



UNIVERSITAT DE
BARCELONA



HIPERTRIGLICERIDÈMIA EN UN MODEL DIETÈTIC D'ESTEATOSI HEPÀTICA EN RATA: MODULACIÓ PER PEMAFIBRAT

Maria Ricart Margaride
Grau de Bioquímica

Departament de Farmacologia i Química Terapèutica

Universitat de Barcelona

Tutora: Dra. Marta Alegret

Cotutor: Roger Bentanachs

Juliol 2023



AGRAÏMENTS

En primer lloc, m'agradaria expressar la meva sincera gratitud a la Dra. Alegret per haver-me acceptat al seu grup de pràctiques. Estic molt agraïda per l'oportunitat que em va donar per aprendre sobre el món de la recerca i la investigació, així com per la seva disposició constant a ajudar-me sempre que ho he necessitat.

També vull agrair especialment al Roger Bentanachs per haver-me ensenyat amb molta paciència el funcionament del laboratori i els mètodes que s'hi apliquen. Ha estat un exemple a seguir i he après moltíssim d'ell durant aquest semestre.

A més, vull expressar el meu agraïment a totes les meves companyes del grup i a la resta del personal del laboratori. Gràcies a la seva amabilitat i suport constant, m'he sentit plenament integrada i sempre he pogut comptar amb elles quan ho he necessitat.

Finalment, no puc deixar de donar les gràcies a la meva família per haver-me fet costat incondicionalment durant tot aquest procés. El seu suport emocional i encoratjament han estat fonamentals per aconseguir els meus objectius.

ABSTRACT

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is a condition characterized by the accumulation of triglycerides, forming lipid droplets in hepatocytes, in the absence of excessive alcohol consumption. It is the most common liver disease worldwide and affects 25% of the population, primarily developing in patients with other metabolic disorders such as obesity, diabetes, or high cholesterol.

There is evidence suggesting that NAFLD can be prevented and treated with physical activity and dietary changes, but currently there is no approved pharmacological treatment for NAFLD. For this reason, a dietary model of fatty liver was developed in female rats to investigate an effective pharmacological therapy for treating early stages of the disease.

To study the effect of pemafibrate, three groups of female *Sprague Dawley* rats with different experimental conditions were used: a standard diet (CT), a high-fat diet supplemented with 10% w/v fructose in drinking water (HFD-HFr), and a HFD-HFr diet with pemafibrate (Pema). Despite the PPAR- α agonist effect of pemafibrate, an increase in blood triglyceride levels contrary to what the literature suggested was observed.

To determine the cause of this hypertriglyceridemia, we explored pathways related to lipoprotein synthesis and export, as well as to blood triglyceride catabolism. Western blot, RT-qPCR, and ELISA techniques were used to analyse the levels of the proteins PNPLA3, UCP1, and ANGPTL3, as well as the expression of genes encoding MTP and LPL. The results revealed that the export of VLDL was not significantly affected by the presence of the drug, but the significant increase in the levels of ANGPTL3, which inhibits lipoprotein lipase, suggests a decrease in the hydrolysis of blood VLDL-triglycerides.

IDENTIFICACIÓ I REFLEXIÓ SOBRE ELS OBJECTIUS PEL DESENVOLUPAMENT SOSTENIBLE (ODS)

El model estudiat en aquest projecte són rates femelles de la soca *Sprague Dawley*, però els resultats obtinguts busquen tenir un impacte a llarg termini sobre el col·lectiu de persones que pateixen la malaltia del fetge gras no alcohòlic, la qual és la malaltia hepàtica més comuna actualment i afecta el 25% de la població mundial. A més, és una malaltia crònica que pot derivar a una situació de fibrosi, cirrosi, càncer de fetge o insuficiència hepàtica. Per tant, una disminució en la prevalença d'aquesta malaltia es traduiria en una reducció en la incidència de patologies hepàtiques, que s'inclouen dins de les malalties no transmissibles, i suposaria una major esperança de vida.

Un dels fàrmacs que podria ser útil pel tractament de la NAFLD és el pemafigbrat, un agonista del receptor PPAR- α que està comercialitzat al Japó per tractar la dislipèmia, és a dir, per reduir els nivells de colesterol i triglicèrids de la sang. El grup de recerca amb el que he realitzat les pràctiques van estudiar l'efecte del pemafigbrat en un model de NAFLD en rata, i van obtenir un efecte beneficiós sobre els lípids hepàtics, però no es va observar reducció de la hipertrigliceridèmia.

És per això, que la investigació duta a terme en aquest TFG pretén estudiar els mecanismes pels quals el pemafigbrat modula els nivells de triglicèrids en el nostre model dietètic d'esteatosi hepàtica en rata. Per fer-ho, s'han estudiat les vies relacionades amb l'exportació de triglicèrids a la sang i amb la hidròlisi d'aquests lípids.

Els resultats indiquen que en el nostre model dietètic de fetge gras en rates femella el tractament amb pemafigbrat s'observa una situació d'hipertrigliceridèmia a causa d'un increment dels nivells de la proteïna angipoiètin like-3, inhibidora de l'activitat lipoproteïna lipasa. Els resultats obtinguts no tenen un impacte directe en la salut de les persones a curt termini, ja que es tracta d'una investigació en curs que necessita molts més resultats per poder-la traslladar als humans i posar remei a aquesta patologia; però l'estudi pretén contribuir a llarg termini a la recerca d'un model que permeti trobar d'un tractament adequat.

Adicionalment, cal remarcar que l'estudi es duu a terme amb rates femelles, al contrari que la majoria d'estudis farmacològics preclínic, que es realitzen amb mascles. Això, pot aportar dades importants sobre les diferències en malalties cròniques respecte al sexe i, així, reduir el biaix de gènere de la medicina.

En aquest cas, la recerca s'ha desenvolupat en les instal·lacions de la Universitat de Barcelona, concretament a la Facultat de Farmàcia, sense cap intervenció directa amb una altra entitat o empresa. S'espera que els resultats d'aquest TFG seran part d'una publicació

en una revista del primer quartil dins de les àrees de “Farmacologia i Farmàcia” o “Nutrició i dietètica”, de forma que l’aprenentatge assolit amb el projecte es divulgarà, tant a escala nacional com internacional.

En conseqüència, considero que aquest TFG tracta l’ODS que s’engloba dins l’àmbit de Persones, i encaixa en l’objectiu 3: “Salut i Benestar per a tothom”. Aquest projecte està enfocat específicament al compliment de la meta 3.4: “Pel 2030, reduir en un terç la mortalitat prematura per malalties no transmissibles mitjançant la prevenció i el tractament, i promoure la salut mental i el benestar”. A més, de manera indirecta el treball també s’inclou en l’objectiu 5: “Aconseguir la igualtat de gènere i empoderar totes les dones i nenes”. Concretament, dins la meta 5.1: “Posar fi a totes les formes de discriminació contra totes les dones i les nenes del món”, ja que no tenir estudis pre-clínics i clínics amb femelles impacta negativament a la salut de les dones.

