2014, 306, C918–C930. [CrossRef] [PubMed]
- Bae, J.; Chen, J.; Zhao, L. Chronic activation of pattern recognition receptors suppresses brown adipogenesis of multipotent mesodermal stem cells and brown pre-adipocytes. *Biochem. Cell Biol.* 2015, 93, 251–261. [CrossRef] [PubMed]
- Cypess, A.M.; Lehman, S.; Williams, G.; Tal, I.; Rodman, D.; Goldfine, A.B.; Kuo, F.C.; Palmer, E.L.; Tseng, Y.H.; Doria, A.; et al. Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. *N. Engl. J. Med.* 2009, *360*, 1509–1517. [CrossRef] [PubMed]
- 13. Cypess, A.M.; White, A.P.; Vernochet, C.; Schulz, T.J.; Xue, R.; Sass, C.A.; Huang, T.L.; Roberts-Toler, C.; Weiner, L.S.; Sze, C.; et al. Anatomical localization, gene expression profiling and functional characterization of adult human neck brown fat. *Nat. Med.* **2013**, *19*, 635–639. [CrossRef] [PubMed]
- 14. Jespersen, N.Z.; Larsen, T.J.; Peijs, L.; Daugaard, S.; Homoe, P.; Loft, A.; de Jong, J.; Mathur, N.; Cannon, B.; Nedergaard, J.; et al. A classical brown adipose tissue mrna signature partly overlaps with brite in the supraclavicular region of adult humans. *Cell Metab.* **2013**, *17*, 798–805. [CrossRef] [PubMed]
- Guerra, C.; Koza, R.A.; Yamashita, H.; Walsh, K.; Kozak, L.P. Emergence of brown adipocytes in white fat in mice is under genetic control. Effects on body weight and adiposity. *J. Clin. Investig.* 1998, 102, 412–420. [CrossRef] [PubMed]
- Chung, K.J.; Chatzigeorgiou, A.; Economopoulou, M.; Garcia-Martin, R.; Alexaki, V.I.; Mitroulis, I.; Nati, M.; Gebler, J.; Ziemssen, T.; Goelz, S.E.; et al. A self-sustained loop of inflammation-driven inhibition of beige adipogenesis in obesity. *Nat. Immunol.* 2017. [CrossRef] [PubMed]
- Qiang, L.; Wang, L.; Kon, N.; Zhao, W.; Lee, S.; Zhang, Y.; Rosenbaum, M.; Zhao, Y.; Gu, W.; Farmer, S.R.; et al. Brown remodeling of white adipose tissue by SirT1-dependent deacetylation of Pparγ. *Cell* 2012, 150, 620–632. [CrossRef] [PubMed]
- Yeung, F.; Hoberg, J.E.; Ramsey, C.S.; Keller, M.D.; Jones, D.R.; Frye, R.A.; Mayo, M.W. Modulation of nf-kappab-dependent transcription and cell survival by the SirT1 deacetylase. *EMBO J.* 2004, 23, 2369–2380. [CrossRef] [PubMed]
- 19. Rodgers, J.T.; Lerin, C.; Haas, W.; Gygi, S.P.; Spiegelman, B.M.; Puigserver, P. Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1α and SIRT1. *Nature* **2005**, *434*, 113–118. [CrossRef] [PubMed]
- 20. Zhao, W.; Kruse, J.P.; Tang, Y.; Jung, S.Y.; Qin, J.; Gu, W. Negative regulation of the deacetylase sirt1 by dbc1. *Nature* **2008**, *451*, 587–590. [CrossRef] [PubMed]
- 21. Kim, J.E.; Chen, J.; Lou, Z. Dbc1 is a negative regulator of sirt1. *Nature* 2008, 451, 583–586. [CrossRef] [PubMed]
- 22. Howitz, K.T.; Bitterman, K.J.; Cohen, H.Y.; Lamming, D.W.; Lavu, S.; Wood, J.G.; Zipkin, R.E.; Chung, P.; Kisielewski, A.; Zhang, L.L.; et al. Small molecule activators of sirtuins extend saccharomyces cerevisiae lifespan. *Nature* **2003**, *425*, 191–196. [CrossRef] [PubMed]
- 23. Hubbard, B.P.; Gomes, A.P.; Dai, H.; Li, J.; Case, A.W.; Considine, T.; Riera, T.V.; Lee, J.E.; E, S.Y.; Lamming, D.W.; et al. Evidence for a common mechanism of sirt1 regulation by allosteric activators. *Science* **2013**, 339, 1216–1219. [CrossRef] [PubMed]
- 24. Park, S.J.; Ahmad, F.; Philp, A.; Baar, K.; Williams, T.; Luo, H.; Ke, H.; Rehmann, H.; Taussig, R.; Brown, A.L.; et al. Resveratrol ameliorates aging-related metabolic phenotypes by inhibiting camp phosphodiesterases. *Cell* **2012**, *148*, 421–433. [CrossRef] [PubMed]

- 25. Price, N.L.; Gomes, A.P.; Ling, A.J.; Duarte, F.V.; Martin-Montalvo, A.; North, B.J.; Agarwal, B.; Ye, L.; Ramadori, G.; Teodoro, J.S.; et al. Sirt1 is required for ampk activation and the beneficial effects of resveratrol on mitochondrial function. *Cell Metab.* **2012**, *15*, 675–690. [CrossRef] [PubMed]
- Uldry, M.; Yang, W.; St-Pierre, J.; Lin, J.; Seale, P.; Spiegelman, B.M. Complementary action of the pgc-1 coactivators in mitochondrial biogenesis and brown fat differentiation. *Cell Metab.* 2006, *3*, 333–341. [CrossRef] [PubMed]
- 27. Baur, J.A.; Pearson, K.J.; Price, N.L.; Jamieson, H.A.; Lerin, C.; Kalra, A.; Prabhu, V.V.; Allard, J.S.; Lopez-Lluch, G.; Lewis, K.; et al. Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature* **2006**, 444, 337–342. [CrossRef] [PubMed]
- Nøhr, M.K.; Dudele, A.; Poulsen, M.M.; Ebbesen, L.H.; Radko, Y.; Christensen, L.P.; Jessen, N.; Richelsen, B.; Lund, S.; Pedersen, S.B. LPS-enhanced glucose-stimulated insulin secretion is normalized by resveratrol. *PLoS ONE* 2016, 11, e0146840. [CrossRef] [PubMed]
- Flierl, M.A.; Rittirsch, D.; Nadeau, B.A.; Chen, A.J.; Sarma, J.V.; Zetoune, F.S.; McGuire, S.R.; List, R.P.; Day, D.E.; Hoesel, L.M.; et al. Phagocyte-derived catecholamines enhance acute inflammatory injury. *Nature* 2007, 449, 721–725. [CrossRef] [PubMed]
- Fischer, K.; Ruiz, H.H.; Jhun, K.; Finan, B.; Oberlin, D.J.; van der Heide, V.; Kalinovich, A.V.; Petrovic, N.; Wolf, Y.; Clemmensen, C.; et al. Alternatively activated macrophages do not synthesize catecholamines or contribute to adipose tissue adaptive thermogenesis. *Nat. Med.* 2017, *23*, 623–630. [CrossRef] [PubMed]
- 31. Sakamoto, T.; Takahashi, N.; Sawaragi, Y.; Naknukool, S.; Yu, R.; Goto, T.; Kawada, T. Inflammation induced by raw macrophages suppresses *UCP1* mRNA induction via ERK activation in 10T1/2 adipocytes. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **2013**, 304, C729–C738. [CrossRef] [PubMed]
- 32. Goto, T.; Naknukool, S.; Yoshitake, R.; Hanafusa, Y.; Tokiwa, S.; Li, Y.; Sakamoto, T.; Nitta, T.; Kim, M.; Takahashi, N.; et al. Proinflammatory cytokine interleukin-1β suppresses cold-induced thermogenesis in adipocytes. *Cytokine* **2016**, *77*, 107–114. [CrossRef] [PubMed]
- 33. Cullberg, K.B.; Larsen, J.O.; Pedersen, S.B.; Richelsen, B. Effects of LPS and dietary free fatty acids on MCP-1 in 3T3-l1 adipocytes and macrophages in vitro. *Nutr. Diabetes* **2014**, *4*, e113. [CrossRef] [PubMed]
- 34. Chirumbolo, S.; Franceschetti, G.; Zoico, E.; Bambace, C.; Cominacini, L.; Zamboni, M. Lps response pattern of inflammatory adipokines in an in vitro 3T3-l1 murine adipocyte model. *Inflamm. Res.* **2014**, *63*, 495–507. [CrossRef] [PubMed]
- 35. Lagouge, M.; Argmann, C.; Gerhart-Hines, Z.; Meziane, H.; Lerin, C.; Daussin, F.; Messadeq, N.; Milne, J.; Lambert, P.; Elliott, P.; et al. Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating sirt1 and PGC-1α. *Cell* 2006, 127, 1109–1122. [CrossRef] [PubMed]
- Arvidsson, S.; Kwasniewski, M.; Riano-Pachon, D.M.; Mueller-Roeber, B. Quantprime-a flexible tool for reliable high-throughput primer design for quantitative pcr. *BMC Bioinform.* 2008, *9*, 465. [CrossRef] [PubMed]



© 2017 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

8. Referencias bibliográficas

- Bray, G. A., and Bouchard, C. (2014) Handbook of Obesity: Epidemiology, Etiology, and Physiopathology, 3rd Ed. (Bray, G. A., and Bouchard, C. eds), CRC Press, Boca Raton
- Bonnet, T. (1700) Sepulchretumsive Anatomia Practica, ex Cadaveribus Morbo Denatis, Proponens Historias Omnium Humani Corporis Affectum. *Geneva: Sumptibus Cramer & Perachonov*
- 3. Haller, A. (1756) Corpulence III Cured; Large Cryptae of the Stomach (etc). *Path Obs.*
- 4. Morgagni, J. B. (1761) De Sedibus, et Causis Morborum per Anatomen Indagatis. Venezia: Remondini.
- 5. Wadd, W. (1829) Comments on Corpulence Lineaments of Leanness Mems on Diet and Dietetics. *London John Ebers Co.*
- 6. Hassall, A. (1849) Observations on the Development of the Fat Vesicle. London Lancet. 9, 295
- 7. Hoggan, G., and Hoggan, F. (1879) On the development and retrogression of the fat cell. J. R. Microsc. Soc.
- 8. Association of Life Insurance Medical Directors (1912) Medico-actuarial mortality investigations.
- Lu, D., Willard, D., Patel, I. R., Kadwell, S., Overton, L., Kost, T., Luther, M., Chen, W., Woychik, R. P., and Wilkison, W. O. (1994) Agouti protein is an antagonist of the melanocyte-stimulating-hormone receptor. *Nature*. 371, 799–802
- Coleman, D. L. (1973) Effects of parabiosis of obese with diabetes and normal mice. *Diabetologia*. 9, 294–298
- Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Lori, L., and Friedman, J. M. (1994) Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*. **372**, 425–432
- Babinski, M. J. (1900) Tumeur du corps pituitaire san acromegalie et avec arret de developpement des organes genitaux. *Rev.Neurol.* 8, 531–533
- Frohlich, a (1901) Ein fall von tumor der hypophysis cerebri ohne akromegalie. Weiner Klin.Rdsch. 15, 883–886
- 14. Cushing, H. (1912) The Pituitary Body and its Disorders. Cal State J Med. 12
- 15. Davenport, C. (1923) Body-Build and its inheritance. Carnegie Inst. Washingtong. 9, 226–230
- Von Verscheuer, O. (1927) Inhre Biologischen Grnndlagen. Ergebnisse der Inneren Medizin und Kinderheilkunde. Berline Verlag von Jul. Spring
- 17. Mohr, G. (1937) Review: Twins: a study of heredity and environment. *Am. J. Orthopsychiatry.* **8(1)**, 167–168
- 18. Levenstein, H. A. (2003) *Revolution at the Table: The Transformation of the American Diet*, Univ. of California Press, California
- 19. WHO (2014) Global status report on noncommunicable diseases 2014, ISBN 9789241564854
- 20. Short, T. (1727) *Discourse Concerning the Causes and Effects of Corpulency Together with the Method for Its Prevention and Cure.*, London
- NHLBI Obesity Education Initiative Expert Panel on the Identification, Evaluation, and T. of O. in A. (1998)
 Clinical Guidelines on the Identification, Evaluation, and Treatment of Overweight and Obesity in Adults.
 Obes Res. 10.1001/jama.2012.39
- Snyder, W.S. Cook, M.J. Nasset, E. S. (1979) *Report of the task group on reference man*, ICRP Publication
 Pergamon Press, Oxford, 10.1016/0020-708X(77)90145-4

