



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Identificación de genes candidatos involucrados con la Homeostasis Energética a partir del análisis de transcriptoma en mucosa gástrica e íleon en modelo de rata Zucker y su posible traslación a humanos.

Jenny Andrea Leiva Salazar

Universidad Nacional de Colombia
Programa de Maestría en Genética Humana
Facultad de Medicina
Bogotá D.C., Colombia

2018

Identificación de genes candidatos involucrados con la Homeostasis Energética a partir del análisis de transcrito en mucosa gástrica e íleon en modelo de rata Zucker y su posible traslación a humanos.

Jenny Andrea Leiva Salazar

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Genética Humana

Director:

PhD., MSc., Jorge Eduardo Caminos Pinzón

Codirectora:

PhD., MSc., María Fernanda Garcés.

Línea de Investigación:

Estudio de las bases moleculares de la fisiopatología de la obesidad.

Grupo de Investigación:

Endocrinología y nutrición básica

Universidad Nacional de Colombia

Programa de Maestría en Genética Humana

Facultad de Medicina

Bogotá D.C

Este trabajo lo dedico a mi esposo y mi hijo, quienes me apoyaron y esperaron pacientemente, contribuyendo a que esta gran ilusión se convirtiera en una realidad. Por supuesto a mi familia, quienes han acompañado cada paso y nunca dejaron de creer en mí.

Agradecimientos

El presente trabajo se realizó en el marco del proyecto “Identificación de potenciales blancos terapéuticos para la obesidad humana mediante el análisis del transcriptoma de estómago e íleon de rata”, financiado por Colciencias código:110165740394 a través de la convocatoria 657-2014.

Mi principal agradecimiento es para mis directores el Doctor Jorge Eduardo Caminos Pinzón y la Doctora María Fernanda Garcés quienes idearon este proyecto, me permitieron hacer parte de su grupo de investigación, me brindaron su confianza, orientación y todas las herramientas necesarias para llevarlo a un feliz término.

En segundo lugar, agradezco a todas las personas que participaron de diferentes maneras en la ejecución del presente trabajo, desde los pacientes, investigadores, profesores y consultores, con los cuales el desarrollo de cada fase de este proyecto fue posible.

El componente de investigación animal del presente trabajo, se realizó en la unidad de experimentación de animales de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia, con seguimiento, control y asesoría para cada uno de los procedimientos propuestos, por un grupo de médicos veterinarios, cuya participación es justa reconocer.

El transcriptoma a analizar fue obtenido mediante tecnología de alto rendimiento, mRNA – seq, por el grupo de investigación de Endocrinología y Nutrición Básica de la Universidad Nacional de Colombia, bajo la dirección del profesor Jorge Eduardo Caminos Pinzón y con la participación del laboratorio de biotecnología FASTERIS S.A con sede en Ginebra, Suiza, donde se realizó la secuenciación. Adicionalmente se contó con la asesoría de expertos en investigación en bioinformática del área de la salud, del Centro de Investigación Inmunológica Aplicada y Básica (CINIBA), de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de la Plata en Argentina.

Los análisis bioquímicos y otros análisis moleculares, se llevaron a cabo en los laboratorios de equipos comunes de la Facultad de Medicina de la Universidad nacional de Colombia y bajo la supervisión de mis directores, a quienes debo agradecer que cada procedimiento fuera de la mejor calidad.

El componente de investigación en humanos, tuvo la participación multidisciplinaria de un excelente grupo de profesionales compuesto por genetistas, bacteriologos, nutricionistas, endocrinólogos, médicos residentes de los programa de postgrado en endocrinología y medicina interna, patólogos y estadísticos, que pertenecen a nuestro grupo de investigación y cuya labor permitió realizar con calidad la evaluación de los participantes y un seguimiento integral que impactó positivamente en su estado de salud.

Resumen

La obesidad puede estar favorecida por la desregulación en la expresión de genes que participan en la homeostasis energética a nivel gastrointestinal. Los mecanismos moleculares que participan en la expresión de estos genes requieren mayor investigación.

Los estudios de obesidad en humanos presentan limitaciones metodológicas para los ensayos *in vivo*, por lo cual, se ha reconocido a la rata Zucker mutante para el gen receptor de Leptina, como el modelo animal mejor conocido de obesidad genética y de elección para el estudio de enfermedades metabólicas, dado su fenotipo similar al de la obesidad humana y una correspondencia del 90% en la secuencia de aminoácidos de su genoma con el del humano.

De esta manera, el presente estudio permitió identificar nuevos genes involucrados en la homeostasis energética, a partir del análisis del transcriptoma obtenido por metodología mRNA-seq, en muestras de mucosa gástrica y de íleon de ratas Zucker magras y obesas, distribuidas en diferentes condiciones de alimentación y seleccionar a uno de estos genes como el “gen candidato” para estudiar.

Adicionalmente, se aplicó un abordaje traslacional de los resultados obtenidos en el modelo animal, a un grupo de jóvenes normopeso y obesos no diabéticos, evaluando en ellos, el comportamiento de la proteína codificada por el “gen candidato” y su correlación con parámetros relacionados con la obesidad.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo representan un aporte a la comprensión de los mecanismos fisiopatológicos que podrían llevar a la obesidad tanto en el modelo animal de rata Zucker como en humanos.

Palabras claves: obesidad, Angiopoyetina 4, células enteroendocrinas, homeostasis energética, transcriptoma, secuenciación mRNA-seq, Lipoprotein lipasa.

Abstract

Obesity may be favored by deregulation in the expression of the genes involved in energy homeostasis at gastrointestinal level. The molecular mechanisms involved in the expression of these genes are not completely defined and require further investigation.

Studies on obesity in humans have methodological limitations in *in vivo* tests. For this reason, mutant Zucker rats for Leptin receptor gene have been recognized as the best known animal model of genetic obesity, and are the first choice in studies on metabolic diseases, mainly due to the similarity between their phenotype and human obesity and a 90% correspondence in the amino acid sequence of their genome.

In consequence, this study allows identifying the genes involved in energy homeostasis, based on the analysis of the transcriptome obtained by mRNA-seq methodology in samples of gastric mucosa and ileum from lean and obese Zucker rats, which were distributed in different feeding conditions.

Moreover, a translational approach of the results obtained in the animal model was applied to a group of normal weight and non-diabetic obese young people, and the serum profiles of the protein encoded by one of the genes identified in the transcriptome analysis of the Zucker rat were evaluated.

The results obtained in this work contribute to the understanding of the physiopathological mechanisms that may lead to obesity in both the Zucker rat animal model and humans.

Keywords: obesity, angiotensin 4, enteroendocrine cells, energy homeostasis, transcriptome, mRNA - seq sequencing, lipoprotein lipase.

Contenido

	Pág.
I. Introducción General.....	1
II. Capítulo 1 - Estudio del transcriptoma de rata Zucker magra y obesa.....	4
1. Introducción capítulo 1	4
2. Materiales y métodos.....	8
2.1. Animales y tejidos.....	9
2.2. Extracción, purificación y secuenciación de ARNm	10
2.3. Procesamiento de las lecturas provenientes de mRNAseq.....	10
2.3.1. Análisis de expresión génica diferencial.....	10
2.3.2. Análisis de Componentes Principales	11
2.3.3. Análisis de Enriquecimiento funcional.....	11
2.3.4. Agrupación jerárquica.....	11
2.4. Selección de genes relevantes para el estudio.....	12
2.5. Confirmación mediante PCR en tiempo real.....	13
2.6. Determinación de los perfiles séricos proteicos mediante ELISA.....	13
2.7. Inmunohistoquímica.....	14
2.8. Análisis Estadísticos.....	14
3. Resultados	15
3.1. Caracterización del transcriptoma obtenido de ratas Zucker.....	15
3.2. Identificación de genes relevantes para el estudio.....	15
3.2.1. Análisis de expresión génica diferencial.....	15
3.2.2. Análisis de Componentes Principales.....	17
3.2.3. Análisis de Agrupamiento.....	18
3.2.4. Análisis de Enriquecimiento Funcional.....	20
3.2.5. Genes seleccionados y validados.....	21
3.3. Análisis de los perfiles de expresión por RT-PCR.....	22
3.4. Análisis de los perfiles séricos de la proteína de interés.....	27
3.5. Análisis de inmunoreactividad de la proteína de interés	30
4. Discusión.....	32

II. Capítulo 2 – Estudios de traslación en humanos.....	42
1. Introducción capítulo 2.....	42
2. Materiales y Métodos.....	46
2.1. Consideraciones éticas.....	46
2.2. Población y grupos de estudio.....	46
2.3. Criterios de exclusión para participar en el estudio.....	47
2.4. Valoración clínica, bioquímica y antropométrica de los participantes...47	
2.5. Análisis sérico de la proteína de estudio.....	49
2.6. Inmunohistoquímica.....	50
2.6. Análisis estadístico.....	50
3. Resultados	51
3.1. Caracterización de los sujetos participantes.....	51
3.2. Estudio de los niveles séricos de las proteínas de interés.....	54
3.3. Estudio de Correlación entre la proteína y parámetros de interés.....	57
3.4. Estudio de Inmunoreactividad en tejidos humanos.....	58
4. Discusión.....	60
III. Conclusiones y recomendaciones.....	67
IV. Lista de Anexos.....	70
A. Anexo: Curvas de ganancia de peso en las ratas Zucker magras y obesas.....	70
B. Anexo: Análisis de calidad de lecturas secuenciadas por mRNA-seq.....	71
V. Referencia.....	72

Lista de figuras

Pág.

- Figura 1.** Representación gráfica del número de genes expresados en la mucosa gástrica y de íleon de las ratas Zucker magras y obesas..... 15
- Figura 2.** Mapas de calor representando la expresión génica diferencial en la mucosa gástrica (A y B) y de íleon (C y D) de las ratas Zucker magras y obesas en las condiciones de alimentación estudiadas..... 16 y 17
- Figura 3.** Círculos de correlación representando el análisis de componentes principales realizado en mucosa gástrica (A) y de íleon (B) de las ratas Zucker magras y obesas en las condiciones de alimentación estudiadas..... 18
- Figura 4.** Análisis de agrupamiento jerárquico de los genes identificados en la mucosa gástrica (A) y mucosa de íleon (B) de las ratas Zucker magras y obesas según los patrones de expresión..... 19
- Figura 5.** Diagramas de Bloxplots que representan los perfiles de expresión de *Angptl4* medidos por PCR en tiempo real en mucosa gástrica (A) y de íleon (B) de las ratas Zucker según la condición experimental *ad libitum*, ayuno y realimentación..... 23 y 24
- Figura 6.** Diagramas de Bloxplots que representan los perfiles de expresión de *Angptl4* medidos por PCR en tiempo real en la mucosa gástrica (A) y de íleon (B) de las ratas Zucker según su condición metabólica magra u obesa..... 25 y 26
- Figuras 7.** Niveles séricos de la proteína relacionada con Angiopoyetina 4 en las ratas Zucker según su condición metabólica (A) y según la condición experimental (B)... 28 y 29
- Figura 8.** Análisis de Inmunohistoquímica para *Angptl4* en la mucosa gástrica (A y B), la mucosa de íleon (C, D y E) y el tejido adiposo (G y H) de las ratas Zucker..... 31

Figura 9. Niveles séricos de la proteína relacionada con Angiopoyetina 4 medidos en hombres jóvenes sanos normopeso y obesos no diabéticos durante una prueba de tolerancia oral a la glucosa (A) y la comparación de dichos niveles según su condición metabólica (B) y en cada tiempo de la PTOG (C).....55 y 56

Figura 10. Análisis de Inmunohistoquímica para ANGPT-L4 en mucosa gástrica (A y B), mucosa de íleon (C y D) y tejido adiposo (E y F) humano.....59

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1. Términos ontológicos más representativos de los clusters identificados en el total de genes diferencialmente expresados de la mucosa gástrica.....	20
Tabla 2. Términos ontológicos más representativos de los clusters identificados en el total de genes diferencialmente expresados de la mucosa de íleon.....	21
Tabla 3. Caracterización de las variables clínicas, bioquímicas y antropométricas de la cohorte de hombres jóvenes sanos normopeso y obesos no diabéticos.....	53 y 54
Tabla 4. Correlación de los niveles séricos de la Proteína Asociada a Angiopoyetina 4 con variables antropométricas, bioquímicas y séricas en la cohorte de humanos.....	58

Lista de símbolos y abreviaturas

Abreviaturas

Abreviatura Término

ENSIN	Encuesta Nacional de Situación Nutricional
CEE	Células Enteroendocrinas
RNA	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
mRNA-seq	RNA Secuencing
RT- PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real
ELISA	Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas
NPY	Neuropéptido Y
AGRP	Proteína Asociada a Agouti
POMC	Proopiomelanocortina
Ghrl	Ghrelin
PYY	Peptido YY
GLP-1	Peptido Similar al Glucagon – 1
<i>Lepr</i>	Gen receptor de Leptina
cDNA	Ácido Desoxirribonucleico complementario

pb	Pares de bases
RPKM	Reads per kilobase of transcript per million reads
DEG	Genes diferencialmente expresados
ACP	Análisis de Componentes Principales
SOM	Self-Organizing Maps
GO	Gene Ontology
BLASTp	Protein BLAST
NCBI	National Center for Biotechnology Information
<i>HPRT</i>	Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase
<i>Angptl4</i>	Gen Angiopoietin like – 4
ANGPT-L4.	Proteína asociada a Angiopoyetina 4
<i>Igf1r</i>	Insulin-like growth factor 1 receptor
<i>Sik1</i>	Salt-inducible kinase 1
<i>Tm4sF5</i>	Transmembrane 4 L six family member 5
<i>Fabp1</i>	Fatty acid binding protein 1
<i>Igfbp3</i>	Insulin-like growth factor binding protein 3
PPARs	Receptores activados por proliferadores peroxisomales
LPL	Lipoprotein lipasa
LP	Lipasa pancreática
TGI	Tracto gastrointestinal
FFA	Acidos grasos libres

IMC	Indice de Masa Corporal
DXA	Absorciometría de rayos X de doble energía
PTOG	Prueba de tolerancia oral a la glucosa
HOMA IR	Homeostatic Model Assessment Insulin Resistance
TGC	Triglicéridos
CT	Colesterol total
c-VLDL	Colesterol de muy baja densidad
c-LDL	Colesterol de baja densidad
c-HDL	Colesterol de alta densidad
PCR	Proteína C reactiva ultrasensible
CV	Coefficiente de variación

Introducción General

La obesidad es una enfermedad crónica altamente prevalente ¹. Según la Organización Mundial de la Salud, para octubre del año 2017, el 39% de los adultos presentaban sobrepeso y el 13% avanzaron a obesidad ². En Colombia, según la última Encuesta Nacional de Situación Nutricional (ENSIN – 2015), la prevalencia de sobrepeso en adultos fue de 37,7% y de obesidad de 18,7% ³. Adicionalmente, la obesidad se relaciona con un incremento significativo en la morbilidad y mortalidad de la población y una carga económica importante para los sistemas de salud en todo el mundo, por lo que ha sido considerada como una prioridad en las actividades de salud pública e incentivando su investigación ⁴.

Por tanto, el desarrollo del presente trabajo se encuentra enmarcado en una de las problemáticas de alto impacto en el área de la salud y busca contribuir al conocimiento todavía limitado, de las bases genéticas y moleculares que modulan su fisiopatología, como un paso previo importante en la búsqueda de alternativas efectivas para su tratamiento.

Por otra parte, la obesidad es un trastorno poligénico y multifactorial, favorecido por la desregulación en la expresión de genes que son importantes para el control del balance energético y el peso corporal ⁴⁻⁵. Específicamente, a nivel de la mucosa gástrica y de íleon, se han identificado la presencia de células enteroendocrinas (CEE) que expresan genes cuyos perfiles transcripcionales determinan la secreción de diferentes neuropéptidos intestinales, cuyas señales en el hipotálamo juegan un papel importante en el control del apetito y la saciedad, la absorción de nutrientes, el metabolismo de los lípidos y de la glucosa ⁶⁻⁷. Actualmente, los mecanismos moleculares que participan en la expresión de estos genes no están totalmente esclarecidos y requieren mayor investigación.

Con base en lo anterior y teniendo en cuenta las limitaciones metodológicas para los estudios *in vivo* en humanos, en el presente trabajo se empleó el modelo animal de rata Zucker magra y obesa, para identificar genes involucrados en la homeostasis energética a nivel gastrointestinal. Estos genes fueron identificados mediante el análisis del transcriptoma a nivel de la mucosa gástrica y de íleon en dicho modelo animal.

El estudio de dicho transcriptoma se realizó mediante la metodología de mRNA-seq⁸ a partir de las muestras de mucosa gástrica y de íleon obtenidas de las ratas Zucker magras y obesas, las cuales fueron distribuidas bajo diferentes condiciones de alimentación: *ad libitum*, ayuno y realimentación. A partir del análisis de dicho transcriptoma, se seleccionó una lista de genes que cumplieran con ciertos criterios de selección. Tras la revisión en la literatura de los genes seleccionados, se escogió uno de estos genes, el cual fue llamado “gen candidato” y cuya expresión fue confirmada mediante técnica de PCR en tiempo real y con el cual se continuaron los demás análisis. En el presente estudio, también se evaluó el perfil sérico de la proteína codificada por dicho gen, mediante la técnica de ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay o ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas) y se determinó su localización en mucosa gástrica, de íleon y tejido adiposo, mediante técnica de inmunohistoquímica.

De acuerdo a la revisión de la literatura publicada hasta la fecha, este es el primer estudio que utiliza el poder de la secuenciación mRNA-seq para caracterizar el perfil transcriptómico en dicho modelo experimental, lo que permitió estudiar nuevos genes y vías involucradas en la fisiopatología de la obesidad, los cuales podrían llegar a representar potenciales blancos terapéuticos.

El objetivo general del presente trabajo fue identificar estos genes relevantes para la homeostasis energética a nivel de la mucosa gástrica y de íleon en el modelo animal de rata Zucker magra y obesa. Adicionalmente, mediante un abordaje traslacional de los resultados obtenidos en el modelo animal de rata Zucker, hacia una cohorte de hombres jóvenes sanos normopeso y obesos no diabéticos, se busca contribuir a la comprensión

de algunos de los mecanismos fisiopatológicos que podrían llevar al desarrollo de la obesidad humana.

Para el cumplimiento del objetivo general, se llevaron a cabo el desarrollo de los siguientes objetivos específicos: 1) se analizó y describió el perfil del transcriptoma de la mucosa gástrica y de íleon en ratas Zucker magras y obesas expuestas a diferentes condiciones de alimentación: *ad-libitum*, ayuno y realimentación, 2) se identificó un grupo de genes que cumplieran con ciertos criterios de selección y se escogió al “gen candidato” para continuar con los análisis del estudio, 3) se estudió en el modelo animal de rata Zucker magra y obesa, el perfil sérico y la inmunolocalización en tejido adiposo y gastrointestinal, de la proteína codificada por el “gen candidato”, 4) para el abordaje traslacional a humanos, se evaluó en la cohorte de jóvenes sanos normopeso y de obesos no diabéticos, el perfil sérico de la proteína codificada por el “gen candidato” identificado a partir del estudio en el modelo animal y 5) en la cohorte de humanos, se correlacionaron los perfiles séricos de la proteína seleccionada, con parámetros clínicos, hormonales, bioquímicos y antropométricos relacionados con la obesidad .

La presentación del presente trabajo se realizó con base en los dos componentes metodológicos empleados: en el capítulo 1 se presentan los resultados y la discusión correspondientes al análisis y confirmación del transcriptoma obtenido en el modelo animal de ratas Zucker y en el capítulo 2, se presenta el estudio realizado en la cohorte de jóvenes sanos normopeso y obesos no diabéticos. El cumplimiento del objetivo general se demuestra a lo largo del escrito y en las conclusiones finales y el cumplimiento de los objetivos específicos, se describen en la metodología y resultados de cada capítulo.

Capítulo 1

1. Introducción capítulo 1: Estudio del transcriptoma de rata Zucker magra y obesa

La homeostasis energética es el proceso mediante el cual un organismo mantiene el equilibrio entre la ingesta calórica y el gasto de energía, garantizando que el peso corporal se mantenga en un rango adecuado. Cuando esta respuesta adaptativa se pierde, se produce una acumulación excesiva de triglicéridos en el tejido adiposo generando la adiposidad propia de la obesidad ⁹.

Dentro de este sistema homeostático, el tracto gastrointestinal juega un papel fundamental ¹⁰. A nivel de la mucosa gástrica y del íleon, se ha identificado la presencia de células enteroendocrinas, las cuales expresan genes que codifican para diferentes neuropéptidos, los cuales ejercen un control sobre el apetito y la saciedad, la absorción de nutrientes y el metabolismo de lípidos y glucosa. Dichos neuropéptidos se secretan en función del estado de ayuno o de alimentación del organismo, por ejemplo, a nivel de la mucosa gástrica se secreta Ghrelin, que constituye la única hormona con efecto orexigénico de origen intestinal conocida, mientras que en el íleon, se han identificado las mayores concentraciones de el Peptido YY (PYY), el cual ejerce un potente efecto anorexigénico, al inhibir la secreción del Neuropéptido Y en el hipotálamo y juega un papel importante en la generación del estado de saciedad ¹¹⁻¹². También a nivel del íleon se secreta el Peptido Similar al Glucagon – 1 (GLP-1), conocido como un potente factor incretínico (al estimular la secreción de insulina por las células beta del páncreas), que disminuye la ingesta de alimentos, aumenta la saciedad y disminuye los niveles de glicemia postprandial ^{6,7,13,14}.

Adicionalmente, a nivel del íleon, se ha reconocido un mecanismo denominado “freno ileal”, el cual consiste en que cuando los nutrientes entran en contacto con la mucosa del íleon, se produce una mayor inhibición del vaciamiento gástrico y del tránsito intestinal, que cuando los nutrientes entran en contacto con otro segmento intestinal, aumentando significativamente el estado de saciedad y con potentes efectos anorexigénicos. GLP-1 y PYY, secretado principalmente por el íleon, son considerados los péptidos mediadores para la activación del freno ileal ^{6,15}.

Se ha planteado que las alteraciones en los perfiles transcripcionales de los genes expresados por las células enteroendocrinas, afectan los patrones de secreción de los péptidos gastrointestinales que participan en el mantenimiento del balance energético corporal, contribuyendo de esta manera con la fisiopatología de la obesidad ^{9,7}.

El transcriptoma es el conjunto completo de transcritos de una célula, tejido u organismo y refleja la expresión y regulación de los genes en una condición fisiológica o patológica determinada ⁸. El análisis del transcriptoma obtenido a partir de las muestras de mucosa gástrica y de íleon procedentes de las ratas Zucker magras y obesas, durante diferentes estados nutricionales, *ad libitum*, ayuno y realimentación, permite identificar genes relevantes, cuyos perfiles transcripcionales reflejarían su participación en vías moleculares involucradas en la regulación del balance energético corporal. Esto podría contribuir a mejorar la comprensión de los mecanismos moleculares que participan en el desarrollo de la obesidad y al posible diseño de terapias dirigidas a estos mecanismos, que sean efectivas para su tratamiento.

Es una fortaleza para el presente estudio, que el transcriptoma analizado fuera obtenido mediante tecnología de RNA-seq, ya que permite que todo el transcriptoma sea estudiado de forma cuantitativa y con una medición más precisa de los niveles de expresión que otros métodos. Además, permite identificar nuevos transcritos y evaluar la dinámica del transcriptoma en los diferentes tejidos y condiciones experimentales con muy alto rendimiento ^{8,16}. La mayoría de los estudios en obesidad que han utilizado esta metodología, se han centrado en el tejido adiposo. Así, el presente trabajo, de manera

novedosa utiliza la secuenciación por metodología de mRNA-seq, para caracterizar el transcriptoma a nivel gastrointestinal en el modelo experimental antes descrito.

Los modelos de animales genéticamente modificados y con fenotipo magro y de obesidad, han sido los más empleados en el estudio de la obesidad ¹⁷⁻¹⁸. El modelo animal de rata ofrece algunas ventajas, como la facilidad de reproducción y mantenimiento, la posibilidad de controlar sus factores ambientales, el acceso a diferentes tejidos diana que no son fácilmente obtenidos en los seres humanos y que permite un análisis fenotípico más detallado y una fisiología mejor entendida y similar a la de los humanos. Adicionalmente, otra gran ventaja es la disponibilidad de la secuencia completa de su genoma y de cepas genéticamente identificadas y definidas ¹⁹⁻²⁰.

Las ratas Zucker obesas son el modelo animal mejor conocido de obesidad genética y se caracterizan por presentar una mutación recesiva en el gen del receptor de la leptina (*lepr*), que en estado de homocigosis, determina el desarrollo de obesidad ²¹. La leptina es una hormona producida por el tejido adiposo e importante en la regulación central del balance energético corporal. Esta hormona, se libera al torrente sanguíneo en proporción a la cantidad de lípidos almacenados en el tejido adiposo y se une al receptor de leptina que se encuentra en el hipotálamo, inhibiendo la producción del péptido orexigénico Neuropeptido Y (NPY) y estimulando la producción del péptido anorexigénico Proopiomelanocortina (POMC). De esta manera, la vía de señalización de leptina participa en el mantenimiento de la homeostasis energética, al promover un estado de saciedad que disminuye la ingesta de alimentos e incrementa el gasto energético corporal ^{22,23}.

Las ratas Zucker presentan una alteración en la vía de señalización de leptina que conlleva a la desregulación de los neuropeptidos orexigénicos y anorexigénicos a nivel cerebral y posterior desarrollo de la obesidad ²⁴. El fenotipo obeso en estos animales, se presenta a una edad temprana entre la tercera y la quinta semana de vida, está asociado a hiperfagia, alteración de la termogénesis e hiperplasia e hipertrofia de los adipocitos. Así mismo, se encuentra asociado con diferentes anormalidades endocrinológicas que

reproduce estrechamente la progresión de la enfermedad observada en humanos y que se describirán posteriormente en este documento ^{21,25}.