ABREVIATURES

- ADPN: adiponutrina
- AG: àcids grassos
- ANGPTL3: angipietin like-3
- Apo: apolipoproteïna
- BAT: teixit adipós marró
- BSA: albúmina sèrica bovina
- cDNA: DNA complementari
- CT: grup control
- DEPC: pirocarbonat de dietil
- DNL: lipogènesi de novo
- dNTPs: deoxinucleòtids trifosfat
- DO: densitat òptica
- DTT: ditiotreitòl
- HFD-HFr: grup high-fat diet high-fructose
- HRP: peroxidasa de rave
- LPL: lipoproteïna lipasa
- MTTP: proteïna microsòmica de transferència de triglicèrids
- NAFL: fetge gras no alcohòlic, Non-Alcoholic fatty liver
- NAFLD: malaltia del fetge gras no alcohòlic, Non-Alcoholic fatty liver disease
- NASH: esteatohepatitis no alcohòlica
- Pema: pema fibrat
- PNPLA3: patatin-like phospholipase domain containing 3
- PPAR- α : receptor activat per proliferadors peroxisòmics tipus α
- PSA: persulfat d'amoni
- QM: quilimicrons
- RNAsa: ribonucleasa
- ROS: espècies reactives d'oxigen
- ROX: carboxirodamina
- RT-qPCR: Reverse transcription - quantitative polymerase chain reaction
- SB: Laemmli sample buffer
- SDS: dodecilsulfat sòdic, sodium dodecyl sulfate
- TEMED: tetrametiletildiamina
- TG: triglicèrids
- UCP1: proteïna desacobladora 1, Uncoupling Protein 1
- VLDL: lipoproteïnes de molt baixa densitat

ÍNDEX

1. Introducció	1
1.1. Malaltia del fetge gras no alcohòlic	1
1.2. Pemafibrat i el seu efecte sobre el receptor PPAR- α	2
1.3. Context de l'estudi	3
1.4. Pemafibrat i els nivells de TG sanguinis	3
1.5. Mecanismes de modulació dels triglicèrids plasmàtics	4
1.5.1. Proteïnes relacionades amb l'exportació: MTTP i PNPLA3	5
1.5.2. Proteïna UCP1 i la termogènesi	5
1.5.3. Proteïna LPL i la hidròlisi de triacilglicèrids	7
1.5.4. Proteïna Angiopoietin-like 3	7
2. Hipòtesi i objectius	9
3. Metodologia	10
3.1. Disseny experimental	10
3.2. Extracció de proteïnes del BAT i del fetge	11
3.3. Assaig de Bradford	11
3.4. Western Blot	12
3.4.1. Preparació dels gels SDS-PAGE	12
3.4.2. Preparació de les mostres	12
3.4.3. Electroforesi en gels SDS-PAGE	13
3.4.4. Transferència per electroblotting	13
3.4.5. Immunodetecció de proteïnes	13
3.4.6. Revelatge de proteïnes amb Amersham TM Imager 680	14
3.4.7. Anàlisi per densitometria	14
3.5. Extracció de mRNA del fetge	14
3.6. Quantificació de la concentració de mRNA	15
3.7. Reverse Transcription - Quantitative PCR (RT-qPCR)	15
3.7.1. Transcripció reversa de les mostres de mRNA (RT)	15
3.7.2. Amplificació de les mostres de cDNA per PCR quantitativa (qPCR)	16
3.7.2.1. Context de la tècnica	16
3.7.2.2. Preparació de les mostres de cDNA	17

3.7.2.3.	Preparació dels reactius	17
3.7.2.4.	Procediment	17
3.7.2.5.	Anàlisi dels resultats de la RT-qPCR	18
3.8.	Kit ELISA per detectar la proteïna ANGPTL3	18
3.8.1.	Preparació dels reactius	18
3.8.2.	Procediment	18
3.9.	Anàlisi estadística	19
4.	Resultats i discussió	20
4.1.	Nivells de les proteïnes relacionades amb l'exportació de VLDL	20
4.1.1.	Nivells de la proteïna ADPN al fetge	20
4.1.2.	Nivells del gen <i>Mttp</i> al fetge	21
4.2.	Nivells de la proteïna UCP1 en BAT	22
4.3.	Nivells d'expressió del gen de la LPL al fetge	23
4.4.	Nivells de la proteïna ANGPTL3 en sèrum	24
5.	Conclusions	27
6.	Bibliografia	28
7.	Annexos	35
7.1.	Annex I: Assaig de Bradford	35
7.2.	Annex II: Western Blot	36
7.3.	Annex III: RT-qPCR	39

1. INTRODUCCIÓ

1.1. Malaltia del fetge gras no alcohòlic

La malaltia del fetge gras no alcohòlic (Non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD) és una patologia que es caracteritza per l'acumulació de triglicèrids (TG) formant gotes lipídiques en almenys el 5% dels hepatòcits, en absència d'un consum excessiu d'alcohol. A escala mundial, a hores d'ara és la malaltia hepàtica més habitual i afecta el 25% de la població (Pydyn et al., 2020).

En la NAFLD es poden distingir diferents fases en el desenvolupament de la malaltia. Pot variar des del fetge gras simple (NAFL), també anomenada esteatosis hepàtica, relativament benigne i reversible, fins a la forma més agressiva anomenada esteatohepatitis no alcohòlica (NASH), caracteritzada pel fetge gras, l'evidència de lesió als hepatòcits i la inflamació del fetge. Tant NAFL com NASH, són malalties cròniques que poden derivar a una situació de fibrosi, cirrosi, càncer de fetge o insuficiència hepàtica (Kleiner et al., 2005) (Utzschneider et al., 2006).

Els nivells de lípids intrahepàtics estan controlats per un equilibri entre la captació/síntesi i la utilització/eliminació dels lípids mitjançant 4 mecanismes: 1) captació de lípids procedents de la dieta; 2) lipogènesi de novo (DNL); 3) oxidació d'àcids grassos; i 4) secreció de lipoproteïnes de molt baixa densitat (VLDL) (Wang et al., 2022).

En circumstàncies normals, els àcids grassos del metabolisme dels lípids al fetge provenen majoritàriament de la dieta, amb una petita aportació d'aproximadament el 5% de DNL. En canvi, en pacients amb NAFLD els hepatòcits presenten un metabolisme alterat en què la contribució de la DNL augmenta fins a un 30% del conjunt dels àcids grassos (AG) metabolitzats, hi ha una captació excessiva d'AG i es redueix l'oxidació d'aquests (Velázquez et al., 2022). Per altra banda, s'ha descrit que en els pacients amb NAFLD la secreció de VLDL està incrementada, fet que comporta l'aparició d'hipertrigliceridèmia. Tot i això, l'augment de la producció de VLDL no compensa l'augment de les vies d'entrada de lípids en el fetge, i aquests s'acumulen als hepatòcits (Wang et al., 2022).

A causa de l'alta prevalença d'aquesta malaltia, ha esdevingut un problema de salut important que cal abordar. Hi ha evidències que suggereixen que la NAFLD es pot prevenir i tractar amb activitat física i canvis en la dieta, ja que tenen efectes beneficiosos en els nivells de lípids intrahepàtics; però, actualment, no existeix cap tractament farmacològic aprovat per a la NAFLD (Qiu et al., 2023).

1.2. Pemafibrat i el seu efecte sobre el receptor PPAR- α

El receptor PPAR- α (receptor activat per proliferadors peroxisòmics tipus α) és un factor de transcripció nuclear que està implicat en la regulació del metabolisme dels lípids i que està present en diversos teixits com el fetge, el múscul esquelètic i el teixit adipós. Quan aquest receptor s'activa, s'uneix a elements de resposta al DNA i modula l'expressió de gens relacionats amb la metabolització i degradació dels lípids, com per exemple augmentant la producció de lipoproteïna lipasa (LPL) i disminuint la de l'apolipoproteïna C-III (Apo C-III), un inhibidor de la LPL (Yamashita et al., 2020) (Takizawa et al., 2013). D'aquesta manera, es redueixen els nivells de TG plasmàtics, ja que augmenta la seva lipòlisi i els AG formats són incorporats als teixits perifèrics.