- Wang, Z., St-Onge, M.-P., Lecumberri, B., Pi-Sunyer, F. X., Heshka, S., Wang, J., Kotler, D. P., Gallagher, D., Wielopolski, L., Pierson, R. N., and Heymsfield, S. B. (2004) Body cell mass: model development and validation at the cellular level of body composition. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 286, E123–E128
- 24. Heymsfield, S. B., Wang, Z., Baumgartner, R. N., Dilmanian, F. A., Ma, R., and Yasumura, S. (1993) Body composition and aging: a study by in vivo neutron activation analysis. *J Nutr.* **123**, 432–7
- 25. Lomonte, F., Kehayias, J. J., Heymsfield, S. B., Wang, J., and Pierson, N. (1991) In vivo determination total body carbon3 of body fat by measuring. *Am J Clin Nutr.* **53**, 1339–1344
- 26. Wang, Z., Deurenberg, P., Wang, W., Pietrobelli, A., Baumgartner, R. N., and Heymsfield, S. B. (1999) Hydration of fat-free body mass: new physiological modeling approach. *Am. J. Physiol.* **276**, E995–E1003
- 27. van der Kooy, K. (1982) Changes in body composition and fat distribution in response to weight loss and weight regain. *Int J Obes Relat Metab Disord*. **16**, 675–683
- Wang, Z. M., Heshka, S., Pierson, R. N., and Heymsfield, S. B. (1995) Systematic organization of bodycomposition methodology: An overview with emphasis on component-based methods. *Am. J. Clin. Nutr.* 61, 457–465
- 29. McCrory, M. A., Gomez, T. D., Bernauer, E. M., and Molé, P. A. (1995) Evaluation of a new air displacement plethysmograph for measuring human body composition. *Med. Sci. Sports Exerc.* **27**, 1686–1691
- Wells, J. C., and Fuller, N. J. (2001) Precision of measurement and body size in whole-body airdisplacement plethysmography. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 25, 1161–7
- Wang, J., Gallagher, D., Thornton, J. C., Yu, W., Horlick, M., and Pi-Sunyer, F. X. (2006) Validation of a 3dimensional photonic scanner for the measurement of body volumes, dimensions, and percentage body fat. *Am. J. Clin. Nutr.* 83, 809–816
- 32. Wells, J. C. K., Ruto, A., and Treleaven, P. (2008) Whole-body three-dimensional photonic scanning: a new technique for obesity research and clinical practice. *Int. J. Obes.* **32**, 232–238
- Mazess, R. B., Barden, H. S., Bisek, J. P., and Hanson, J. (1990) Dual-energy x-ray absorptiometry for totalbody and regional bone-mineral and soft-tissue composition. *Am. J. Clin. Nutr.* **51**, 1106–1112
- 34. Tataranni, P. A. P. A. P. A. P. A., Ravussin, E., and Ravuss (1995) Use of dual-energy X-ray absorptiometry in obese individuals. *Am. J. Clin. Nutr.* **62**, 730–734
- 35. Taicher, G. Z., Tinsley, F. C., Reiderman, A., and Heiman, M. L. (2003) Quantitative magnetic resonance (QMR) method for bone and whole-body-composition analysis. *Anal. Bioanal. Chem.* **377**, 990–1002
- Napolitano, A., Miller, S. R., Murgatroyd, P. R., Coward, W. A., Wright, A., Finer, N., De Bruin, T. W., Bullmore, E. T., and Nunez, D. J. (2008) Validation of a quantitative magnetic resonance method for measuring human body composition. *Obesity (Silver Spring).* 16, 191–8
- Gallagher, D., Thornton, J. C., He, Q., Wang, J., Yu, W., Bradstreet, T. E., Burke, J., Heymsfield, S. B., Rivas, V. M., and Kaufman, R. (2010) Quantitative magnetic resonance fat measurements in humans correlate with established methods but are biased. *Obesity.* 18, 2047–2054
- Kvist, H., Sjostrom, L., and Tylen, U. (1986) Adipose tissue volume determinations in women by computed tomography: technical considerations. *Int.J Obes.* **10**, 53–67
- Seidell, J. C., Bakker, C. J., and Van Der Kooy, K. (1990) Original Research Communications-general Imaging techniques for measuring adipose-tissue distribution-a comparison between computed tomography and 1.5-T magnetic resonance. *Am JClin Nuir.* 5, 953–7
- Elbers, J. M., Haumann, G., Asscheman, H., Seidell, J. C., and Gooren, L. J. (1997) Reproducibility of fat area measurements in young, non-obese subjects by computerized analysis of magnetic resonance images. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 21, 1121–1129

- Machann, J., Thamer, C., Schnoedt, B., Haap, M., Haring, H. U., Claussen, C. D., Stumvoll, M., Fritsche, A., and Schick, F. (2005) Standardized assessment of whole body adipose tissue topography by MRI. *J. Magn. Reson. Imaging.* 21, 455–462
- Kullberg, J., Johansson, L., Ahlstr??m, H., Courivaud, F., Koken, P., Eggers, H., and B??rnert, P. (2009) Automated assessment of whole-body adipose tissue depots from continuously moving bed MRI: A feasibility study. *J. Magn. Reson. Imaging.* **30**, 185–193
- 43. Alabousi, A., Al-Attar, S., Joy, T. R., Hegele, R. A., and McKenzie, C. A. (2011) Evaluation of adipose tissue volume quantification with IDEAL fat-water separation. *J. Magn. Reson. Imaging.* **34**, 474–479
- 44. Friesen, N., and Anderson, T. (2004) Interaction for lifelong learning. Br. J. Educ. Technol. 35, 679–687
- 45. Lohman, T. G., Roche, A. F., and Martorell, R. (1988) *Anthropometric standardization reference manual*, Champaign, IL : Human Kinetics Books, 10.1002/ajhb.1310040323
- 46. WHO (2008) *Waist Circumference and Waist-Hip Ratio: Report of a WHO Expert Consultation*, Geneva., 10.1038/ejcn.2009.139
- 47. Quetelet, A. J. (1835) Sur l'Homme et le Developpement de ses Facultes, Bachelier, Paris
- 48. V., F. C. (1970) The use and interpretation of ponderal index and other weight height ratios in epidemiological studies . *J. Chronic Dis.* **23**, 93–103
- Keys, A., Fidanza, F., Karvonen, M., Kimura, N., and Taylor, H. (1972) Indicies of Relative Weight and Obesity. *J. Chronic Dis.* 25, 329–343
- 50. Deurenberg, P., Weststrate, A. J., and Seidell, C. J. (1991) Body mass index as a measure of body fatness: age-and sex- specific prediction formulas. *Br. Journul oj Nutr.* **65**, 105–114
- 51. Deurenberg, P., Yap, M., and van Staveren, W. A. (1998) Body mass index and percent body fat: A meta analysis among different ethnic groups. *Int. J. Obes.* **22**, 1164–1171
- Gallagher, D., Heymsfield, S. B., Heo, M., Jebb, S. A., Murgatroyd, P. R., and Sakamoto, Y. (2000) Healthy percentage body fat ranges : an approach for developing guidelines based on body mass index 1 3. *Am. Soc. Clin. Nutr.* **72**, 694–701
- 53. Gupta, R., Deedwania, P. C., Mohan, V., Rao, G. H. R., and others (2007) *The metabolic syndrome and obesity: management issues.*, Humana Press Inc, Totowa
- 54. National Institutes of Health (2000) Weight Management Techniques
- 55. WHO, W. H. O.- (2000) *Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation*, Geneva, ISBN 92 4 120894 5
- Cornier, M., Després, J., Davis, N., Grossniklaus, D. A., Lamarche, B., Lopez-jimenez, F., Rao, G., Cornier,
 M., and Despre, J. (2011) A Scientific Statement From the American Heart Association. *Circulation*. **124**, 1996–2019
- Wellens, R. I., Roche, A. F., Khamisr, H. J., Jacksons, A. S., Pollock, M. L., Siervogel, R. M., Rita, I., Harry, J., Jackson, A. S., Michael, L., Khamis, H. J., Jackson, A. S., Pollock, M. L., and Siervogel, R. M. (1996) Relationships between the Body Mass Index and body composition. *Obes. Res.* 4, 35–44
- Barba, C., Cavalli-Sforza, T., Cutter, J., Darnton-Hill, I., Deurenberg, P., Deurenberg-Yap, M., Gill, T., James, P., Ko, G., and Nishida, C. (2004) Appropriate body-mass index for Asian populations and its implications for policy and intervention strategies. *Lancet.* 363, 157–163
- Heymsfield, S. B., Peterson, C. M., Thomas, D. M., Heo, M., and Schuna, J. M. (2016) Why are there race/ethnic differences in adult body mass index-adiposity relationships? A quantitative critical review. *Obes. Rev.* 17, 262–275
- 60. Katzmarzyk, P. T., Bray, G. A., Greenway, F. L., Johnson, W. D., Jr, L. N., Ravussin, E., Ryan, D. H., and

Bouchard, C. (2014) Ethnic-Specific BMI and Waist Circumference Thresholds. *Obes. (Silver Spring).* **19**, 1272–1278

- 61. Patois, M. E., and Semp, M. (1982) Adiposity indices in children. Am J Clin Nutr. 36, 178–184
- Freedman, D. S., Wang, J., Maynard, L. M., Thornton, J. C., Mei, Z., Pierson, R. N., Dietz, W. H., and Horlick, M. (2005) Relation of BMI to fat and fat-free mass among children and adolescents. *Int. J. Obes.* (Lond). 29, 1–8
- Kuczmarski, R. J., Ogden, C. L., Guo, S. S., Grummer-Strawn, L. M., Flegal, K. M., Mei, Z., Wei, R., Curtin, L. R., Roche, A. F., and Johnson, C. L. (2002) 2000 CDC growth charts for the United States: Methods and development. *Vital Heal. Stat.* **11**, 1–190
- Ogden, C. L., and Flegal, K. M. (2010) Changes in terminology for childhood overweight and obesity. *Natl. Health Stat. Report.* 25, 1–5
- Cole, T. J., Bellizzi, M. C., Flegal, K. M., and Dietz, W. H. (2000) Establishing a standard definition for child overweight and obesity worldwide: international survey. *BMJ*. **320**, 1240–3
- 66. WHO Multicentre growth reference study group (2006) WHO Child Growth Standards based on length / height, weight and age. Acta Paediatr. Suppl 450, 76–85
- Onis, M. de, Onyango, A., Borghi, E., Siyam, A., Nishida, C., and Siekmann, J. (2011) Development of a WHO growth reference for school-aged children and adolescents. *Bull World Heal. Organ.* 85, 660–667
- Krebs, N., Himes, J., and Jacobson, D. (2007) Assessment of child and adolescent overweight and obesity. *Pediatrics.* **120**, 193–228
- Sbarbati, A., Accorsi, D., Benati, D., Marchetti, L., Orsini, G., Rigotti, G., and Panettiere, P. (2010) Subcutaneous adipose tissue classification. *Eur. J. Histochem.* 54, 48
- 70. Durnin, J. V., and Womersley, J. (1974) Body fat assessed from total body density and its estimation from skinfold thickness : measurements on 481 men and women aged from 16 to 72 years. *Br. J. Nutr.* **32**, 77–97
- Jackson, A. S., Ellis, K. J., McFarlin, B. K., Sailors, M. H., and Bray, M. S. (2009) Cross-validation of generalised body composition equations with diverse young men and women: the Training Intervention and Genetics of Exercise Response (TIGER) Study. *Br. J. Nutr.* **101**, 871–878
- Davidson, L. E., Wang, J., Thornton, J. C., Kaleem, Z., Pierson, R. N., and Heymsfield, S. B. (2012) Predicting Fat Percent by Skinfolds in Racial Groups: Durnin and Womersley Revisited. *Nutr. Res.* 43, 542– 549
- 73. Himes, H., Roche, F., and Siervogel, R. (1979) Compressibility measurement of skinfolds of subcutaneous the. *Am. J. Clin. Nutr.* **32**, 1734–1740
- 74. Kriemler, S., Puder, J., Zahner, L., Roth, R., Meyer, U., and Bedogni, G. (2010) Estimation of percentage body fat in 6- to 13-year-old children by skinfold thickness, body mass index and waist circumference. *Br. J. Nutr.* **104**, 1565–1572
- Slaughter, M., Lohman, T., Boileau, R., Horswill, C., Stillman, R., Loan, V., Bemben, D., and Slaughter, B.
 M. (1988) Skinfold Equations for Estimation of Body Fatness in Children and Youth Human Biology Skinfold
 Equations for Estimation of Body Fatness in Children and Youth. *Source Hum. Biol.* 6058129109, 709–723
- Mercedes de Onis, a Adelheid W Onyango, a Elaine Borghi, a Amani Siyam, a C. N. & J. S. (2007) Determination of Body Composition of Children from Skinfold Measurements. *Bull. World Health Organ.* 85, 660–667
- 77. Larsson, B., Svardsudd, K., Welin, L., Wilhelmsen, L., Bjorntorp, P., and Tibblin, G. (1984) Abdominal adipose tissue distribution, obesity, and risk of cardiovascular disease and death: 13 year follow up of