El modelo experimental de ratas magras y obesas bajo diferentes condiciones de alimentación utilizado en el presente trabajo, retoma uno de los modelos estandarizados para el estudio de la regulación de la homeostasis energética, ya que imita el comportamiento fisiológico demostrado durante el estado de ayuno y alimentación en humanos delgados y obesos ^{26,27}.

Los roedores magros, tienen reservas bajas de grasa y son ideales para estudiar los cambios rápidos que se dan en respuesta a la inanición y la restricción calórica; mientras que los roedores obesos, debido a los mayores depósitos de grasa, pueden sobrevivir periodos prolongados de ayuno antes de recurrir a otras fuentes de energía diferentes a los lípidos, siendo ideales para estudiar el ayuno a largo plazo y los mecanismos fisiopatológicos que promueven el exceso de adiposidad ²⁸⁻²⁹.

En condiciones de alimentación normal (*ad libitum*), la utilización de energía cambia poco y ocurre tanto el almacenamiento como la movilización de la grasa; mientras que durante el ayuno y la realimentación, la utilización de la energía cambia mucho y de forma aguda, induciendo cambios drásticos en el metabolismo que le permitan mantener la homeostasis energética³⁰.

En condiciones de ayuno, la disminución en los niveles de insulina, favorecen la lipólisis del tejido adiposo, y con esto, la liberación de ácidos grasos libres a la sangre y su movilización hacia otros tejidos, para ser utilizados como combustible energético. Esto requiere un incremento en la expresión de genes implicados en la lipólisis y la beta oxidación de los ácidos grasos durante el ayuno. Además, se presenta una disminución de la lipogénesis en el tejido adiposo secundario a cambios en los principales factores de transcripción lipogénicos ³¹. En el modelo experimental utilizado en el presente estudio, las ratas se sometieron a un estado de ayuno durante 36 horas, el cual es suficiente para

garantizar que el perfil transcriptómico evaluado, reflejara las condiciones de ayuno real, sin que se llegara a un estado catabólico del animal^{30,32}.

Durante la realimentación, se han documentado cambios en la transcripción génica que incrementa los niveles de insulina. El efecto anti-lipolítico de la insulina, altera la movilización de los lípidos a la sangre. La insulina promueve la lipogénesis y el almacenamiento de ácidos grasos en el tejido adiposo, para reponer las reservas de grasa utilizadas durante el ayuno³³. Esto favorece un aumento rápido en el peso y la grasa corporal, volviendo a la normalidad después de recuperar el tamaño y el contenido de adipocitos disminuido durante el ayuno y que determina la secreción de varias adipocitoquinas, las cuales participan en la regulación central del apetito y la saciedad^{27,29}. El estudio de la realimentación refleja la fisiología de la ingesta de alimentos que da unas señales de saciedad y el papel potencial de la regulación postalimentación en la obesidad³⁴.

De esta manera, este modelo permite comprender los efectos de la disponibilidad de alimentos en la dinámica transcriptómica de la mucosa gástrica y del íleon, en los patrones fisiológicos de alimentación que mantienen la homeostasis energética en las ratas Zucker magras y cuya alteración durante la respuesta a las condiciones de ayuno/alimentación en las ratas Zucker obesas, permite identificar factores y posibles vías biológicas que pueden contribuir a la fisiopatología de la obesidad.

2. Materiales y Métodos

El diseño general del presente estudio se basó en dos componentes metodológicos: el primer componente se expone a continuación en este primer capítulo, donde se identificaron genes involucrados en la homeostasis energética en un modelo animal de ratas Zucker magras y obesas expuestas a diferentes condiciones de alimentación, *ad libitum*, ayuno y realimentación y posteriormente se evaluaron los perfiles séricos y la inmunolocalización en el tejido adiposo, gástrico e íleon, de la proteína codificada por uno

de los genes seleccionados del análisis de mRNA–Seq en el modelo animal. El segundo componente consiste en el enfoque traslacional a humanos de los resultados obtenidos en el modelo animal de rata Zucker y se expone en el capítulo 2.

2.1 Animales y tejidos

Los experimentos en animales siguieron los principios y procedimientos descritos en la guía del National institute of Health (NIH) para el cuidado y uso de animales de laboratorio. El protocolo fue aprobado por el Comité de ética en investigación animal de la Universidad Nacional de Colombia ³⁵.

Se emplearon ratas machos Zucker magras y obesas adquiridas de la compañía *Charles River Laboratories International, Inc*, las cuales fueron pareadas por edad (5 semanas) en grupos de 10 ratas y alojadas en el microaislador “*Flexible Front Glovebox*”, bajo condiciones controladas de temperatura, humedad, ciclo de luz día/noche, alimento (5001 - *Laboratory Rodent Diet*) y agua *ad libitum* y controlando su peso corporal cada tercer día. Los datos antropométricos de las ratas Zucker utilizadas, mostraron que las ratas obesas ganaron significativamente más peso que las ratas magras, principalmente a partir de las 7 semanas de vida, como ha sido reportado en otros estudios con este animal (anexo A).

A las 10 semanas de vida, las ratas fueron distribuidas en tres condiciones experimentales: 1) ratas Zucker magras (n=10) y obesas (n=10) alimentadas *ad – libitum*, 2) ratas Zucker magras (n=10) y obesas (n=10) sometidas a ayuno de 36 horas y 3) ratas Zucker magras (n=10) y obesas (n=10) sometidas a ayuno de 36 horas y luego realimentadas durante 15 minutos. Posteriormente se les practicó eutanasia por dislocación cervical, previa aplicación intraperitoneal de Ketamina (60 mg/kg) y Acepromacina (0,1 mg/kg) a cada grupo de ratas y se tomaron muestras de sangre troncal, las cuales fueron almacenadas a -80°C para los análisis bioquímicos y hormonales. Se obtuvieron muestras de mucosa

tanto gástrica como de íleon, las cuales se congelaron en nitrógeno líquido inmediatamente y se almacenaron a -80°C hasta los análisis moleculares.

2.2 Extracción, purificación y secuenciación de ARNm

Los tejidos fueron almacenados en reactivo Trizol y el RNA total se extrajo usando el kit PureLink® RNA mini kit - Life Technologies. La cantidad de RNA se determinó usando el kit Qubit® Fluorometric Quantitation - Life Technologies - Invitrogen y se verificó su integridad por electroforesis. Se prepararon *pools* y réplicas biológicas con cantidades equivalentes de RNA total de 5 ratas por cada condición de alimentación. A partir de estos *pools*, se construyeron librerías de cDNA, las cuales fueron amplificadas y sometidas a control de calidad y validación. Los clusters aptos para el análisis, fueron secuenciados por metodología de mRNA-Seq utilizando el secuenciador Illumina HiSeq 2500 y con duplicado técnico por cada lectura.

Los datos provenientes del proceso de secuenciamiento fueron procesados usando la plataforma web Galaxy a través de dos herramientas: FastQC-ReadQC para realizar el control de calidad a los datos crudos y posteriormente Tophat-BOWTIE para alinear las lecturas secuenciadas con el genoma de *Rattus Norvegicus*³⁶. En este punto, se generó una tabla de cuentas de “lecturas por kilobase de transcritos por millón de lecturas” secuenciadas (RPKM), a partir de la cual se inició el análisis del transcriptoma.

2.3 Procesamiento de las lecturas provenientes de la secuenciación mediante mRNA-seq

2.3.1 Análisis de expresión génica diferencial

El análisis de calidad de los datos obtenidos del secuenciamiento con la herramienta FastQC-Read, habían indicado la calidad de secuenciación de las muestras (anexo B), lo que permitió iniciar el análisis del transcriptoma. Las cuentas de los genes detectados tras

el alineamiento de las secuencias de ARNm al genoma de referencia de *Rattus norvegicus* estaban reportadas como valores RPKM (*Reads per kilobase of transcript per million reads*), a partir de las cuales se iniciaron los análisis de expresión génica diferencial. De los registros obtenidos, se tuvieron en cuenta solamente los registros que tuvieran un mínimo de 50 lecturas, para determinar los perfiles de expresión génica diferencial. Se contrastaron los registros obtenidos de los diferentes estados metabólicos (magro y obeso) durante las diferentes condiciones de alimentación (*ad libitum*, ayuno y realimentación) en los grupos de ratas Zucker. Este análisis se realizó de manera independiente para la mucosa gástrica y de íleon. De esta manera, se identificó un subgrupo de genes diferencialmente expresados, según un *fold change* >1.8.

2.3.2 Análisis de Componentes Principales

Los valores de RPKM de los genes diferencialmente expresados, fueron transformados en log₂ y resumidos mediante análisis de componentes principales (ACP) utilizando el programa Excel Xlstat, con el propósito de contrastar los perfiles de expresión génica entre los diferentes tejidos sometidos a las mismas condiciones de alimentación y discriminar las diferentes condiciones estudiadas a partir de los perfiles de expresión obtenidos.

2.3.3 Análisis de Enriquecimiento Funcional

Para identificar los genes con función biológica relevante para los objetivos del estudio, se empleó un análisis de enriquecimiento funcional usando términos ontológicos (GO) relacionados con el balance energético y se identificaron los grupos de genes con los valores de enriquecimiento más significativos ($p < 0.05$)³⁷.

2.3.4 Agrupación Jerárquica

Con el subgrupo de genes diferencialmente expresados, se realizó de manera independiente para la mucosa gástrica y de íleon, un agrupamiento jerárquico basado en

los patrones de expresión, empleando el algoritmo *Self Organizing Maps* (SOM) y la herramienta Open Source Multiexperiment Viewer, con el fin de determinar grupos de genes con tendencias similares en los perfiles de expresión durante las diferentes condiciones analizadas en cada tejido^{38,39}.

2.4 Selección de genes relevantes para el estudio

Los análisis descritos previamente, permitieron hacer una selección preliminar de genes, con los cuales se realizó un alineamiento apareado con el genoma de referencia de *Rattus norvegicus*. Se seleccionaron solamente los genes con secuencias de aminoácidos confirmadas (nomenclatura NP) y se estableció el porcentaje de identidad en secuencias de aminoácidos entre las especies *Rattus norvegicus* y *Homo sapiens*. Para este análisis se usaron las herramientas BLASTp y HomoloGene disponible en la página del NCBI <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/homologene>.

La selección final de genes se hizo teniendo en cuenta los siguientes criterios: 1) que los genes tuvieran perfiles de expresión diferencial de interés para los objetivos del estudio, 2) que tuvieran una función biológica relacionada con el balance energético, 3) que presentaran un porcentaje de identidad $\geq 75\%$ en la secuencias de aminoácidos entre las especies de *Rattus norvegicus* y *Homo sapiens* y 4) que la proteína codificada por estos genes fuera secretable y medible en suero por inmunoensayo.

Los genes seleccionados del análisis de mRNA-seq, fueron validados con la literatura científica con el fin de identificar aquellos genes que pudieran tener una función relevante en la homeostasis energética y cuya desregulación pudiera contribuir con la fisiopatología de la obesidad, pero principalmente, que hubieran sido recientemente descritos y cuya investigación pudiera contribuir a su conocimiento y representar un aporte novedoso a la literatura. Tras esta validación, se escogió el “**gen candidato**” para continuar con los estudios. Los perfiles de expresión diferencial del gen escogido como candidato fueron confirmados por RT-PCR.

2.5 Confirmación mediante RT-PCR

Con el propósito de verificar los perfiles de expresión diferencial observados previamente, se procedió a analizar los niveles de expresión a nivel de ARNm del gen escogido como “candidato” mediante PCR en tiempo real. Las muestras de mucosa gástrica y de íleon congeladas y almacenadas a -80°C , fueron embebidas en reactivo Trizol (1mL/100mg de tejido -Trizol® Invitrogen) y homogenizadas (microhomogenizador de tejidos PRO2000®), luego se extrajo 1,5 ug de RNA total (kit PureLink® RNA mini kit – Life Technologies), el cual se cuantificó por fluorescencia (kit Quibit®, Life Technologies, Invitrogen) y se verificó su integridad por electroforesis. La retrotranscripción se realizó con el kit Super Script III de Invitrogen y el Termociclador Thermal Cycle 1000C BIORAD, en las siguientes condiciones de ciclado: 37°C por 40 min, 42°C por 15 min, 96°C por 1 min y 4°C por 5 min. El cDNA obtenido se utilizó como template para realizar la RT-PCR (Applied Biosystems 7500/7500 Fast Real - CA, USA). Para confirmar la expresión del gen escogido como “candidato”, se emplearon primer y sondas específicos de rata (sonda Taq Man Gene Expression, Thermo Fisher Scientific) y HPRT fue usado como gen housekeeping para el control interno (sonda # 95 para HPRT, Roche Diagnostics GmbH Mannheim, Germany). Las condiciones de ciclado para la PCR fueron de 95°C por 15 seg, 60°C por 30 seg y 72°C por 1 min durante 35 ciclos. Los tamaños de los productos fueron confirmados por electroforesis en gel de agarosa al 2.0% y se visualizaron por tinción con bromuro de etidio (Gel Doc 1000 Documentación System de Bio-Rad Laboratories, Inc., Richmond, CA). Los datos informados en la PCR en tiempo real fueron normalizados y las expresiones génicas relativas de los genes seleccionados fueron calculadas usando el método $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ ⁴⁰.

2.6 Determinación de los perfiles séricos proteicos

Mediante metodología de ELISA se evaluaron los perfiles séricos de la proteína codificada por el gen seleccionado como “candidato”, tras su validación por RT-PCR. Se emplearon sueros obtenidos de los diferentes grupos de experimentación en el modelo animal de ratas Zucker magra y obesa, que habían sido almacenadas a -80°C . Se utilizaron kits de ELISA

comercialmente disponibles y específicos para cada especie [Rat Angiopoietin-related protein 4 (Angptl4) ELISA kit-CUSABIO y Human Angiopoietin-like 4 ELISA kit-Thermo Fisher Scientific Inc]. Los ensayos se realizaron por duplicado y los resultados se expresaron de acuerdo a la curva estándar en pg/mL.

2.7 Inmunohistoquímica

A partir de muestras de mucosa gástrica, mucosa de íleon y tejido adiposo, procedentes de las ratas Zucker delgadas y obesas, fijados en bloques de formalina tamponada neutra al 10% y embebidos en parafina, se determinó la inmunoreactividad del Anticuerpo policlonal de rata Anti-Angiopoietin-like 4 antibody (ab115798)⁴¹. Todos los ensayos se realizaron en el mismo corrido y se utilizaron como controles internos, las células dentro del mismo tejido que no mostraban marcación al anticuerpo.

2.8 Análisis Estadístico

Los datos provenientes de mRNA-Seq y RT-PCR, se analizaron usando el software R (versión 3.1.1). La comparación entre los grupos para el estudio de expresión génica se realizó con ANOVA de una y dos vías, seguido de la prueba de Tukey *post hoc*. Para los otros ensayos, los valores se expresaron como la media de la desviación estándar o mediana (rango intercuartílico), para variables no distribuidas normalmente. Todas las variables se probaron para la normalidad de la distribución. Se usó la prueba exacta de Fisher, t-test (valor t) para muestras independientes y ANOVA, para detectar la diferencia entre dos medias aritméticas. Los valores estadísticos son presentados como * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. La significancia estadística fue asumida con un $p < 0.05$.

3. Resultados en el modelo animal

3.1 Caracterización del transcriptoma obtenido

Inicialmente la base de datos obtenida del análisis del transcriptoma, estuvo compuesta por 39.595 registros. Tras una primera depuración de los datos, se seleccionaron solo los registros con mas de 50 lecturas, tras lo cual, se identificaron 11.449 registros provenientes de mucosa gástrica y 11.667 registros de la mucosa de íleon. En el diagrama de Venn se observan genes expresados de manera específica para cada tejido, sin embargo, la mayoría de los genes detectados muestran expresión común entre la mucosa gástrica y de íleon (figura 1).

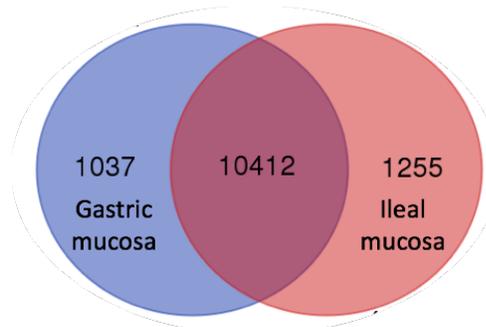


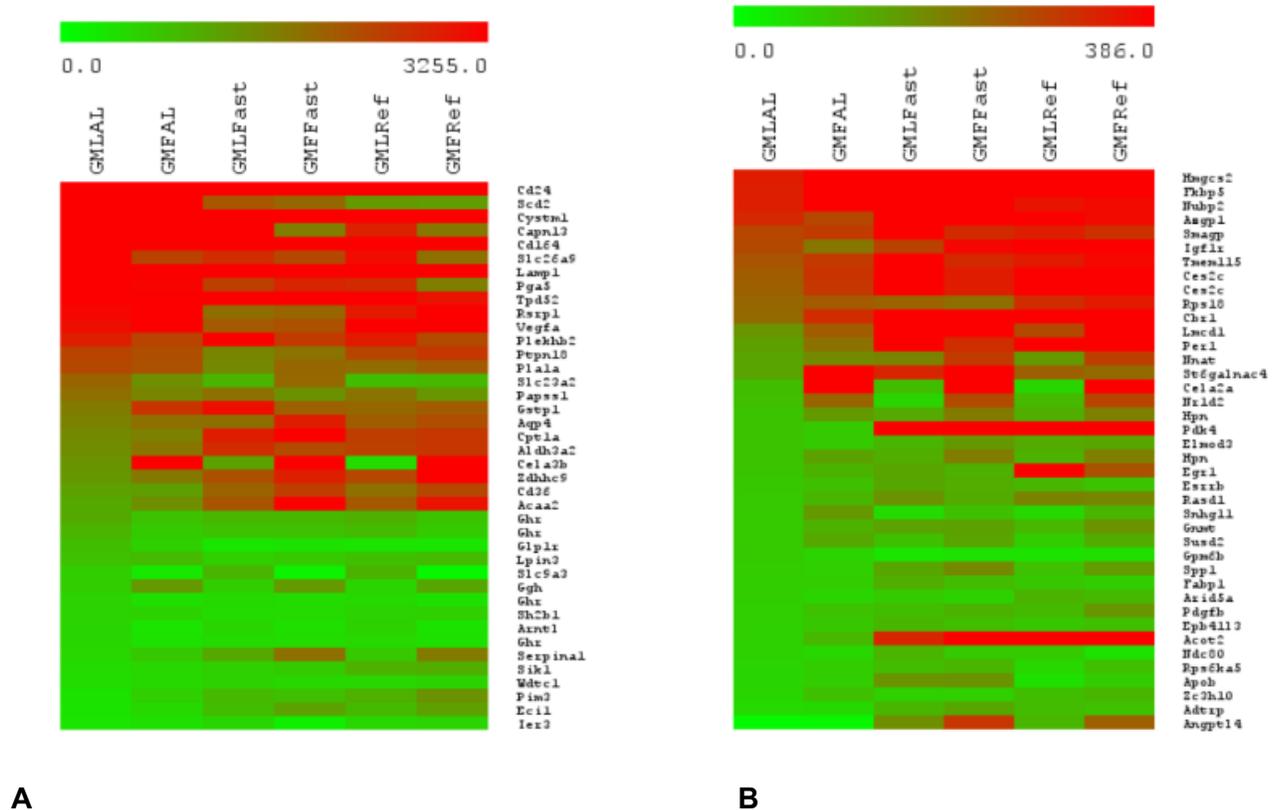
Figura 1: número de genes expresados en la mucosa gástrica y de íleon de las ratas Zucker magras y obesas. Diagrama de Venn que representa la distribución del número de genes por cada tejido analizado y la superposición entre ellos. Draw venn diagram <http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/Flanders> Interuniversity Institute for Biotechnology (VIB).

3.2 Identificación de genes relevantes para el estudio

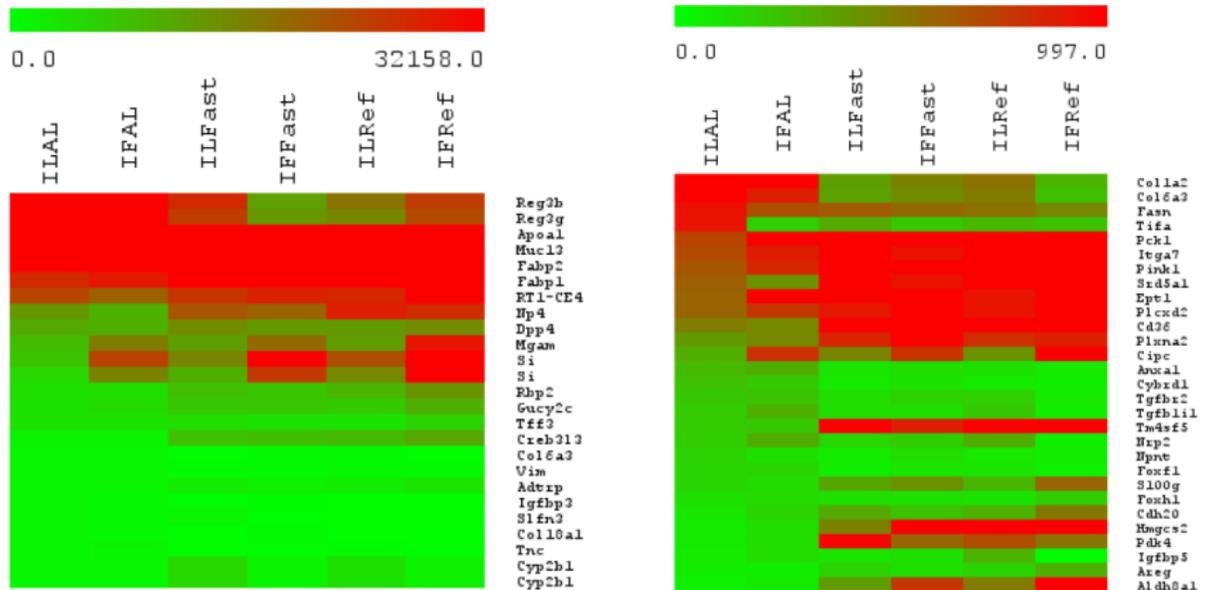
3.2.1 Análisis de expresión génica diferencial

Tras los análisis de expresión génica diferencial a nivel de la mucosa gástrica y de íleon usando el algoritmo DESeq, se identificó un subgrupo de 70 genes en la mucosa gástrica

y otro subgrupo de 55 genes en la mucosa de íleon, con la mayor expresión diferencial durante los diferentes estados metabólicos (magro y obeso) y de alimentación (*ad libitum*, ayuno y realimentación). Los perfiles de expresión ARNm diferencial de dichos genes fueron ilustrados en los siguientes mapas de calor y de manera independiente para cada tejido (figuras 2 A-D).



Figuras 2A y 2B: mapas de calor que representan la expresión génica diferencial de ARNm en mucosa gástrica de las ratas Zucker. Se evidencian los perfiles de expresión génica diferencial en muestras de mucosa gástrica (GM) por cada condición de alimentación *ad libitum* (AL), ayuno (Fast) y realimentación (Ref), para las ratas Zucker magras (L) y obesas (F), figuras 2 A y B. El color verde representa los genes con baja expresión y el color rojo los genes con expresión elevada. Los resultados se visualizaron mediante el programa Multiexperiment Viewer.



C

D

Figuras 2C y 2D: mapas de calor que representan la expresión génica diferencial de ARNm en mucosa de íleon de las ratas Zucker. Se evidencian los perfiles de expresión génica diferencial en muestras de mucosa de íleon (IL) por cada condición de alimentación *ad libitum* (AL), ayuno (Fast) y realimentación (Ref), para las ratas Zucker magras (L) y obesas (F), figuras 2 C y D. El color verde representa los genes con baja expresión y el color rojo los genes con expresión elevada. Los resultados se visualizaron mediante el programa Multiexperiment Viewer.

3.2.2 Análisis de Componentes Principales

Para evaluar el comportamiento de los perfiles de expresión ARNm en las ratas magras y obesas, sometidas a las mismas condiciones experimentales, se realizó un Análisis de Componentes Principales con los datos obtenidos del subgrupo de genes con mayor expresión diferencial en cada tejido y condición experimental. La disposición de los datos en este análisis, permitió evidenciar que en la mucosa gástrica los perfiles de expresión fueron similares durante las diferentes condiciones de alimentación, pero opuestos en función del estado metabólico magro u obeso (figura 3A). En la mucosa del íleon, el

comportamiento de los datos fue similar para las ratas magras y obesas, pero las variaciones se dieron en función a las condiciones experimentales de *ad libitum*, ayuno y realimentación (figura 3B).