L'activació de PPAR- α també regula els gens implicats a les vies de β -oxidació. Els nivells d'AG es redueixen gràcies a la metabolització d'aquests al múscul esquelètic i al fetge mitjançant l'augment de l'expressió de diversos gens implicats en la via de la β -oxidació i (Staels et al., 1998). En pacients amb NAFLD, aquests processos es veuen alterats, provocant una acumulació excessiva de TG als hepatòcits. L'activació de PPAR- α es considera una potencial diana farmacològica, ja que l'augment de la β -oxidació redueix els nivells de TG hepàtics (Pydyn et al., 2020).

Múltiples línies d'evidència donen suport a l'estratègia de la teràpia combinada per al tractament de la NAFLD a causa de la complexitat, l'heterogeneïtat i la patogènesi multifactorial de la malaltia (Chakravarthy et al., 2020). En el projecte del que forma part aquest TFG, s'ha testat l'eficàcia de dos fàrmacs (pemafibrat i mirabegró) per separat i la seva combinació. Pel que fa al present TFG, correspon només als estudis realitzats amb pemafibrat.

El pemafibrat (K-877) és un fàrmac sintetitzat per Kowa Company, Ltd. que pertany al grup dels fibrats i està comercialitzat al Japó per tractar la dislipèmia. La dislipèmia és una condició en què el nivell dels lípids, tant els de TG com els de colesterol, en sang són elevats. Els fibrats com el bezafibrat, el fenofibrat i el gemfibrozil són agonistes PPAR- α relativament febles amb poca selectivitat del substrat; en canvi, el pemafibrat és un modulador de PPAR- α altament selectiu amb una potent activitat agonista (Blair, 2017b). A més, l'ús clínic dels fibrats provoca efectes secundaris, com per exemple l'empitjorament de la funció hepàtica i renal, ja que la majoria dels fibrats disponibles s'excreten principalment al ronyó. Per fer front a aquests inconvenients, es proposa la utilització del pemafibrat a causa del seu equilibri entre l'eficàcia i la seguretat. Aquest fàrmac té una relació benefici-risc superior a la dels altres fibrats perquè millora els tests de funció hepàtica, i com que es metabolitza principalment al fetge i no al

ronyó pot ser utilitzat en pacients amb malaltia renal (Yamashita et al., 2019b) (Yamashita et al., 2020).

El mecanisme d'acció del pema fibrat és l'activació del receptor nuclear PPAR- α en les cèl·lules del fetge i en altres teixits. La unió selectiva entre el pema fibrat i el receptor PPAR- α produeix la seva activació i, com ja s'ha esmentat, regula l'expressió de gens diana encarregats d'estimular l'eliminació dels triglicèrids plasmàtics augmentant la producció d'enzims que duen a terme la lipòlisi i el catabolisme de lípids al fetge (Blair, 2017b).

1.3. Context de l'estudi

En estudis anteriors, al grup de recerca de la Dra. Alegret i el Dr. Laguna del Departament de Farmacologia, Toxicologia i Química Terapèutica va caracteritzar un model animal experimental de NAFLD que es basava en l'administració durant 3 mesos d'una dieta sòlida alta en greixos, però sense colesterol, complementada amb una solució de fructosa líquida (10% p/v) com a beguda a rates femelles *Sprague Dawley* (Velázquez et al., 2022).

Aquest nou model evita inconvenients que presenten altres tipus de models dietètics els quals imitaven dietes poc saludables en humans i causaven l'aparició de comorbiditats com l'obesitat, la resistència a la insulina i la diabetis de tipus 2, la dificultat de diferenciar un fetge gras simple de l'esteatohepatitis, i la necessitat d'esperar llargs períodes de temps per aconseguir canvis fisiopatològics al fetge dels animals.

L'objectiu del grup de recerca era d'aconseguir crear un model animal de NAFLD útil per la recerca d'una teràpia farmacològica efectiva per tractar els estats primerencs de la malaltia, l'esteatosi hepàtica simple sense inflamació. En estudis posteriors s'ha demostrat l'efectivitat de l'àcid bempedoic en aquest model, i actualment s'està estudiant l'efecte del pema fibrat i mirabegró.

En el meu Treball de Final de Grau, em centraré en uns resultats específics obtinguts a l'últim estudi, en què es comprovava l'eficàcia del pema fibrat.

1.4. Pema fibrat i nivells de TG sanguinis

En l'estudi esmentat, un dels primers paràmetres que es van valorar en finalitzar el protocol experimental (vegeu el disseny experimental a la secció 3.1), van ser els nivells de TG en sang.

Tal com podem veure a la **Figura 1**, en el nostre estudi els nivells de TG sanguinis en els animals sotmesos a la dieta HFD-HFr són significativament superiors als animals control, tal com s'havia descrit prèviament en treballs anteriors del grup en aquest mateix model. Per altra banda, les concentracions de TG en sang en els animals tractats amb pema fibrat són

significativament superiors a la dels animals del grup HFD-HFr. Aquest fet va ser un resultat sorprenent, ja que està demostrat que l'efecte del pema fibrat, almenys en la seva utilització clínica, és reduir la trigliceridèmia, degut a la seva capacitat d'activar el receptor PPAR- α , efecte associat l'augment del catabolisme de les lipoproteïnes riques en TG (Ginsberg et al., 2022).

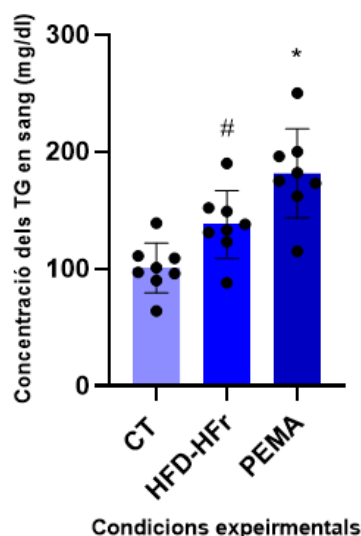


Figura 1. Concentració dels TG en sang de la cua de les rates en les tres condicions experimentals: grups Control (CT), Dieta High-Fat amb Fructosa (HFD-HFr) i tractament amb Pema fibrat (Pema). Els gràfics de barres mostren la mitjana $\pm$ SD dels grups (n=8), expressada en %. #indica diferències significatives entre HFD-HFr i el control amb un p-valor<0,05. *indica diferències significatives entre Pema i HFD-HFr amb un p-valor<0,05. Gràfic realitzat amb GraphPad Prism 8.0. Els resultats s'analitzen amb un model ANOVA i les comparacions múltiples utilitzant el Test de Sidak. (Font pròpia)

Aquests resultats tampoc no concorden amb estudis d'altres grups de recerca realitzats en ratolins i en rates *Sprague Dawley*, en els que s'observava una disminució significativa dels nivells dels TG plasmàtics, a més d'una disminució dels nivells d'insulina i glucosa plasmàtics (Araki et al., 2018) (Takizawa et al., 2013).