participants in the study of men born in 1913. Bmj. 288, 1401-1404

- Rosner, B. A., Speizer, F. E., and Manson, J. E. (1997) Body Fat Distribution and Risk of Non-Insulindependent Diabetes Mellitus in Women. *Am. J. Epidemiol.* 145, 614–619
- 79. Wang, Y., Rimm, E. B., Stampfer, M. J., Willett, W. C., and Hu, F. B. (2005) Comparison of abdominal adiposity and overall obesity in predicting risk of type 2 diabetes among men. *Am J Clin Nutr.* **81**, 555–563
- Zhang, C., Rexrode, K. M., Van Dam, R. M., Li, T. Y., and Hu, F. B. (2008) Abdominal obesity and the risk of all-cause, cardiovascular, and cancer mortality: Sixteen years of follow-up in US women. *Circulation*. **117**, 1658–1667
- Seidell, J. C. (2010) Waist circumference and waist/hip ratio in relation to all-cause mortality, cancer and sleep apnea. *Eur. J. Clin. Nutr.* 64, 35–41
- Kekes-szabo, T., Hunter, G. R., Nyikos, I., Nicholson, C., and Snyder, S. (1994) Development and validation of computed tomography derived anthropometric regression equations for estimating abdominal adipose tissue distribution. 2, 450–457
- 83. MC, P. (1994) Waist circumference and abdominal sagittal diameter: best simple antrhopometric indexes of abdominal viseral adipose tissue acumulation and related cardiovascular risk in men and women. *Am J Cardiol.* **73**, 460–8
- Janssen, I., Heymsfield, S. B., Allison, D. B., Kotler, D. P., and Ross, R. (2002) Body mass index and waist circumference independently contribute to the prediction of nonabdominal, abdominal subcutaneous, and visceral fat. *Am. J. Clin. Nutr.* **75**, 683–688
- Ross, R., Berentzen, T., Bradshaw, A. J., Janssen, I., Kahn, H. S., Katzmarzyk, P. T., Kuk, J. L., Seidell, J. C., Snijder, M. B., Sørensen, T. I. A., and Després, J. P. (2008) Does the relationship between waist circumference, morbidity and mortality depend on measurement protocol for waist circumference? *Obes. Rev.* 9, 312–325
- Mason, C., and Katzmarzyk, P. T. (2009) Variability in waist circumference measurements according to anatomic measurement site. *Obesity (Silver Spring)*. **17**, 1789–1795
- 87. Wang, J., and Et al. (2003) Comparison of waist circumferences measured at 4 sites. *Am J Clin Nutr.* **77**, 379–384
- Matsushita, Y., Tomita, K., Yokoyama, T., and Mizoue, T. (2009) Optimal waist circumference measurement site for assessing the metabolic syndrome. *Diabetes Care*. 10.2337/dc09-0190
- 89. World Health Organization (1997) Preventing and managing the global epidemic, Geneva, June 3–5, 1997
- James, W. P. T. (2008) WHO recognition of the global obesity epidemic. Int. J. Obes. (Lond). 32 Suppl 7, S120–S126
- 91. Stevens, G. A., Singh, G. M., Lu, Y., Danaei, G., Lin, J. K., Finucane, M. M., Bahalim, A. N., McIntire, R. K., Gutierrez, H. R., Cowan, M., Paciorek, C. J., Farzadfar, F., Riley, L., Ezzati, M., and Global Burden of Metabolic Risk Factors of Chronic Diseases Collaborating Group (Body Mass Index) (2012) National, regional, and global trends in adult overweight and obesity prevalences. *Popul ation Heal. Metrics.* **10**, 22
- de Onis, M., Blössner, M., and Borghi, E. (2010) Global prevalence and trends of overweight and obesity among preschool children. *Am. J. Clin. Nutr.* 92, 1257–1264
- Swinburn, B. A., Sacks, G., Hall, K. D., McPherson, K., Finegood, D. T., Moodie, M. L., and Gortmaker, S. L.
 (2011) The global obesity pandemic: Shaped by global drivers and local environments. *Lancet.* 378, 804–814
- 94. Ng, M., Fleming, T., Robinson, M., Thomson, B., and Graetz, N. (2014) Global, regional and national prevalence of overweight and obesity in children and adults 1980-2013: A systematic analysis. *Lancet.* **384**,

766-781

- 95. Instituto Nacional de Estadística (2014) Uruguay en Cifras, Montevideo, 10.1017/CBO9781107415324.004
- 96. Cabella, W., De Rosa, M., Failache, E., Fitermann, P., Katzkowicz, N., Medina, M., Mila, J., Nathan, M., Nocetto, A., Pardo, I., Perazzo, I., Salas, G., Salmentón, C., Severi, C., and Vigorito, A. (2015) *Salud, nutrición y desarrollo en la primera infancia. Primeros resultados de la ENDIS*, Montevideo
- 97. Gebreyohannis, T., Shibeshi, W., Asres, K., International Diabetes Federation (IDF), Litwak, L., Goh, S.-Y., Hussein, Z., Malek, R., Prusty, V., Khamseh, M. E., Livingstone, S. J., Levin, D., Looker, H. C., Lindsay, R. S., Wild, S. H., Joss, N., Leese, G., Leslie, P., McCrimmon, R. J., Metcalfe, W., McKnight, J. A., Morris, A. D., Pearson, D. W. M., Petrie, J. R., Philip, S., Sattar, N. A., Traynor, J. P., Colhoun, H. M., Miller, R. G., Secrest, A. M., Sharma, R. K., Songer, T. J., Orchard, T. J., Mohamadi, A., Cooke, D. W., Olokoba, A. B., Obateru, O. A., Olokoba, L. B., S. Palani, Marew, N. M. joseph2 Y. T. A. Z. T., Tang, W. H., Martin, K. A., Hwa, J., Tobergte, D. R., Curtis, S., Vargas, R., Repke, J. T., Ural, S. H., Singal, R., Grimes, S. R., Tirosh, A., Shai, I., Afek, A., Dubnov-Raz, G., Ayalon, N., Gordon, B., Derazne, E., Tzur, D., Shamis, A., Vinker, S., Rudich, A., Siscovick, D. S., Sotoodehnia, N., and Rea, T. D. (2013) *Follow-up to the Political Declaration of the High-level Meeting of the General Assembly on the Prevention and Control of Non-communicable Diseases The*, Geneva, Switzerland, 10.1007/BF03038934
- Huang, T., Marsh, T., and Moodie, M. (2012) Changing the future of obesity: science, policy, and action.
 Lancet. 378, 838–847
- Swinburn, B. A. (2008) Obesity prevention: the role of policies, laws and regulations. *Aust. New Zealand Health Policy.* 5, 12
- 100. Ahima, R. S. (2011) Metabolic basis of obesity, 10.1007/978-1-4419-1607-5
- Perusse, L., Tremblay, A., Leblanc, C., Cloninger, C. R., Reich, T., Rice, J., and Bouchard, C. (1988)
 Familial Resemblance in Energy-Intake Contribution of Genetic and Environmental-Factors. *Am. J. Clin. Nutr.* 47, 629–635
- Rankinen, T., and Bouchard, C. (2006) Genetics of food intake and eating behavior phenotypes in humans.
 Annu. Rev. Nutr. 26, 413–34
- Goldschmidt, A. B., Crosby, R. D., Cao, L., Pearson, C. M., Utzinger, L. M., Pacanowski, C. R., Mason, T. B., Berner, L. A., Engel, S. G., Wonderlich, S. A., and Peterson, C. B. (2017) Contextual factors associated with eating in the absence of hunger among adults with obesity. *Eat. Behav.* 26, 33–39
- 104. Bouhlal, S., McBride, C. M., Trivedi, N. S., Agurs-Collins, T., and Persky, S. (2017) Identifying eating behavior phenotypes and their correlates: A novel direction toward improving weight management interventions. *Appetite*. **111**, 142–150
- Persky, S., Bouhlal, S., Goldring, M. R., and McBride, C. M. (2017) Beliefs about genetic influences on eating behaviors: Characteristics and associations with weight management confidence. *Eat. Behav.* 26, 93–98
- Abbott, W. G., Howard, B. V, Christin, L., Freymond, D., Lillioja, S., Boyce, V. L., Anderson, T. E., Bogardus,
 C., and Ravussin, E. (1988) Short-term energy balance: relationship with protein, carbohydrate, and fat
 balances. *Am. J. Physiol.* 255, E332–E337
- Bray, G. A. (1991) Treatment for Obesity: A Nutrient Balance/Nutrient Partition Approach. *Nutr. Rev.* 49, 33–45
- 108. Livesey, G., and Elia, M. (1988) Estimation of energy expenditure, and net fat oxidation calorimetry: evaluation of errors to the detailed composition of net carbohydrate and synthesis by indirect with special reference. *Clin. Nutr.* **47**, 608–28

- Ravussin, E., Lillioja, S., Anderson, T. E., Christin, L., and Bogardus, C. (1986) Determinants of 24-hour energy expenditure in man. Methods and results using a respiratory chamber. *J. Clin. Invest.* 78, 1568– 1578
- 110. Saad, M. F., Alger, S. A., Zurlo, F., Young, J. B., Bogardus, C., and Ravussin, E. (1991) Ethnic differences in sympathetic nervous system-mediated energy expenditure. *Am. J. Physiol.* **261**, E789-94
- 111. Fontaine, E., Savard, R., Tremblay, A., Després, J. P., Poehlman, E., and Bouchard, C. (1985) Resting metabolic rate in monozygotic and dizygotic twins. *Acta Genet. Med. Gemellol. (Roma).* **34**, 41–7
- 112. Bouchard, C., Tremblay, A., Nadeau, A., and al, et (1989) Genetic effects in resting and exercise metabolic rates. *Metabolism.* **38**, 364–370
- Kohrt, W. M., Bloomfield, S. A., Little, K. D., Nelson, M. E., and Yingling, V. R. (2004) *Physical activity and bone health*, Human Kine (Bouchard, C., and Katzmarzyk, P. eds), Boca Raton, 10.1249/01.MSS.0000142662.21767.58
- Beunen, G., and Thomis, M. (1999) Genetic determinants of sports participation and daily physical activity. Int J Obes Relat Metab Disord. 23, S55–S63
- Hoffman, C. B. and E. P. (2010) Genetic and Molecular Aspects of Sport Performance, Wiley-Blackwell, Oxford, UK, 10.1002/9781444327335.fmatter
- Redman, L. M., Heilbronn, L. K., Martin, C. K., de Jonge, L., Williamson, D. A., Delany, J. P., and Ravussin,
 E. (2009) Metabolic and behavioral compensations in response to caloric restriction: Implications for the maintenance of weight loss. *PLoS One.* 10.1371/journal.pone.0004377
- 117. Frayn, K. (2002) Adipose tissue as a buffer for daily lipid flux. *Diabetologia*. **45**, 1201–1210
- Bastard, J. P., and Fève, B. (2012) *Physiology and physiopathology of adipose tissue*, First Edit, Springer, 10.1007/978-2-8178-0343-2
- 119. Stock, M. J. (1999) Gluttony and thermogenesis revisited. Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord. 23, 1105–17
- 120. Ottaviani, E., Malagoli, D., and Franceschi, C. (2011) The evolution of the adipose tissue: A neglected enigma. *Gen. Comp. Endocrinol.* **174**, 1–4
- 121. Symonds, M. E. (2012) Adipose tissue biology (Symonds, M. E. ed), Springer, 10.1007/978-1-4614-0965-6
- Mariman, E. C., and Wang, P. (2010) Adipocyte extracellular matrix composition, dynamics and role in obesity. *Cell Mol Life Sci.* 67, 1277–1292
- 123. Lafontan, M., and Berlan, M. (2003) Do regional differences in adipocyte biology provide new pathophysiological insights? *Trends Pharmacol. Sci.* **24**, 276–283
- Pischon, T., Boeing, H., Hoffmann, K., Bergmann, M., Schulze, M. B., Overvad, K., van der Schouw, Y. T., Spencer, E., Moons, K. G. M., Tjønneland, A., Halkjaer, J., Jensen, M. K., Stegger, J., Clavel-Chapelon, F., Boutron-Ruault, M.-C., Chajes, V., Linseisen, J., Kaaks, R., Trichopoulou, A., Trichopoulos, D., Bamia, C., Sieri, S., Palli, D., Tumino, R., Vineis, P., Panico, S., Peeters, P. H. M., May, A. M., Bueno-de-Mesquita, H. B., van Duijnhoven, F. J. B., Hallmans, G., Weinehall, L., Manjer, J., Hedblad, B., Lund, E., Agudo, A., Arriola, L., Barricarte, A., Navarro, C., Martinez, C., Quirós, J. R., Key, T., Bingham, S., Khaw, K. T., Boffetta, P., Jenab, M., Ferrari, P., and Riboli, E. (2008) General and Abdominal Adiposity and Risk of Death in Europe. *N. Engl. J. Med.* 359, 2105–2120
- 125. Alligier, M., Meugnier, E., Debard, C., Lambert-Porcheron, S., Chanseaume, E., Sothier, M., Loizon, E., Ait Hssain, A., Brozek, J., Scoazec, J. Y., Morio, B., Vidal, H., and Laville, M. (2012) Subcutaneous adipose tissue remodeling during the initial phase of weight gain induced by overfeeding in humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 97, 183–192
- 126. Franck, N., Gummesson, A., Jernås, M., Glad, C., Svensson, P. A., Guillot, G., Rudemo, M., Nyström, F. H.,

Carlsson, L. M. S., and Olsson, B. (2011) Identification of adipocyte genes regulated by caloric intake. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **96**, 413–418