Figura 3A

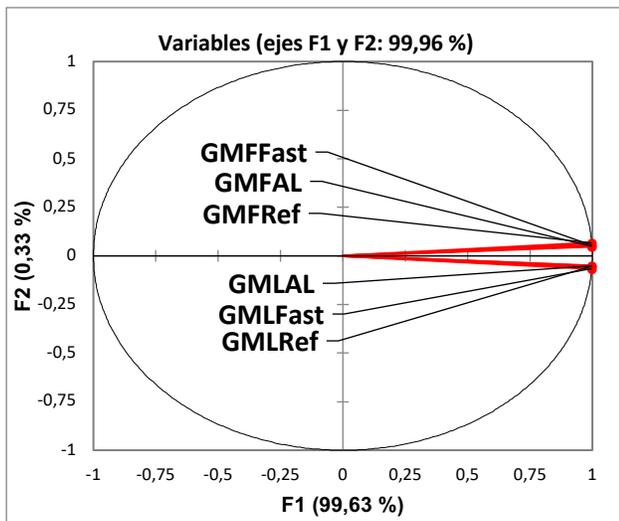
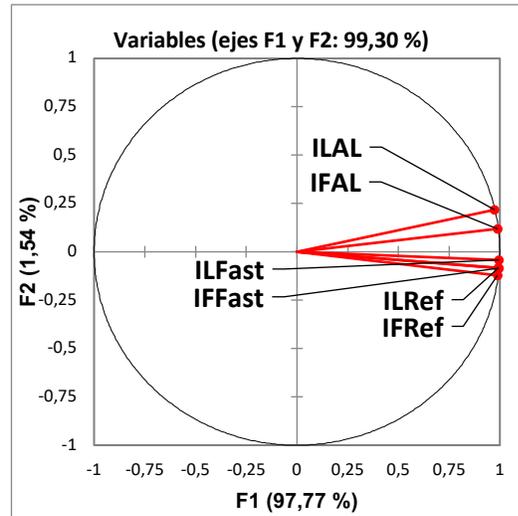


Figura 3B



Figuras 3 A y B: Análisis de Componentes Principales. Los círculos de correlación correspondientes a mucosa gástrica (GM) en la figura 3A y de íleon en la figura 3B, muestran los eigenvalores F1 y F2 que resumen el 99,96% y 99,30% la tendencia de los datos respectivamente para cada tejido. Se evidencia la oposición entre los perfiles de expresión observados en función a la condición metabólica magra (L) y obesa (F) en la mucosa gástrica y en función a la condición de alimentación *ad libitum* (AL), ayuno (Fast) y realimentación (Ref) en la mucosa del íleon.

3.2.3 Análisis de Agrupamiento

Los patrones de expresión del subgrupo de genes diferencialmente expresados que tuvieron un comportamiento similar, fueron agrupados jerárquicamente en 9 clusters para la mucosa gástrica (figura 4A) y 9 clusters para la mucosa de íleon (figura 4B). Cada cluster tenía diferente densidad génica, con patrones de expresión similares entre sí, pero diferentes del resto de los clusters, esto permitió revelar grupos de genes con respuestas similares en diferentes condiciones metabólicas y de alimentación, que podrían llegar a coexpresarse, regularse conjuntamente y participar en los mismos procesos biológicos.

Figura 4A

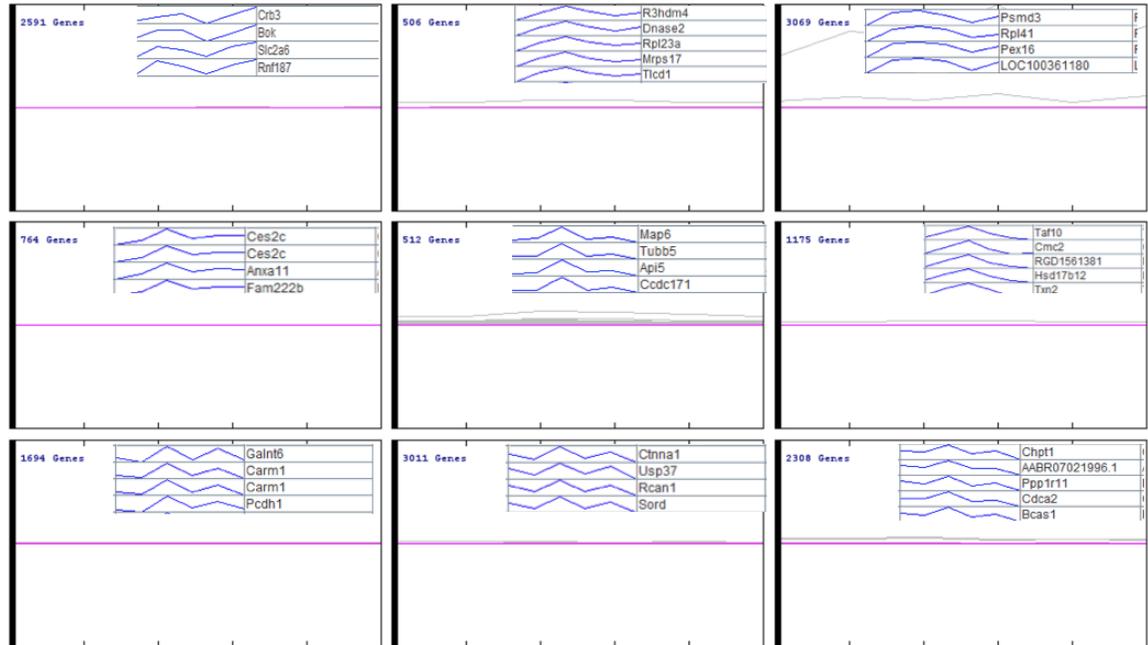


Figura 4B

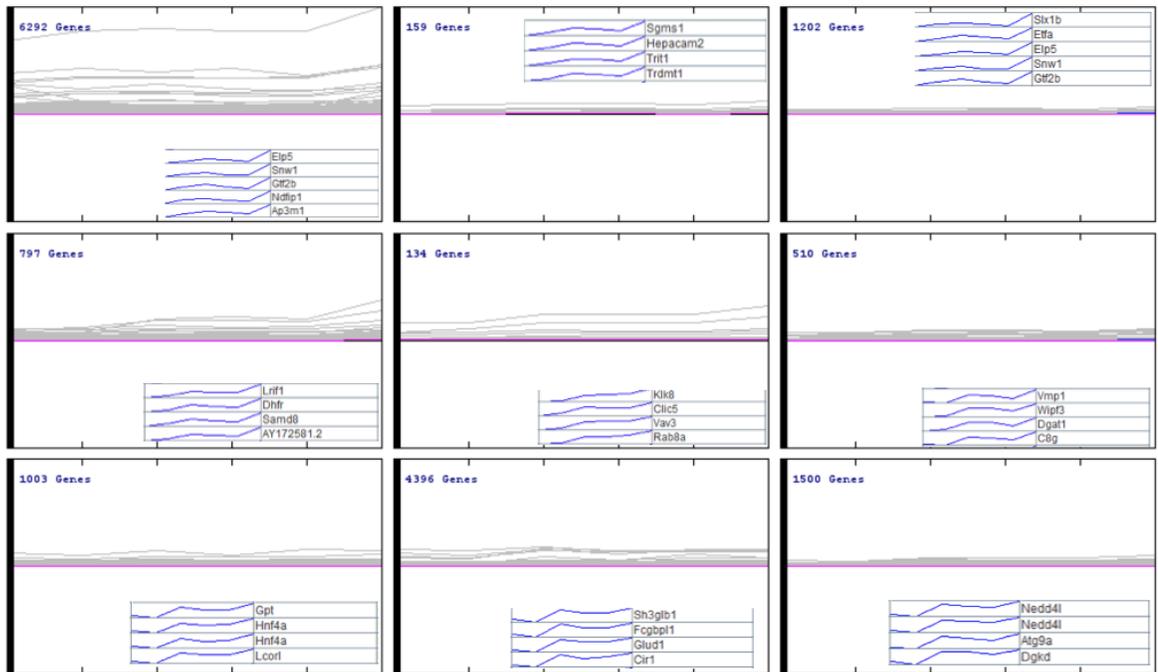


Figura 4 A y B: perfiles de expresión identificados por técnicas de agrupación en mucosa gástrica (figura 4A) y mucosa de íleon (figura 4B), representados en clusters compuestos por subgrupos de genes que comparten el mismo patrón de expresión entre ellos, pero diferente con respecto al conjunto de datos analizados. En cada recuadro se muestra el total de genes agrupados en cada cluster.

3.2.4 Análisis de Enriquecimiento Funcional

El análisis de enriquecimiento funcional permitió identificar grupos de genes con los términos ontológicos más significativamente representados ($p < 0.05$), tanto para mucosa gástrica como de íleon y cuyas funciones estuvieron asociadas con la síntesis y el metabolismo de ácidos grasos, las vías de señalización hormonal, la generación de precursores metabólicos y de energía, así como los procesos de oxidoreducción (Tablas 1 y 2).

Tabla 1: Términos Ontológicos más representativos de los clusters identificados en el total de genes diferencialmente expresados de mucosa gástrica.

CLUSTER	GO Biological Process Complete	upload_1 (2012)	upload_1 (expected)	upload_1 (over/under)	upload_1 (fold Enrichment)	upload_1 (P-value)
1	fatty acid beta-oxidation using acyl-CoA dehydrogenase (GO:0033539)	8	.85	+	9.46	3.19E-02
	fatty acid beta-oxidation (GO:0006635)	26	4.23	+	6.15	7.71E-09
	mitophagy (GO:0000422)	15	2.71	+	5.54	1.91E-03
2	ribosome assembly (GO:0042255)	10	1.15	+	8.69	3.86E-03
	translation (GO:0006412)	58	7.08	+	8.19	4.81E-30
	ribosomal large subunit biogenesis (GO:0042273)	10	1.23	+	8.14	6.94E-03
3	ATP synthesis coupled electron transport (GO:0042773)	26	5.38	+	4.83	1.36E-06
	oxidative phosphorylation (GO:0006119)	28	6.09	+	4.60	8.26E-07
	mitochondrial ATP synthesis coupled electron transport (GO:0042775)	22	4.87	+	4.52	1.14E-04
4	positive regulation of protein localization to Cajal body (GO:1904871)	5	.22	+	23.12	3.41E-02
	regulation of protein localization to Cajal body (GO:1904869)	5	.22	+	23.12	3.41E-02
	3'-UTR-mediated mRNA stabilization (GO:0070935)	6	.32	+	18.49	1.26E-02
5	cellular respiration (GO:0045333)	12	2.20	+	5.46	3.34E-02
	oxidation-reduction process (GO:0055114)	41	14.94	+	2.74	9.40E-05
	carbohydrate derivative metabolic process (GO:1901135)	37	14.36	+	2.58	2.44E-03
7	negative regulation of epidermal growth factor-activated receptor activity (GO:0007175)	7	.61	+	11.56	3.61E-02
	chaperone-mediated protein folding (GO:0061077)	17	3.25	+	5.23	6.48E-04
	nucleosome assembly (GO:0006334)	21	4.57	+	4.60	1.74E-04
8	histone lysine demethylation (GO:0070076)	13	2.45	+	5.31	1.94E-02
	histone demethylation (GO:0016577)	13	2.54	+	5.12	2.86E-02
	intracellular steroid hormone receptor signaling pathway (GO:0030518)	18	4.53	+	3.97	1.43E-02
9	protein localization to chromosome, centromeric region (GO:0071459)	9	1.12	+	8.05	2.86E-02
	antigen processing and presentation of peptide antigen via MHC class I (GO:0002474)	13	1.86	+	6.97	9.54E-04
	antigen processing and presentation of peptide antigen (GO:0048002)	20	3.28	+	6.10	3.71E-06

Análisis realizado empleando la herramienta de enriquecimiento funcional de Gene Ontology Consortium <http://www.geneontology.org/> empleando los parámetros por defecto

Tabla 2: Términos Ontológicos más representativos de los clusters identificados en el total de genes diferencialmente expresados de mucosa de íleon.

CLUSTER	GO biological process complete	Rattus norvegicus - REFLIST (23781)	upload_1 (4798)	upload_1 (expected)	upload_1 (over/under)	upload_1 (fold Enrichment)	upload_1 (P-value)
1	secondary alcohol biosynthetic process (GO:1902653)	31	21	6.25	+	3.36	2.81E-02
	sterol biosynthetic process (GO:0016126)	38	24	7.67	+	3.13	1.88E-02
	membrane docking (GO:0022406)	71	39	14.32	+	2.72	5.49E-04
2	single-organism metabolic process (GO:0044710)	2866	37	16.03	+	2.31	7.64E-03
	cellular metabolic process (GO:0044237)	6649	62	37.19	+	1.67	3.81E-02
3	internal peptidyl-lysine acetylation (GO:0018393)	106	17	4.22	+	4.03	2.19E-02
	peptidyl-lysine acetylation (GO:0018394)	108	17	4.30	+	3.96	2.80E-02
	endosomal transport (GO:0016197)	206	27	8.19	+	3.29	1.44E-03
4	mitochondrial electron transport, cytochrome c to oxygen (GO:0006123)	13	6	.39	+	15.37	3.62E-02
	antigen processing and presentation of peptide antigen via MHC class I (GO:0002474)	25	9	.75	+	11.99	1.07E-03
	tricarboxylic acid cycle (GO:0006099)	29	9	.87	+	10.34	3.65E-03
5	organic substance transport (GO:0071702)	1588	20	6.41	+	3.12	4.94E-02
	Unclassified (UNCLASSIFIED)	7542	13	30.45	-	.43	0.00E00
6	protein autophosphorylation (GO:0046777)	202	15	3.52	+	4.27	4.06E-02
	regulation of cell size (GO:0008361)	346	20	6.02	+	3.32	4.56E-02
	negative regulation of intracellular signal transduction (GO:1902532)	489	25	8.51	+	2.94	2.58E-02
7	ATP synthesis coupled electron transport (GO:0042773)	53	16	1.91	+	8.36	2.43E-06
	mitochondrial translation (GO:0032543)	33	9	1.19	+	7.55	4.68E-02
	oxidative phosphorylation (GO:0006119)	60	16	2.17	+	7.38	1.40E-05
8	protein localization to chromosome (GO:0034502)	51	24	6.98	+	3.44	3.68E-03
	DNA duplex unwinding (GO:0032508)	46	21	6.29	+	3.34	3.05E-02
	mitotic sister chromatid segregation (GO:0000070)	94	41	12.86	+	3.19	3.11E-06
9	dendrite morphogenesis (GO:0048813)	63	15	3.01	+	4.98	6.96E-03
	dendrite development (GO:0016358)	111	21	5.31	+	3.96	2.00E-03
	hormone-mediated signaling pathway (GO:0009755)	140	22	6.69	+	3.29	2.14E-02

Tomados en conjunto, estos análisis permitieron hacer una nueva selección preliminar de los genes ***Angptl4***, ***Igf1r***, ***SIK1***, ***Tm4sF5***, ***Fabp1*** y ***Igfbp3***, teniendo en cuenta los criterios de selección de genes previamente establecidos (perfiles de expresión génica diferencial de interés para los objetivos del estudio, función biológica relacionada con el balance energético, porcentaje de identidad $\geq 75\%$ en las secuencias de aminoácidos entre especies de *Rattus norvegicus* y *Homo sapiens* y cuya proteína codificada fuera secretable y medible en suero y tejido).

3.2.5 Genes Seleccionados y validados

A partir del análisis de mRNA-Seq y teniendo en cuenta los criterios de selección de genes, se procedió a validar en la literatura científica los genes seleccionados preliminarmente. Esto permitió identificar al gen ***Angptl4***, como un gen recientemente descrito en modelos de humanos y roedores, con función relevante en la homeostasis energética, cuya

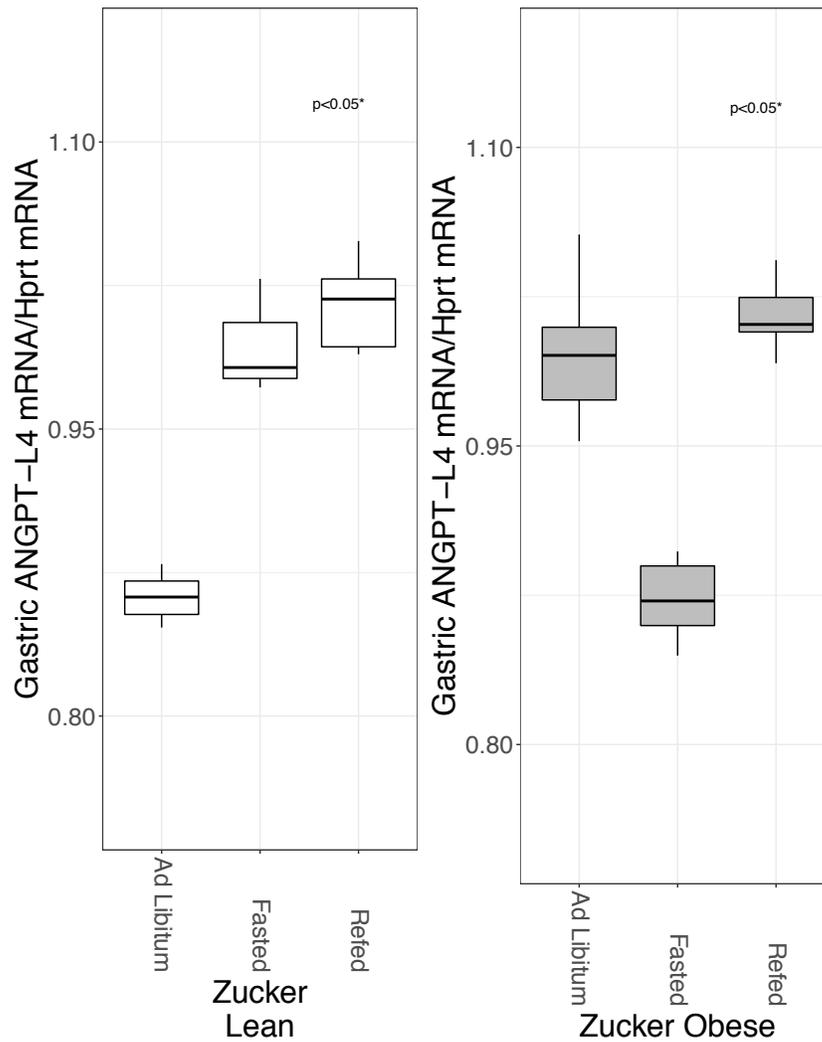
expresión cambia en respuesta a los diferentes estados de alimentación y cuya desregulación se ha sugerido que puede estar involucrada en la fisiopatología de la obesidad⁴⁸⁻⁵². Adicionalmente, son escasos los reportes de su expresión a nivel intestinal, lo cual permitiría contribuir a su conocimiento. Todo esto, aunado a una alta densidad transcripcional y el perfil de expresión génica diferencial en las diferentes condiciones del estudio, permitió su selección como “**gen candidato**” para continuar con los análisis.

3.3 Análisis de los perfiles de expresión por RT- PCR

La validación de la expresión de *Angptl4* por RT-PCR realizada de manera independiente para la mucosa gástrica y del íleon, en el modelo animal de rata Zucker magra y obesa sometidas a las mismas condiciones de alimentación, permitió evidenciar que los perfiles de expresión de *Angptl4* mostraron en general, un comportamiento muy semejante entre la mucosa gástrica y del íleon (figuras 5 A y B).

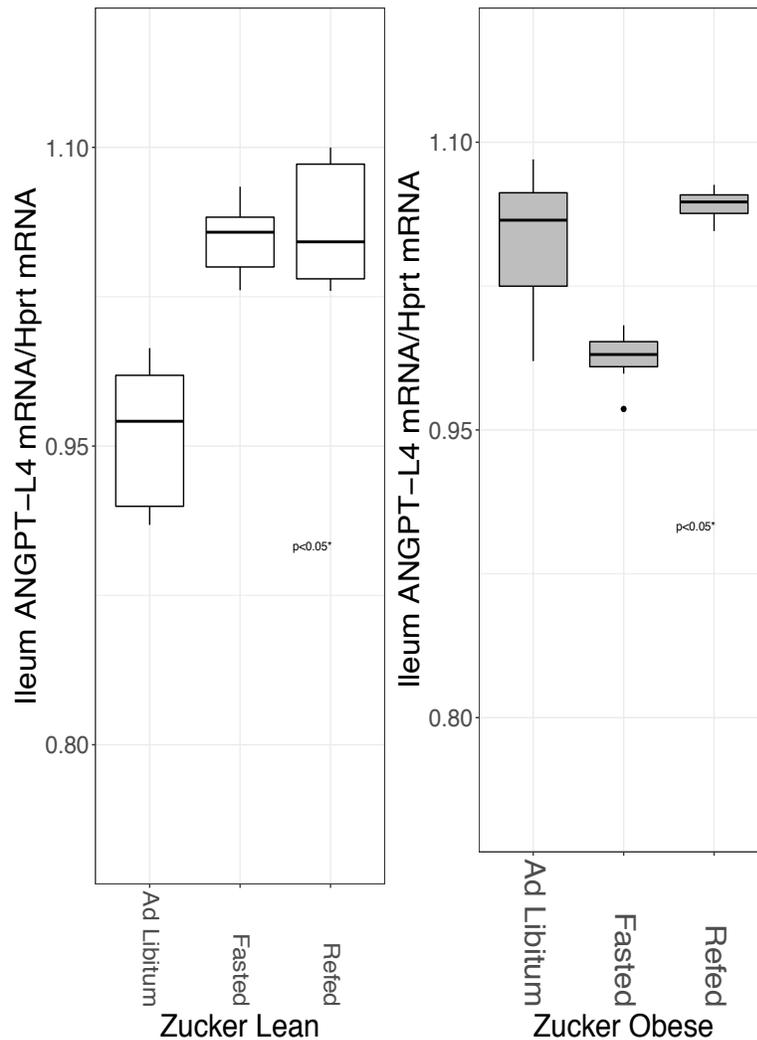
Los niveles de expresión de *Angptl4* cambiaron significativamente durante los diferentes estados de alimentación tanto para las ratas magras como obesas ($p < 0.05$). El patrón de expresión de *Angptl4* entre las ratas magras y obesas durante los diferentes estados de alimentación fue opuesto: mientras que en las ratas magras, los niveles de expresión de *Angptl4* aumentan durante el ayuno y permanecen bajos durante el estado *ad libitum*, en las ratas obesas, los niveles de expresión de *Angptl4* permanecen bajos durante el ayuno y no se regulan a la baja durante el estado de alimentación (figuras 5 A y B). Al comparar los niveles de expresión entre los dos grupos, los niveles de *Angptl4* en las ratas obesas son menores durante el ayuno y mayores durante el estado alimentado, en comparación con los niveles de expresión de *Angptl4* de las ratas magras ($p < 0.01$) (figuras 6A y B).

Figura 5A



Figuras 5A: Niveles de expresión ARNm de *Angptl4* en mucosa de íleon de ratas Zucker, según su condición metabólica. Diagramas de Bloxplots representan los niveles de expresión ARNm de *Angptl4* en mucosa de Íleon de las ratas Zucker, durante los diferentes estados de alimentación y discriminados por su condición metabólica magra (Lean) u obesa (Obese). El significado estadístico está indicado por $p < 0,05$.

Figura 5B



Figuras 5 B: Niveles de expresión ARNm de *Angptl4* en mucosa gástrica de ratas Zucker, según su condición metabólica. Diagramas de Bloxplots representan los niveles de expresión ARNm de *Angptl4* en mucosa gástrica de las ratas Zucker, durante los diferentes estados de alimentación y discriminados por su condición metabólica magra (Lean) u obesa (Obese). El significado estadístico está indicado por $p < 0,05$.

Figura 6A

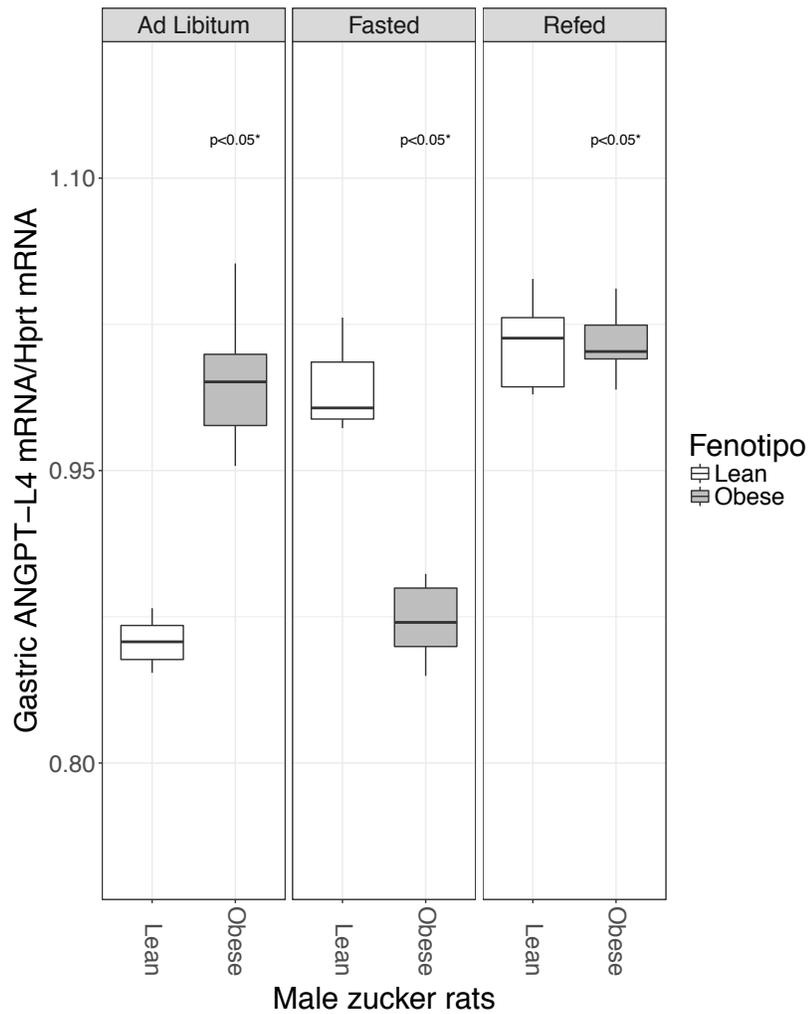


Figura 6A: Niveles de expresión ARNm de *Angptl4* en mucosa gástrica de ratas Zucker, según su condición experimental. Diagramas de Bloxplots representan los niveles de expresión ARNm de *Angptl4* en mucosa gástrica para las ratas Zucker magras (Lean) y obesas (Obese), discriminadas según los diferentes estados de alimentación, ad libitum, ayuno (Fasted) y realimentación (Refed). El significado estadístico está indicado por * $p < 0,05$ y *** $p < 0,01$.