1.5. Mecanismes de modulació dels triglicèrids plasmàtics

Hi ha diverses causes possibles que podrien explicar els alts nivells de triglicèrids sanguinis en el nostre model dietètic de fetge gras en rata femella tractat amb pema fibrat.

Per una banda, podria ser a causa d'un augment en l'exportació de VLDL, ja que l'augment en sang d'aquestes lipoproteïnes dona lloc a un augment de les concentracions circulants de TG, provinents de l'esterificació d'AG al fetge (Soca et al., 2009).

D'altra banda, podria deure's a una disminució de la hidròlisi dels TG associats a lipoproteïnes i de la captació d'àcids grassos als teixits, a causa d'una disminució de l'expressió de proteïnes que indueixen o duen a terme la lipòlisi dels TG.

Per últim, una tercera possibilitat podria ser un augment en l'expressió de proteïnes inhibidores del metabolisme dels lípids que fan augmentar la trigliceridèmia.

1.5.1. Proteïnes relacionades amb l'exportació: MTTP i PNPLA3

Segons resultats anteriors obtinguts en aquest mateix estudi, els nivells de TG hepàtics es van veure significativament disminuïts amb el pemafibrat (resultat no mostrats). És per això, que es va plantejar la possibilitat que els TG hepàtics estaven disminuint perquè estaven sent exportats cap a la sang, causant hipertrigliceridèmia. Per comprovar-ho, caldria determinar els nivells de proteïnes relacionades amb l'exportació, com són la proteïna microsomal de transferència de triglicèrids (MTTP) i l'adiponutrina (ADPN), codificada pel gen *Pnpla3*.

El gen *Pnpla3* està ubicat al braç llarg del cromosoma 22 i codifica per la proteïna adiponutrina (43 kDa). Les variacions en l'expressió d'aquesta proteïna influeixen sobre el metabolisme energètic i dels lípids i, per tant, està involucrat en el desenvolupament de la patologia del fetge gras. L'adiponutrina és una lipasa que permet la hidròlisi de TG continguts a les gotes lipídiques dels hepatòcits, donant lloc a AG (Winberg et al., 2014) (Trépo et al., 2016).

Posteriorment, els AG obtinguts de la hidròlisi de les gotes lipídiques es reesterifiquen a TG, els quals són conjugats amb la proteïna apolipoproteïna B100 (Apo-B100) formant les VLDL. La proteïna que duu a terme la transferència de TG a les apolipoproteïnes i sintetitza VLDL madures és la subunitat gran de la proteïna microsomal de transferència de triglicèrids, codificada pel gen *Mttp*. MTTP transfereix colesterol lliure, fosfolípids, triglicèrids i èsters de colesterol a Apo-B100, permetent que aquesta apolipoproteïna assoleixi una conformació de pre-VLDL, que admet la fusió de gotes de TG, formant VLDL madures (Higuchi et al., 2011).

Per tant, tal com podem veure a la **Figura 2**, les proteïnes ADPN i MTTP són essencials per la lipidació de Apo-B100 i per la síntesi de les VLDL. Estudiar el seu nivell d'expressió és útil per confirmar si l'exportació de VLDL s'està veient augmentada.

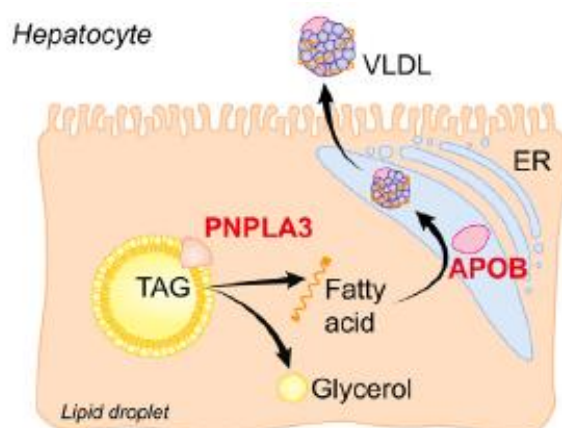


Figura 2. La proteïna ADPN (PNPLA3) hidrolitza els TG hepàtics, que donen lloc a AG i glicerol. Els AG són esterificats i es conjuguen amb Apo-B per formar els VLDL. Els VLDL s'exporten cap al torrent sanguini. (Trépo et al., 2016).

1.5.2. Proteïna UCP1 i la termogènesi

Una altra possible causa, que explicaria l'augment de TG plasmàtics en el nostre model en els animals tractats amb pemafibrat, seria una disminució de la captació de lípids circulants al teixit adipós marró que produiria una menor entrada d'àcids grassos a la via de la termogènesi.

La termogènesi és el procés mitjançant el qual el cos és capaç de generar calor. La producció de calor varia segons el teixit: en la major part de l'organisme es metabolitzen glúcids, lípids i proteïnes per obtenir calor; però en teixits específics, com el teixit adipós marró, té lloc la termogènesi facultativa o adaptativa. La termogènesi del teixit adipós marró pot ser induïda pel fred o la dieta, però en tots dos mecanismes està involucrada la proteïna desacobladora 1 (UCP1) (Del Mar Gonzalez-Barroso et al., 2000).

En estudis anteriors del nostre grup de recerca, ja es va demostrar que en el nostre model la termogènesi es veu incrementada gràcies a la dieta que s'administra a les rates, ja que aquesta és rica en àcid palmític i àcid esteàric. Durant la metabolització de l'àcid esteàric, aquest pateix una dessaturació i s'obté àcid oleic, el qual és un dels majors inductors de la termogènesi, a més de contrarestar els efectes proinflamatoris de l'àcid palmític (Velázquez et al., 2022).

La proteïna UCP1 (32 kDa), també coneguda com a proteïna desacobladora 1 de la fosforilació oxidativa o Uncoupling Protein 1, és una proteïna que s'expressa exclusivament a les membranes mitocondrials internes en el teixit adipós marró. Aquesta proteïna té un paper essencial en la termogènesi sense tremolor: la funció de la UCP1 és desacoblar la respiració cel·lular de la síntesi d'ATP, dissipant el gradient de protons en forma de calor en els mitocondris del teixit en qüestió (**Figura 3**). La UCP1 permet que els protons tornin a entrar la matriu evitant l'ATP sintasa (Cannon & Nedergaard, 2017) (Del Mar Gonzalez-Barroso et al., 2000) (Nedergaard et al., 2001).

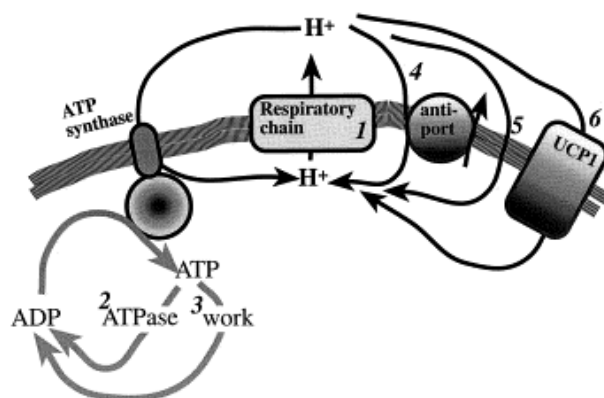


Figura 3. Respiració cel·lular desacoblada de la síntesi d'ATP gràcies a la funció de la UCP1 (Nedergaard et al., 2001).