- Bjorntorp, P., and Sjostrom, L. (1972) Fat cell size and number in adipose tissue in relation to metabolism. Isr J Med Sci. 8, 320–324
- 128. Marques, B. G., Hausman, D. B., and Martin, R. J. (1998) Association of fat cell size and paracrine growth factors in development of hyperplastic obesity. *Am. J. Physiol.* **275**, R1898-908
- Jo, J., Gavrilova, O., Pack, S., Jou, W., Mullen, S., Sumner, A. E., Cushman, S. W., and Periwal, V. (2009)
 Hypertrophy and/or hyperplasia: Dynamics of adipose tissue growth. *PLoS Comput. Biol.* 10.1371/journal.pcbi.1000324
- Tchoukalova, Y. D., Votruba, S. B., Tchkonia, T., Giorgadze, N., Kirkland, J. L., and Jensen, M. D. (2010) Regional differences in cellular mechanisms of adipose tissue gain with overfeeding. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 18226–18231
- 131. Kim, J. I., Huh, J. Y., Sohn, J. H., Choe, S. S., Lee, Y. S., Lim, C. Y., Jo, A., Park, S. B., Han, W., and Kim, J. B. (2015) Lipid-overloaded enlarged adipocytes provoke insulin resistance independent of inflammation. *Mol. Cell. Biol.* **35**, 1686–99
- Berger JJ, Barnard, R. (1999) Effect of diet on fat cell size and hormone-sensitive lipase activity. J Appl Physiol. 87, 227–32
- 133. Suganami, T., Yuan, X., Shimoda, Y., Uchio-Yamada, K., Nakagawa, N., Shirakawa, I., Usami, T., Tsukahara, T., Nakayama, K., Miyamoto, Y., Yasuda, K., Matsuda, J., Kamei, Y., Kitajima, S., and Ogawa, Y. (2009) Activating transcription factor 3 constitutes a negative feedback mechanism that attenuates saturated fatty Acid/Toll-like receptor 4 signaling and macrophage activation in obese adipose tissue. *Circ. Res.* 105, 25–32
- Strissel, K. J., Stancheva, Z., Miyoshi, H., Perfield, J. W., DeFuria, J., Jick, Z., Greenberg, A. S., and Obin,
 M. S. (2007) Adipocyte death, adipose tissue remodeling, and obesity complications. *Diabetes.* 56, 2910–2918
- Cinti, S., Mitchell, G., Barbatelli, G., Murano, I., Ceresi, E., Faloia, E., Wang, S., Fortier, M., Greenberg, A.
 S., and Obin, M. S. (2005) Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. *J. Lipid Res.* 46, 2347–55
- Kabon, B., Nagele, A., Reddy, D., Eagon, C., Fleshman, J. W., Sessler, D. I., and Kurz, A. (2004) Obesity decreases perioperative tissue oxygenation. *Anesthesiology*. **100**, 274–80
- 137. Trayhurn, P. (2013) Hypoxia and adipose tissue function and dysfunction in obesity. *Physiol. Rev.* 93, 1–21
- 138. Lolmède, K., Durand de Saint Front, V., Galitzky, J., Lafontan, M., and Bouloumié, a (2003) Effects of hypoxia on the expression of proangiogenic factors in differentiated 3T3-F442A adipocytes. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 27, 1187–95
- 139. Halberg, N., Khan, T., Trujillo, M. E., Wernstedt-Asterholm, I., Attie, A. D., Sherwani, S., Wang, Z. V, Landskroner-Eiger, S., Dineen, S., Magalang, U. J., Brekken, R. A., and Scherer, P. E. (2009) Hypoxia-Inducible Factor 1α Induces Fibrosis and Insulin Resistance in White Adipose Tissue. *Mol. Cell. Biol.* 29, 4467–4483
- 140. Hosogai, N., Fukuhara, A., Oshima, K., Miyata, Y., Tanaka, S., Segawa, K., Furukawa, S., Tochino, Y., Komuro, R., Matsuda, M., and Shimomura, I. (2007) Adipose tissue hypoxia in obesity and its impact on adipocytokine dysregulation. *Diabetes.* **56**, 901–911
- 141. Ye, J., Gao, Z., Yin, J., and He, Q. (2007) Hypoxia is a potential risk factor for chronic inflammation and adiponectin reduction in adipose tissue of ob/ob and dietary obese mice. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*

293, E1118-E1128

- Chen, B., Lam, K. S. L., Wang, Y., Wu, D., Lam, M. C., Shen, J., Wong, L., Hoo, R. L. C., Zhang, J., and Xu,
 A. (2006) Hypoxia dysregulates the production of adiponectin and plasminogen activator inhibitor-1 independent of reactive oxygen species in adipocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 341, 549–556
- Jernås, M., Palming, J., Sjöholm, K., Jennische, E., Svensson, P. A., Gabrielsson, B. G., Levin, M., Sjögren,
 A., Rudemo, M., Lystig, T. C., Carlsson, B., Carlsson, L. M. S., and Lönn, M. (2006) Separation of human adipocytes by size: hypertrophic fat cells display distinct gene expression. *FASEB J.* 20, 1540–1542
- 144. Huh, J. Y., Park, Y. J., Ham, M., and Kim, J. B. (2014) Crosstalk between adipocytes and immune cells in adipose tissue inflammation and metabolic dysregulation in obesity. *Mol Cells.* **37**, 365–371
- 145. Jang, H., Kim, M., Lee, S., Kim, J., Woo, D.-C., Kim, K. W., Song, K., and Lee, I. (2016) Adipose tissue hyperplasia with enhanced adipocyte-derived stem cell activity in Tc1(C8orf4)-deleted mice. *Sci. Rep.* 6, 35884
- O'Connell, J., Lynch, L., Cawood, T. J., Kwasnik, A., Nolan, N., Geoghegan, J., McCormick, A., O'Farrelly,
 C., and O'Shea, D. (2010) The relationship of omental and subcutaneous adipocyte size to metabolic disease in severe obesity. *PLoS One.* 10.1371/journal.pone.0009997
- 147. Klöting, N., Fasshauer, M., Dietrich, A., Kovacs, P., Schön, M. R., Kern, M., Stumvoll, M., and Blüher, M. (2010) Insulin-sensitive obesity. *Am. J.* 299, 506–515
- 148. Choe, S. S., Huh, J. Y., Hwang, I. J., Kim, J. I., and Kim, J. B. (2016) Adipose tissue remodeling: Its role in energy metabolism and metabolic disorders. *Front. Endocrinol. (Lausanne).* 10.3389/fendo.2016.00030
- 149. Sun, K., Kusminski, C. C. M., and Scherer, P. E. P. (2011) Adipose tissue remodeling and obesity. J. Clin. 121, 2094–2101
- Lee, M.-J., Wu, Y., and Fried, S. K. (2010) Adipose tissue remodeling in pathophysiology of obesity. *Curr.* Opin. Clin. Nutr. Metab. Care. 13, 371–6
- Rupnick, M. A., Panigrahy, D., Zhang, C.-Y., Dallabrida, S. M., Lowell, B. B., Langer, R., and Folkman, M. J.
 (2002) Adipose tissue mass can be regulated through the vasculature. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 10730–5
- 152. Cao, Y. (2007) Angiogenesis modulates adipogenesis and obesity. J. Clin. Invest. 117, 2362–2368
- 153. Christiaens, V., and Lijnen, H. R. (2010) Angiogenesis and development of adipose tissue. *Mol. Cell. Endocrinol.* **318**, 2–9
- 154. Neels, J. G., Thinnes, T., and Loskutoff, D. J. (2004) Angiogenesis in an in vivo model of adipose tissue development. *FASEB J.* **18**, 983–5
- 155. Gealekman, O., Burkart, A., Chouinard, M., Nicoloro, S. M., Straubhaar, J., and Corvera, S. (2008) Enhanced angiogenesis in obesity and in response to PPARgamma activators through adipocyte VEGF and ANGPTL4 production. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **295**, E1056–E1064
- 156. Divoux, A., Tordjman, J., Lacasa, D., Veyrie, N., Hugol, D., Aissat, A., Basdevant, A., Guerre-Millo, M., Poitou, C., Zucker, J.-D., Bedossa, P., Clément, K., Aissat, A., Basdevant, A., Zucker, J.-D., Bedossa, P., and Cle, K. (2010) Fibrosis in Human Adipose Tissue: Composition, Distribution, and Link With Lipid Metabolism and Fat. *Diabetes*. **59**, 2817–2825
- Khan, T., Muise, E. S., Iyengar, P., Wang, Z. V, Chandalia, M., Abate, N., Zhang, B. B., Bonaldo, P., Chua, S., and Scherer, P. E. (2009) Metabolic dysregulation and adipose tissue fibrosis: role of collagen VI. *Mol. Cell. Biol.* 29, 1575–1591
- 158. Henegar, C., Tordjman, J., Achard, V., Lacasa, D., Cremer, I., Guerre-Millo, M., Poitou, C., Basdevant, A., Stich, V., Viguerie, N., Langin, D., Bedossa, P., Zucker, J. D., and Clement, K. (2008) Adipose tissue

transcriptomic signature highlights the pathological relevance of extracellular matrix in human obesity. *Genome Biol.* **9**, R14

- 159. Lumeng, C. N., Bodzin, J. L., and Saltiel, A. R. (2007) Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J. Clin. Invest.* **117**, 175–184
- Gordon, S., and Taylor, P. R. (2005) Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat. Rev. Immunol.* 5, 953–64
- Skurk, T., Alberti-Huber, C., Herder, C., and Hauner, H. (2007) Relationship between adipocyte size and adipokine expression and secretion. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 92, 1023–1033
- Ye, J. (2009) Emerging role of adipose tissue hypoxia in obesity and insulin resistance. *Int. J. Obes.* 33, 54–66
- 163. Elgazar-Carmon, V., Rudich, A., Hadad, N., and Levy, R. (2008) Neutrophils transiently infiltrate intraabdominal fat early in the course of high-fat feeding. *J. Lipid Res.* **49**, 1894–1903
- 164. Ohmura, K., Ishimori, N., Ohmura, Y., Tokuhara, S., Nozawa, A., Horii, S., Andoh, Y., Fujii, S., Iwabuchi, K., Onoé, K., and Tsutsui, H. (2010) Natural killer T cells are involved in adipose tissues inflammation and glucose intolerance in diet-induced obese mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **30**, 193–199
- 165. Liu, J., Divoux, A., Sun, J., Zhang, J., Clément, K., Jonathan, N., Sukhova, G. K., Wolters, P. J., Du, J., Gorgun, C. Z., Libby, P., Blumberg, R. S., Kahn, B. B., Hotamisligil, G. S., and Curie-paris, M. (2010) Genetric deficiency and pharmacological stabilization of mast cells reduce diet-induced obesity and diabetes in mice. *Nat Med.* **15**, 940–945
- 166. Kintscher, U., Hartge, M., Hess, K., Foryst-Ludwig, A., Clemenz, M., Wabitsch, M., Fischer-Posovszky, P., Barth, T. F. E., Dragun, D., Skurk, T., Hauner, H., Blüher, M., Unger, T., Wolf, A. M., Knippschild, U., Hombach, V., and Marx, N. (2008) T-lymphocyte infiltration in visceral adipose tissue: A primary event in adipose tissue inflammation and the development of obesity-mediated insulin resistance. *Arterioscler*. *Thromb. Vasc. Biol.* 28, 1304–1310
- 167. Nishimura, S., Manabe, I., Nagasaki, M., Eto, K., Yamashita, H., Ohsugi, M., Otsu, M., Hara, K., Ueki, K., Sugiura, S., Yoshimura, K., Kadowaki, T., and Nagai, R. (2009) CD8+ effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity. *Nat Med.* **15**, 914–920
- Rogacev, K. S., Ulrich, C., Blömer, L., Hornof, F., Oster, K., Ziegelin, M., Cremers, B., Grenner, Y., Geisel, J., Schlitt, A., Köhler, H., Fliser, D., Girndt, M., and Heine, G. H. (2010) Monocyte heterogeneity in obesity and subclinical atherosclerosis. *Eur. Heart J.* **31**, 369–376
- Weisberg, S. P., McCann, D., Desai, M., Rosenbaum, M., Leibel, R. L., and Ferrante, A. W. (2003) Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J. Clin. Invest.* **112**, 1796–1808
- 170. Lumeng, C. N., DeYoung, S. M., Bodzin, J. L., and Saltiel, A. R. (2007) Increased inflammatory properties of adipose tissue macrophages recruited during diet-induced obesity. *Diabetes*. **56**, 16–23
- 171. Fujisaka, S., Usui, I., Bukhari, A., Ikutani, M., Oya, T., Kanatani, Y., Tsuneyama, K., Nagai, Y., Takatsu, K.,
 Urakaze, M., Kobayashi, M., and Tobe, K. (2009) Macrophages in Diet-Induced Obese Mice. *Diabetes*. 58, 2574–2582
- Koliwad, S. K., Streeper, R. S., Monetti, M., Cornelissen, I., Chan, L., Terayama, K., Naylor, S., Rao, M., Hubbard, B., and Jr, R. V. F. (2010) DGAT1-dependent triacylglycerol storage by macrophages protects mice from diet- induced insulin resistance and inflammation. *J. Clin. Invest.* **120**, 756–797
- Pang, C., Gao, Z., Yin, J., Zhang, J., Jia, W., and Ye, J. (2008) Macrophage infiltration into adipose tissue may promote angiogenesis for adipose tissue remodeling in obesity. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 295, E313–E322