Figura 6B

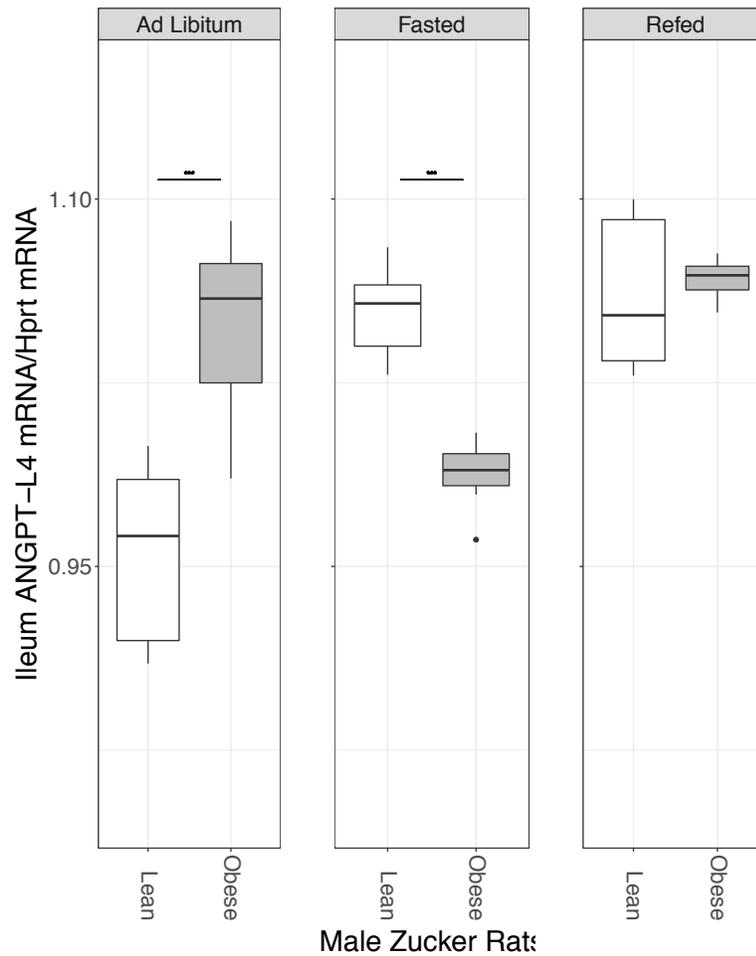
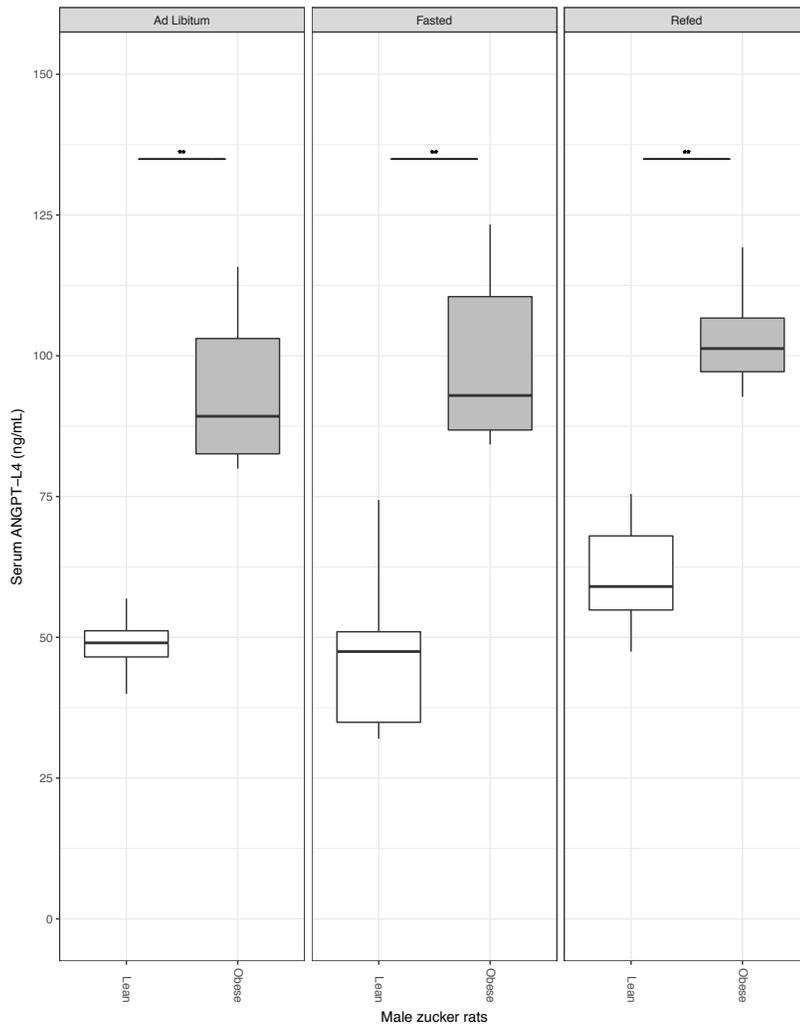


Figura 6B: Niveles de expresión ARNm de *Angptl4* en mucosa de íleon de ratas Zucker, según su condición experimental. Diagramas de Bloxplots representan los niveles de expresión ARNm de *Angptl4* en mucosa de íleon, para las ratas Zucker magras (Lean) y obesas (Obese) discriminadas según los diferentes estados de alimentación, ad libitum, ayuno (Fasted) y realimentación (Refed). El significado estadístico está indicado por * $p < 0,05$ y *** $p < 0,01$.

3.4 Análisis de los perfiles séricos de la proteína relacionada con Angiopoyetina 4

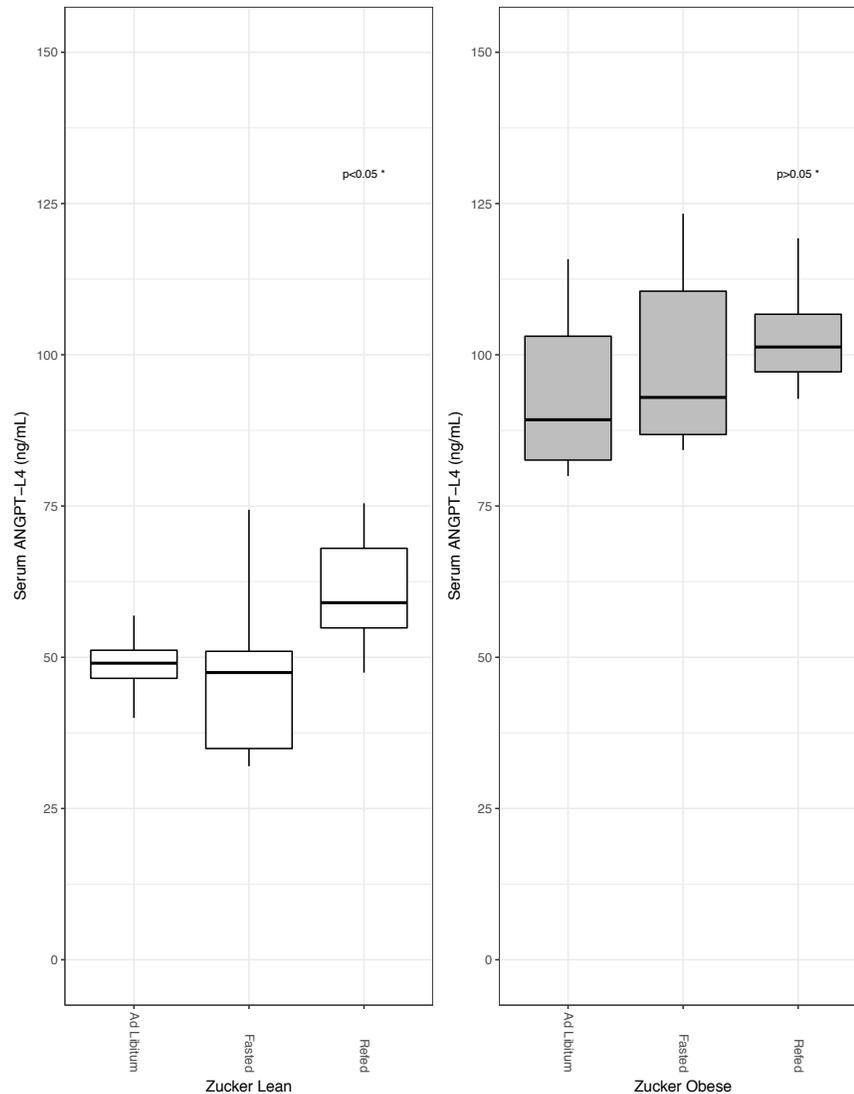
Al comparar los niveles séricos de la Proteína Relacionada con Angiopoyetina 4, que fueron cuantificados por metodología de ELISA en el suero de las ratas Zucker magras y obesas, se evidenciaron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos ($p < 0.01$). Los niveles séricos de la Proteína Relacionada con Angiopoyetina 4 en las ratas Zucker obesas, fueron significativamente mayores en comparación con las ratas Zucker magras durante todas las condiciones de alimentación: *ad Libitum*, ayuno y realimentación (Figura 7A). Al evaluar los niveles de la Proteína Relacionada con Angiopoyetina 4 durante los diferentes estados de alimentación y de manera independiente para cada uno de los grupos de ratas magras y obesas, se evidenció que los niveles séricos de la Proteína Relacionada con Angiopoyetina 4 en las ratas magras, mostraron cambios estadísticamente significativos durante los estados de alimentación *ad libitum* y ayuno ($p < 0,05$), mientras que en las ratas obesas, los niveles séricos de la Proteína Relacionada con Angiopoyetina 4, no variaron significativamente durante los diferentes estados de alimentación ($p > 0.05$), representados en la figura 7B.

Figura 7A



Figuras 7A: Niveles séricos de la Proteína Relacionada con Angiopoietina 4 en las ratas Zucker magras y obesas durante los diferentes estados de alimentación. Los diagramas de Boxplots representan los niveles séricos de la Proteína Relacionada con Angiopoietina 4 durante los diferentes estados de alimentación discriminados por su condición metabólica magra (Lean) u obesa (Obese). El significado estadístico está indicado por * $p < 0,05$ y *** $p < 0,001$.

Figura 7B



Figuras 7B: Niveles séricos de la Proteína Relacionada con Angiopoyetina 4 en las ratas Zucker magras y obesas durante los diferentes estados de alimentación. Los diagramas de Bloxplots representan los niveles séricos de la Proteína Relacionada con Angiopoyetina 4 discriminados por el modelo experimental de alimentación (*ad libitum*, ayuno (Fasted) y realimentación (Refed), de manera independiente para las ratas magras (Lean) y obesas (obese). El significado estadístico está indicado por * $p < 0,05$ y *** $p < 0,001$.

3.5 Análisis de Inmunoreactividad

El estudio de inmunohistoquímica para la Proteína Relacionada con Angiopoyetina 4 en las muestras de la mucosa gástrica, mucosa de íleon y el tejido adiposo de las ratas Zucker demostró: una reacción de inmunorreactividad moderada a intensa, muy específica y bien definida a nivel de la porción profunda de la mucosa fúngica del estómago, predominando en el citoplasma de las células principales. En la mucosa del íleon, la inmunoreactividad observada demostró la marcación citoplasmática de la Proteína Relacionada con Angiopoyetina 4 en todos los enterocitos, localizados tanto en la superficie de las vellosidades como en el fondo de las criptas. Adicionalmente, a nivel de la mucosa de íleon también se encontró inmunorreactividad para la Proteína Relacionada con Angiopoyetina 4 en algunas de las células del infiltrado inflamatorio, principalmente en el citoplasma de las células inflamatorias que están dentro del epitelio. Finalmente, en el tejido adiposo de las ratas Zucker evaluado, se evidenció una marcación focal por inmunoreactividad a nivel del endotelio de los vasos sanguíneos, en algunas membranas de los adipocitos y en algunas células del infiltrado inflamatorio como los mastocitos.

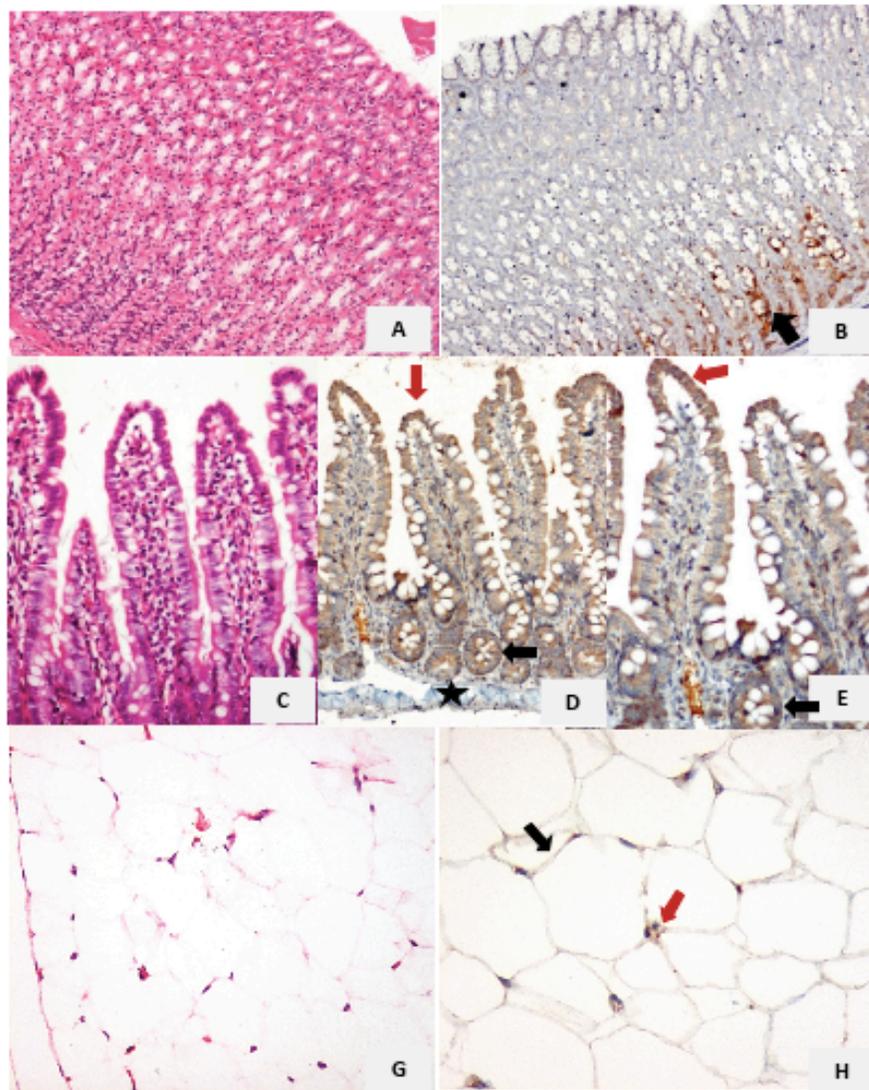


Figura 8: Inmunohistoquímica de la Proteína Relacionada a Angiopoyetina 4. Estómago de rata teñido con hematoxilina-eosina (A) e inmunoreactividad para *Angptl4* (B) observadas en 10X. Se observa marcación de la porción profunda de la mucosa fúndica donde predominan las células principales (flecha). Ileon de rata teñido con hematoxilina-eosina y observado en 20X (C) e inmunoreactividad para *Angptl4* en íleon observada en 10X (D) y 20X (E). Se aprecia marcación en enterocitos tanto de las vellosidades (flecha roja), como de las criptas (flecha negra); el estroma y la túnica muscular son negativos (asterisco). Tejido adiposo de rata teñido con hematoxilina-eosina y observado en 10X (G) e inmunoreactividad de *Angptl4* en tejido adiposo observado en 20X (H). Se aprecia marcación de membrana en adipocitos (flecha negra) y marcación en endotelio de vasos sanguíneos (flecha roja)

4. Discusión

Mediante el análisis del transcriptoma de la mucosa gástrica y del íleon, obtenido mediante metodología de mRNA-seq en el modelo animal de ratas Zucker, se determinaron los perfiles transcripcionales de dichos tejidos en diferentes condiciones metabólicas (magra y obesa) y en tres condiciones experimentales diferentes (*ad Libitum*, ayuno y realimentación). El estudio del transcriptoma permitió el reconocimiento de algunos genes expresados diferencialmente durante los diferentes estados metabólicos y condiciones de alimentación (*Igf1r*, *SIK1*, *Tm4sF5*, *Fabp1* y *Igfbp3*), los cuales no habían sido descritos previamente a nivel gastrointestinal y que podrían tener una función relevante en la regulación del balance energético corporal.

Adicionalmente, los criterios de selección utilizados en el presente estudio y la validación en la literatura, permitieron identificar el gen de *Angptl4* como el “gen candidato” para continuar con los análisis. Esta selección como “gen candidato” se vió favorecida por su alta densidad transcripcional y el perfil de expresión génica diferencial observado en las diferentes condiciones del estudio. Por otra parte, la descripción de *Angptl4* en humanos y en roedores es muy reciente, son escasos los reportes a nivel intestinal y se ha planteado que su función puede ser relevante en el mantenimiento de la homeostasis energética corporal, mientras su desregulación, puede contribuir en la fisiopatología de la obesidad ^{43,44,42}.

El gen de *Angptl4* ha sido identificado con diferentes nombres: Fasting-Induced Adipose Factor (FIAF), PPARgamma Angiopoietin-Related (PGAR) y Hepatic Fibrinogen/Angiopoietin-Related Protein (HFARP) ⁴⁵. En el genoma de la rata, *Angptl4* se localiza en el cromosoma 7p13, tiene siete exones y se expresa principalmente en el tejido adiposo y en un grado mucho menor en el hígado, músculo esquelético e intestino ⁴⁶. *Angptl4* codifica para una proteína secretable de 406 aminoácidos, la cual se puede dividir en distintas regiones: un péptido señal N-terminal, una región que contiene dos dominios de espiral, una región enlazadora y un gran dominio similar al fibrinógeno C-terminal ⁴³.

La Proteína Relacionada con Angiopoyetina 4, puede presentar diferentes modificaciones postraduccionales (glicosilación, oligomerización y escisión), las cuales se presentan de manera específica en los diferentes tejidos y generan diferentes isoformas, cada una con funciones biológicas particulares ⁴⁵. La Proteína Relacionada con Angiopoyetina 4 de longitud completa, es secretada por los adipocitos y las células endoteliales al torrente sanguíneo ⁴⁷. A nivel de la matriz extracelular o en el plasma, la Proteína Relacionada con Angiopoyetina 4, se somete a un procesamiento proteolítico por las Convertasas de Proteínas (Pcs) generando un fragmento N-terminal y un fragmento C-terminal, ambos con actividades biológicas diferentes, siendo la región N-terminal la responsable de su participación dentro del metabolismo de los lípidos, mientras que la región C-terminal está implicada en múltiples procesos biológicos no metabólicos como la diferenciación celular, la angiogénesis, la inflamación, entre otros ^{43,48-49}. La regulación del metabolismo lipídico por la Proteína Relacionada con Angiopoyetina 4, representa una función biológica relevante en el mantenimiento de la homeostasis energética corporal como se describe a continuación.

Los ácidos grasos constituyen una de las principales reservas energética del organismo, son transportados en la sangre en forma de triglicéridos (TGC), unidos a las lipoproteínas y almacenados en el tejido adiposo. Para que los ácidos grasos sean almacenados y utilizados como combustible energético, es necesario que la enzima Lipoproteína Lipasa (LPL) hidrolice a las lipoproteínas ricas en TGC, permitiendo la liberación de los ácidos grasos a la sangre. Estos ácidos grasos libres (FFA) son almacenados nuevamente en forma de TGC en el tejido adiposo para conservar los niveles de reserva energética del organismo, pero ante un incremento en la demanda metabólica o un balance energético negativo, el tejido adiposo libera la energía almacenada en forma de ácidos grasos mediante la lipólisis por acción de las enzimas lipasas, las cuales a su vez, están bajo control de otras hormonas. Estos ácidos grasos libres (FFA) en el plasma, son redireccionados y utilizados como combustible energético en diferentes tejidos periféricos. Un desajuste en la regulación de la captación y el uso de FFA por los tejidos subyacentes, puede conducir a la pérdida de la homeostasis energética con la sobrecarga de lípidos celulares, característico en la obesidad ⁵⁰.

Se ha demostrado ampliamente que la Proteína Relacionada con Angiopoyetina 4, inhibe la actividad de la enzima Lipoproteína Lipasa (LPL), bloqueando la hidrólisis de las lipoproteínas ricas en TGC y suprimiendo la liberación y absorción de los ácidos grasos no esterificados por los tejidos subyacentes. A través de este mecanismo, *Angptl4* es un componente central que regula el aclaramiento de los TGC plasmáticos, la absorción de los ácidos grasos en el tejido adiposo y favorece el redireccionamiento de los ácidos grasos libres en la sangre, hacia otros tejidos periféricos como el músculo cardíaco y el músculo esquelético, para ser utilizados como combustible energético en determinadas circunstancias ^{49, 51,52}.

La distribución adecuada de los ácidos grasos en los diferentes tejidos y durante los diferentes estados de alimentación (cuando las necesidades energéticas del organismo varían), constituye un evento importante para el metabolismo energético y la salud metabólica. Para esto, la participación y regulación en la expresión del gen *Angptl4* es fundamental. Los resultados del presente estudio muestran cambios significativos en los niveles de expresión de *Angptl4* en los diferentes estados de ayuno y alimentación, lo cual coincide con lo reportado previamente en la literatura, donde diferentes autores han identificado reguladores transcripcionales claves de *Angptl4* como los ácidos grasos, Receptores activados por proliferadores peroxisomales (PPARs) y algunas hormonas principalmente la insulina, los cuales cambian durante los diferentes estados de ayuno y alimentación modulando rápidamente la expresión de *ANGPTL4* ⁵³⁻⁵⁴. Se ha demostrado ampliamente que los ácidos grasos que se encuentran incrementados en el plasma durante el ayuno activan los factores de transcripción PPARs, los cuales se unen a la región promotora del gen *ANGPTL4* y estimulan su expresión, desempeñando un papel importante en la respuesta metabólica al ayuno ^{53,55,54}. Por el contrario, tras la alimentación se ha demostrado que los niveles séricos característicamente elevados de insulina, reprimen la expresión de *ANGPTL4* por mecanismos aún desconocidos ^{56,57}.

Por su parte, Cushing *et al.* y Kroupa *et al.*, demostraron en ensayos con ratas silvestres y mutantes para *Angptl4*, que la expresión de *ANGPTL4* se induce de manera temprana durante el ayuno en varios tejidos y con un nivel bajo de alimentos, es suficiente para disminuirse en estado de alimentación ⁵⁸. Estos autores demostraron la importancia de

aumentar la expresión de *Angptl4* durante el ayuno para inhibir la actividad de LPL, prevenir la hidrólisis de lipoproteínas ricas en TGC y restringir la absorción de ácidos grasos al tejido adiposo, quedando disponibles en sangre para ser redireccionados hacia otros tejidos como el músculo cardíaco y esquelético para ser utilizados como combustible energético^{57,68}. Adicionalmente, *Angptl4* ejerce un efecto lipolítico directo sobre el tejido adiposo, favoreciendo la liberación de ácidos grasos libres al plasma y promoviendo el uso de la grasa almacenada como combustible energético, disminuyendo la adiposidad^{33,43}. Sin embargo, la expresión de *Angptl4* debía disminuir durante la alimentación, para permitir la actividad de LPL y la absorción de los ácidos grasos, recuperando las reservas energéticas en el tejido adiposo, que habían sido utilizadas durante el ayuno, garantizando de esta manera, la adecuada compartimentalización de los lípidos corporales y evitando la lipotoxicidad en los diferentes tejidos^{56,59-60}.

Adicionalmente, una característica particular del gen *Angptl4* intestinal, es que su expresión está fuertemente regulada por la microbiota intestinal y sus metabolitos, los cuales varían ampliamente según el tipo de nutrientes y estado de alimentación⁶¹⁻⁶². Estudios *in vivo* e *in vitro* con modelos de roedores, mostraron que la expresión de *Angptl4* intestinal está significativamente reprimida en ratones con una microbiota intestinal normal en comparación con los roedores libres de gérmenes⁶¹. Sin embargo, la regulación de la expresión de *Angptl4* depende del tipo de comunidad microbiana intestinal y sus metabolitos microbianos específicos, algunos de los cuales disminuyen la actividad de factores potenciadores de transcripción específicos de *Angptl4*, disminuyendo su expresión y secreción por las células enteroendocrinas, con el fin de contribuir a la regulación sistémica del metabolismo y absorción de ácidos grasos por los diferentes tejidos; mientras que otras comunidades de microorganismos y los ácidos grasos microbianos de cadena corta y larga aumentan la expresión de *Angptl4* intestinal^{45,63,64}.

El mecanismo regulador de *Angptl4* durante la realimentación tras un periodo de ayuno ha sido menos descrito y no está totalmente esclarecido. Varios autores que han estudiado los efectos del ayuno y la realimentación sobre la enzima LPL en tejido adiposo de rata, han encontrado que la actividad de LPL estaba modulada por los cambios en el patrón de ingesta de alimentos^{32,65}. De esta manera, durante el ayuno a corto plazo, la actividad de

LPL disminuye y se restablece tras 4 horas de realimentación, mientras que cuando la realimentación se da tras un periodo de ayuno más largo (>36 horas), como en el caso del presente estudio, la actividad de LPL toma más tiempo en recuperarse, favoreciendo la persistencia de los ácidos grasos libres en el plasma que venían elevados desde el ayuno y que podrían favorecer la expresión de *Angptl4*³².

Esto se explica porque durante un periodo de ayuno a corto plazo, la actividad de LPL es inhibida a través de mecanismos postraduccionales que cambian su configuración de dímero activo a monómero inactivo, permitiendo que tras la realimentación, la LPL pueda recuperar su actividad rápidamente para manejar y almacenar una carga de lípidos ingerida, mientras que durante un periodo de ayuno prolongado, como el que se empleó en las ratas Zucker durante el presente estudio, los cambios de LPL se dieron a nivel transcripcional y de síntesis, por tanto, la actividad de la LPL no se puede recuperar hasta que los niveles de RNAm de LPL se restauren, lo cual ocurre muy lentamente^{32,66,67}.