Els diferents subtipus de PPAR regulen l'expressió de les proteïnes desacobladores 1, 2 i 3 (Panadero et al., 2008). El gen UCP1 està sota el control dual de PPAR- α i PPAR- γ en relació amb l'oxidació de lípids i la diferenciació a adipòcit marró, respectivament. El gen de la UCP1 és induït principalment per PPAR- α en adipòcits marrons madurs, produint l'activació de la termogènesi en BAT, la qual és mediada per vies dependents de cAMP i que indueix a la

lipòlisi dels TG emmagatzemats. S'ha observat que PPAR- γ no és essencial per l'expressió del gen UCP1 en adipòcits marrons ja diferenciats (Villarroya et al., 2007).

Els AG utilitzats en la termogènesi poden derivar de diferents fonts: de la lipòlisi de TG endògens del teixit adipós, de la lipòlisi dels TG plasmàtics transportats per les VLDL (via LPL) o els AG lliures de la sang. Per tant, una major expressió de la UCP1 al BAT indicaria un augment de la termogènesi, que podria promoure l'entrada de TG en aquest teixit i, finalment, donar lloc a la reducció dels TG plasmàtics.

1.5.3. Proteïna LPL i la hidròlisi de triacilglicèrids

La lipoproteïna lipasa (LPL) és un enzim que hidrolitza els TG de les lipoproteïnes, com poden ser els quilomicrons (QM) i les proteïnes de molt baixa densitat (VLDL), i els descompon a àcids grassos lliures (AG) i 2-monoacilglicerol. Aquestes lipoproteïnes són estructures que transporten diversos tipus de lípids per tot l'organisme, primer a nivell limfàtic i després per la sang, alliberant els lípids a diferents teixits.

La funció de la LPL és extreure els TG que circulen per la sang associats a les esmentades lipoproteïnes i degradar-los. A més, aquesta lipasa promou la captació dels àcids grassos lliures resultants de la hidròlisi als teixits, d'aquesta manera els AG captats es poden utilitzar com a reserva o com a font d'energia (Moreno, 2012).

La proteïna LPL es troba en la superfície interna dels vasos sanguinis o endoteli; i està present a pràcticament tots els teixits, presentant més activitat al teixit adipós, al cor al múscul esquelètic i a les glàndules mamàries durant la lactància. La seva síntesi depèn exclusivament d'un únic gen que codifica per un homodímer que serà glicosilat al reticle endoplasmàtic, quan la seva expressió es vegi induïda per l'activació del receptor PPAR- α (Mead et al., 2002). L'apolipoproteïna C-II (Apo C-II) és un component proteic de les VLDL que actua com a cofactor de la LPL, activant la seva funció lipasa (Kinnunen et al., 1977) (Kim et al., 2006).

1.5.4. Proteïna Angiopoietin-like 3

Per últim, un augment en l'expressió de proteïnes inhibidores del metabolisme dels lípids podria ser la causa de la hipertrigliceridèmia. Les lipoproteïnes riques en TG alliberen àcids grassos als teixits gràcies a l'acció de la LPL, la qual està regulada per diversos enzims.

Un inhibidor fisiològic de l'enzim lipoproteïna lipasa és l'apolipoproteïna C-III, que és sintetitzada al fetge i a l'intestí (Berroeta & Davidsson, 2012). En els experiments duts a terme prèviament al grup de recerca, es va observar que els nivells d'expressió de la proteïna disminuïen en els animals tractats amb pemafibrat. Per aquesta raó, es va descartar aquest inhibidor fisiològic del metabolisme dels lípids com a possible causa d'hipertrigliceridèmia. Aquests resultats no estan inclosos perquè no formen part del meu treball.

La LPL també està regulada per una sèrie de proteïnes extracel·lulars semblants a l'angiopoietina, que es coordinen per modular el metabolisme dels lípids. La família de les proteïnes semblants a l'angiopoietina (ANGPTL) s'anomena així a causa de la seva similitud estructural a aquesta proteïna; però a diferència de l'angiopoietina, les proteïnes ANGPTL no contribueixen a l'angiogènesi. Actualment, aquesta família està composta per vuit membres, dels quals l'ANGPTL 3, 4 i 8 contribueixen al metabolisme dels TG (Sylvers-Davie et al., 2021). Es va escollir la ANGPTL3 per l'estudi, perquè és l'única que es produeix exclusivament al fetge, al contrari que la ANGPTL4 que s'expressa en nombroses cèl·lules i teixits, com el teixit adipós, al fetge, al múscul esquelètic, al cor, a l'intestí i en macròfags (Kersten, 2017).

L'angiopoietin like-3 (ANGPTL3) és una proteïna que s'expressa i es segrega al fetge i circula pel torrent sanguini. L'ANGPTL3 circulant té la funció d'interaccionar amb la LPL a la vasculatura, inhibint la seva activitat lipasa i reduint l'eliminació de partícules de lipoproteïnes riques en TG. En diversos estudis s'ha observat un augment dels TG plasmàtics a causa d'una sobreexpressió o injecció d'ANGPTL3 i una reducció d'aquests lípids quan ANGPTL3 es troba inactivada (Koishi et al., 2002) (Ono et al., 2003).

2. HIPÒTESI I OBJECTIUS

En aquest treball s'han analitzat els efectes del pema fibrat en un model dietètic de fetge gras en rata femella, que es basa en l'administració d'una dieta rica en greix suplementada amb fructosa en l'aigua de beguda.

L'objectiu principal del treball és determinar per quin motiu el pema fibrat no és efectiu reduint els nivells de TG sanguinis en el nostre model. La nostra hipòtesi és que pot ser degut a un augment en l'exportació de lipoproteïnes i/o a la reducció de la hidròlisi dels TG associats a lipoproteïnes.

Objectius específics:

1. Determinar els nivells de proteïnes relacionades amb l'exportació (MTTP i ADPN) per comprovar si l'exportació de VLDL es veu augmentada a causa del pema fibrat.
2. Determinar els nivells de la proteïna UCP1 en BAT per saber si la termogènesi s'ha vist disminuïda en els animals tractats amb pema fibrat.
3. Determinar els nivells d'expressió del gen de la LPL al fetge com a indicador de la lipòlisi dels TG sanguinis.
4. Determinar els nivells d'expressió de l'ANGPTL3 per comprovar si l'activitat de la proteïna LPL està sent inhibida per l'acció del pema fibrat.

3. METODOLOGIA

3.1. Disseny experimental

En aquest estudi s'han utilitzat mostres obtingudes de 24 rates femelles de la soca *Sprague Dawley*. En el moment d'arribar, les rates tenien vuit setmanes d'edat. Van ser assignades aleatòriament a tres grups diferents (n=8), com es descriu a continuació, i es van mantenir amb unes condicions constants d'humitat (40-60%) i temperatura (20-24°C). Es van col·locar per parelles en gàbies que tenien un cicle de llum-fosc de 12 hores.

Es van estudiar tres condicions experimentals:

- La primera condició és el grup control (CT), en el qual les rates van ser alimentades amb una dieta estàndard per rosegadors.
- La segona condició és el grup de rates que van ser alimentades amb una dieta rica en greix, sense colesterol, i aigua de beguda suplementada amb fructosa al 10% p/v (HFD-HFr, high fat diet - high fructose). Aquesta dieta té l'objectiu d'induir la primera fase del fetge gras, caracteritzada per l'esteatosi sense inflamació, mitjançant un augment en la ingesta d'AG i un augment de la seva síntesi (DNL) introduint fructosa en la dieta (Velázquez et al., 2022).
- L'última condició estudiada en aquests experiments és el grup tractat amb el fàrmac pemafibrat (Pema). Aquest grup de rates van rebre la dieta HFD-HFr i en l'últim mes de tractament se'ls va administrar pemafibrat, juntament amb la dieta, a la dosi d'1 mg/kg.