- 174. Keophiphath, M., Achard, V., Henegar, C., Rouault, C., Clément, K., and Lacasa, D. (2009) Macrophagesecreted factors promote a profibrotic phenotype in human preadipocytes. *Mol. Endocrinol.* **23**, 11–24
- Lacasa, D., Taleb, S., Keophiphath, M., Miranville, A., and Clement, K. (2007) Macrophage-secreted factors impair human adipogenesis: Involvement of proinflammatory state in preadipocytes. *Endocrinology.* 148, 868–877
- Tchkonia, T., Morbeck, D. E., Von Zglinicki, T., Van Deursen, J., Lustgarten, J., Scrable, H., Khosla, S., Jensen, M. D., and Kirkland, J. L. (2010) Fat tissue, aging, and cellular senescence. *Aging Cell.* 9, 667–684
- 177. Suganami, T., Nishida, J., and Ogawa, Y. (2005) A paracrine loop between adipocytes and macrophages aggravates inflammatory changes: role of free fatty acids and tumor necrosis factor alpha. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **25**, 2062–2068
- 178. Apovian, C. M., Bigornia, S., Mott, M., Meyers, M. R., Ulloor, J., Gagua, M., McDonnell, M., Hess, D., Joseph, L., and Gokce, N. (2008) Adipose macrophage infiltration is associated with insulin resistance and vascular endothelial dysfunction in obese subjects. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 28, 1654–1659
- 179. Tanti, J. F., and Jager, J. (2009) Cellular mechanisms of insulin resistance: role of stress-regulated serine kinases and insulin receptor substrates (IRS) serine phosphorylation. *Curr. Opin. Pharmacol.* **9**, 753–762
- Kawahito, S., Kitahata, H., and Oshita, S. (2009) Problems associated with glucose toxicity: Role of hyperglycemia-induced oxidative stress. *World J. Gastroenterol.* 15, 4137–4142
- 181. Schaffer, J. E. (2003) Lipotoxicity: when tissues overeat. Curr. Opin. Lipidol. 14, 281-7
- van Herpen, N. A., and Schrauwen-Hinderling, V. B. (2008) Lipid accumulation in non-adipose tissue and lipotoxicity. *Physiol. Behav.* 94, 231–241
- 183. Primeau, V., Coderre, L., Karelis, a D., Brochu, M., Lavoie, M.-E., Messier, V., Sladek, R., and Rabasa-Lhoret, R. (2011) Characterizing the profile of obese patients who are metabolically healthy. *Int. J. Obes.* (*Lond*). **35**, 971–981
- Sims, E. A. H. (2001) Are there persons who are obese, but metabolically healthy? *Metabolism*. 50, 1499– 1504
- Hamaguchi, M., Meth, J. L., von Klitzing, C., Wei, W., Esposito, D., Rodgers, L., Walsh, T., Welcsh, P., King,
 M. C., and Wigler, M. H. (2002) DBC2, a candidate for a tumor suppressor gene involved in breast cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 13647–13652
- 186. Hart, A. B., Samuels, D. C., and Hulgan, T. (2013) The other genome: A systematic review of studies of mitochondrial DNA haplogroups and outcomes of HIV infection and antiretroviral therapy. *AIDS Rev.* 15, 213–220
- 187. Sung, J. Y., Kim, R., Kim, J. E., and Lee, J. (2010) Balance between SIRT1 and DBC1 expression is lost in breast cancer. *Cancer Sci.* **101**, 1738–1744
- 188. Lee, H., Kim, K. R., Noh, S. J., Park, H. S., Kwon, K. S., Park, B. H., Jung, S. H., Youn, H. J., Lee, B. K., Chung, M. J., Koh, D. H., Moon, W. S., and Jang, K. Y. (2011) Expression of DBC1 and SIRT1 is associated with poor prognosis for breast carcinoma. *Hum. Pathol.* **42**, 204–213
- 189. Hiraike, H., Wada-Hiraike, O., Nakagawa, S., Saji, S., Maeda, D., Miyamoto, Y., Sone, K., Tanikawa, M., Oda, K., Nakagawa, K., Yano, T., Fukayama, M., and Taketani, Y. (2011) Expression of DBC1 is associated with nuclear grade and HER2 expression in breast cancer. *Exp. Ther. Med.* 2, 1105–1109
- 190. Kim, H. J., Kim, S.-H., Yu, E. J., Seo, W.-Y., and Kim, J. H. (2014) A positive role of DBC1 in PEA3mediated progression of estrogen receptor-negative breast cancer. *Oncogene*. 10.1038/onc.2014.381
- 191. Kim, W., and Kim, J. E. (2013) Deleted in breast cancer 1 (DBC1) deficiency results in apoptosis of breast cancer cells through impaired responses to UV-induced DNA damage. *Cancer Lett.* **333**, 180–186

- 192. Tseng, R.-C., Lee, C.-C., Hsu, H.-S., Tzao, C., and Wang, Y.-C. (2009) Distinct HIC1-SIRT1-p53 loop deregulation in lung squamous carcinoma and adenocarcinoma patients. *Neoplasia*. **11**, 763–70
- 193. Jung, W., Hong, K. D., Jung, W. Y., Lee, E., Shin, B. K., Kim, H. K., Kim, A., and Kim, B. H. (2013) SIRT1 expression is associated with good prognosis in colorectal cancer. *Korean J. Pathol.* 47, 332–339
- 194. Zhang, Y., Gu, Y., Sha, S., Kong, X., Zhu, H., Xu, B., Li, Y., and Wu, K. (2014) DBC1 is over-expressed and associated with poor prognosis in colorectal cancer. *Int. J. Clin. Oncol.* **19**, 106–112
- Seok-Hyung Kim1, Jeong Hoon Kim2, 3, Eun Ji Yu2, 3, K.-W. L. and C.-K. P. (2012) The overexpression of DBC1 in esophageal squamous cell carcinoma correlates with poor prognosis. *Histol. Histopathol.* 15, 49– 58
- 196. Cha, E. J., Noh, S. J., Kwon, K. S., Kim, C. Y., Park, B.-H., Park, H. S., Lee, H., Chung, M. J., Kang, M. J., Lee, D. G., Moon, W. S., and Jang, K. Y. (2009) Expression of DBC1 and SIRT1 is associated with poor prognosis of gastric carcinoma. *Clin. Cancer Res.* **15**, 4453–9
- 197. Kang, Y., Jung, W. Y., Lee, H., Kim, E. L. A., and Kim, B. H. (2012) Expression of SIRT1 and DBC1 in gastric adenocarcinoma. *Korean J. Pathol.* 46, 523–531
- 198. Bae, J. S., Park, S. H., Kim, K. M., Kwon, K. S., Kim, C. Y., Lee, H. K., Park, B. H., Park, H. S., Lee, H., Moon, W. S., Chung, M. J., Sylvester, K. G., and Jang, K. Y. (2015) CK2α phosphorylates DBC1 and is involved in the progression of gastric carcinoma and predicts poor survival of gastric carcinoma patients. *Int. J. Cancer.* **136**, 797–809
- 199. Ha, S. Y., Kim, J. H., Yang, J. W., Bae, H., Cho, H. Y., and Park, C. K. (2016) Expression of DBC1 is associated with poor prognosis in hepatitis virus-related hepatocellular carcinoma. *Pathol. Res. Pract.* 212, 616–621
- Bae, H. J., Chang, Y. G., Noh, J. H., Kim, J. K., Eun, J. W., Jung, K. H., Kim, M. G., Shen, Q., Ahn, Y. M., Kwon, S. H., Park, W. S., Lee, J. Y., and Nam, S. W. (2012) DBC1 does not function as a negative regulator of SIRT1 in liver cancer. *Oncol. Lett.* 4, 873–877
- 201. Won, K. Y., Cho, H., Kim, G. Y., Lim, S. J., Bae, G. E., Lim, J. U., Sung, J. Y., Park, Y. K., Kim, Y. W., and Lee, J. (2015) High DBC1 (CCAR2) expression in gallbladder carcinoma is associated with favorable clinicopathological factors. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **8**, 11440–11445
- 202. Noh, S. J., Kang, M. J., Kim, K. M., Bae, J. S., Park, H. S., Moon, W. S., Chung, M. J., Lee, H., Lee, D. G., and Jang, K. Y. (2013) Acetylation status of P53 and the expression of DBC1, SIRT1, and androgen receptor are associated with survival in clear cell renal cell carcinoma patients. *Pathology*. **45**, 574–80
- 203. Cho, D., Park, H., Park, S.-H., Kim, K., Chung, M., Moon, W., Kang, M., and Jang, K. (2015) The expression of DBC1/CCAR2 is associated with poor prognosis of ovarian carcinoma. *J. Ovarian Res.* **8**, 2
- 204. Park, H., Bae, J., Noh, S., and Kim, K. (2013) Expression of DBC1 and Androgen Receptor Predict Poor Prognosis in Diffuse Large B Cell Lymphoma. *Transl. Oncol.* 6, 370–381
- 205. Kim, J. R., Moon, Y. J., Kwon, K. S., Bae, J. S., Wagle, S., Yu, T. K., Kim, K. M., Park, H. S., Lee, J. H., Moon, W. S., Lee, H., Chung, M. J., and Jang, K. Y. (2013) Expression of SIRT1 and DBC1 Is Associated with Poor Prognosis of Soft Tissue Sarcomas. *PLoS One*. 10.1371/journal.pone.0074738
- 206. Resick, P. A., Wachen, J. S., Mintz, J., Young-mccaughan, S., John, D., Borah, A. M., Borah, E. V, Dondanville, K. A., Hembree, E. A., Litz, B. T., Peterson, A. L., Star, S., Resick, P. A., Wachen, J. S., Mintz, J., Young-mccaughan, S., Roache, J. D., Borah, A. M., Hembree, E. A., and Peterson, A. L. (2015) A Randomized Clinical Trial of Group Cognitive Present-Centered Therapy for PTSD Among Active Duty Military Personnel A Randomized Clinical Trial of Group Cognitive Processing Therapy Compared With Group Prese. *J. Consult. Clin. Psychol.* 83, Advance online publication

- 207. Brunquell, J., Yuan, J., Erwin, A., Westerheide, S. D., and Xue, B. (2014) DBC1/CCAR2 and CCAR1 are largely disordered proteins that have evolved from one common ancestor. *Biomed Res. Int.* 10.1155/2014/418458
- 208. Rishi, A. K., Zhang, L., Boyanapalli, M., Wali, A., Mohammad, R. M., Yu, Y., Fontana, J. A., Hatfield, J. S., Dawson, M. I., Majumdar, A. P. N., and Reichert, U. (2003) Identification and characterization of a cell cycle and apoptosis regulatory protein-1 as a novel mediator of apoptosis signaling by retinoid CD437. *J. Biol. Chem.* **278**, 33422–33435
- 209. Sundararajan, R., Chen, G., Mukherjee, C., and White, E. (2005) Caspase-dependent processing activates the proapoptotic activity of deleted in breast cancer-1 during tumor necrosis factor-alpha-mediated death signaling. *Oncogene*. **24**, 4908–4920
- 210. Anantharaman, V., and Aravind, L. (2008) Analysis of DBC1 and its homologs suggests a potential mechanism for regulation of sirtuin domain deacetylases by NAD metabolites. *Cell Cycle*. **7**, 1467–1472
- 211. Muthu, M., Cheriyan, V. T., and Rishi, A. K. (2015) CARP-1/CCAR1: a biphasic regulator of cancer cell growth and apoptosis. *Oncotarget.* **6**, 6499–510
- Kim, J. H., Yang, C. K., Heo, K., Roeder, R. G., An, W., and Stallcup, M. R. (2008) Nuclear Receptor Transcription Complexes. *Mol. Cell.* **31**, 510–519
- Seo, W. Y., Jeong, B. C., Yu, E. J., Kim, H. J., Kim, S. H., Lim, J. E., Kwon, G. Y., Lee, H. M., and Kim, J. H.
 (2013) CCAR1 promotes chromatin loading of androgen receptor (AR) transcription complex by stabilizing the association between AR and GATA2. *Nucleic Acids Res.* 41, 8526–8536
- Ji Yu, E., Kim, S. H., Heo, K., Ou, C. Y., Stallcup, M. R., and Kim, J. H. (2011) Reciprocal roles of DBC1 and SIRT1 in regulating estrogen receptor α activity and co-activator synergy. *Nucleic Acids Res.* 39, 6932–6943
- Fu, J., Jiang, J., Li, J., Wang, S., Shi, G., Feng, Q., White, E., Qin, J., and Wong, J. (2009) Deleted in breast cancer 1, a novel Androgen receptor (AR) coactivator that promotes AR DNA-binding activity. *J. Biol. Chem.* 284, 6832–6840
- 216. Garapaty, S., Xu, C., Trojer, P., Mahajan, M., Neubert, T., and Samuels, H. (2009) Identification and characterization of a novel nuclear protein complex Involved In nuclear hormone receptor-mediated gene regulation. *J Biol Chem.* **284**, 7542–7552
- Subramanian, A. R. (1983) Structure and Functions of Ribosomal Protein S1. Prog Nucleic Acid Res&Molecular Bio. 3192, 101
- 218. Bycroft, M., Hubbard, T. J. P., Proctor, M., Freund, S. M. V, and Murzin, A. G. (1997) The solution structure of the S1 RNA binding domain: A member of an ancient nucleic acid-binding fold. *Cell.* **88**, 235–242
- Close, P., East, P., Dirac-Svejstrup, a. B., Hartmann, H., Heron, M., Maslen, S., Chariot, A., Söding, J., Skehel, M., and Svejstrup, J. Q. (2012) DBIRD complex integrates alternative mRNA splicing with RNA polymerase II transcript elongation. *Nature*. 484, 386–389
- 220. Landschulz, W., Johnson, P., and McKnight, S. (1988) The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. *Science (80-.).* **240**, 1759–1764
- 221. Kim, J. E., Chen, J., and Lou, Z. (2008) DBC1 is a negative regulator of SIRT1. *Nature*. **451**, 583–586
- 222. Chini, C. C. S., Escande, C., Nin, V., and Chini, E. N. (2010) HDAC3 is negatively regulated by the nuclear protein DBC1. *J. Biol. Chem.* **285**, 40830–40837
- 223. Zhao, W., Kruse, J.-P., Tang, Y., Jung, S. Y., Qin, J., and Gu, W. (2008) Negative regulation of the deacetylase SIRT1 by DBC1. *Nature*. **451**, 587–90
- 224. McLennan, A. G. (2006) The Nudix hydrolase superfamily. Cell. Mol. Life Sci. 63, 123–143