Dado que *Angptl4* es la principal reguladora de la actividad de la LPL, los hallazgos antes mencionados se correlacionan con el comportamiento evidenciado en los niveles de expresión de *Angptl4* durante el ayuno y la realimentación en el modelo animal de rata Zucker, en el cual los niveles de *Angptl4* se deben incrementar durante el ayuno, para inhibir la actividad de LPL mediante el cambio de su configuración de dímero activo a monómero inactivo. Durante la realimentación, posterior a un periodo de ayuno prolongado, los niveles de *Angptl4* permanecen elevados, prolongando el estado de inactividad de la enzima LPL durante el estado de realimentación⁶⁶.

Por otra parte, es probable que la presencia de alimentos en el tracto gastrointestinal, que estimulan la liberación de la lipasa pancreática (LP) y aumentan la absorción de los ácidos grasos por el enterocito, deba ser regulada de alguna manera, por tanto, el aumento de los ácidos grasos provenientes de los lípidos orales, inducen la expresión intestinal de *Angptl4*, regulando la actividad de la LP y restringiendo la absorción de los ácidos grasos para proteger al enterocito contra la sobrecarga de los lípidos al regular la absorción intestinal de los lípidos orales⁶⁸. Un efecto protector de *Angptl4* a la lipotoxicidad, se ha

demostrado también en otros órganos y tejidos como el corazón y el músculo esquelético. Sin embargo, es necesario realizar más estudios para comprender mejor el papel de *Angptl4* en la realimentación ^{50,69}.

En los resultados del presente estudio, el perfil de los niveles de expresión de *Angptl4* en las ratas magras, refleja el comportamiento fisiológico de *Angptl4* demostrado en los diferentes estudios *in vivo* e *in vitro*, realizados tanto en humanos como en roedores. Durante el ayuno, los niveles de insulina son bajos, mientras los niveles plasmáticos de los ácidos grasos están elevados, activando los PPARs y estimulando la expresión de *ANGPTL4* en los diferentes tejidos ⁵⁸.

En el intestino la proteína codificada por el gen de *Angptl4*, en su mayoría es vertida a la sangre, inhibiendo la actividad de la LPL en los tejidos distantes principalmente en el tejido adiposo, con lo cual, se impide la absorción local de los ácidos grasos libres (FFA) y por otro lado, se estimula la lipólisis del tejido adiposo, favoreciendo la liberación de FFA al plasma ³³. Mediante estos dos mecanismos, fisiológicamente se garantiza la provisión adecuada de los ácidos grasos a los músculos cardíaco y esquelético durante el ayuno y se promueve el uso de la grasa almacenada como combustible energético ^{43,46,49}. Por otra parte, durante el estado de alimentación, los niveles de insulina se incrementan y los niveles de los ácidos grasos disminuyen por el efecto antilipolítico característico de la insulina sobre el tejido adiposo, disminuyendo la liberación de los ácidos grasos del tejido adiposo a la sangre y prevaleciendo el efecto represor de la insulina sobre la expresión de *Angptl4*; con lo cual se favorece el incremento de la actividad de la LPL, la hidrólisis de los TGC y la absorción de los ácidos grasos al tejido adiposo, para reponer las reservas energéticas utilizadas durante el ayuno y favorecer una adecuada compartimentalización de la grasa corporal, evitando su acumulación en los diferentes tejidos y la lipotoxicidad ^{33, 43,59}.

Por otra parte, durante el estado *ad libitum*, se favorece la colonización de la microbiota intestinal, inhibiendo aún más la expresión y actividad de *Angptl4* en el lumen intestinal, permitiendo la actividad de la lipasa pancreática y la absorción de los lípidos orales, los

cuales son transportados al plasma, donde la actividad de la LPL esta desinhibida y contribuye a la absorción de los ácidos grasos al tejido adiposo ^{68,70}.

En este sentido, el perfil de los niveles de expresión de *Angptl4* observado en las ratas obesas en el presente estudio, también se correlaciona con lo reportado previamente en la literatura, donde diferentes autores plantean que el “encendido y apagado” del gen *Angptl4* esta alterado en la obesidad y por tanto, la respuesta del sistema de LPL a los cambios de ayuno y alimentación, se encuentra atenuada en roedores y sujetos obesos ^{60,71}. Kroupa *et al.* demostraron que la expresión de *Angptl4* en las ratas magras, era mayor durante el ayuno y con menor actividad de LPL que en el estado de alimentación; mientras que en las ratas obesas, no hubo cambios estadísticamente significativos y con niveles de glicemia e insulina mayores en comparación con las ratas magras, sugiriendo un estado de resistencia a la insulina en las ratas obesas, que podría explicar la desregulación de la expresión de *Angptl4* ^{56,59}.

Tomados en conjunto, estos hallazgos han descrito que durante el ayuno en los organismos obesos (probablemente por los niveles típicamente elevados de algunas hormonas como los glucocorticoides), la expresión de *Angptl4* se encuentra disminuida, lo cual favorece que la actividad de LPL permanezca activa durante el ayuno, permitiendo la hidrólisis de los TGC y la absorción de los ácidos grasos al tejido adiposo, promoviendo la adiposidad ⁶⁰. La hipertrofia e hiperplasia secundaria de los adipocitos, conlleva a un estado proinflamatorio que altera la vía de señalización de la insulina, promoviendo un estado de resistencia a la insulina. Este estado insulino resistente genera que durante la alimentación en las ratas obesas, la insulina no pueda regular a la baja la expresión de *Angptl4*, permaneciendo elevada y manteniendo inhibida la actividad de la LPL durante la alimentación, alterando con ello la adecuada compartimentalización de la grasa ^{33,44, 59,72}.

Mientras que en los organismos magros hay un equilibrio entre las diferentes vías de regulación de la lipólisis, absorción y distribución de los ácidos grasos, en los organismos obesos las vías de señalización endocrina (principalmente la vía de señalización de insulina) y otras vías de señalización inflamatorias y celulares están alteradas, por lo cual

se presenta una desregulación en la lipólisis y se altera la capacidad de almacenar adecuadamente los lípidos por los diferentes tejidos ^{33,44, 59,72}.

De otro lado, recientemente se demostró que la microbiota intestinal en humanos y roedores obesos se encuentra alterada y por tanto, no se disminuye la actividad de los factores potenciadores de transcripción específicos de *Angptl4* ^{64,73}, favoreciéndose la expresión intestinal de *Angptl4* y su secreción por las células enteroendocrinas durante la alimentación, lo que podría contribuir al deterioro en la respuesta del sistema de LPL durante la alimentación, ya que no se regula la lipólisis y se promueve el exceso de los ácidos grasos en plasma que impide el apagado de *Angptl4* y favorece la resistencia a la insulina ⁶².

El análisis de los niveles séricos de la Proteína Asociada a Angiopoyetina 4 en el modelo animal, mostro diferencias significativas entre las ratas magras y obesas, con niveles séricos incrementados de la proteína en las ratas obesas, lo cual puede ser explicado por los niveles elevados de los ácidos grasos y el estado de resistencia a la insulina característicos en la obesidad. Diferentes autores han demostrado que la expresión de *Angptl4* está principalmente bajo control transcripcional sensible por los ácidos grasos y se podría esperar que en los organismos obesos, con niveles característicamente elevados de los ácidos grasos, *Angptl4* se sobreexpresara en los diferentes tejidos y su producto proteico secretable al torrente sanguíneo, tuviera mayores niveles séricos en las ratas obesas ^{50,74,75}.

Por otra parte, el estado de resistencia a la insulina característico en organismos obesos, impide que la insulina inhiba la lipólisis del tejido adiposo, con generación excesiva de ácidos grasos hacia el torrente sanguíneo y por tanto prima el efecto estimulador de la expresión de *Angptl4* por los ácidos grasos, sobre el efecto represor de la insulina sobre la expresión de *Angptl4*.

Adicionalmente, los niveles de expresión de *Angptl4* y los niveles séricos de la Proteína Asociada a Angiopoyetina 4, pueden estar incrementados en los organismos obesos al estar relacionados con la fisiopatología de la obesidad por otros mecanismos no metabólicos, por ejemplo, se ha demostrado que *Angptl4* es un factor proangiogénico necesario para permitir la expansión del tejido adiposo; así mismo, se ha documentado la expresión incrementada de *Angptl4* durante la diferenciación adipositaria en estudios *in vitro* ^{55,76,77,78}.

Los niveles séricos de la Proteína Asociada a Angiopoyetina 4 para las ratas magras, variaron significativamente entre los diferentes estados de alimentación, ya que fisiológicamente (como es lo esperado en las ratas magras), *Angptl4* se regula según los diferentes estados nutricionales para asegurar una distribución adecuada de ácidos grasos en los tejidos, evitando su acumulación; mientras que los niveles séricos de la Proteína Asociada a Angiopoyetina 4 en las ratas obesas, no variaron significativamente entre los diferentes estados de alimentación, posiblemente por que en las ratas obesas, la respuesta de *Angptl4* a los cambios de ayuno/alimentación se encuentra atenuada ^{42,59}. Adicionalmente, los niveles séricos de la Proteína Asociada a Angiopoyetina 4 en los organismos obesos, pueden estar influenciados por los otros mecanismos no metabólicos que involucran a *Angptl4* con la fisiopatología de la obesidad.

Sin embargo, el comportamiento de los niveles séricos de la Proteína Asociada a Angiopoyetina 4 en los diferentes estados de alimentación tanto para las ratas magras como obesas, no se correlacionó con los perfiles de expresión de *Angptl4*, lo cual está en consonancia con muchos estudios donde con frecuencia no se logra establecer dicha correlación. Por ejemplo, Kroupa et al. encontraron que los niveles séricos de la Proteína Asociada a Angiopoyetina 4 son relativamente estables y cambian lentamente tras las variaciones en los niveles de expresión de *Angptl4*, lo cual se explica por qué a pesar de ser una proteína secretable, una cantidad significativa puede quedar retenida en la matriz extracelular unida a los glicosaminoglicanos ^{44,59}. Adicionalmente, la Proteína Asociada a Angiopoyetina 4 puede ser diferencialmente procesada en los diferentes tejidos o incluso en el mismo tejido, dependiendo de la expresión diferencial de las Proteínas Convertasas,

por tanto, es posible detectar en la sangre tanto fragmentos N-terminal que cumplen la función metabólica, como fragmentos C-terminal o la proteína completa ^{43,66}. Así mismo, la expresión ubicua de *Angptl4* y el carácter multifuncional de su proteína, hace que los niveles séricos de la Proteína Asociada a Angiopoyetina 4, puedan estar influenciados por muchos otros estímulos diferentes al estado metabólico y de alimentación ^{43,45}.

Por otra parte, actualmente se sabe poco sobre el sitio y la regulación de la producción de *Angptl4* en el intestino; sin embargo, los resultados de los análisis de inmunohistoquímica realizados en los tejidos de las ratas Zucker, estuvieron en consonancia con lo reportado hasta el momento en la literatura. En el presente estudio se demostró la inmunolocalización de *Angptl4* en la mucosa de ileon, con expresión citoplasmática en todos los enterocitos y a lo largo del eje cripta-vellosidad. Dichos hallazgos son similares a lo reportado en los ensayos de Alex *et al.*, quienes identificaron la presencia de células positivas para *Angptl4* a lo largo del intestino humano (principalmente en el ileon) y con características de células enteroendocrinas. Las células con inmunorreactividad para *Angptl4*, acumulan la Proteína Asociada a Angiopoyetina 4 en gránulos citoplasmáticos y puede ser liberada a nivel local, inhibiendo la actividad de la lipasa pancreática, o a nivel del torrente sanguíneo actuando como factor endocrino para inhibir la LPL en los tejidos distantes, ya que la LPL se expresa muy débilmente en el intestino ^{68,58,79}.

Como ha sido previamente reportado, en el presente estudio se observó la inmunolocalización de *Angptl4* en la membrana de los adipocitos y en el endotelio vascular del tejido adiposo donde *Angptl4* ejerce principalmente su función metabólica. En este estudio se describe por primera vez la inmunolocalización de *Angptl4* en la mucosa gástrica de la rata Zucker, con marcación de la porción profunda de la mucosa fúndica, donde predominan las células principales.

Capítulo 2

1. Introducción segundo capítulo: Estudio traslacional de rata a humanos

La obesidad en humanos es de naturaleza multifactorial, con la participación de factores genéticos, epigenéticos, metabólicos, del comportamiento y ambientales que confluyen en una alteración en el balance energético⁸⁰. Esta compleja etiología, junto con las limitaciones metodológicas para los estudios *in vivo* en humanos, hacen que la investigación de la obesidad en humanos sea un reto ^{12,81,82}.

En este sentido, el estudio de la obesidad ha sido abordado desde diferentes puntos de vista, tales como la investigación básica de los mecanismos de control del balance energético, la participación de la microbiota intestinal, los estudios de expresión diferencial en diferentes tejidos relacionados con el control del peso corporal y estudios genéticos y epigenéticos mediante aproximaciones traslacionales ^{83 9,84-85}.

La investigación traslacional es definida como el diseño metodológico que permite trasladar los descubrimientos científicos que surgen del laboratorio, en aplicaciones clínicas que facilitan la caracterización de los procesos de enfermedad, así como la generación de nuevas hipótesis basadas en las observaciones obtenidas en modelos de animales y humanos ⁸⁶. Durante la última década, se ha definido que la investigación traslacional es una prioridad en salud y busca que el conocimiento científico obtenido, sea útil para la población mediante la generación de medidas más efectivas para su manejo

El modelo animal de rata Zucker magra y obesa es un modelo ideal para el estudio de las enfermedades metabólicas y el abordaje traslacional a humanos por las siguientes razones:

- Disponibilidad de cepas genéticamente identificadas y definidas para el desarrollo de obesidad y de grupos control, lo que permite contribuir a la comprensión de los mecanismos fisiológicos y moleculares que mantienen el equilibrio energético y cuya alteración puede contribuir al desarrollo de la fisiopatología de la obesidad^{17,20, 89,90}.
- Disponibilidad de la secuencia completa de su genoma y una correspondencia del 90% en la secuencia de aminoácidos de su genoma con el genoma humano^{85,91, 92}. Adicionalmente, se ha determinado que la mayor parte de los genes humanos conocidos y asociados a enfermedades complejas, tienen su equivalente en el genoma de la rata^{89, 91}.
- Las ratas Zucker obesas, presentan un fenotipo muy similar al que caracteriza la obesidad y el síndrome metabólico humano: inicia en edades tempranas, cursa con hiperfagia, disminución del gasto energético y depósitos de lípidos principalmente en el tejido adiposo blanco. Al igual que en los humanos, la ausencia en la señal de Leptina causa obesidad, produce una desregulación de los péptidos orexigénicos y mayores niveles circulantes de Leptina que en sus controles magros. Como en el síndrome metabólico en humanos, el perfil lipídico y de lipoproteínas en plasma de estos animales también se encuentra alterado²². Existen claras diferencias entre los machos y las hembras obesas. Al igual que en los humanos, las ratas Zucker obesas desarrollan hiperplasia e hipertrofia de los adipocitos principalmente en el tejido adiposo subcutáneo y presentan alteraciones endocrinas, como la hiperleptinemia, hiperinsulinemia, resistencia a la insulina e intolerancia a la glucosa^{21,22,78}.

- Existe la posibilidad de acceder a algunos tejidos diana en las rata Zucker, a los que no se puede acceder fácilmente en los seres humanos para los estudios genómicos y de la regulación funcional de la enfermedad²⁰.
- La fisiología de la rata es mejor entendida y similar a la de los humanos ^{93, 92}.
- Facilidad para controlar sus factores de comportamiento alimentario y ambientales.

Recientemente se ha tenido una cantidad importante de información sobre los mecanismos de control del apetito en modelo animal de rata, donde se han descrito más de 30 hormonas, neuropéptidos y neurotransmisores. Estudios traslacionales permitieron la identificación en humano de estos mismos factores, lo cual ha favorecido el avance en los estudios farmacológicos para el tratamiento de la obesidad ^{10,94,95}.

Se ha demostrado que los péptidos sintetizados en el tracto gastrointestinal como GLP-1 (péptido-1 similar a glucagón), PYY (péptido tirosina-tirosina), CCK (colecistokinina) y Ghrelina, así como la hormona Leptina sintetizada en el tejido adiposo, modulan el apetito tanto en humano como en animales y su desregulación junto con la resistencia central a la hormona leptina se han relacionado con la obesidad ^{94,95}.

Al igual que en las ratas, en el humano, dichos péptidos son liberados por las células enteroendocrinas en respuesta a la ingesta de alimentos en diferentes regiones del tracto gastrointestinal incluyendo el estómago, el intestino delgado, el colon y el páncreas ⁹⁶. Estas células liberan moléculas que actúan en forma autocrina, paracrina y endocrina o sobre neuronas entéricas y extraentéricas, activando señales vagales nerviosas aferentes que inervan regiones del sistema nervioso central, involucrado en el control de la ingesta de alimentos ^{94,95,97,98}.

Las células entero–endocrinas, contribuyen también con el metabolismo postprandial de la glucosa ⁹⁹. Algunos péptidos derivados del tracto gastrointestinal luego de la ingesta, aumentan la descarga de insulina por parte de la célula beta, en respuesta a las

concentraciones de glucosa¹⁰⁰. A estos factores se les han denominado incretinas y son determinantes de la homeóstasis del metabolismo energético^{101,102}.

Se ha demostrado que la obesidad y la diabetes mellitus tipo 2, son patologías caracterizadas por la resistencia a la insulina y una disminución de la secreción de incretinas, con alteración en la respuesta incretínica ante la ingesta de glucosa y la subsecuente disminución en la liberación de insulina, predominando las vías orexigénicas sobre las anorexigénicas^{102,103}.

Con base en lo anterior y teniendo en cuenta que mas de la mitad de los pacientes obesos desarrollan diabetes mellitus tipo II, en el abordaje traslacional a humanos durante el presente estudio, se tuvo en cuenta la expresión diferencial del transcriptoma de la mucosa gástrica y del íleon, dos tejidos que podrían contribuir al control incretínico del organismo, así como la evaluación de los niveles séricos de la proteína de interés identificada en el modelo animal, los niveles de glucosa e insulina y otros parametros relacionados con la obesidad, durante una prueba de tolerancia oral a la glucosa (PTOG), buscando simular la respuesta fisiologica del organismo ante la ingesta de alimentos y la eventual participación del eje entero-insular.

Por otro lado, se ha demostrado una estrecha relación simbiótica entre el huésped y la microbiota intestinal para el apropiado funcionamiento del metabolismo y el control del peso corporal, describiéndose alteraciones en la microbiota de pacientes obesos¹⁰⁴.

Finalmente, el abordaje traslacional a partir del modelo animal de rata Zucker magra y obesa al humano, permite mejorar la comprensión de los mecanismos moleculares relacionados con el balance energético y el desarrollo de la obesidad, mediante los cuales el tracto gastrointestinal es fundamental como órgano endocrino que participa activamente en la regulación del peso corporal y la expresión de los genes identificados a este nivel, podrían contribuir a la identificación de nuevos factores involucrados en el control de la ingesta y la determinación de factores incretínicos y anti – incretínicos que podrían ser empleados para la implementación de biomarcadores y el tratamiento.

2. Materiales y Métodos

Como se mencionó anteriormente, el diseño general del presente estudio se basó en dos componentes metodológicos: el primer componente (presentado en el capítulo 1), permitió identificar en el modelo animal de ratas Zucker empleado, al gen de *Angptl4* como un gen relevante involucrado en la homeostasis energética a nivel gastrointestinal y seleccionarlo como el “gen candidato” para continuar con los análisis. El segundo componente se expone a continuación y consiste en evaluar si los hallazgos encontrados en el modelo animal podrían ser relevantes también en la obesidad humana, para lo cual se emplea un enfoque traslacional a humanos de los resultados obtenidos en el modelo animal, mediante la evaluación de los perfiles séricos de la proteína codificada por el gen de *Angptl4* (Proteína Asociada a Angiopoyetina 4), en una cohorte de hombres jóvenes sanos normopeso y obesos no diabéticos, correlacionando dichos perfiles con parámetros clínicos, bioquímicos y antropométricos relacionados con la obesidad y evaluados en la cohorte de humanos.

2.1 Consideraciones éticas

El protocolo del presente estudio fue aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia (acta de evaluación número 022-278-16 del 12 de diciembre del 2016). Para el estudio en humanos, se tuvieron en cuenta las normas legales vigentes con respecto a los lineamientos éticos para la investigación en seres humanos en Colombia (Resolución No. 008430 de 1993 del Ministerio de Salud y en la Ley 84 de 1989)¹⁰⁵.

2.2 Población y grupos de estudio

Para el componente de estudio en humanos, se invitó a participar a un grupo de hombres jóvenes sanos, principalmente estudiantes de la Universidad Nacional de Colombia. La

convocatoria se realizó a través de publicidad verbal y por escrito. Se incluyeron a 40 hombres jóvenes sanos normopeso, con edad promedio de 23.4 (21.0-26.8) años, e índice de masa corporal (IMC) promedio de 22,21 (+/- 1,85) kg/m² y 40 hombres jóvenes obesos no diabéticos con edad promedio de 24 (21.0-26.8) años, e IMC promedio de 37.62 (+/- 4,61) kg/m².

2.3 Criterios de exclusión

Se excluyeron los participantes que tuvieran un diagnóstico establecido de diabetes mellitus (cualquiera que sea su tipo), presentaran enfermedades cardíacas, hepáticas, renales, gastrointestinales, tiroideas u otra enfermedad crónica o infecciosa; tuvieran historia de hiperlipidemia primaria o estuvieran tomando medicamentos que pudieran afectar la tolerancia a la glucosa o el perfil lipídico, tales como beta bloqueadores, diuréticos tiazídicos, metformina, levotiroxina o corticoides durante los últimos 12 meses, o que tuvieran alguna prescripción médica que alterara el metabolismo energético, o que se encuentren sometidos a cualquier tipo de dieta o hubieran sido llevados a cirugía de bypass gástrico o cualquier otra cirugía bariátrica.

2.4 Valoración clínica, bioquímica y antropométrica

Cada uno de los participantes contó con la valoración médica y de antropometría realizada por nutricionista. A cada participante de la cohorte de jóvenes sanos normopeso y de jóvenes obesos no diabéticos, se le indagó sobre los hábitos de actividad física, sintomatología previa relacionada con estados de hiperglicemia, antecedentes patológicos, quirúrgicos y farmacológicos, hábito de tabaquismo y consumo de alcohol, antecedentes familiares en primer y segundo grado de consanguinidad para obesidad, diabetes, enfermedad coronaria, enfermedad cerebrovascular, hipertensión arterial, dislipidemia y neoplasias. Se midieron las variables antropométricas de forma estandarizada (talla, peso, índice de masa corporal (IMC). La composición corporal se determinó mediante absorciometría de rayos X de doble energía (DXA) (GE Lunar Prodigy Advance). La obesidad se definió como un IMC > 30 kg/m², de acuerdo con los criterios de clasificación

de la Organización Mundial de la Salud de 2017 ². Adicionalmente, se determinaron las mediciones de frecuencia cardiaca, presión arterial sistólica, diastólica y media en cada uno de los participantes de las diferentes cohortes según protocolo establecido.

Para las diferentes determinaciones bioquímicas, se tomaron muestras de sangre mediante venopunción en la región antecubital del brazo, de acuerdo al Manual para Obtención y Envío de Muestras para Análisis de Eventos de Interés en Salud Pública, usando el sistema venoject ¹⁰⁶. En cada uno de los participantes se realizó una prueba de tolerancia oral a la glucosa (PTOG), empleando los criterios del Comité de Expertos Internacionales. Dicha prueba se llevó a cabo a las 07:00 am después de un ayuno nocturno de 10 horas. Se colocó un catéter en la vena antecubital de uno de los antebrazos y se tomó una muestra inicial de sangre venosa (3 - 4 cc) en un tubo seco. Además de la muestra tomada en ayuno, se tomaron otras muestras de sangre venosa a los 30, 60, 90 y 120 minutos después de una carga oral de glucosa de 75 g disuelta en 300 mL de agua ¹⁰⁷. Los sueros fueron centrifugados a 3000Xg por 5 minutos y se almacenaron a -80°C hasta su análisis bioquímico u hormonal.

Se determinaron los niveles de glucosa e insulina en las muestras de suero obtenidas de los sujetos participantes, durante cada tiempo de la PTOG. Los niveles séricos de insulina se determinaron mediante inmunoensayo de electroquimioluminiscencia (Elecsys, Roche). La sensibilidad a la insulina se estimó utilizando el Modelo Homeostático de Evaluación de Resistencia a la Insulina (HOMA IR) = $\text{insulina } (\mu\text{U/mL}) \times \text{glucosa en ayunas (mmol/L)} / 22,5$], como lo describe el grupo de Matthews y Colaboradores ¹⁰⁸.

A partir de las muestras de sangre tomadas en el estado de ayuno, se determinó también el perfil lipídico de los participantes utilizando un Kit comercial proporcionado por Spinreact, que incluye la medición de triglicéridos, el colesterol de muy baja densidad (cVLDL), el colesterol de baja densidad (c-LDL), el colesterol de alta densidad (c-HDL) y el colesterol total.

Adicionalmente, se determinaron los niveles séricos de la Proteína C Reactiva Ultrasensible (PCR) y los niveles séricos de Leptina utilizando un kit de ELISA humano comercialmente disponible de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Número de Catálogo KAC2281-Thermo Fisher Scientific Inc), con una sensibilidad al ensayo <3,5 pg/ml y coeficientes de variación (CV) intra e inter ensayo de <3,9% y <5,3% respectivamente.

Así mismo, se determinaron los niveles séricos de Adiponectina en el suero humano, utilizando un KIT de ELISA humano comercialmente disponible de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Número de Catálogo KHP0041 - Thermo Fisher Scientific Inc), con sensibilidad al ensayo de 100 pg/mL y con coeficientes de variación (CV) intra e inter ensayo <3,8% y <5,5%, respectivamente. Todas las muestras se analizaron por duplicado y se informó el valor medio de las dos mediciones.