Els tractaments van tenir una durada total de tres mesos, durant els quals l'aigua i el pinso de les gàbies es va canviar cada dos dies. Al llarg de tot el tractament es va portar un control del consum d'aliments sòlids i líquids tres cops per setmana i el pes corporal dels animals un cop per setmana.

Passats els tres mesos, els animals van ser sacrificats. Primerament, es van deixar dues hores en dejú i es van extreure mostres de sang de la cua. Posteriorment, van ser anestesiats amb una dosi combinada de 40 µg de xilacina i 9 mg de ketamina per cada 100 g de pes; van ser sacrificats per exsanguinació; i els seus teixits es van extreure, pesar i congelar per parts amb nitrogen líquid. Finalment, es van conservar a -80°C.

Tots els procediments experimentals que implicaven animals van ser aprovats pel Comitè Ètic de la Universitat de Barcelona (198/21).

3.2. Extracció de proteïnes del BAT i del fetge

Per extraure les proteïnes de les mostres de teixit de BAT i de fetge, es pesen entre 80-100mg de teixit i es col·loquen en un tub Eppendorf que conté 3 beads d'acer. Després, per cada 100mg de teixit s'afegeix 0,5 ml de tampó d'extracció, el qual està format per: HEPES 30 mM pH=7,4, NaCL 150 mM, glicerol 10%, Triton X-100 1%, deoxicolat de sodi 0,5% (DOC), inhibidors de proteases i inhibidors de fosfatases.

Els tubs es col·loquen a l'aparell TissueLyser II durant 5 min a 50 Hz. Aquest aparell facilita l'extracció disgregant el teixit mitjançant l'agitació de les mostres a altes velocitats en tubs Eppendorf que contenen els beads d'acer. L'homogenat obtingut gràcies als xocs que exerceixen els beads sobre el teixit es transfereix a un tub Eppendorf de 1,5ml i es centrifuga a 13.300 rpm durant 15 min a 4°C.

Posteriorment, es separa l'extracte proteic (fase vermellosa) de l'extracte lipídic (fase blanquinosa) que quedarà a la superfície. Es transfereix el sobrenedant a un nou Eppendorf de 1,5 ml que es guardarà a -20°C fins al seu ús i es descarta el pel·let.

3.3. Assaig de Bradford

L'assaig de Bradford és una tècnica colorimètrica que serveix per determinar la quantitat proteica total d'una mostra. Es basa en la variació de l'absorbància produïda pel canvi de color del reactiu Blau Brillant de Coomassie quan interacciona amb els aminoàcids bàsics i aromàtics de les proteïnes mitjançant unions per forces de Van der Waals i interaccions hidrofòbiques. El pic d'absorció del colorant es desplaça de 470 nm a 595 nm perquè el reactiu es converteix en la seva forma desprotonada i adopta una coloració blava. La intensitat del color blau i la quantitat de proteïna de la mostra estan correlacionades positivament (Compton & Jones, 1985).

Per transformar els valors d'absorbància en valors de quantitat total (U.A.), es realitza una recta patró amb diferents quantitats conegudes de la proteïna albúmina sèrica bovina (BSA): 1, 2, 3, 4, 5 i 6 µg; a partir d'una solució mare de BSA 1 g/ml.

En experiments anteriors del grup de recerca s'havia establert que la dilució òptima per les mostres era una dilució 1/50. El procés experimental consisteix a pipetejar 10 µl de les mostres problema o de les dilucions de BSA en una placa de 96 pous (MW96), fent duplicats de totes les mostres i del blanc. Posteriorment, s'afegeix a cada pou 190 µl de reactiu de Bradford prèviament diluït 1/5 i es determina l'absorbància de la placa a 595 nm.

Els resultats del mètode de Bradford ens indiquen que el contingut proteic de les mostres ha estat el mostrat a l'**Annex I, Taula 2a i Taula 2b**. Per calcular les concentracions s'ha tingut en compte el volum en què es va afegir la quantitat corresponent (10 µl).

3.4. Western Blot

El Western blot és una tècnica quantitativa que s'utilitza per analitzar la concentració d'una proteïna determinada en diferents mostres biològiques. Aquesta tècnica consisteix a la separació de les proteïnes d'una mostra en un gel de poliacrilamida amb SDS segons el seu pes molecular i la posterior transferència a una membrana on s'incubaran els anticossos, amb l'objectiu de visualitzar la proteïna al revelatge.

3.4.1. Preparació dels gels SDS-PAGE

L'electroforesi es duu a terme sobre un suport inert SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis), el qual és un gel de poliacrilamida desnaturalitzant. Aquest està format per dos gels diferents: el gel concentrador (stacking gel), que concentra la mostra en el mateix punt per tal que corrin totes les proteïnes a la vegada; i el gel separador (running gel), que separa les proteïnes de la mostra segons el seu pes molecular.

El persulfat d'amoni (PSA) i la tetrametilenediamina (TEMED) permeten la polimerització de l'acrilamida en forma de cadenes lineals, la bisacrilamida dona lloc a punts de ramificació del polímer. La mida dels porus del polímer depenen del percentatge de poliacrilamida usat.

Com que la proteïna UCP1 pesa 32 kDa, es va preparar un gel de concentració al 5% i un gel de separació al 12% de poliacrilamida. En canvi, la proteïna ADPN pesa 43 kDa, i per això es va preparar un gel concentrador del 4% i un gel separador del 10% de poliacrilamida. Els volums dels reactius utilitzats per la preparació de 4 gels de 1,5 mm de gruix són els mostrats a l'**Annex II, Taula 3a i Taula 3b**.

En primer lloc, es munten els vidres i es prepara el gel separador, que es deixa polimeritzar 20 minuts. Posteriorment, es prepara el gel concentrador i es col·loquen les pintes per tal que es formin els pous on carregarem les mostres. Així, el gel concentrador polimeritzarà sobre el gel separador.

3.4.2. Preparació de les mostres

Les mostres són tractades en condicions desnaturalitzants amb agents químics que s'encarreguen de trencar les estructures tridimensionals de les proteïnes. El tampó de càrrega (SB 2x) conté:

- SDS (dodecilsulfat sòdic): Desnaturalitza les proteïnes fins a la seva estructura primària i les recobreix de càrregues negatives.
- β -mercaptoetanol: Trenca els ponts disulfur de les proteïnes (les redueix).
- Glicerol: Augmenta la densitat de les mostres, així cauen dins del pou al carregar-les.

- Blau de bromofenol: Facilita el procés de carregar les mostres, ja que les fa visibles, i marca el front de migració durant l'electroforesi.

A més a més del SDS i el β -mercaptoetanol, s'afavoreix la desnaturalització de les proteïnes escalfant-les mostres durant 5 minuts a 100°C en un bany sec.

A partir de les concentracions proteiques de les mostres obtingudes mitjançant l'assaig de Bradford previ, es calcula la quantitat de mostra que cal pipetejar en cada cas per tenir la mateixa 10 μ g de proteïna en cada pou. Sabent que el volum total escollit són 24 μ l i que la meitat d'aquest volum estarà format per SB 2x (12 μ l), hem de calcular el volum de Tris-HCl 50mM pH=7,5 que queda per arribar al volum total a carregar. Els volums de cada component per carregar dos pous (més un pou extra) estan disponibles a l'**Annex II, Taula 4a i Taula 4b**.