- 225. Blander, G., and Guarente, L. (2004) The Sir2 Family of Protein Deactylases. Annu. Rev. Biochem. 73, 417–435
- 226. Modeling, N., Latimer, K. W., Yates, J. L., Meister, M. L. R., Huk, A. C., and Pillow, J. W. (2017) A conserved NAD+ binding pocket that regulatesprotein-protein interactions during aging. *Science (80-.).* 355, 1312–1317
- 227. Gagné, J. P., Isabelle, M., Lo, K. S., Bourassa, S., Hendzel, M. J., Dawson, V. L., Dawson, T. M., and Poirier, G. G. (2008) Proteome-wide identification of poly(ADP-ribose) binding proteins and poly(ADPribose)-associated protein complexes. *Nucleic Acids Res.* **36**, 6959–6976
- Yeger, H., Perbal, B., Sun, W., Yang, J., Stéhelin, D., Rouleau, M., Patel, A., Hendzel, M. J., Kaufmann, S. H., Poirier, G. G., Perbal, B., Lim, S., Kaldis, P., Lee, E. Y. H. P., Muller, W. J., Lapenna, S., Giordano, A., Kastan, M. B., Bartek, J., Holbourn, K. P., Acharya, K. R., Perbal, B., Hodgson, S., Gao, J., Boothman, D. A., Casimiro, M. C., Crosariol, M., Loro, E., Li, Z., Pestell, R. G., Bertoli, C., Skotheim, J. M., and de Bruin, R. A. M. (2010) Control of cell cycle transcription during G1 and S phases. *J. Zhejiang Univ. Sci. B.* 1, 461–473
- Lewit-Bentley, A., and Réty, S. (2000) EF-hand calcium-binding proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 10, 637–643
- 230. Neukirch, S., Goriely, A., and Hausrath, A. C. (2008) Chirality of coiled coils: Elasticity matters. *Phys. Rev. Lett.* **100**, 1–4
- 231. Chini, C. C. S., Escande, C., Nin, V., and Chini, E. N. (2013) DBC1 (Deleted in Breast Cancer 1) modulates the stability and function of the nuclear receptor Rev-erbα. *Biochem. J.* **451**, 453–61
- Koch, H. B., Zhang, R., Verdoodt, B., Bailey, A., Zhang, C. D., Yates, J. R., Menssen, A., and Hermeking, H.
 (2007) Large-scale identification of c-MYC-associated proteins using a combined TAP/MudPIT approach. *Cell Cycle.* 6, 205–217
- 233. Menssen, A., Hydbring, P., Kapelle, K., Vervoorts, J., Diebold, J., Lüscher, B., Larsson, L.-G., and Hermeking, H. (2012) The c-MYC oncoprotein, the NAMPT enzyme, the SIRT1-inhibitor DBC1, and the SIRT1 deacetylase form a positive feedback loop. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, E187-96
- 234. Secombe, J., Pierce, S. B., and Eisenman, R. N. (2004) Myc: A weapon of mass destruction. *Cell.* **117**, 153–156
- 235. Dang, C., O'Donnell, K., Zeller, K., Nguyen, T., Osthus, R., and Li, F. (2006) The c-Myc target gene network. *Semin Cancer Biol.* **16**, 253–264
- 236. Zhang, L. J., Liu, X., Gafken, P. R., Kioussi, C., and Leid, M. (2009) A Chicken Ovalbumin Upstream Promoter Transcription Factor I (COUP-TFI) Complex Represses Expression of the Gene Encoding Tumor Necrosis Factor α-induced Protein 8 (TNFAIP8). J. Biol. Chem. 284, 6156–6168
- 237. Pereira, F. a, Tsai, M. J., and Tsai, S. Y. (2000) COUP-TF orphan nuclear receptors in development and differentiation. *Cell. Mol. Life Sci.* **57**, 1388–1398
- 238. Gelmann, E. P. (2002) Molecular biology of the androgen receptor. J. Clin. Oncol. 20, 3001–3015
- Trauernicht, A. M., Kim, S. J., Kim, N. H., and Boyer, T. G. (2007) Modulation of estrogen receptor alpha protein level and survival function by DBC-1. *Mol. Endocrinol.* 21, 1526–36
- 240. Tsai, M., and O'Malley, B. W. (1994) Molecular mechanisms of action of steroid / thyroid receptor superfamily members. *Annu. Rev. Biochem.* **63**, 451–486
- 241. Duez, H., and Staels, B. (2009) Rev-erb-alpha: an integrator of circadian rhythms and metabolism. *J Appl Physiol.* **107**, 1972–1980
- 242. Yin, L., and Lazar, M. A. (2015) The Orphan Nuclear Receptor Rev-erbα Recruits the N-CoR/Histone

Deacetylase 3 Corepressor to Regulate the Circadian Bmal1 Gene. Mol Endocrinol. 19, 1452–1459

- 243. Everett, L. J., and Lazar, M. A. (2014) Nuclear receptor Rev-erbalpha: up, down, and all around. *Trends Endocrinol Metab.* **25**, 586–592
- 244. Crumbley, C., and Burris, T. P. (2011) Direct regulation of CLOCK expression by REV-ERB. *PLoS One*. 10.1371/journal.pone.0017290
- 245. Whitaker, A. M., Farooq, M. A., Edwards, S., and Gilpin, N. W. (2015) DBC1 Functions as a Tumour Suppressor by Regulating p53 Stability. *Cell Rep.* **10**, 1324–34
- 246. Brady, C. A., and Attardi, L. D. (2010) P53 At a Glance. J. Cell Sci. 123, 2527–2532
- 247. Vousden, K. H., and Prives, C. (2009) Blinded by the Light: The Growing Complexity of p53. *Cell.* 137, 413–431
- Koyama, S., Wada-Hiraike, O., Nakagawa, S., Tanikawa, M., Hiraike, H., Miyamoto, Y., Sone, K., Oda, K.,
 Fukuhara, H., Nakagawa, K., Kato, S., Yano, T., and Taketani, Y. (2010) Repression of estrogen receptor β
 function by putative tumor suppressor DBC1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 392, 357–362
- Pettersson, K. K., Gustafsson, J.-A. A. J.-Å., Pattersson, K., Gustafsson, J.-A. A. J.-Å., Pettersson, K. K., Gustafsson, J.-A. A. J.-Å., Pattersson, K., Gustafsson, J.-A. A. J.-Å., Pettersson, K. K., and Gustafsson, J.-A. A. J.-Å. (2001) Role of estrogen receptor beta in estrogen action. *Annu. Rev. Physiol.* 63, 165–92
- Hiraike, H., Wada-Hiraike, O., Nakagawa, S., Koyama, S., Miyamoto, Y., Sone, K., Tanikawa, M., Tsuruga, T., Nagasaka, K., Matsumoto, Y., Oda, K., Shoji, K., Fukuhara, H., Saji, S., Nakagawa, K., Kato, S., Yano, T., and Taketani, Y. (2010) Identification of DBC1 as a transcriptional repressor for BRCA1. *Br. J. Cancer.* 102, 1061–7
- 251. Deng, C. X. (2006) BRCA1: Cell cycle checkpoint, genetic instability, DNA damage response and cancer evolution. *Nucleic Acids Res.* **34**, 1416–1426
- 252. Rosen, E. M., Fan, S., and Ma, Y. (2006) BRCA1 regulation of transcription. Cancer Lett. 236, 175–185
- Miki, Y., Swensen, J., Shattuck-Eidens, D., Futreal, P. A., Harshman, K., Tavtigian, S., Liu, Q., Cochran, C., Bennett, L. M., and Ding, W. (1994) A Strong Candidate for the Breast and Ovarian Cancer Susceptibility Gene BRCA1. *Science (80-.).* 266, 66–71
- 254. Mullan, P. B., Quinn, J. E., and Harkin, D. P. (2006) The role of BRCA1 in transcriptional regulation and cell cycle control. *Oncogene*. **25**, 5854–5863
- 255. Gao, Y., Tang, J., Chen, W., Li, Q., Nie, J., Lin, F., Wu, Q., Chen, Z., Gao, Z., Fan, H., Tsun, A., Shen, J., Chen, G., Liu, Z., Lou, Z., Olsen, N. J., Zheng, S. G., and Li, B. (2015) Inflammation negatively regulates FOXP3 and regulatory T-cell function via DBC1. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **112**, E3246–E3254
- 256. Fontenot, J. D., Gavin, M. a, and Rudensky, A. Y. (2003) Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat. Immunol.* 4, 330–6
- Pearsall, D. M., Di-, S., Robinson, R. W., Maynard, D. N., Bozarth, S. R., Piperno, D. R., Holst, I., Andres, T. C., Sanjur, O. I., Lathrap, D. W., Collier, D., Chandra, H., Raymond, J. S., Burger, R., Central, B., and Sciences, F. M. (2002) Control of Regulatory T Cell Development by the Transcription Factor Foxp3. *Science (80-.).* 299, 1057–1061
- 258. Sakurabashi, A., Wada-Hiraike, O., Hirano, M., Fu, H., Isono, W., Fukuda, T., Morita, Y., Tanikawa, M., Miyamoto, Y., Oda, K., Kawana, K., Osuga, Y., and Fujii, T. (2015) CCAR2 negatively regulates nuclear receptor LXRα by competing with SIRT1 deacetylase. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **149**, 80–88
- 259. Jakobsson, T., Treuter, E., Gustafsson, J. Å., and Steffensen, K. R. (2012) Liver X receptor biology and pharmacology: New pathways, challenges and opportunities. *Trends Pharmacol. Sci.* **33**, 394–404
- 260. Kong, S., Thiruppathi, M., Qiu, Q., Lin, Z., Dong, H., Chini, E. N., Prabhakar, B. S., and Fang, D. (2014)

DBC1 Is a Suppressor of B Cell Activation by Negatively Regulating Alternative NF-κB Transcriptional Activity. *J. Immunol.* **193**, 5515–5524

- 261. Kong, S., Dong, H., Song, J., Thiruppathi, M., Prabhakar, B. S., Qiu, Q., Lin, Z., Chini, E., Zhang, B., and Fang, D. (2015) Deleted in Breast Cancer 1 Suppresses B Cell Activation through RelB and Is Regulated by IKKα Phosphorylation. *J. Immunol.* **195**, 3685–3693
- Senftleben, U., Cao, Y., Xiao, G., Greten, F. R., Krähn, G., Bonizzi, G., Chen, Y., Hu, Y., Fong, A., Sun, S. C., and Karin, M. (2001) Activation by IKKalpha of a second, evolutionary conserved, NF-kappa B signaling pathway. *Science (80-.).* 293, 1495–1499
- 263. Bonizzi, G., and Karin, M. (2004) The two NF-κB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol.* **25**, 280–288
- 264. Park, S. H., Riley IV, P., and Frisch, S. M. (2013) Regulation of anoikis by deleted in breast cancer-1 (DBC1) through NF-κB. *Apoptosis.* **18**, 949–962
- 265. Israël, A. (2010) The IKK complex, a central regulator of NF-kappaB activation. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 10.1101/cshperspect.a000158
- 266. Karin, M., and Ben-Neriah, Y. (2000) Phosphorylation Meets Ubiquitination: The Control of NF-κB Activity. *Annu. Rev. Immunol.* **18**, 621–663
- Perkins, N. D. (2007) Integrating cell-signalling pathways with NF-kappaB and IKK function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 49–62
- Sakurai, H., Chiba, H., Miyoshi, H., Sugita, T., and Toriumi, W. (1999) IkappaB kinases phosphorylate NFkappaB p65 subunit on serine 536 in the transactivation domain. *J. Biol. Chem.* 274, 30353–30356
- Zandi, E., Rothwarf, D. M., Delhase, M., Hayakawa, M., and Karin, M. (1997) The IkB Kinase Complex (IKK) Contains Two Kinase Subunits, IKKb1; and IKKb2;, Necessary for IkB Phosphorylation and NFkB Activation. *Cell.* **91**, 243–252
- 270. DiDonato, J. a, Hayakawa, M., Rothwarf, D. M., Zandi, E., and Karin, M. (1997) A cytokine-responsive IkappaB kinase that activates the transcription factor NF-kappaB. *Nature*. **388**, 548–54
- 271. Ray Chaudhuri, A., and Nussenzweig, A. (2017) The multifaceted roles of PARP1 in DNA repair and chromatin remodelling. *Nat. Publ. Gr.* 10.1038/nrm.2017.53
- 272. Li, Z., Chen, L., Kabra, N., Wang, C., Fang, J., and Chen, J. (2009) Inhibition of SUV39H1 methyltransferase activity by DBC1. *J. Biol. Chem.* 284, 10361–10366
- Peters, A. H. F. M., O'Carroll, D., Scherthan, H., Mechtler, K., Sauer, S., Schöfer, C., Weipoltshammer, K., Pagani, M., Lachner, M., Kohlmaier, A., Opravil, S., Doyle, M., Sibilia, M., and Jenuwein, T. (2001) Loss of the Suv39h histone methyltransferases impairs mammalian heterochromatin and genome stability. *Cell.* 107, 323–337
- 274. Melcher, M., Schmid, M., Aagaard, L., Selenko, P., Laible, G., and Jenuwein, T. (2000) Structure-function analysis of SUV39H1 reveals a dominant role in heterochromatin organization, chromosome segregation, and mitotic progression. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 3728–3741
- 275. Firestein, R., Cui, X., Huie, P., and Cleary, M. L. (2000) Set domain-dependent regulation of transcriptional silencing and growth control by SUV39H1, a mammalian ortholog of Drosophila Su(var)3-9. *Mol. Cell. Biol.* 20, 4900–4909
- Karagianni, P., and Wong, J. (2007) HDAC3: taking the SMRT-N-CoRrect road to repression. *Oncogene*.
 26, 5439–5449
- Ishizuka, T., and Lazar, M. a (2003) The N-CoR/histone deacetylase 3 complex is required for repression by thyroid hormone receptor. *Mol. Cell. Biol.* 23, 5122–31