2.5 Análisis sérico de la Proteína ANGPT-L4

La selección de la proteína de estudio en el modelo humano, se realizó a partir del análisis del transcriptoma en el modelo animal de ratas Zucker, descrito previamente en el capítulo 1. Este análisis permitió identificar al gen *Angptl4* como el “gen candidato” para continuar con los estudios y a la Proteína Asociada a Angiopoyetina 4, como la “proteína de estudio”, cuyo patrón sérico fue estudiado en el modelo animal de rata Zucker y fue evaluado en la cohorte de humanos.

El estudio de los perfiles séricos de la Proteína Asociada a Angiopoyetina 4 en humanos, se realizó mediante metodología de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA). Para estos ensayos se utilizaron muestras de suero provenientes de los grupos de jóvenes sanos normopeso y de obesos no diabéticos, tomadas durante la prueba de tolerancia oral a la glucosa (PTOG) y de acuerdo a la metodología descrita previamente. Para estos análisis se utilizaron kits de ELISA comercialmente disponibles y específicos para la especie de humanos (Human Angiopoyetin like 4 ELISA kit- (Thermo Fisher Scientific - Número de catálogo: EHANGPTL4)), la sensibilidad de este ensayo fue de 20 pg/ml, los

coeficientes de variación (CV) intra e inter ensayo fueron de $< 10\%$ y $< 12\%$ respectivamente. Las muestras de suero se analizaron por duplicado y se informó el valor medio de las dos mediciones y la desviación estándar de cada determinación. Los resultados se expresaron de acuerdo a la curva estándar en pg/mL.

Se evaluó la correlación de los niveles séricos de la Proteína Asociada con Angiopoyetina 4 (obtenidos durante el ayuno y los diferentes tiempos de la PTOG), con los parámetros clínicos, bioquímicos y antropométricos relacionados con la obesidad y evaluados en la cohorte de humanos. El estudio de correlación se realizó usando diferentes métodos estadísticos de acuerdo con la distribución de los datos y que se describen más adelante.

2.6 Estudio de Inmunoreactividad en tejidos humanos

En el abordaje traslacional a humanos se incluyó el análisis de inmunoreactividad para la proteína de estudio codificada por el gen *ANGPTL4*, en tejidos humanos correspondientes a la mucosa gástrica, la mucosa de íleon y el tejido adiposo, los cuales fueron obtenidos y analizados por el servicio de patología de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia. En la reacción se usó el anticuerpo policlonal IgG de ratón Anti-Angiopoyetina-like 4 antibody (ab115798), el cual presenta inmunoreactividad para *ANGPTL4* en tejidos tanto de rata, como de humano⁴¹. Los tejidos se encontraban fijados en bloques de formalina tamponada neutra al 10% y embebidos en parafina. Todos los ensayos se realizaron en el mismo corrido y se utilizaron como controles internos las células dentro del mismo tejido que no mostraban marcación al anticuerpo.

3. Análisis Estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron con R Statistical Software (versión 2.2.0). Se usó el test de Shapiro–Wilk para probar la hipótesis de distribución normal de los datos. En cuyo caso, los resultados se informan como medias (+/-) de la desviación estándar

(desviación a partir de la media), mientras que los datos con distribución no normal, se reportaron como medianas y rangos intercuartílicos (IQR). Los datos categóricos se presentaron como proporciones. La significancia estadística entre dos grupos se determinó mediante el test t-Student, o de ANOVA cuando dicha comparación se realizó entre más de dos grupos. El estudio de correlación entre los niveles séricos de la Proteína Relacionada con la Angiopoyetina 4 y los diferentes parámetros metabólicos y antropométricos evaluados en la cohorte de humanos, se realizó mediante análisis del coeficiente de correlación de Pearson, cuando se cumplían los supuestos de normalidad, o mediante el coeficiente de correlación parcial de Spearman, cuando no se cumplían los supuestos de normalidad. Se realizó un modelo de regresión lineal multivariado, para estimar el efecto de la proteína estudiada sobre los parámetros de interés, como el índice de HOMA IR. Los valores estadísticos son presentados como * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. La significancia estadística fue asumida con un $p < 0.05$.

4. Resultados en humanos

4.1 Caracterización de los sujetos participantes

Las características clínicas, bioquímicas y antropométricas se muestran en la tabla 3. No hubo diferencias significativas en cuanto a la edad y la estatura de los participantes de cada cohorte. Se mostró una edad promedio de 23.4 (21.0-26.8) años para los hombres jóvenes sanos normopeso y de 24 (21.0-26.8) años para los jóvenes obesos no diabéticos ($p > 0,05$). Por el contrario, se mostraron diferencias estadísticamente significativas en cuanto al IMC ($37,6 \pm 4,6 \text{ Kg/m}^2$ vs. $22,21 \pm 1,9 \text{ Kg/m}^2$, $p < 0,001$), el porcentaje de grasa corporal total ($45,0 \pm 3,83$ vs. $21,13 \pm 4,6$, $p < 0,001$) y el porcentaje de grasa androide ($55,66 \pm 3,28$ vs. $28,93 \pm 6,92$, $p < 0,001$) entre los hombres jóvenes obesos no diabéticos versus los jóvenes sanos normopeso, respectivamente.

Con relación a los parámetros clínicos y bioquímicos, también hubo diferencias estadísticamente significativas entre las cohortes, con niveles significativamente más elevados en los sujetos obesos no diabéticos, para los niveles de Presión Arterial Media (PAM) [100,24 ± 9,82 vs. 84,24 ± 6,98), <0.0001], niveles séricos de PCR [4.2 (4-8.1) vs. 0.5 (0.05-0.7), p<0.001], niveles de glicemia en ayunas [88 (67,4-97,4) mg/dl vs. 82,4 (± 7,7) mg/dl, p<0,05] y los niveles de glicemia durante los diferentes tiempos de la PTOG: 30 min (131.83 ± 24.47 mg/dL vs. 115.46 ± 21.05 mg/dL, p=0.0038), 60 min (113,66 ± 31,06 mg/dL vs. 86,87 ± 19,36 mg/dL, p< 0.001) y 120 min (91,9 ± 27,41 mg/dl vs. 75,17 ± 13,75 μUI/mL, p=0,0181).

Adicionalmente, los jóvenes obesos no diabéticos presentaron mayores niveles de insulina sérica basal [27(12.6 – 41.4) μUI/ml vs. 7,93 ± 3,08 μUI/ml, p<0.001] y de los niveles de insulina determinados durante los diferentes tiempos de la PTOG: 30 min [217,64 ± 95,69 μUI/ml vs. 74,1 (6,32-141,88) μUI/ml, p<0,001], 60 min [135,6 (48 -223.2) μUI/ml vs. 55,39 ± 31,34 μUI/ml, p<0,001] y 120 min [75,2 (10.7–161) vs. 23,3 (0,25-46,35) μUI/mL, p<0,001], que en los jóvenes sanos normopeso, respectivamente; así como un HOMA-IR significativamente mayor para los jóvenes obesos no diabéticos versus los jóvenes sanos normopeso [5,89 (2,09-9,69) vs. 1,61 ± 0,62), p<0,001].

El perfil lipídico de los participantes, también mostró diferencias estadísticamente significativas entre las cohortes, con mayores niveles en los jóvenes obesos no diabéticos respecto a los jóvenes sanos normopeso para el Colesterol Total (188,72 ± 27,96 mg/dL vs. 165,73 ± 25,28 mg/dL, p=0.0041), el colesterol LDL (112.79 ± 19.3 mg/dL vs. 97.05 ± 19.32 mg/dL, p=0.0166), el colesterol VLDL [31,2 (-4,37-39,63) mg/dL vs. 17,63 ± 5,46 mg/dL, p <0,001] y los TGC [164 (69 -256) mg/dL vs. 90,37 ± 29,77 mg/dL, p<0.001]; mientras que los niveles de colesterol HDL estuvieron significativamente disminuidos en los jóvenes obesos no diabéticos frente a los jóvenes sanos normopeso [39 (35-43) mg/dL vs. 46,97 ± 7,49 mg/dL, p=0.0026]. Finalmente, los niveles séricos de Leptina en ayuno fueron significativamente más elevados en los jóvenes obesos no diabéticos frente a los jóvenes sanos normopeso [26.75 (17.56-26.9) pg/mL vs. 7.47 (6.74-7.69) pg/mL, p<0,001], mientras que los niveles de Adiponectina en ayuno, tuvieron un comportamiento contrario,

con niveles significativamente menores en los jóvenes obesos no diabéticos con respecto a los jóvenes sanos normopeso, respectivamente ($13,23 \pm 1,97 \mu\text{g/mL}$ vs. $15,09 \pm 1,92 \mu\text{g/mL}$, $p < 0,001$).

Tabla 3. Caracterización de las variables clínicas, bioquímicas y antropométricas de la cohorte de jóvenes sanos normopeso y obesos no diabéticos.

VARIABLE	Hombres sanos normopeso (n=40)	Hombres obesos no diabéticos (n=40)	P-valor
Edad (años)	23.40 (21-26.75)	24 (21.15-26.75)	0.6468
Peso (Kg)	66,75 \pm 6,53	115,05 \pm 14,42	<0.0001
Talla (metros)	1,73 \pm 0,05	1,75 \pm 0,07	0,29
IMC (Kg/m ²)	22,21 \pm 1,85	37,62 \pm 4,61	< 0.001
Circunferencia de cintura (cm)	78,2 \pm 4,45	111,06 \pm 8,53	< 0.001
Grasa total (%)	21,13 \pm 4,62	45,07 \pm 3,83	< 0.001
PAM (mmHg)	84.24 \pm 6.98	100.24 \pm 9.82	<0.0001
Glucosa basal (mg/dL)	82,4 \pm 7,7	88 (67,4-97,4)	0.048
Glucosa 30 min (mg/dL)	115.46 \pm 21.05	131.83 \pm 24.47	0.0038
Glucosa 60 min (mg/dL)	86,87 \pm 19,36	113.66 \pm 31.06	< 0.001
Glucosa 120 min (mg/dL)	75.17 \pm 13,75	91.9 \pm 27.41	0.0181
Insulina basal ($\mu\text{UI/mL}$)	7,93 \pm 3,08	27 (12.6 – 41.4)	< 0.001
Insulina 30 min ($\mu\text{UI/mL}$)	74,1 (6,32-141,88)	217,64 \pm 95,69	< 0.001
Insulina 60 min ($\mu\text{UI/mL}$)	55,39 \pm 31,34	135,6 (48 -223.2)	< 0.001
Insulina 120 min ($\mu\text{UI/mL}$)	23,3 (0,25-46,35)	75,2 (10.7 -161)	< 0.001
HOMA-IR	1,61 \pm 0,62	5,89 (2,09 - 9,69)	< 0.001
CT (mg/dL)	165,73 \pm 25,28	188,72 \pm 27,96	0.0041
c-HDL (mg/dL)	46,97 \pm 7,49	39 (35 - 43)	0.0026
c-LDL-colesterol (mg/dL)	97,05 \pm 19,32	112.79 \pm 19.3	0.0166
c-VLDL-colesterol (mg/dL)	17,63 \pm 5,46	31,2 (-4,37-39,63)	< 0.001

Triglicéridos (mg/dL)	90,37 ± 29,77	164 (69 - 256)	< 0.001
PCR	0.5 (0.05-0.7)	4.2 (4-8.1)	< 0.001
Leptina (ng/mL)	7.47 (6.74-7.69)	26.75 (17.56-26.9)	< 0.001
Adiponectina (µg/mL)	15,09 ± 1,92	13,23 ± 1,97	< 0.001
Angiopoyetina basal (pg/mL)	929,22 ± 741,72	1018,16 ± 725,06	0,66
Angiopoyetina 30 min (pg/mL)	853,53 ± 712,93	944,45 ± 668,46	0,63
Angiopoyetina 60 min (pg/mL)	798,39 ± 592,28	975,01 ± 667,95	0,33
Angiopoyetina 120 min (pg/mL)	916,94 ± 826,99	1002,68 ± 821,94	0,71

Los datos distribuidos normalmente se presentan como media de la desviación standar (\pm) y los datos no distribuidos normalmente se presentan como medianas o rangos intercuartílicos (IQR). Si las variables en ambos grupos se distribuyen normalmente, se comparan mediante una prueba T. Si una o ambas variables no se distribuyen normalmente, se comparan mediante un análisis no paramétrico con la prueba de rango con signo de Wilcoxon. Un valor de $p < 0.05$ se consideró estadísticamente significativo. HOMA-IR (Evaluación del Modelo de Homeostasis-Resistencia a la insulina), IMC (Índice de Masa Corporal), PAM (presión arterial media), CT (colesterol total), c-HDL (colesterol de alta densidad), c-LDL (colesterol de baja densidad), c-VLDL (colesterol de muy baja densidad), TGC (triglicéridos), PCR (proteína C reactiva ultrasensible).

4.2 Estudio de niveles séricos de la Proteína ANGPT-L4

Los niveles séricos de la Proteína Asociada a Angiopoyetina 4 (ANGPT-L4) para los jóvenes obesos no diabéticos y para los jóvenes sanos normopeso, mostraron una alta variabilidad entre los individuos, incluso de la misma cohorte. De manera general, los jóvenes obesos no diabéticos mostraron niveles séricos levemente mayores que en los jóvenes sanos normopeso, tanto en condiciones de ayuno [1018,16 ± 725,06 vs. 929,22 ± 741,72, $p=0,66$], como durante los diferentes tiempos de la PTOG, respectivamente [30 min (944,45 ± 668,46 vs. 853,53 ± 712,93, $p=0,63$), 60 min (975,01 ± 667,95 vs. 798,39 ± 592,28, $p=0,33$) y 120 min (1002,68 ± 821,94 vs. 916,94 ± 826,99, $p=0,71$), sin embargo, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas (tabla 3, figura 9A).

Figura 9A

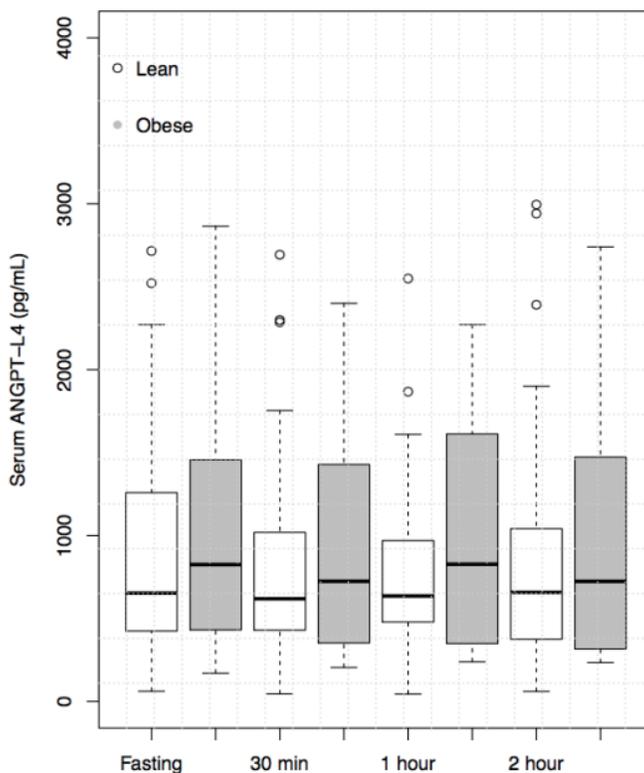


Figura 9A: Gráfico de caja y bigotes que compara los niveles séricos de la Proteína Asociada a Angiopoyetina 4 (ANGPT-L4) entre los jóvenes sanos normopeso y obesos no diabéticos, medidos durante el ayuno (Fasting) y a los 30, 60 y 120 minutos, durante una prueba de tolerancia oral a la glucosa (PTOG). No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los jóvenes sanos normopeso y obesos no diabéticos, durante el ayuno ni los diferentes tiempos de la PTOG ($p > 0,05$).

El perfil sérico de los niveles de la Proteína Asociada a Angiopoyetina 4, evaluados en la cohorte de humanos durante la PTOG, mostró leves variaciones en los niveles de la proteína para los jóvenes sanos normopeso, tras la exposición a las diferentes concentraciones de glucosa durante los diferentes tiempos de la PTOG; mientras que en el grupo de jóvenes obesos no diabéticos, los niveles séricos de dicha proteína

disminuyeron a los 30 minutos y principalmente a los 60 minutos de la prueba. Sin embargo, dichos cambios no fueron estadísticamente significativos para ninguna de las cohortes ($p > 0,05$), (figura 9 B y C).

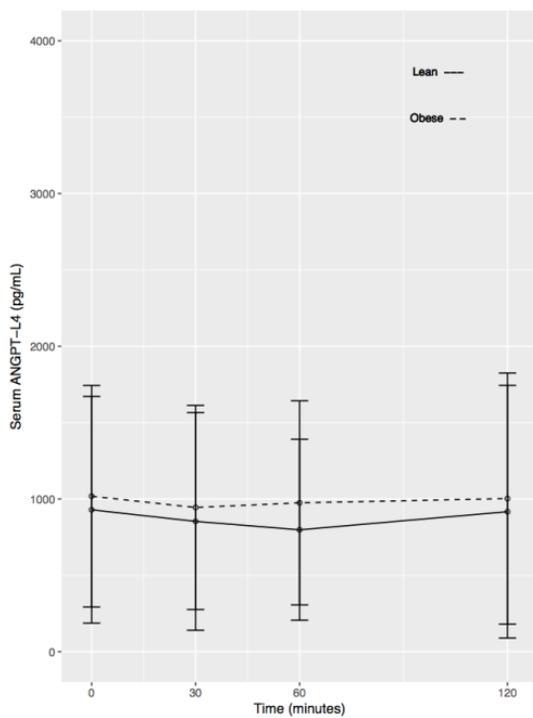
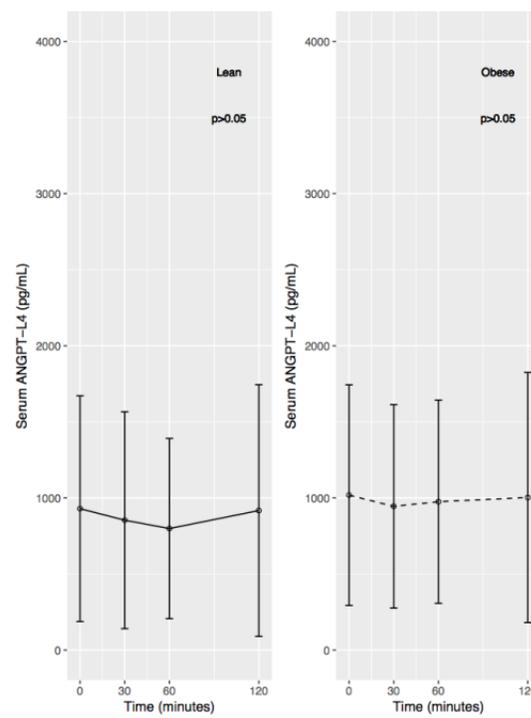
Figura 9B**Figura 9C**

Figura 9 B y C. Niveles séricos de la Proteína Asociada a Angiopoyetina 4 (ANGPT-L4) medidos en jóvenes sanos normopeso y obesos no diabéticos durante una prueba de tolerancia oral a la glucosa, las curvas muestran el comportamiento de los niveles de la Proteína Asociada a Angiopoyetina 4 en los diferentes tiempos durante la PTOG (ayuno, 30, 60 y 120 minutos) (figura 8B) y se comparan dichas mediciones de acuerdo con la condición metabólica (normopeso y obeso) (figura 8C). El significado estadístico está indicado por $p < 0,05$.

4.3 Estudio de correlación entre los niveles séricos de la proteína de interés y los parámetros bioquímicos y antropométricos

El análisis de correlación entre los niveles séricos de la Proteína Asociada a Angiopoyetina 4 (evaluados tras el periodo de ayuno (basal) y los diferentes tiempos de la PTOG, en conjunto para la cohorte de jóvenes sanos normopeso y de obesos no diabéticos), con los parámetros clínicos, bioquímicos y antropométricos, se muestra en la tabla 4. En el presente estudio, se observaron correlaciones negativas entre ANGPT-L4 basal con el IMC ($r = -0.0310$; $p = 0.85$), el porcentaje de grasa corporal total ($r = -0.0169$; $p = 0.9197$), los niveles de glicemia basal ($r = -0.1733$; $p = 0.29$), niveles de insulina basal ($r = -0.1622$; $p = 0.33$), el HOMA-IR ($r = -0.0372$, $p = 0.329$), el colesterol total ($r = -0.114$, $p = 0.493$), el colesterol LDL ($r = -0.1068$, $p = 0.58$), el colesterol VLDL ($r = -0.0952$, $p = 0.56$), los triglicéridos ($r = -0.0822$; $p = 0.623$) y la Leptina ($r = -0.022$; $p = 0.893$). Por otra parte, se observaron correlaciones positivas entre los niveles de ANGPT-L4 y el colesterol HDL ($r = 0.024$, $p = 0.88$), la PCR ($r = 0.065$; $p = 0.697$) y los niveles de Adiponectina ($r = 0.182$; $p = 0.274$). Adicionalmente, los niveles séricos de ANGPT-L4 evaluada a los 30 minutos de la PTOG, se correlacionaron negativamente con los niveles de glicemia ($r = -0.124$; $p = 0.45$) e insulina ($r = -0.128$; $p = 0.44$) medidos también a los 30 minutos. Finalmente, los niveles séricos de ANGPT-L4 evaluada a los 60 minutos de la PTOG, se correlacionaron negativamente con los niveles de glicemia ($r = -0.089$; $p = 0.59$) e insulina ($r = -0.161$; $p = 0.33$) medidos también a los 60 minutos y de la misma manera, a los 120 minutos para los niveles de glicemia ($r = -0.147$; $p = 0.37$) e insulina ($r = -0.237$; $p = 0.15$) medidos también a los 120 minutos.

Sin embargo, en general ninguna de estas correlaciones mostró un valor de significancia estadística ($p > 0,05$), por lo cual se asume que no se encontró una correlación significativa entre el perfil sérico de ANGPT-L4 medido durante el ayuno y los diferentes tiempos de la PTOG con los parámetros clínicos, bioquímicos y antropométricos que habían sido evaluados en la cohorte de humanos (tabla 4).

Tabla 4. Correlación de los niveles séricos de ANGPT-L4 con variables clínicas, bioquímicas y antropométricas medidos en la cohorte de humanos.

Variable	r	P- valor
ANGPTL4 basal		
IMC, Kg/m ²	-0.0310	0.8535
Grasa total, %	-0.0169	0.9197
Glucosa basal, mg/dl	-0.1733	0.2982
Insulina basal, U/ml	-0.1622	0.3305
HOMA - IR	-0.0372	0.3295
Colesterol total, mg/dL	-0.1146	0.4934
Colesterol HDL, mg/dL	0.0246	0.8834
Colesterol LDL, mg/dL	-0.1068	0.5233
Colesterol VLDL, mg/dL	-0.0952	0.5698
Triacilglicérols, mg/dL	-0.0822	0.6237
Leptina, ng/mL	-0.0225	0.8934
Adiponectin, ug/mL	0.1820	0.2742
ANGPTL-4 30 min		
Glucosa 30 min, mg/dL	-0.1241	0.4580
Insulina 30 min, uUI/mL	-0.1287	0.4412
ANGPTL-4 60 min		
Glucosa 60 min, mg/dL	-0.0898	0.5920
Insulina 60 min, uUI/mL	-0.1613	0.3333
ANGPTL-4 120 min		
Glucosa 120 min, mg/dL	-0.1472	0.3780
Insulina 120 min, uUI/mL	-0.2374	0.1512

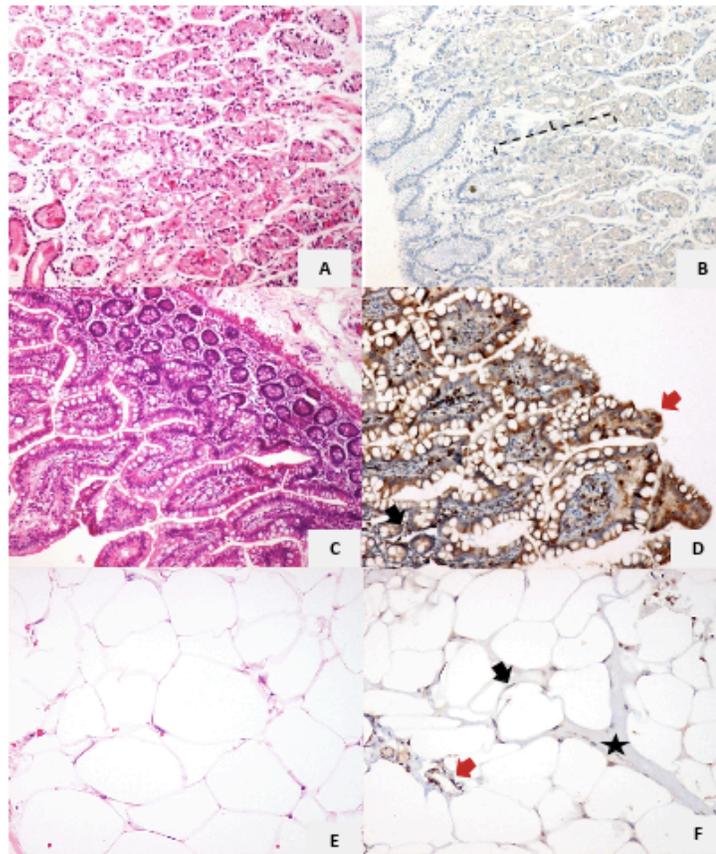
Coefficientes de correlación entre los niveles séricos de ANGPT-L4 medidos durante el ayuno y los diferentes tiempos de la PTOG y los parámetros clínicos, bioquímicos y antropométricos, medidos en conjunto para la cohorte de jóvenes sanos normopeso y obesos no diabéticos. El análisis univariado utilizando el coeficiente de correlación de Pearson o Spearman se realizó de acuerdo con la distribución de los datos. Un valor de $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo.