3.4.3. Electroforesi en gels SDS-PAGE

L'electroforesi en gels SDS-PAGE separa les proteïnes segons el pes molecular i corren juntament amb un marcador de pes molecular que ens permet relacionar les bandes de les mostres amb el seu pes molecular. Es col·loquen els gels a una cubeta d'electroforesi amb tampó de migració i es connecta a una font de corrent a un voltatge constant de 100V, fins que l'amperatge s'estabilitza a 36mA. L'electroforesi es deixa córrer uns 120 min aproximadament, i s'atura quan el front blau ha desaparegut per complet i les primeres bandes del marcador de pes molecular han arribat a la part inferior del gel.

3.4.4. Transferència per electroblotting

Les proteïnes es transfereixen a una membrana PVDF (6x9 cm) perquè els gels de poliacrilamida són molt dèbils i costa treballar amb aquest material. Les membranes són activades amb metanol durant 1 min perquè les proteïnes s'hi puguin unir.

La transferència es duu a terme mitjançant la tècnica d'electroblotting, que es basa en l'aplicació d'un camp elèctric horitzontal de 200mA durant 2 hores, que transfereix les proteïnes del gel a la membrana. Cada gel de poliacrilamida es posa en contacte amb una membrana formant un "sandwich" de transferència. Els "sandwich" es submergeixen en un tampó de transferència, que és una solució conductora, dins d'una cubeta. Les membranes que s'obtenen tenen totes les proteïnes que estaven prèviament als gels de poliacrilamida.

3.4.5. Immunodetecció de proteïnes

En primer lloc, s'han de bloquejar els llocs d'unió inespecífics amb 5 ml de Palex, llet o BSA al 5% en TBS-Tween 0,1% durant 1 hora. En segon lloc, les membranes s'incuben amb un anticòs primari que reconegui la proteïna problema over-night a 4°C. L'endemà, les membranes s'incuben durant 1 hora a temperatura ambient (TA) amb un anticòs secundari

marcat amb HRP (Peroxidasa de rave) que s'uneix a l'anticòs primari, formant un complex ternari (**Annex II, Taula 5**). Aquest mètode d'immunodetecció s'anomena detecció indirecta.

A més, utilitzem un control de càrrega, com per exemple la β -tubulina o la vinculina, que s'expressen homogèniament en tots els grups de tractament. La proteïna de control de càrrega ens assegura que hem carregat la mateixa quantitat de mostra a cada pou, i, en cas que no sigui així, ens permet normalitzar els valors de la proteïna problema amb els valors de la proteïna control de cada una de les mostres individualment, ja que la seva expressió no es modifica en cap condició de tractament.

Entre incubacions, les membranes s'han de rentar 3 vegades en TBS-Tween durant 5 min per eliminar les restes de l'anticòs primari que no s'ha unit a la membrana. En acabar la segona incubació, es fan 3 rentats de nou per eliminar l'excés d'anticòs que no s'ha unit a la membrana.

3.4.6. Revelatge de proteïnes amb Amersham™ Imager 680

L'Amersham™ Imager 680 és un aparell que permet la immunodetecció de les proteïnes utilitzant una solució de detecció. La solució de detecció es prepara barrejant 1ml del Reactiu 1 (Peroxide Solution) i 1 ml del Reactiu 2 (Luminol Enhancer Solution) per produir un volum final suficient per cobrir tota la superfície de la membrana.

Com ja he comentat, l'anticòs secundari té una etiqueta enzimàtica que és la peroxidasa de rave (HRP). Aquest enzim és capaç de catalitzar l'oxidació d'una gran quantitat de substrats orgànics i inorgànics quimioluminiscent, reduint H_2O_2 i produint senyals detectables (Li et al., 2008).

3.4.7. Anàlisi per densitometria

Podrem semiquantificar qualitativament l'expressió de la proteïna problema amb les imatges obtingudes amb l'aparell Amersham™ Imager 680. Aquestes imatges són analitzades per densitometria mitjançant el programa Image Lab. En funció de la intensitat de la banda detectada, sabrem si la proteïna s'expressa més o menys en cada grup de tractament.

3.5. Extracció de mRNA del fetge

L'extracció de mRNA es duu a terme amb el reactiu TRIsure (també anomenat TRIzol) que permet aïllar l'mRNA del DNA i les proteïnes del teixit hepàtic. Les propietats inhibidores de la RNases que posseeix TRIsure protegeixen l'RNA durant la lisi.

En primer lloc, es disgreguen entre 100 i 150 mg de teixit en 1ml de TRIsure a 50Hz mitjançant l'aparell TissueLyser II. S'afegeixen 200 μ l de cloroform a cada tub i es deixen en agitació durant 15 min. S'incuben els tubs a TA durant 3 minuts i es centrifuguen a 12.000 g durant 15

min a 4°C. La mostra biològica es separarà en tres fases: fase aquosa (superior), fase orgànica (inferior) i la interfase. El mRNA es trobarà a la fase aquosa, la qual es transfereix a un nou tub Eppendorf, on s'afegeix 500 µl d'isopropanol. S'incuben les mostres a TA durant 10 min i, posteriorment, es centrifuguen a 12.000 g durant 10 min.

Seguidament, descartem el sobrenedant i rentem el pellet, que conté el mRNA sense reactius, resuspenent-lo amb 1ml d'etanol al 75%. S'agita amb el vòrtex i es centrifuga a 7.500 g durant 5 min a 4°C. El procés de rentat es repeteix dues vegades. Es torna a descartar el sobrenedant i es deixa assecar el pellet sota la campana durant 20 min. Per últim, es resuspen el pellet amb 30 µl d'H₂O lliure de RNAses. Les mostres de mRNA obtingudes de l'extracció s'incubaran a 60°C durant 10 min al bany maria i es guardaran a -80°C fins que s'hagin d'utilitzar.

3.6. Quantificació de la concentració de mRNA

Per quantificar el mRNA, utilitzem un espectrofotòmetre anomenat NanoDrop que mesura l'absorbància a 260 nm, que és la longitud d'ona a la qual absorbeix l'àcid ribonucleic. A més, l'aparell també mesura les relacions d'absorbància entre 260/280 i 260/230, que determinen la puresa de la mostra. L'absorbància 260/280 s'utilitza per comprovar el nivell de contaminació de les mostres; valors entre 1,7 i 2 indicarien que la mostra és pura i valors superiors a 2 indiquen una concentració òptima de mRNA. L'absorbància 260/230 també indica la puresa de la mostra; valors inferiors a 1,5 indicarien la presència de contaminants (Bunu et al., 2020).

3.7. Reverse Transcription - Quantitative PCR (RT-qPCR)

3.7.1. Transcripció reversa de les mostres de mRNA (RT)

La transcripció reversa és una tècnica que es permet generar una cadena DNA de doble cadena anomenat DNA complementari (cDNA) a partir d'una cadena senzilla de mRNA motlle, mitjançant l'enzim retrotranscriptasa o transcriptasa inversa.