- 278. Guenther, M. G., Barak, O., and Lazar, M. A. (2001) The SMRT and N-CoR Corepressors Are Activating Cofactors for Histone Deacetylase 3. *Mol. Cell. Biol.* 21, 6091–6101
- 279. Imai, S., Armstrong, C. M., Kaeberlein, M., and Guarente, L. (2000) Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase. *Nature*. **403**, 795–800
- 280. Vaquero, A., Scher, M., Lee, D., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Reinberg, D. (2004) Human SirT1 interacts with histone H1 and promotes formation of facultative heterochromatin. *Mol. Cell.* **16**, 93–105
- Vaziri, H., Dessain, S. K., Eaton, E. N., Imai, S. I., Frye, R. A., Pandita, T. K., Guarente, L., and Weinberg, R. A. (2001) hSIR2SIRT1 functions as an NAD-dependent p53 deacetylase. *Cell.* **107**, 149–159
- Brunet, A., Sweeney, L., Fitzhugh Sturgill, J., Chua, K., Greer, P., Lin, Y., Tran, H., Ross, S., Mostoslavsky, R., Cohen, H., Hu, L., Cheng, H., Jedrychowski, M., Gygi, S., Sinclair, D., Alt, F., and Greenberg, M. (2004) Stress-Dependent Regulatin of FOXO Transcription Factors by SIRT1 Deacetylase. *Science (80-.).* 303, 2011–2015
- Yeung, F., Hoberg, J. E., Ramsey, C. S., Keller, M. D., Jones, D. R., Frye, R. A., and Mayo, M. W. (2004) Modulation of NF-kappaB-dependent transcription and cell survival by the SIRT1 deacetylase. *EMBO J.* 23, 2369–80
- 284. Pighin JA1, Zheng H, Balakshin LJ, Goodman IP, Western TL, Jetter R, Kunst L, S. A. (2013) Calorie Restriction Promotes Mammalian Cell Survival by Inducing the SIRT1 Deacetylase. *Nature*. **306**, 702–704
- 285. Fulco, M., Schiltz, R. L., lezzi, S., King, M. T., Zhao, P., Kashiwaya, Y., Hoffman, E., Veech, R. L., and Sartorelli, V. (2003) Sir2 regulates skeletal muscle differentiation as a potential sensor of the redox state. *Mol. Cell.* **12**, 51–62
- Qiang, L., Wang, L., Kon, N., Zhao, W., Lee, S., Zhang, Y., Rosenbaum, M., Zhao, Y., Gu, W., Farmer, S. R., and Accili, D. (2012) Brown remodeling of white adipose tissue by SirT1-dependent deacetylation of Ppary. *Cell.* **150**, 620–632
- 287. Rodgers, J. T., Lerin, C., Haas, W., Gygi, S. P., Spiegelman, B. M., and Puigserver, P. (2005) Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1a and SIRT1. *Nature*. **434**, 113–118
- Bouras, T., Fu, M., Sauve, A. A., Wang, F., Quong, A. A., Perkins, N. D., Hay, R. T., Gu, W., and Pestell, R.
 G. (2005) SIRT1 deacetylation and repression of p300 involves lysine residues 1020/1024 within the cell cycle regulatory domain 1. *J. Biol. Chem.* 280, 10264–10276
- Oberdoerffer, P., Michan, S., McVay, M., Mostoslavsky, R., Vann, J., Park, S. K., Hartlerode, A., Stegmuller, J., Hafner, A., Loerch, P., Wright, S. M., Mills, K. D., Bonni, A., Yankner, B. A., Scully, R., Prolla, T. A., Alt, F. W., and Sinclair, D. A. (2008) SIRT1 Redistribution on Chromatin Promotes Genomic Stability but Alters Gene Expression during Aging. *Cell.* **135**, 907–918
- 290. Luo, J., Nikolaev, A. Y., Imai, S., Chen, D., Su, F., Shiloh, A., Guarente, L., and Gu, W. (2001) Negative control of p53 by Sir2alpha promotes cell survival under stress. *Cell.* **107**, 137–48
- 291. Yang, S., Wright, J., Bauter, M., Seweryniak, K., Kode, A., and Rahman, I. (2007) Sirtuin regulates cigarette smoke-induced proinflammatory mediator release via RelA/p65 NF-kappaB in macrophages in vitro and in rat lungs in vivo: implications for chronic inflammation and aging. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 14642, 567–576
- 292. Yu, J., and Auwerx, J. (2010) Protein deacetylation by SIRT1: An emerging key post-translational modification in metabolic regulation. *Pharmacol. Res.* **62**, 35–41
- Liu, Y., Dentin, R., Chen, D., Hedrick, S., Ravnskjaer, K., Milne, J., Meyers, D. J., Cole, P., Iii, J. Y., Olefsky, J., Guarente, L., and Montminy, M. (2009) A Fasting Inducible Switch Modulates Gluconeogenesis Via Activator-Coactivator Exchange. *Nature*. 456, 269–273
- Bordone, L., Motta, M. C., Picard, F., Robinson, A., Jhala, U. S., Apfeld, J., McDonagh, T., Lemieux, M.,
 McBurney, M., Szilvasi, A., Easlon, E. J., Lin, S. J., and Guarente, L. (2006) Sirt1 regulates insulin secretion
 by repressing UCP2 in pancreatic β cells. *PLoS Biol.* 4, 210–220
- 295. Sun, C., Zhang, F., Ge, X., Yan, T., Chen, X., Shi, X., and Zhai, Q. (2007) SIRT1 Improves Insulin Sensitivity under Insulin-Resistant Conditions by Repressing PTP1B. *Cell Metab.* **6**, 307–319
- Schenk, S., McCurdy, C. E., Philp, A., Chen, M. Z., Holliday, M. J., Bandyopadhyay, G. K., Osborn, O., Baar, K., and Olefsky, J. M. (2011) Sirt1 enhances skeletal muscle insulin sensitivity in mice during caloric restriction. *J Clin Invest.* **121**, 4281–4288
- 297. Gerhart-Hines, Z., Rodgers, J. T., Bare, O., Lerin, C., Kim, S.-H., Mostoslavsky, R., Alt, F. W., Wu, Z., and Puigserver, P. (2007) Metabolic control of muscle mitochondrial function and fatty acid oxidation through SIRT1/PGC-1α. *EMBO J.* 26, 1913–1923
- 298. Picard, F., Kurtev, M., Chung, N., Topark-ngarm, A., Oliveira, R. M. De, Leid, M., and Mcburney, M. W.
 (2010) Sirt1 promotes fat mobilization in white adipocytes by repressing PPAR-γ. *Nature*. 429, 771–776
- Mayoral, R., Osborn, O., McNelis, J., Johnson, A. M., Oh, D. Y., Izquierdo, C. L., Chung, H., Li, P., Traves,
 P. G., Bandyopadhyay, G., Pessentheiner, A. R., Ofrecio, J. M., Cook, J. R., Qiang, L., Accili, D., and
 Olefsky, J. M. (2015) Adipocyte SIRT1 knockout promotes PPARγ activity, adipogenesis and insulin sensitivity in chronic-HFD and obesity. *Mol. Metab.* 4, 378–391
- 300. Zhou, Y., Song, T., Peng, J., Zhou, Z., Wei, H., Zhou, R., Jiang, S., and Peng, J. (2016) SIRT1 suppresses adipogenesis by activating Wnt/beta-catenin signaling in vivo and in vitro. *Oncotarget*. **7**, 77707–77720
- Qiao, L., and Shao, J. (2006) SIRT1 regulates adiponectin gene expression through Foxo1-C/enhancerbinding protein alpha transcriptional complex. *J. Biol. Chem.* 281, 39915–39924
- 302. Nøhr, M. K., Bobba, N., Richelsen, B., Lund, S., and Pedersen, S. B. (2017) Inflammation downregulates UCP1 expression in brown adipocytes potentially via SIRT1 and DBC1 interaction. *Int. J. Mol. Sci.* 10.3390/ijms18051006
- Fu, M., Liu, M., Sauve, A. A., Jiao, X., Zhang, X., Wu, X., Powell, M. J., Yang, T., Gu, W., Avantaggiati, M.
 L., Pattabiraman, N., Pestell, T. G., Wang, F., Quong, A. A., Wang, C., and Pestell, R. G. (2006) Hormonal control of androgen receptor function through SIRT1. *Mol. Cell. Biol.* 26, 8122–35
- 304. Park, K. J., Krishnan, V., O'Malley, B. W., Yamamoto, Y., and Gaynor, R. B. (2005) Formation of an IKKαdependent transcription complex is required for estrogen receptor-mediated gene activation. *Mol. Cell.* 18, 71–82
- 305. Angelova, S. G., Krasteva, M. E., Gospodinova, Z. I., and Georgieva, E. I. (2012) CHEK2 gene alterations independently increase the risk of death from breast cancer in Bulgarian patients. *Neoplasma*. 59, 622–630
- 306. Nakayasu, E. S., Brown, R. N., Ansong, C., Sydor, M. A., Imtiaz, S., Mihai, C., Sontag, R., Hixson, K. K., Monroe, M. E., Sobreira, T. J. P., Orr, G., Petyuk, V. A., Yang, F., Smith, R. D., and Adkins, J. N. (2013) Multi-omic data integration links deleted in breast cancer 1 (DBC1) degradation to chromatin remodeling in inflammatory response. *Mol. Cell. Proteomics.* **12**, 2136–47
- 307. Joshi, P., Quach, O. L., Giguere, S. S. B., and Cristea, I. M. (2014) A Functional Proteomics Perspective of DBC1 as a Regulator of Transcription. *J. Proteomics Bioinform.* **509**, 385–388
- Latchman, D. S. (2001) Transcription factors: Bound to activate or repress. *Trends Biochem. Sci.* 26, 211–213
- Mckenna, N. J., and Malley, B. W. O. (2002) Combinatorial control of gene expression by nuclear receptors and coregulators. *Cell.* **108**, 465–474
- 310. Duan, G., and Walther, D. (2015) The Roles of Post-translational Modifications in the Context of Protein

Interaction Networks. PLoS Comput. Biol. 10.1371/journal.pcbi.1004049

- 311. Giguère, S. S. B., Guise, A. J., Jean Beltran, P. M., Joshi, P. M., Greco, T. M., Quach, O. L., Kong, J., and Cristea, I. M. (2016) The Proteomic Profile of Deleted in Breast Cancer 1 (DBC1) Interactions Points to a Multifaceted Regulation of Gene Expression. *Mol. Cell. Proteomics.* **15**, 791–809
- 312. Escande, C., Nin, V., Pirtskhalava, T., Chini, C. C. S., Tchkonia, T., Kirkland, J. L., and Chini, E. N. (2015) Deleted in breast cancer 1 limits adipose tissue fat accumulation and plays a key role in the development of metabolic syndrome phenotype. *Diabetes.* 64, 12–22
- Escande, C., Nin, V., Pirtskhalava, T., Chini, C. C., Barbosa, M. T., Mathison, A., Urrutia, R., Tchkonia, T., Kirkland, J. L., and Chini, E. N. (2014) Deleted in Breast Cancer 1 regulates cellular senescence during obesity. *Aging Cell.* 12, 951–953
- Escande, C., Chini, C. C. S., Nin, V., Dykhouse, K. M., Novak, C. M., Levine, J., Van Deursen, J., Gores, G. J., Chen, J., Lou, Z., and Chini, E. N. (2010) Deleted in breast cancer-1 regulates SIRT1 activity and contributes to high-fat diet-induced liver steatosis in mice. *J. Clin. Invest.* **120**, 545–558
- 315. Moreno-Navarrete, J. M., Moreno, M., Vidal, M., Ortega, F., Ricart, W., and Fernández-Real, J. M. (2015) DBC1 is involved in adipocyte inflammation and is a possible marker of human adipose tissue senescence. *Obesity.* 23, 519–522
- Moreno-Navarrete, J. M., Moreno, M., Vidal, M., Ortega, F., Serrano, M., Xifra, G., Ricart, W., and Fernández-Real, J. M. (2015) Deleted in breast cancer 1 plays a functional role in adipocyte differentiation. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 308, E554-61
- Kolovou, G., Anagnostopoulou, K., Mikhailidis, D. P., and Cokkinos, D. V (2008) Apolipoprotein E knockout models. *Curr. Pharm. Des.* 14, 338–351
- Xu, J. (2005) Preparation, Culture, and Immortalization of Mouse Embryonic Fibroblasts. *Curr. Protoc. Mol. Biol.* Chapter 28, 1–8
- Manzanero, S. (2012) Generation of Mouse Bone Marrow-Derived Macrophages. *Methods Mol Biol.* 844, 177–181
- 320. Serrano, M., Lin, A. W., McCurrach, M. E., Beach, D., and Lowe, S. W. (1997) Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16(INK4a). *Cell.* **88**, 593–602
- Quijano, C., Cao, L., Fergusson, M. M., Romero, H., Liu, J., Gutkind, S., Rovira, I. I., Mohney, R. P., Karoly,
 E. D., and Finkel, T. (2012) Oncogene-induced senescence results in marked metabolic and bioenergetic alterations. *Cell Cycle.* 11, 1383–1392
- 322. Mitchell, C., and Willenbring, H. (2008) A reproducible and well-tolerated method for 2/3 partial hepatectomy in mice. *Nat. Protoc.* **3**, 1167–1170
- Mann, A., Thompson, A., Robbins, N., and Blomkalns, A. L. (2014) Localization, Identification, and Excision of Murine Adipose Depots. J. Vis. Exp. 94, 1–7
- Lê, K., Mahurkar, S., Alderete, T. L., Hasson, R. E., Adam, T. C., Kim, J. S., Beale, E., Xie, C., Greenberg,
 A. S., Allayee, H., and Goran, M. I. (2011) Subcutaneous Adipose Tissue Macrophage Infiltration Is
 Associated With Hepatic and Visceral Fat Deposition, Hyperinsulinemia, and Stimulation of NF-kB Stress
 Pathway. *Diabetes.* 60, 2802–9
- Chen, L. -f. (2001) Duration of Nuclear NF-kappa B Action Regulated by Reversible Acetylation. Science (80-.). 293, 1653–1657
- Cooper, S. (2003) Reappraisal of serum starvation, the restriction point, G0, and G1 phase arrest points.
 FASEB J. 17, 333–40
- 327. Holley, R. W., and Kiernan, J. a (1968) "Contact inhibition" of cell division in 3T3 cells. Proc. Natl. Acad. Sci.