4.4 Estudio de Inmunoreactividad en tejidos humanos

En el estudio de inmunohistoquímica para *ANGPTL4* en las muestras de mucosa gástrica, mucosa de íleon y del tejido adiposo humano, se observó una inmunoreactividad con tinción muy tenue en algunas células parietales de la mucosa gástrica. En la mucosa del íleon, la inmunoreactividad reveló la expresión citoplasmática de *ANGPTL4* en todos los

enterocitos, tanto de la superficie de las vellosidades como el fondo de las criptas y adicionalmente, se observó inmunoreactividad en algunas células inflamatorias que estaban presentes allí. La marcación en el tejido adiposo humano evidenció inmunoreactividad para *ANGPTL4* a nivel del endotelio de los vasos sanguíneos, algunas membranas de los adipocitos y también en algunas células inflamatorias como mastocitos.

Figura 10



Figuras 10: Inmunohistoquímica de *ANGPTL4*. Estómago de humano (región fúndica) teñido con hematoxilina-eosina (A) e inmunoreactividad para *ANGPTL4* (B) observadas en 10X. Se observa marcación en las células parietales de la mucosa (flecha). Íleon humano teñido con hematoxilina-eosina (C) e inmunoreactividad para *ANGPTL4* en íleon (D) observado en 10X. Se aprecia marcación en enterocitos tanto de las vellosidades (flecha roja), como de las criptas (flecha negra); el estroma y la túnica muscular son negativos. Tejido adiposo humano teñido con hematoxilina-eosina y observado en 20X (E), e inmunoreactividad de *ANGPTL4* en tejido adiposo observado en 10X (F). Se aprecia marcación focal de membrana en adipocitos (flecha negra) y de endotelio de vasos sanguíneos (flecha roja). Control interno negativo en el estroma conectivo (asterisco).

5. Discusión:

El estudio realizado en los jóvenes sanos normopeso y obesos no diabéticos, se caracterizó por la selección de un grupo homogéneo de participantes del mismo sexo, en un rango de edad similar entre ellos y sin antecedentes personales o familiares que pudieran sesgar los resultados. Muchos estudios han reconocido el efecto del género sobre el IMC, con diferencias significativas en el contenido y la distribución de la grasa corporal entre los géneros, secundario al efecto de las hormonas sexuales, las diferencias en el metabolismo energético y los diferentes niveles de sensibilidad a ciertas hormonas como las adipoquinas (leptina y adiponectina) y la insulina ^{109,110}.

Con respecto a la edad de los participantes, algunos estudios han demostrado que los mecanismos moleculares que participan en la fisiopatología de la obesidad, se activan desde etapas muy tempranas de la vida, sin embargo, el fenotipo obeso se manifiesta con mayor frecuencia a partir de la segunda década de la vida, favorecido además por la expansión del tejido adiposo durante el crecimiento. En una etapa más avanzada de la vida, se presenta una disfunción mitocondrial en la oxidación de los ácidos grasos que promueve el acúmulo de lípidos en los adipocitos y la lipotoxicidad, produciendo cambios disfuncionales en el metabolismo de los lípidos y la glucosa, resistencia a la insulina y el desarrollo de las comorbilidades asociadas a la obesidad ^{111,112}.

La caracterización fisiológica de los participantes, permitió demostrar que las cohortes analizadas en el presente estudio fueron claramente representativas del fenotipo metabólico de normopeso y de obesidad. El incremento significativo en el IMC y el porcentaje corporal de grasa en los jóvenes obesos no diabéticos, explica el incremento significativo en los niveles plasmáticos de las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), necesarias para el transporte del exceso de triglicéridos almacenados. Por otra parte, actualmente se ha reconocido al tejido adiposo como un órgano endocrino activo, cuyos

factores secretados tienen patrones de expresión que están bajo controles nutricionales y hormonales ⁴⁵. El incremento en los depósitos de grasa en la cohorte de jóvenes obesos no diabéticos, explica la liberación proporcional y significativamente incrementada de la leptina y la insulina en este grupo. Se ha demostrado ampliamente, que la obesidad en los humanos cursa con una alteración en la vía de señalización hipotalámica de la leptina, lo que podría explicar la hiperfagia y la disminución del gasto energético corporal. Esto conlleva a la pérdida de la homeostasis energética y representa la principal analogía con el modelo animal de rata Zucker obeso, portador de una mutación en el gen receptor de leptina ¹¹³.

Se ha demostrado tanto en humanos como en roedores, que la hiperplasia e hipertrofia de los adipocitos, favorece un estado proinflamatorio, que conlleva a la alteración en la vía de señalización de la insulina en dicha población celular ³³. El estado de resistencia a la insulina evidenciado en la cohorte de jóvenes obesos no diabéticos, explica los niveles significativamente incrementados de insulina y glucosa en este grupo.

Diferentes estudios han demostrado que muchos de los hallazgos observados en los modelos animales son relevantes en la obesidad humana ^{21,25,114}. Los resultados encontrados en el modelo animal de rata Zucker magra y obesa, permitieron identificar a *ANGPTL4* como un gen relevante en el control de la homeostasis energética corporal. El abordaje traslacional de estos resultados, hacia la cohorte de hombres jóvenes normopeso y obesos no diabéticos, se vio favorecida por que el gen *ANGPTL4* se conserva evolutivamente entre las diferentes especies de mamíferos. Entre roedores y humanos, *ANGPTL4* comparte un 73% de identidad de nucleótidos y un 77% de identidad en la secuencia de aminoácidos, entre el genoma *Rattus Norvegicus* y *Homo Sapiens* ⁴³. Adicionalmente en el genoma humano, el gen *ANGPTL4* está localizado en el cromosoma 19p13.2 y al igual que en el genoma de la rata, este gen cuenta con siete exones y codifica para una única proteína secretable y multifuncional llamada “Proteína Asociada a Angiopoyetina 4 (*ANGPT-L4*)”, la cual presenta las mismas características estructurales, sufre las mismas modificaciones postraduccionales, es regulada por los mismos factores y funciona como una hormona sérica que regula la homeostasis de la glucosa, el

metabolismo de los lípidos y se ve influenciada por la sensibilidad a la insulina en ambas especies ^{42,45,55}.

Los estudios de *ANGPTL4* en humanos, han identificado su participación en el metabolismo energético, pero se han enfocado en investigar su papel en el desarrollo de dislipidemias y riesgo cardiovascular^{115,116}. Los mecanismos fisiopatológicos que desencadenan la dislipidemia en los humanos, se correlacionan con el mecanismo por el cual, *ANGPTL4* regula el metabolismo de los lípidos descrito en el modelo animal.

De manera relevante, los estudios en humanos han demostrado el carácter multifuncional de la Proteína Asociada a Angiopoyetina 4 y su participación en muchos otros procesos biológicos como la angiogénesis, diferenciación celular, cicatrización de heridas e inflamación. Este carácter multifuncional de la proteína, ha permitido asociar a *ANGPTL4* con una variedad de efectos sobre la salud ^{45,115}. Al igual que en el genoma de la rata, la función de la Proteína Asociada a Angiopoyetina 4 en humanos, depende del sitio de expresión, su presencia en el torrente sanguíneo y la apariencia de la isoforma ^{43,45,48}.

En consonancia con los resultados del análisis sérico de la Proteína Asociada a Angiopoyetina 4 en el modelo animal de ratas Zucker magras y obesas, donde se planteó que la naturaleza y las características multifuncionales de la Proteína Asociada a Angiopoyetina 4, no permitieron establecer una correlación entre los perfiles de expresión génica y los niveles séricos de la proteína durante los diferentes estados de alimentación, en la cohorte de humanos no se estableció ninguna correlación significativa entre los niveles séricos de la Proteína Asociada a Angiopoyetina 4 y otras medidas clínicas, bioquímicas y antropométricas relacionadas con la obesidad, posiblemente secundario a las características y la naturaleza de la proteína también para los humanos, lo cual es expuesto a continuación.

A pesar de la evidencia genética respecto al papel de *ANGPTL4* en la homeostasis de los triglicéridos plasmáticos, de manera similar a los resultados del presente trabajo, con frecuencia en diferentes estudios no se logra establecer una correlación significativa entre los niveles séricos de ANGPT-L4, los niveles séricos de triglicéridos y otros marcadores de

adiposidad^{49,115-117}. Este resultado podría ser explicado en base a que la Proteína Asociada a Angiopoyetina 4 se une a la enzima LPL a nivel subendotelial, inactivando una parte de ella, mientras que la otra parte de la enzima LPL se ve protegida de dicha inhibición por su proteína transportadora, logrando alcanzar la luz vascular donde ejerce su acción^{44,49,50,117}. De esta manera, las concentraciones plasmáticas de ANGPT-L4 no reflejarían el nivel de unión a la enzima LPL y no representarían plenamente la actividad funcional metabólica de ANGPT-L4. Por otra parte, ANGPT-L4 circulante no es el único determinante de la acción de la LPL, sino que otras Angiopoyetinas, proteínas transportadoras, apolipoproteínas e inclusive los mismos ácidos grasos, por mecanismos diferentes a ANGPT-L4, pueden regular la actividad de la enzima LPL^{49,59}.

En el presente estudio, los niveles séricos de la Proteína Asociada a Angiopoyetina 4 en la cohorte de jóvenes sanos normopeso y obesos no diabéticos, mostraron una alta variabilidad interindividual. Diferentes estudios han reconocido que ANGPT-L4 es una proteína notablemente dinámica con drásticas variaciones en sus niveles séricos entre los individuos^{43,49}. Esto puede deberse a diferentes factores que influyen tanto en su expresión, como en las modificaciones postraduccionales de su proteína dándole un carácter multifuncional^{51,55}. Por tanto, los niveles séricos de la Proteína Asociada a Angiopoyetina 4, representan la expresión integrada de *ANGPTL4* en los diferentes tejidos ante diferentes estímulos, tanto metabólicos como no metabólicos⁴⁵. Recientemente, también se ha reconocido un papel regulador de *ANGPTL4* en la ingesta de alimentos, control de la homeostasis energética y la adiposidad, mediante la modulación de la actividad de AMPK (proteína quinasa activada por AMP) en el hipotálamo. Esto ha permitido demostrar su participación en el control del balance energético a través otros mecanismos diferentes a los descritos a nivel periférico^{118,119}.

Aunque las diferencias entre los niveles séricos de la Proteína Asociada a Angiopoyetina 4 entre los jóvenes sanos normopeso y obesos no diabéticos medidos durante la PTOG, no fueron estadísticamente significativas, los niveles séricos de la proteína en los jóvenes obesos no diabéticos, estuvieron levemente más elevados que en los jóvenes sanos normopeso durante todos los tiempos de la PTOG. De acuerdo con los análisis séricos de

la Proteína Asociada a Angiopoyetina 4 en el modelo animal de rata Zucker presentados en este estudio, diferentes autores han encontrado que el nivel sérico de dicha proteína en los humanos obesos es mayor. Kroupa *et al.* demostraron que existe una regulación alterada de *ANGPTL4* a los cambios de ayuno/alimentación en los humanos obesos con y sin diabetes mellitus tipo II, permaneciendo con niveles sericos de su proteína persistentemente mas elevados que en los humanos normopeso⁵⁹. Dichas observaciones se podrían explicar por el estado de resistencia a la insulina característico de los organismos obesos y que se evidenció en los jóvenes obesos no diabéticos del presente estudio, así como por los niveles elevados de los ácidos grasos característicos de la obesidad, que incrementan los niveles de *ANGPTL4*¹²⁰. Esto sugiere que en los humanos obesos, como en el modelo animal de rata Zucker, también se podría presentar una desregulación en la expresión de *ANGPTL4* y en la secreción de su proteína, así como la presencia de niveles elevados de dicha proteína secundarios a su participación en el desarrollo de la obesidad, a través de otros mecanismos no relacionados con la inhibición de LPL, los cuales han sido mencionados previamente en el capítulo 1^{76,121}.

Los niveles séricos de la Proteína Asociada a Angiopoyetina 4 medidos en la cohorte de humanos, en respuesta a la exposición a las diferentes concentraciones de glucosa durante la PTOG, variaron muy levemente y no mostraron cambios estadísticamente significativos. Dichos hallazgos se encuentra en consonancia con varios estudios como el de Vienberg *et al*, en el cual se evaluó la expresión de *ANGPTL4* en ratones silvestres y mutantes para *ANGPTL4*, tras inducir un estado de hiperglicemia con posterior administración intraperitoneal de insulina, demostrando que los niveles de *ANGPTL4* no fueron regulados directamente por la glucosa sino por la insulina^{56,57,122}. En este sentido, las variaciones encontradas en los niveles séricos de la Proteína Asociada a Angiopoyetina 4 en el presente trabajo, aunque no significativas, se correlacionaron con los cambios esperados en los niveles de insulina durante los diferentes tiempos de la PTOG. Los cambios en los niveles séricos de la Proteína Asociada a Angiopoyetina 4 durante la PTOG en el grupo de jóvenes normopeso, aunque fueron leves, tuvieron una disminución a los 60 minutos de la prueba, tiempo en el cual, se esperaba que los niveles de insulina fueran mayores; mientras que en el grupo de jóvenes obesos no diabéticos que presentaron

característicamente resistencia a la insulina, se perdió la capacidad de regular a la baja los niveles de *ANGPTL4*.

El estudio de inmunolocalización de *ANGPL4* en las muestras de mucosa gástrica, mucosa de íleon y el tejido adiposo humano, se correlacionó parcialmente con los hallazgos reportados en la inmunohistoquímica de los mismos tejidos en el modelo animal. Al igual que en las ratas Zucker del presente estudio, en la mucosa de íleon humano se evidenció la expresión citoplasmática de *ANGPTL4* en todos los enterocitos y a lo largo del eje cripta-vellosidad, como había sido reportado previamente por Alex et al., quienes consideraron que dichas células podían tener las características de células enteroendocrinas, con granulos secretores de *ANGPTL4* en su interior y localizadas de manera dispersa en el epitelio del intestino delgado humano ⁵².

Por otra parte, la inmunoreactividad de *ANGPTL4* en el tejido adiposo humano identificada en el presente estudio, también fue muy similar a la demostrada en el tejido adiposo del modelo animal, con marcación positiva para *ANGPTL4* en el endotelio vascular del tejido adiposo y en las membranas del adipocito, donde informa la literatura que la Proteína Asociada a Angiopoyetina 4 cumplen su principal función metabólica ^{43,59}.

A diferencia de la mucosa gástrica en las ratas Zucker, donde se evidenció inmunoreactividad para *ANGPTL4* en las células principales, en la mucosa gástrica humana la marcación para *ANGPTL4* fue mas tenue y predominó en las células parietales. Estos hallazgos, podrían estar en consonancia con lo informado hasta el momento en la literatura, donde se reporta que la expresión de *ANGPTL4* a nivel gástrico es escasa ¹²³. Sin embargo, la mayoría de los estudios se han centrado en investigar al tejido adiposo, mientras que los reportes en intestino delgado y en la mucosa gástrica son muy escasos y se requieren una mayor investigación a éste nivel.

En conjunto, los resultados obtenidos en el presente estudio tanto en el modelo animal de rata Zucker como en los humanos, contribuyen a la comprensión de la fisiología y la patología del balance energético corporal y reconocen la participación de nuevos genes a

nivel gastrointestinal involucrados en el mantenimiento de la homeostasis energética como el gen *ANGPTL4*, cuya desregulación podría contribuir al desarrollo de la obesidad. El abordaje translacional de los resultados obtenidos en el modelo animal de rata Zucker hacia el humano durante el presente estudio, sugiere que muchos de los efectos observados en los modelos animales pueden ser relevantes también en el contexto de la obesidad humana.

III. Conclusiones y recomendaciones

Conclusiones

1. Los análisis del transcriptoma obtenido por metodología mRNA-seq a partir de muestras de mucosa gástrica y de íleon en el modelo animal de rata Zucker magra y obesa, permitieron identificar a *Angptl4*, *Igf1r*, *SIK1*, *Tm4sF5*, *Fabp1* y *Igfbp3*, como nuevos genes a nivel gastrointestinal involucrados en la regulación de la homeostasis energética, los cuales podrían ser investigados posteriormente.
2. Del grupo de nuevos genes identificados, se reconoció a *ANGPTL4* como un gen relevante involucrado en la regulación del metabolismo lipídico y la adiposidad, recientemente descrito tanto en humanos como en roedores y con escasos reportes a nivel gastrointestinal, lo cual nos permitió contribuir a su conocimiento.
3. Los cambios en los perfiles de expresión de *ANGPTL4*, identificados en las ratas Zucker magras durante las diferentes condiciones analizadas en el presente estudio, permitieron demostrar que su regulación constituye un evento importante para la salud metabólica del organismo; mientras que su desregulación, evidenciada en las ratas Zucker obesas durante el presente estudio, podría alterar la respuesta fisiológica del sistema de Lipoprotein lipasa a los cambios de ayuno y alimentación, contribuyendo con la fisiopatología de la obesidad.
4. El presente trabajo describe por primera vez el comportamiento de *ANGPTL4* durante la realimentación en el modelo animal de rata Zucker y sugiere que el incremento de su expresión a nivel intestinal puede obedecer a un posible mecanismo de protección contra la lipotoxicidad, que adicionalmente contribuye al metabolismo sistémico de los lípidos.

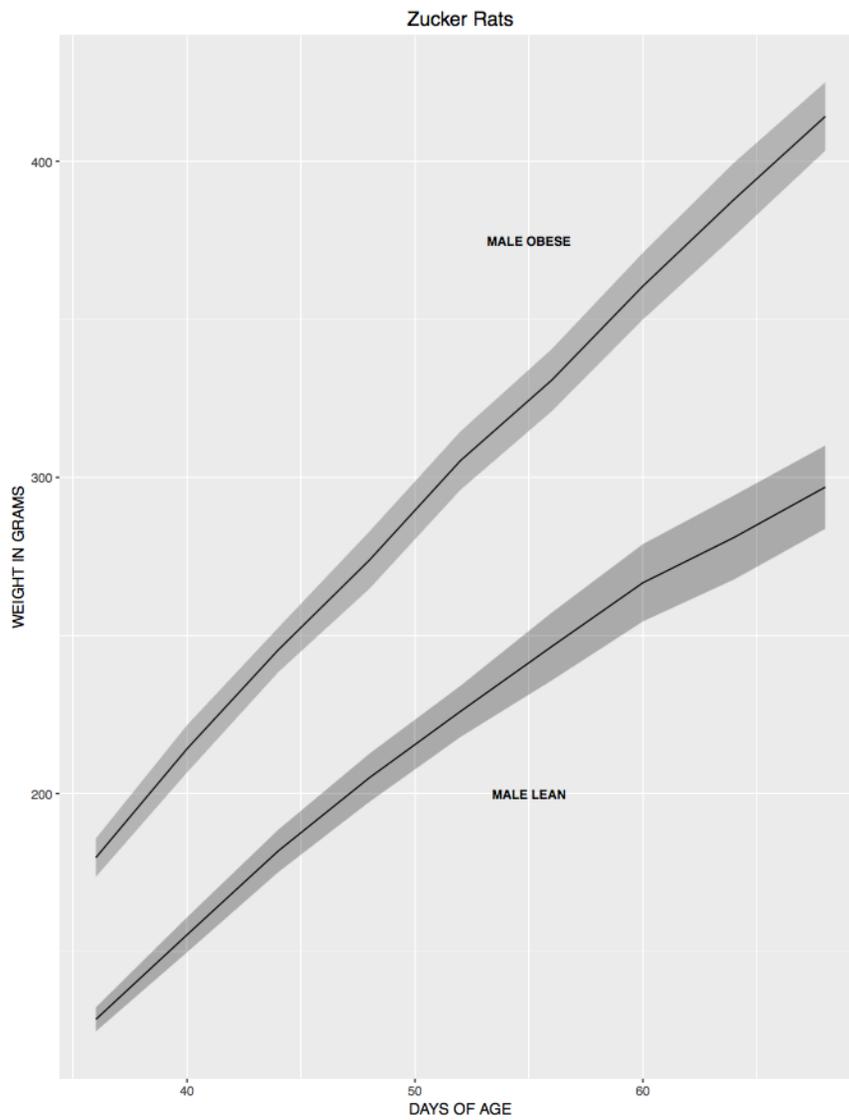
5. La evaluación de los perfiles séricos de la proteína codificada por *ANGPTL4* en el modelo animal y humano, durante el presente estudio, puso en evidencia el comportamiento dinámico de esta proteína, probablemente secundario a su naturaleza y carácter multifuncional, sin que esto invalide su participación como una señal endocrina que regula el metabolismo de lípidos y el balance energético corporal.
6. Los análisis de inmunohistoquímica realizados en tejidos de rata Zucker y humanos en el presente estudio, de manera novedosa describen la inmunolocalización de *ANGPTL4* a nivel de la mucosa gástrica y confirman su inmunolocalización a nivel de la mucosa de íleon y el tejido adiposo, que había sido descrita previamente en la literatura.
7. El abordaje traslacional de los resultados obtenidos en el modelo animal de rata Zucker al humano durante el presente estudio, sugiere que muchos de los hallazgos encontrados en el modelo animal podrían ser relevantes también para la obesidad humana.
8. El perfil de expresión evidenciado en las ratas Zucker magras y obesas podría reflejar el comportamiento del gen *Angptl4* en los humanos normopeso y obesos no diabéticos, sugiriendo que el estado de resistencia a la insulina, los niveles plasmáticos de los ácidos grasos y las alteraciones en la microbiota intestinal en los humanos, podrían representar los factores mas relevante para la desregulación de *ANGPTL4* y su participación en la fisiopatología de la obesidad humana.
9. En conjunto, los resultados obtenidos en el presente estudio contribuyen a la comprensión de la fisiopatología de la obesidad y sugiere a *ANGPTL4*, como factor Intestinal y endocrino que podría ser tenido en cuenta en el diseño de estrategias terapéuticas para la obesidad.

Recomendaciones

1. Dada la importancia que tiene el sistema gastrointestinal dentro del mecanismo de regulación homeostática corporal, resulta valioso ampliar las investigaciones a este nivel, debido a que la mayoría de los estudios, se han enfocado hacia el tejido adiposo. En este sentido, *ANGPTL4* intestinal, ha mostrado ser un gen relevante y recientemente descrito que podría representar un potencial blanco terapéutico para el control del metabolismo lipídico y la adiposidad.
2. Dada la naturaleza dinámica y el carácter multifuncional de la proteína ANGPT-L4, se recomienda que las nuevas investigaciones relacionadas con el papel metabólico de ANGPT-L4 requieran el planteamiento de estrategias metodológicas muy específicas para la detección aislada de la fracción N-terminal, responsable de la función metabólica.
3. Debido al interés cada vez mayor en el papel de la comunidad microbiana en el desarrollo de la obesidad, las investigaciones adicionales en humanos y roedores podrían aclarar aun más los efectos de la microbiota intestinal al estimular la expresión de ANGPTL4 y podrían dirigirse a la modulación dietética del ambiente microbiano intestinal para afectar moléculas clave como ANGPTL4 involucrada en la regulación del metabolismo lipídico y la adiposidad.

IV. Lista de Anexos

Anexo A: Curvas de ganancia de peso en las ratas macho Zucker magras (Male Lean) y obesas (Male obese) desde el día 38 de vida hasta el día 88 de vida.



Anexo B: Análisis de calidad de las lecturas secuenciadas por mRNA-seq, utilizando FastQC-ReadQC (versión 0,52) sobre cada una de las muestras, se describe en la siguiente tabla.

Tabla: Descripción estadística de las secuencias.

Samples	Total Sequences	Sequence length	%GC	Mean Sequence Quality Phred Score
Sample_1	7765783	100	49	37
Sample_2	8902523	100	49	37
Sample_3	12415385	100	49	37
Sample_4	9631251	100	49	37
Sample_5	8942275	100	49	37
Sample_6	22160862	100	49	37

El número de secuencias leídas estuvieron en un rango de 2.5-25 millones de pb, la calidad de secuencia por base correspondió en todos los casos a la categoría de muy alta calidad, la calificación de la calidad de secuencia mostró en todos los casos un Score Phres >30 en cada muestra analizada; el porcentaje de GC fue de 48-49% coincidente con la distribución teórica esperada. Todas las secuencias tuvieron una longitud de 100pb, durante el alineamiento no se detectaron outliers. Estos parámetros indican claramente una alta calidad de secuenciación de las muestras.

V. Bibliografía

1. Ng M, Fleming T, Robinson M, et al. Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980-2013: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet*. 2014;384(9945):766-781. doi:10.1016/S0140-6736(14)60460-8.
2. Salud OM de la. Obesidad y sobrepeso. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/es/>.
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/es/>. Published 2017.
3. Social M de S y P. Colombia. Ministerio de Salud y Protección Social. Encuesta nacional de la Situación Nutricional ENSIN 2015. <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/VS/ED/PS/P/presentacion-lanzamiento-ensin-2015.pdf>.
<https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/VS/ED/PS/P/presentacion-lanzamiento-ensin-2015.pdf>. Published 2017.
4. Barsh GS, Schwartz MW. Genetic approaches to studying energy balance: perception and integration. *Nat Rev Genet*. 2002;3(8):589-600. doi:10.1038/nrg862.
5. Pigeyre M, Yazdi FT, Kaur Y, Meyre D. Recent progress in genetics, epigenetics and metagenomics unveils the pathophysiology of human obesity. *Clin Sci*. 2016;130(12):943-986. doi:10.1042/CS20160136.
6. Maljaars J, Peters HPF, Masclee AM. Review article: The gastrointestinal tract: Neuroendocrine regulation of satiety and food intake. *Aliment Pharmacol Ther*. 2007;26(SUPPL. 2):241-250. doi:10.1111/j.1365-2036.2007.03550.x.
7. Buhmann H, Pracht M, Roux CW, Med P, Bueter M, Med PD. Best Practice & Research Clinical Gastroenterology: The gut-brain axis in obesity. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2014;28:559-572.
8. Zhong Wang, Mark Gerstein and MS. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics Zhong. *Nat Rev Genet*. 2009;10(1):57-63. doi:10.1038/nrg2484.RNA-Seq.
9. Rui L. Brain Regulation of energy balance and body weights. *Rev Endocr Metab Disord*. 2013;14(4):1-35. doi:10.1007/s11154-013-9261-9.Brain.