U. S. A. 60, 300-4

- 328. Sancho, P., and Fabregat, I. (2010) NADPH oxidase NOX1 controls autocrine growth of liver tumor cells through up-regulation of the epidermal growth factor receptor pathway. J. Biol. Chem. 285, 24815–24824
- 329. Takehara, T., Liu, X., Fujimoto, J., Friedman, S. L., and Takahashi, H. (2001) Expression and role of Bcl-xL in human hepatocellular carcinomas. *Hepatology*. 34, 55–61
- 330. Lee, S. A., Lee, S. Y., Cho, I. H., Oh, M. A., Kang, E. S., Kim, Y. B., Woo, D. S., Choi, S., Nam, J. O., Tamamori-Adachi, M., Kitajima, S., Ye, S. K., Kim, S., Hwang, Y. J., Kim, I. S., Ki, H. P., and Jung, W. L. (2008) Tetraspanin TM4SF5 mediates loss of contact inhibition through epithelial-mesenchymal transition in human hepatocarcinoma. *J. Clin. Invest.* **118**, 1354–1366
- Sherwood, S. W., Rush, D., Ellsworth, J. L., and Schimke, R. T. (1988) Defining cellular senescence in IMR-90 cells: a flow cytometric analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 85, 9086–90
- 332. Schäuble, S., Klement, K., Marthandan, S., Münch, S., Heiland, I., Schuster, S., Hemmerich, P., and Diekmann, S. (2012) Quantitative model of cell cycle arrest and cellular senescence in primary human fibroblasts. *PLoS One.* 7, 22–24
- 333. Mao, Z., Ke, Z., Gorbunova, V., and Seluanov, A. (2012) Replicatively senescent cells are arrested in G1 and G2 phases. Aging (Albany. NY). 4, 431–435
- 334. Dike, L. E., and Farmer, S. R. (1988) Cell adhesion induces expression of growth-associated genes in suspension-arrested fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 85, 6792–6796
- 335. Ciecierski, R., Wisniewski, M., and Paczek, L. (2005) Liver regeneration. Pol Merkur Lek. 18, 473–477
- 336. Higgins, G. M., and Anderson, R. M. (1931) Experimental pathology of liver. I. Restroration of liver white rat following partial surgical removal. *Arch. Pathol.* **12**, 186–202
- Greene, A. K., and Puder, M. (2003) Partial hepatectomy in the mouse: technique and perioperative management. J. Invest. Surg. 16, 99–102
- Martins, P. N. A., Theruvath, T. P., and Neuhaus, P. (2008) Rodent models of partial hepatectomies. *Liver* Int. 28, 3–11
- 339. Mastellos, D. C., Deangelis, R. A., and Lambris, J. D. (2013) Inducing and characterizing liver regeneration in mice: Reliable models, essential "readouts" and critical perspectives. *Curr. Protoc. Mouse Biol.* 3, 141–170
- 340. Cressman, D. E., Greenbaum, L. E., Haber, B. A., and Taub, R. (1994) Rapid activation of posthepatectomy factor/nuclear factor κB in hepatocytes, a primary response in the regenerating liver. *J. Biol. Chem.* **269**, 30429–30435
- Mohn, K. L., Laz, T. M., Melby, A. E., and Taub, R. (1990) Immediate-early gene expression differs between regenerating liver, insulin-stimulated H-35 cells, and mitogen-stimulated Balb/c 3T3 cells. *J. Biol. Chem.* 265, 21914–21921
- 342. Taub, R. (1996) Liver regeneration 4: transcriptional control of liver regeneration. Faseb J. 10, 413–427
- Cressman, D. E., Diamond, R. H., and Taub, R. (1995) Rapid activation of the Stat3 transcription complex in liver regeneration. *Hepatology*. 21, 1443–1449
- 344. Fausto, N. (2000) Liver regeneration. J. Hepatol. 32, 19–31
- Martinez-Hernandez, A., and Amenta, P. S. (1995) The extracellular matrix in hepatic regeneration. *FASEB* J. 9, 1401–10
- Bezerra, J. a, Currier, a R., Melin-Aldana, H., Sabla, G., Bugge, T. H., Kombrinck, K. W., and Degen, J. L.
 (2001) Plasminogen activators direct reorganization of the liver lobule after acute injury. *Am. J. Pathol.* 158, 921–929

- 347. Harvard Stem Cell Institute (2008) StemBook, Cambridge
- Si-Tayeb, K., Lemaigre, F. P., and Duncan, S. A. (2010) Organogenesis and Development of the Liver. *Dev. Cell.* 18, 175–189
- Hata, M., Nanno, M., Doi, H., Satomi, S., Sakata, T., Suzuki, R., and Itoh, T. (1993) Establishment of a hepatocytic epithelial cell line from the murine fetal liver capable of promoting hemopoietic cell proliferation.
 J. Cell. Physiol. **154**, 381–392
- 350. Kinoshita, T., Sekiguchi, T., Xu, M. J., Ito, Y., Kamiya, a, Tsuji, K., Nakahata, T., and Miyajima, a (1999)
 Hepatic differentiation induced by oncostatin M attenuates fetal liver hematopoiesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* U. S. A. 96, 7265–70
- Michaud, M., Balardy, L., Moulis, G., Gaudin, C., Peyrot, C., Vellas, B., Cesari, M., and Nourhashemi, F.
 (2013) Proinflammatory cytokines, aging, and age-related diseases. J. Am. Med. Dir. Assoc. 14, 877–882
- 352. Bruunsgaard, H., Pedersen, M., and Pedersen, B. K. (2001) Aging and proinflammatory cytokines. *Curr. Opin. Hematol.* **8**, 131–136
- 353. Joyce, D., Albanese, C., Steer, J., Fu, M., Bouzahzah, B., and Pestell, R. G. (2001) NF-κB and cell-cycle regulation: The cyclin connection. *Cytokine Growth Factor Rev.* **12**, 73–90
- 354. Ledoux, A. C., and Perkins, N. D. (2014) NF-kB and the cell cycle. *Biochem. Soc. Trans.* 42, 76–81
- 355. Chen, F., Castranova, V., and Shi, X. (2001) New insights into the role of nuclear factor-kappaB in cell growth regulation. *Am. J. Pathol.* **159**, 387–97
- 356. Hinz, M., Krappmann, D., Eichten, A., Heder, A., Scheidereit, C., and Strauss, M. (1999) NF-kappaB function in growth control: regulation of cyclin D1 expression and G0/G1-to-S-phase transition. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 2690–8
- 357. Zhi, H., Yang, L., Kuo, Y. L., Ho, Y. K., Shih, H. M., and Giam, C. Z. (2011) NF-κB hyper-activation by HTLV-1 tax induces cellular senescence, but can be alleviated by the viral anti-sense protein HBZ. *PLoS Pathog.* 10.1371/journal.ppat.1002025
- 358. Dahlman, J. M., Wang, J., Bakkar, N., and Guttridge, D. C. (2009) The RelA/p65 subunit of NF-κB specifically regulates cyclin D1 protein stability: Implications for cell cycle withdrawal and skeletal myogenesis. J. Cell. Biochem. 106, 42–51
- 359. Janbandhu, V. C., Singh, A. K., Mukherji, A., and Kumar, V. (2010) p65 negatively regulates transcription of the cyclin E gene. J. Biol. Chem. 285, 17453–17464
- 360. Taub, R. (2004) Liver regeneration: from myth to mechanism. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 5, 836–47
- Taub, R., Greenbaum, L. E., and Peng, Y. (1999) Transcriptional regulatory signals define cytokinedependent and -independent pathways in liver regeneration. *Semin. Liver Dis.* 19, 117–27
- Polyak, K., Kato, J., Solomon, M. J., Sherr, C. J., Massague, J., Roberts, J. M., and Koff, A. (1994) p27Kip1, a cyclin-Cdk inhibitor, links transforming Growth Factor-13 and Contact Inhibition To Cell Cycle Arrest. *Genes Ddev.* 8, 9–22
- 363. Kato, J. ya, Matsuoka, M., Polyak, K., Massague, J., and Sherr, C. J. (1994) Cyclic AMP-induced G1 phase arrest mediated by an inhibitor (p27Kip1) of cyclin-dependent kinase 4 activation. *Cell.* **79**, 487–496
- Lloyd, R. V, Erickson, L. A., Jin, L., Kulig, E., Qian, X., Cheville, J. C., and Scheithauer, B. W. (1999)
 P27Kip1: a Multifunctional Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor With Prognostic Significance in Human Cancers. Am. J. Pathol. 154, 313–23
- 365. Weinberg, R. A. (1995) The retinoblastoma protein and cell cycle control. Cell. 81, 323–330
- 366. Baldin, V., Lukas, J., Marcote, M. J., Pagano, M., and Draetta, G. (1993) Cyclin D1 is a nuclear protein required for cell cycle progression in G1. *Genes Dev.* **7**, 812–821

- Yang, K., Hitomi, M., and Stacey, D. W. (2006) Variations in cyclin D1 levels through the cell cycle determine the proliferative fate of a cell. *Cell Div.* 1, 32
- 368. Lundberg, A. S., and Weinberg, R. A. (1998) Functional inactivation of the retinoblastoma protein requires sequential modification by at least two distinct cyclin-cdk complexes. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 753–61
- Fukami-Kobayashi, J., and Mitsui, Y. (1999) Cyclin D1 inhibits cell proliferation through binding to PCNA and cdk2. *Exp. Cell Res.* 246, 338–347
- 370. Guttridge, D. C., Albanese, C., Reuther, J. Y., Pestell, R. G., and Baldwin, A. S. (1999) NF-kappaB controls cell growth and differentiation through transcriptional regulation of cyclin D1. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 5785–99
- Lukas, J., Herzinger, T., Hansen, K., Moroni, M. C., Resnitzky, D., Helin, K., Reed, S. I., and Bartek, J. (1997) Cyclin E-induced S phase without activation of the pRb/E2F pathway. *Genes Dev.* 11, 1479–1492
- 372. Hwang, H. C., and Clurman, B. E. (2005) Cyclin E in normal and neoplastic cell cycles. *Oncogene.* 24, 2776–2786
- 373. Ekholm-Reed, S., Méndez, J., Tedesco, D., Zetterberg, A., Stillman, B., and Reed, S. I. (2004) Deregulation of cyclin E in human cells interferes with prereplication complex assembly. *J. Cell Biol.* **165**, 789–800
- 374. Spruck, C. H., Won, K. a, and Reed, S. I. (1999) Deregulated cyclin E induces chromosome instability. *Nature.* **401**, 297–300
- 375. Wajchenberg, B. L., and Cohen, R. (2014) Adipose Tissue and Adipokines in Health and Disease, 10.1007/978-1-62703-770-9
- Fajas, L. (2003) Adipogenesis: a cross-talk between cell proliferation and cell differentiation. Ann. Med. 35, 79–85

9. Agradecimientos

A mis padres y mi hermano, por el apoyo incondicional y el aliento constante.

A mis amigos más cercanos, por estar ahí siempre, y a los no tan cercanos, por estar ahí cuando se los necesita.

A los integrantes del Laboratorio de Patologías del Metabolismo y el Envejecimiento, en especial a Mariana Bresque, Leonardo Santos, Alejandro Rodríguez, Pía Garat, Laura Colman, y Paola Contreras, por compartir el día a día y hacer de lo malo algo menos malo y de los bueno algo mejor.

A los integrantes de la Unidad de Bioquímica y Proteómica Analítica y del Laboratorio de Genética Molecular Humana, en especial a Jorge Rodríguez, Paulina Invernizzi, Alejandro Leiva, Rosina Dapueto, Germán Galliussi y Jessica Rossello, Florencia Iriogoín, Victoria Prieto y Belén Torrado, por estar siempre en la vuelta y dar una mano en lo que sea.

A José Badano, Carlos Batthyány, y Celia Quijano, por su enorme colaboración en el desarrollo de las líneas de investigación en las que he participado.

A Niels Jessen, por recibirme en su laboratorio e introducirme en el mundo de las muestras humanas, y a Mikkel Vendelbo, por la ayuda dentro y fuera del laboratorio.

A Steen Bønløkke Pedersen, por abrirme las puertas de su laboratorio cuando otras parecían cerradas y darme vía libre para hacer experimentos *a piacere*, y a Pía Hornbek, por la disposición y la alegría constante.

A Carlos Escande, por su rol como orientador y su colaboración en mi desarrollo a nivel científico.

A las agencias financiadoras, Agencia Nacional de Innovación e Investigación, Programa de Educación en Ciencias Básicas y Comisión Académica de Posgrado.