-
10. Clemmensen C, Müller TD, Woods SC, Berthoud HR, Seeley RJ, Tschöp MH. Gut-Brain Cross-Talk in Metabolic Control. *Cell*. 2017;168(5):758-774. doi:10.1016/j.cell.2017.01.025.
 11. Latorre R, Sternini C, De Giorgio R, Greenwood-Van Meerveld B. Enteroendocrine cells: A review of their role in brain-gut communication. *Neurogastroenterol Motil*. 2016;28(5):620-630. doi:10.1111/nmo.12754.
 12. Cummings DE, Schwartz MW. Genetics and Pathophysiology of Human Obesity. *Annu Rev Med*. 2003;54(1):453-471. doi:10.1146/annurev.med.54.101601.152403.
 13. Hussain SS, Bloom SR. The regulation of food intake by the gut-brain axis: Implications for obesity. *Int J Obes*. 2013;37(5):625-633. doi:10.1038/ijo.2012.93.
 14. Sam AH, Troke RC, Tan TM, Bewick GA. The role of the gut/brain axis in modulating food intake. *Neuropharmacology*. 2012;63(1):46-56. doi:10.1016/j.neuropharm.2011.10.008.
 15. Middlesex C, Hospital H. The ileal brake inhibition of jejunal motility after ileal fat perfusion in man. 1984:365-374.
 16. Spies D, Ciaudo C. Dynamics in Transcriptomics: Advancements in RNA-seq Time Course and Downstream Analysis. *Comput Struct Biotechnol J*. 2015;13:469-477. doi:10.1016/j.csbj.2015.08.004.
 17. Speakman, John; Hambly, Catherine; Mitchell, Sharon & Król E. Contribución de los modelos animales al estudio de la obesidad. *Lab Anim*. 2008;42:413-432.
 18. Brockmann GA, Bevova MR. Using mouse models to dissect the genetics of obesity. *Trends Genet*. 2002;18(7):367-376. doi:10.1016/S0168-9525(02)02703-8.
 19. Jacoby RO. The Biological Integrity of Laboratory Rodents. In: *Paper Presented at: The 19th US/Japan Conference (Tokyo, Japan: National Academy Press)*.
 20. Gauguier D. Application of quantitative metabolomics in systems genetics in rodent models of complex phenotypes. *Arch Biochem Biophys*. 2016;589:158-167. doi:10.1016/j.abb.2015.09.016.
 21. Aleixandre MA, Miguel M. Ratas Zucker como modelo experimental para el estudio de diferentes enfermedades. *Endocrinol y Nutr*. 2008;55(5):217-222. doi:10.1016/S1575-0922(08)70670-3.

22. Castro MM, Artin AA De. Experimental rat models to study the metabolic syndrome *British Journal of Nutrition*. 2009;1246-1253. doi:10.1017/S0007114509990729.
23. New THE, Journal E, Medicine OF. Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. 1996:292-295.
24. Iwasa T, Matsuzaki T, Kinouchi R, et al. International Journal of Developmental Neuroscience Changes in the responsiveness of serum leptin and hypothalamic neuropeptide Y mRNA levels to food deprivation in developing rats. *Int J Dev Neurosci*. 2011;29(4):377-380. doi:10.1016/j.ijdevneu.2011.03.006.
25. Scholar MD, Morrison R, Morrison R. The Zucker Rat as a Model of Obesity- Hypertension. 2006.
26. Brooks SPJ. Fasting and Refeeding : Models of Changes in Metabolic Efficiency. 2001.
27. Zhan X, Li Y, Wang D. Effects of fasting and refeeding on body mass , thermogenesis and serum leptin in Brandt ' s voles (*Lasiopodomys brandtii*). 2009;34:237-243. doi:10.1016/j.jtherbio.2009.02.006.
28. Chereil Y, Robin JP, Heitz A, Calgari C LMY. Relationships between lipid availability and protein utilization during prolonged fasting. *J Comp Physiol B*. 1992;162(4):305-313.
29. Guyenet SJ, Schwartz MW. Regulation of food intake, energy balance, and body fat mass: Implications for the pathogenesis and treatment of obesity. *J Clin Endocrinol Metab*. 2012;97(3):745-755. doi:10.1210/jc.2011-2525.
30. Gong H, Han Y, Sun L, et al. The effects of energy intake of four different feeding patterns in rats. *Exp Biol Med*. 2016;241(1):52-59. doi:10.1177/1535370215584890.
31. Palou M, Sánchez J, Priego T, Rodríguez AM, Picó C, Palou A. Regional differences in the expression of genes involved in lipid metabolism in adipose tissue in response to short- and medium-term fasting and refeeding. *J Nutr Biochem*. 2010;21(1):23-33. doi:10.1016/j.jnutbio.2008.10.001.
32. Bergo M, Olivecrona G, Olivecrona T. Diurnal rhythms and effects of fasting and refeeding on rat adipose tissue lipoprotein lipase. *Am J Physiol*. 1996;271(6 Pt 1):E1092-7.
33. Nielsen TS, Jessen N, Jørgensen JOL, Møller N, Lund S. Dissecting adipose tissue lipolysis: Molecular regulation and implications for metabolic

- disease. *J Mol Endocrinol*. 2014;52(3). doi:10.1530/JME-13-0277.
34. Lenard NR, Berthoud H. Central and Peripheral Regulation of Food Intake and Physical Activity: Pathways and Genes. *Obesity (Silver Spring)*. 2009;16(Suppl 3):S11-22. doi:10.1038/oby.2008.511.Central.
 35. Poirier GM, Bergmann C, Denais-Lalievie DG, et al. ESLAV/ECLAM/LAVA/EVERI recommendations for the roles, responsibilities and training of the laboratory animal veterinarian and the designated veterinarian under Directive 2010/63/EU. *Lab Anim*. 2015;49(2):89-99. doi:10.1177/0023677214557717.
 36. Giardine B, Riemer C, Hardison RC, et al. Galaxy: A platform for interactive large-scale genome analysis. *Genome Res*. 2005;15(10):1451-1455. doi:10.1101/gr.4086505.
 37. Gibbons FD, Roth FP. Judging the quality of gene expression-based clustering methods using gene annotation. *Genome Res*. 2002;12(10):1574-1581. doi:10.1101/gr.397002.
 38. Törönen P, Kolehmainen M, Wong G, Castrén E. Analysis of gene expression data using self-organizing maps. *FEBS Lett*. 1999;451(2):142-146. doi:10.1016/S0014-5793(99)00524-4.
 39. Howe EA, Sinha R, Schlauch D, Quackenbush J. RNA-Seq analysis in MeV. *Bioinformatics*. 2011;27(22):3209-3210. doi:10.1093/bioinformatics/btr490.
 40. Schmittgen TD LK. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc*. 3(6):1101–8.
 41. Abcam. Western blot abreview for Anti-Angiopoietin-like 4 antibody. <http://www.abcam.com/angiopoietin-like-4-antibody-ab2920.html?productWallTab=ShowAll>.
 42. Mandard S, Zandbergen F, Van Straten E, et al. The fasting-induced adipose factor/angiopoietin-like protein 4 is physically associated with lipoproteins and governs plasma lipid levels and adiposity. *J Biol Chem*. 2006;281(2):934-944. doi:10.1074/jbc.M506519200.
 43. Zhu P, Goh YY, Chin HFA, Kersten S, Tan NS. Angiopoietin-like 4: a decade of research. *Biosci Rep*. 2012;32(3):211-219. doi:10.1042/BSR20110102.
 44. Lichtenstein L, Kersten S. Modulation of plasma TG lipolysis by Angiopoietin-like proteins and GPIHBP1. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell*

- Biol Lipids*. 2010;1801(4):415-420. doi:10.1016/j.bbalip.2009.12.015.
45. Grootaert C, Van De Wiele T, Verstraete W, Bracke M, Vanhoecke B. Angiopoietin-like protein 4: Health effects, modulating agents and structure-function relationships. *Expert Rev Proteomics*. 2012;9(2):181-199. doi:10.1586/epr.12.12.
 46. Dutton S, Trayhurn P. Regulation of angiopoietin-like protein 4/fasting-induced adipose factor (Angptl4/FIAF) expression in mouse white adipose tissue and 3T3-L1 adipocytes. *Br J Nutr*. 2008;100(01):18-26. doi:10.1017/S0007114507882961.
 47. Mandard S, Zandbergen F, Nguan ST, et al. The direct peroxisome proliferator-activated receptor target fasting-induced adipose factor (FIAF/PGAR/ANGPTL4) is present in blood plasma as a truncated protein that is increased by fenofibrate treatment. *J Biol Chem*. 2004;279(33):34411-34420. doi:10.1074/jbc.M403058200.
 48. Lei X, Shi F, Basu D, et al. Proteolytic processing of angiopoietin-like protein 4 by proprotein convertases modulates its inhibitory effects on lipoprotein lipase activity. *J Biol Chem*. 2011;286(18):15747-15756. doi:10.1074/jbc.M110.217638.
 49. Mattijssen F, Kersten S. Regulation of triglyceride metabolism by Angiopoietin-like proteins. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids*. 2012;1821(5):782-789. doi:10.1016/j.bbalip.2011.10.010.
 50. Dijk W, Kersten S. Regulation of lipoprotein lipase by Angptl4. *Trends Endocrinol Metab*. 2014;25(3):146-155. doi:10.1016/j.tem.2013.12.005.
 51. Santulli G. Angiopoietin-like proteins: A comprehensive look. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2014;5(JAN):5-10. doi:10.3389/fendo.2014.00004.
 52. Alex S, Lichtenstein L, Dijk W, Mensink RP, Tan NS, Kersten S. ANGPTL4 is produced by entero-endocrine cells in the human intestinal tract. *Histochem Cell Biol*. 2014. doi:10.1007/s00418-013-1157-y.
 53. Kersten S, Mandard S, Tan NS, et al. Characterization of the fasting-induced adipose factor FIAF, a novel peroxisome proliferator-activated receptor target gene. *J Biol Chem*. 2000;275(37):28488-28493. doi:10.1074/jbc.M004029200.
 54. Kersten S, Lichtenstein L, Steenbergen E, et al. Caloric restriction and exercise increase plasma ANGPTL4 levels in humans via elevated free fatty acids. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2009;29(6):969-974. doi:10.1161/ATVBAHA.108.182147.

-
55. Yoon JC, Chickering TW, Rosen ED, et al. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gamma Target Gene Encoding a Novel Angiopoietin-Related Protein Associated with Adipose Differentiation. *Mol Cell Biol*. 2000;20(14):5343-5349. doi:10.1128/MCB.20.14.5343-5349.2000.
 56. Yamada T, Ozaki N, Kato Y, Miura Y, Oiso Y. Insulin downregulates angiopoietin-like protein 4 mRNA in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;347(4):1138-1144. doi:10.1016/j.bbrc.2006.07.032.
 57. Ruge T, Sukonina V, Kroupa O, et al. Effects of hyperinsulinemia on lipoprotein lipase, angiopoietin-like protein 4, and glycosylphosphatidylinositol-anchored high-density lipoprotein binding protein 1 in subjects with and without type 2 diabetes mellitus. *Metabolism*. 2012;61(5):652-660. doi:10.1016/j.metabol.2011.09.014.
 58. Cushing EM, Chi X, Sylvers KL, Shetty SK, Potthoff MJ, Davies BSJ. Angiopoietin-like 4 directs uptake of dietary fat away from adipose during fasting. *Mol Metab*. 2017;6(8):809-818. doi:10.1016/j.molmet.2017.06.007.
 59. Kroupa O, Vorrstö E, Stienstra R, et al. Linking nutritional regulation of Angptl4, Gpihbp1, and Lmf1 to lipoprotein lipase activity in rodent adipose tissue. *BMC Physiol*. 2012;23:1-15. doi:10.1186/1472-6793-12-13.
 60. Bergö M, Wu G, Ruge T, Olivecrona T. Down-regulation of adipose tissue lipoprotein lipase during fasting requires that a gene, separate from the lipase gene, is switched on. *J Biol Chem*. 2002;277(14):11927-11932. doi:10.1074/jbc.M200325200.
 61. Ding H, Wang T, Hooper LV, et al. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. 2004;101(44).
 62. Zarrinpar A, Chaix A, Yooseph S, Panda S. Diet and feeding pattern affect the diurnal dynamics of the gut microbiome. *Cell Metab*. 2014;20(6):1006-1017. doi:10.1016/j.cmet.2014.11.008.
 63. Fleissner CK, Huebel N, Abd El-Bary MM, Loh G, Klaus S, Blaut M. Absence of intestinal microbiota does not protect mice from diet-induced obesity. *Br J Nutr*. 2010;104(06):919-929. doi:10.1017/S0007114510001303.
 64. Turnbaugh PJ, Hamady M, Yatsunencko T, et al. A core gut microbiom in obese and lean twins. *Nature*. 2009;457(32089):480-484. doi:10.1038/nature07540.A.
 65. Botion LM. The influence of fasting/refeeding on the lipoprotein lipase activity of adipose tissue and muscle. *Brazilian J Med Biol Res*.

- 2001;34(11):1411-1414. doi:10.1590/S0100-879X2001001100006.
66. Sukonina V, Lookene A, Olivecrona T, Olivecrona G. Angiotensin-like protein 4 converts lipoprotein lipase to inactive monomers and modulates lipase activity in adipose tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(46):17450-17455. doi:10.1073/pnas.0604026103.
 67. Doolittle MH, Ben-Zeev O, Elovson J, Martin D, Kirchgessner TG. The response of lipoprotein lipase to feeding and fasting. Evidence for posttranslational regulation. *J Biol Chem*. 1990;265(8):4570-4577.
 68. Kotzbeck P, Zechner R. Angiotensin-like 4: An endogenous break of intestinal lipid digestion. *Mol Metab*. 2014;3(2):88-89. doi:10.1016/j.molmet.2014.01.009.
 69. Kersten S. Physiological regulation of lipoprotein lipase. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids*. 2014;1841(7):919-933. doi:10.1016/j.bbalip.2014.03.013.
 70. Greiner T, Bäckhed F. Effects of the gut microbiota on obesity and glucose homeostasis. *Trends Endocrinol Metab*. 2011;22(4):117-123. doi:10.1016/j.tem.2011.01.002.
 71. Bergo M, Olivecrona G, Olivecrona T. Regulation of adipose tissue lipoprotein lipase in young and old rats. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 1997;21(11):980-986.
 72. Van Raalte DH, Brands M, Serlie MJ, et al. Angiotensin-like protein 4 is differentially regulated by glucocorticoids and insulin in vitro and in vivo in healthy humans. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2012;120(10):598-603. doi:10.1055/s-0032-1321864.
 73. Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, Magrini V, Mardis ER, Gordon JI. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature*. 2006;444(7122):1027-1031. doi:10.1038/nature05414.
 74. Xu A, Lam MC, Chan KW, et al. Angiotensin-like protein 4 decreases blood glucose and improves glucose tolerance but induces hyperlipidemia and hepatic steatosis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(17):6086-6091. doi:10.1073/pnas.0408452102.
 75. Shan L, Yu XC, Liu Z, et al. The angiotensin-like proteins ANGPTL3 and ANGPTL4 Inhibit lipoprotein lipase activity through distinct mechanisms. *J Biol Chem*. 2009;284(3):1419-1424. doi:10.1074/jbc.M808477200.
 76. Gorgoglione M, Gurav K, Tran K, Straubhaar J, Corvera S. Depot Specific

- Differences and Insufficient Subcutaneous Adipose Tissue Angiogenesis in Human Obesity. 2012;123(2):186-194.
doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.110.970145.Depot.
77. Mysling S, Kristensen KK, Larsson M, et al. The angiopoietin-like protein angptl4 catalyzes unfolding of the hydrolase domain in lipoprotein lipase and the endothelial membrane protein gpihbp1 counteracts this unfolding. *Elife*. 2016;5(DECEMBER2016):18. doi:10.7554/eLife.20958.
 78. Wong SK, Chin K-Y, Suhaimi FH, Fairus A, Ima-Nirwana S. Animal models of metabolic syndrome: a review. *Nutr Metab (Lond)*. 2016;13(1):65. doi:10.1186/s12986-016-0123-9.
 79. Mattijssen F, Alex S, Swarts HJ, Groen AK, van Schothorst EM, Kersten S. Angptl4 serves as an endogenous inhibitor of intestinal lipid digestion. *Mol Metab*. 2014;3(2):135-144. doi:10.1016/j.molmet.2013.11.004.
 80. Palou A, Bonet ML. Challenges in obesity research. *Nutr Hosp*. 2013;28 Suppl 5:144-153. doi:10.3305/nh.2013.28.sup5.6930.
 81. Van Dijk SJ, Molloy PL, Varinli H, et al. Epigenetics and human obesity. *Int J Obes*. 2015;39(1):85-97. doi:10.1038/ijo.2014.34.
 82. Speakman JR. Evolutionary Perspectives on the Obesity Epidemic: Adaptive, Maladaptive, and Neutral Viewpoints. *Annu Rev Nutr*. 2013;33(1):289-317. doi:10.1146/annurev-nutr-071811-150711.
 83. Palou A, Bonet ML. Challenges in obesity research. *Nutr Hosp*. 2013;28 Suppl 5:144-153. doi:10.3305/nh.2013.28.sup5.6930.
 84. Locke A, Kahali B, Berndt S, Justice A, Pers T. Genetic studies of body mass index yield new insights for obesity biology. *Nature*. 2015;518(7538):197-206. doi:10.1038/nature14177.Genetic.
 85. Shimoyama M, Lauderkind SJF, Pons J De, et al. Exploring human disease using the Rat Genome Database. 2016:1089-1095. doi:10.1242/dmm.026021.
 86. Hawk, Ernest, Lynn Matrisian WN. *Transforming Translation: Harnessing Discovery for Patient & Public Benefit*. Bethesda, Maryland; 2007.
 87. En DED, Salud PDE. TRANSLATIONAL RESEARCH AND ITS CONTRIBUTION TO THE DECISION MAKING PROCESS IN HEALTH POLICIES. 2011;28(2):288-297.
 88. Coller BS. Medicina traslacional. 2015:1-4.

89. Moreno-moral A, Petretto E. From integrative genomics to systems genetics in the rat to link genotypes to phenotypes. 2016:1097-1110. doi:10.1242/dmm.026104.
90. Aitman T, Dhillon P, Geurts AM. SPECIAL COLLECTION : TRANSLATIONAL IMPACT OF RAT A RAtional choice for translational research ? 2016:1069-1072. doi:10.1242/dmm.027706.
91. Gibbs RA, Weinstock GM, Metzker ML, et al. Genome sequence of the Brown Norway rat yields insights into mammalian evolution. *Nature*. 2004;428(6982):493-520. doi:10.1038/nature02426.
92. Shimoyama M, De Pons J, Hayman GT, et al. The Rat Genome Database 2015: Genomic, phenotypic and environmental variations and disease. *Nucleic Acids Res*. 2015;43(D1):D743-D750. doi:10.1093/nar/gku1026.
93. Jacob HJ, Kwitek AE. Rat genetics: Attaching physiology and pharmacology to the genome. *Nat Rev Genet*. 2002;3(1):33-42. doi:10.1038/nrg702.
94. Scarlett JM, Schwartz MW. Gut-brain mechanisms controlling glucose homeostasis. *F1000Prime Rep*. 2015;7:12. doi:10.12703/P7-12.
95. Chaudhri O, Small C, Bloom S. Gastrointestinal hormones regulating appetite. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2006;361(1471):1187-1209. doi:10.1098/rstb.2006.1856.
96. Rui L. Brain regulation of energy balance and body weight. *Rev Endocr Metab Disord*. 2013;14(4):387-407. doi:10.1007/s11154-013-9261-9.
97. Psichas A1, Glass LL1, Sharp SJ2, Reimann F1 GF. Galanin inhibits GLP-1 and GIP secretion via the GAL1 receptor in enteroendocrine L and K cells. *Br J Pharmacol*. 2015;Dec 12(Epub ahead of print).
98. Patterson E, Ryan PM, Cryan JF, et al. Gut microbiota, obesity and diabetes. *Postgrad Med J*. February 2016. doi:10.1136/postgradmedj-2015-133285.
99. Latorre R, Sternini C, De Giorgio R, Greenwood-Van Meerveld B. Enteroendocrine cells: A review of their role in brain-gut communication. *Neurogastroenterol Motil*. 2015:1-11. doi:10.1111/nmo.12754.
100. Patel D. Pharmacotherapy for the management of obesity. *Metabolism*. 2015;64(11):1376-1385. doi:10.1016/j.metabol.2015.08.001.
101. Tasyurek HM, Altunbas HA, Balci MK, Sanlioglu S. Incretins: their physiology and application in the treatment of diabetes mellitus. *Diabetes Metab Res Rev*. 2014;30(5):354-371. doi:10.1002/dmrr.2501.

-
102. Pais R, Gribble FM, Reimann F. Stimulation of incretin secreting cells. *Ther Adv Endocrinol Metab.* 2016;7(1):24-42. doi:10.1177/2042018815618177.
 103. Wikarek T, Chudek J, Owczarek A, Olszanecka-Glinianowicz M. Effect of dietary macronutrients on postprandial incretin hormone release and satiety in obese and normal-weight women. *Br J Nutr.* 2014;111(2):236-246. doi:10.1017/S0007114513002389.
 104. Cho Y, Shore SA. Obesity, Asthma, and the Microbiome. *Physiology (Bethesda).* 2016;31(2):108-116. doi:10.1152/physiol.00045.2015.
 105. Ministerio de Salud. Resolución 8430 de 1993. *Minist Salud y Protección Soc República Colomb.* 1993;1993(Octubre 4):1-19. doi:10.2353/jmoldx.2008.080023.
 106. Rey G, González M, Bermúdez A, et al. *Manual Para Obtención y Envío de Muestras Para Análisis de Eventos de Interés En Salud Pública.*; 2011.
 107. OPS. Guías ALAD. *Guías ALAD diagnóstico, Control y Trat la Diabetes Mellit Tipo 2.* 2006:1-80.
 108. Matthews DR et al. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia.* 1985;28:412-419.
 109. Lovejoy JC, Sainsbury A. Sex differences in obesity and the regulation of energy homeostasis: Etiology and pathophysiology. *Obes Rev.* 2009;10(2):154-167. doi:10.1111/j.1467-789X.2008.00529.x.
 110. Woods SC, Gotoh K, Clegg DJ. Gender differences in the control of energy homeostasis. *Exp Biol Med (Maywood).* 2003;228(10):1175-1180. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14610257>. Accessed May 1, 2017.
 111. Landgraf K, Rockstroh D, Wagner I V., et al. Evidence of early alterations in adipose tissue biology and function and its association with obesity-related inflammation and insulin resistance in children. *Diabetes.* 2015;64(4):1249-1261. doi:10.2337/db14-0744.
 112. Winkler TW, Justice AE, Graff M, et al. *The Influence of Age and Sex on Genetic Associations with Adult Body Size and Shape: A Large-Scale Genome-Wide Interaction Study.* Vol 11.; 2015. doi:10.1371/journal.pgen.1005378.
 113. Pan H, Guo J, Su Z. Advances in understanding the interrelations between leptin resistance and obesity. *Physiol Behav.* 2014;130:157-169. doi:10.1016/j.physbeh.2014.04.003.

114. Woods TAL and SC. Overview of Animal Models of Obesity. *Neuroscience*. 2007;1-20. doi:10.1002/0471141755.ph0561s58.Overview.
115. Dewey FE, Gusarova V, O'Dushlaine C, et al. Inactivating Variants in *ANGPTL4* and Risk of Coronary Artery Disease. *N Engl J Med*. 2016;374(12):1123-1133. doi:10.1056/NEJMoa1510926.
116. Article O. Coding Variation in *ANGPTL4*, *LPL*, and *SVEP1* and the Risk of Coronary Disease. *N Engl J Med*. 2016;374(12):1134-1144. doi:10.1056/NEJMoa1507652.
117. Kumari M, Kivimaki M, Khaw K, Humphries SE, Ehnholm C. R1: The relationship between plasma Angiopoietin-like protein 4 (Angptl4) levels, *ANGPTL4* genotype and coronary heart disease risk. *Arter Thromb Vasc Biol*. 2012;30(11):2277-2282. doi:10.1161/ATVBAHA.110.212209.R1.
118. Kim HK, Youn BS, Shin M-S, et al. Hypothalamic Angptl4 / Fiaf Is a Novel Regulator of Food Intake and Body Weight. *Imaging*. 2010;59(12):1-11. doi:10.2337/db10-0145.H.-K.K.
119. Le Foll C, Dunn-Meynell AA, Miziorko HM, Levin BE. Regulation of hypothalamic neuronal sensing and food intake by ketone bodies and fatty acids. *Diabetes*. 2014;63(4):1259-1269. doi:10.2337/db13-1090.
120. González-Muniesa P, De Oliveira C, Pérez De Heredia F, Thompson MP, Trayhurn P. Fatty acids and hypoxia stimulate the expression and secretion of the adipokine *ANGPTL4* (angiopoietin-like protein 4/ fasting-induced adipose factor) by human adipocytes. *J Nutrigenet Nutrigenomics*. 2011;4(3):146-153. doi:10.1159/000327774.
121. Mandard S, Miller M, Kersten S. Peroxisome proliferator-activated receptor a target genes. *Cell Mol Life Sci*. 2004;61(4):393-416. doi:10.1007/s00018-003-3216-3.
122. Vienberg SG, Kleinridders A, Suzuki R, Kahn CR. Differential effects of angiopoietin-like 4 in brain and muscle on regulation of lipoprotein lipase activity. *Mol Metab*. 2015;4(2):144-150. doi:10.1016/j.molmet.2014.11.003.
123. www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/51129#gene-expression.