En primer lloc, les mostres són diluïdes en funció dels resultats obtinguts al Nanodrop amb aigua milli-Q autoclavada i tractada amb pirocarbonat de dietil (DEPC), el qual és un inhibidor de nucleases que desactiva les RNAses que poden estar presents a l'aigua. Es fa una dilució de 150 ng/µl de les mostres de mRNA en un volum final de 20 µl. Cal carregar 3 µg de mostra en cada Eppendorf de 0,6 ml i afegir aigua DEPC per completar el volum de 11,25 µl.

La resta del volum fins arribar a 20 µl està formada per diversos components, que han d'estar presents a la mescla perquè tingui lloc l'amplificació:

- Mix 1: Volum total per pou = 1,25 µl

- Random Hexamers: actuen com a encebadors o primers per la funció de la DNA polimerasa.
- dNTP mix 10 nM: desoxinucleòtids trifosfat.
- Mix 2: Volum total per pou = 7,5 µl
 - Tampó 5X de reacció.
 - DTT 0,1 mM (ditiotreitòl): estabilitza la RNAsa OUT.
 - RNAsa OUT 40 U/µl: té la funció d'eliminar totes les RNAses.
 - Transcriptasa reversa 200 U/ µl.

Continuant amb el procediment, després de diluir les mostres, es prepara el Mix 1 i s'afegeix 1,25 µl a cada Eppendorf. Es centrifuguen les mostres durant 30 segons per fer baixar el volum al fons del tub i es col·loquen al termociclador. Aquest aparell duu a terme la transcripció reversa, realitzant diversos cicles d'amplificació de DNA. Abans que l'aparell arribi a la segona etapa, s'atura el procés i es col·loquen les mostres en gel durant 5 minuts, per aturar la reacció disminuint la temperatura dels tubs. Posteriorment, es prepara el Mix 2 i es pipeteja 7,5 µl a cada un dels Eppendorfs. Es tornen les mostres al termociclador, perquè pugui continuar amb les següents etapes. Un cop acaba la retrotranscripció, s'emmagatzemen les mostres de cDNA a -20°C.

3.7.2. Amplificació de les mostres de cDNA per PCR quantitativa (qPCR)

3.7.2.1. Context de la tècnica

La PCR quantitativa o a temps real (qPCR) és una variant de la PCR en la qual s'amplifica i es quantifica simultàniament el producte que es va acumulant, utilitzant fluoròfor que permetrà detectar els productes de PCR. En el nostre cas, detectem el DNA generat a la PCR gràcies al Sybr Green, que s'uneix a la doble cadena interaccionant amb el solc menor del DNA (Zhang et al., 2015). Com més producte de PCR s'acumuli més senyal de fluorescència serà captada pels detectors del termociclador.

En una RT-qPCR, depenent de la concentració inicial de cDNA faran falta més o menys cicles de PCR per arribar a un nivell determinat de fluorescència, el *cycle threshold* o llindar de cicles. La quantificació del gen d'interès es fa de forma relativa a un gen *housekeeping* o gen de referència que s'expressarà de la mateixa manera a totes les mostres.

Durant tot el procediment es treballa en condicions d'esterilitat, utilitzant puntes, tubs Eppendorf i aigua milli-Q autoclavada. D'aquesta manera ens assegurem que no es produeixin contaminacions que afectin la reacció de la PCR.

3.7.2.2. Preparació de les mostres de cDNA

Un cop acabada la retrotranscripció tenim unes mostres amb una concentració de 150 ng/μl de cDNA. Haurem de preparar dilucions de les mostres per tenir una concentració de 2,5 ng/μl. Per fer-ho es pipetegen 7,5 μl de les mostres mare de cDNA i s'afegeixen 443,5 μl d'aigua milli-Q autoclavada.

A més, haurem de calcular quin volum de mostra s'afegeix als pous: com que a cada pou volem afegir 10 ng de mostra i la concentració d'aquestes és de 2,5 ng/μl, a cada pou es pipetegen 4 μl de cDNA.

3.7.2.3. Preparació dels reactius

Per començar, es prepara una dilució 1/10 dels primers forward i reverse (**Annex III, Taula 6**) amb aigua milli-Q autoclavada tractada amb DEPC. Es pipetegen 20 μl de cada un dels primers en un volum final de 200 μl.

Després, es prepara el Sybr complet amb 12,5 μl de Sybr Green i 0,05 μl de ROX (carboxiroadamina), la qual evita les unions inespecífiques del Sybr Green, per cada un dels pous. Per últim, prepararem el mix de PCR en un Eppendorf de 1,5 μl amb els volums indicats a la **Taula 1** per tenir un volum final de 25 μl. La preparació de la placa es realitza en gel per evitar que les mostres es facin malbé.

Reactius		Volums per pou	
Mix	Sybr Complet	12,55 µl	21 µl
	Primers (1/10)	0,75 µl	
	H ₂ O milli-Q autoclavada	7,70 µl	
Mostra cDNA 2,5 ng/µl		4 µl	
Volum final per pou		25 µl	

Taula 1. Volums dels reactius que cal pipetejar a cada pou de la placa de PCR.

3.7.2.4. Procediment

Es pipetegen els volums corresponents de cada reactiu a una placa de PCR que té 96 pous. Posteriorment, s'addiciona la mostra corresponent en cada pou per duplicat. A més, es fan dos blancs en els quals s'afegeix H₂O milli-Q en comptes de mostra com a control negatiu, que esperem que no amplifiqui res.

Finalment, es segella la placa amb un film de plàstic per evitar l'evaporació dels reactius durant la reacció, es centrifuga a 1200-1500 rpm durant 1 minut per assegurar-nos que tot el volum està al fons del pou i posem la placa al termociclador.

Tot aquest procés es repeteix utilitzant els primers que amplifiquen el gen de referència, que en el nostre cas és l'actina. Durant tot el procediment es treballa en condicions d'esterilitat, per assegurar-nos que no es produeixen contaminacions que afectin la reacció de la PCR.

3.7.3. Anàlisi dels resultats de la RT-qPCR

Un cop acabada la PCR, els nivells de mRNA es calculen pel mètode de $2^{-\Delta\Delta C_t}$, utilitzant la *β -actina* com a gen control per normalitzar els resultats.

3.8. Kit ELISA per detectar la proteïna ANGPTL3

La determinació quantitativa de la concentració de la proteïna ANGPTL3 de rata en sèrum es realitza mitjançant un kit ELISA tipus Sandwich. La microplaca ELISA proporcionada per aquest kit havia estat recoberta prèviament amb anticossos específics contra ANGPTL3.

3.8.1. Preparació dels reactius

Es prepara el Wash Buffer, la Standard working solution, la Biotinylated Detection Ab working solution i la Concentrated HRP Conjugate working solution a partir de les solucions mare i els diluents proveïts pel fabricant, tenint en compte el volum necessari de cada una varia segons el nombre de pous de la placa que cal omplir. Un cop es preparen els reactius, es guarden a 4°C. Quan calgui utilitzar-los, s'han de deixar temperar durant 15 min.

3.8.2. Procediment

Els estàndards (corba estàndard) i les mostres s'afegeixen als pous de la placa. Es segella la placa amb un plate sealer i s'incuba durant 90 min a 37°C. D'aquesta manera, les proteïnes dels estàndards o de les mostres es combinen amb l'anticòs específic que està ancorat al pou.

Després, es buiden els pous i s'afegeix 100 µl dels anticossos específics biotinilats contra ANGPTL3 de rata. Es torna a segellar la placa i s'incuba 1 hora a 37°C. Un cop acabada la incubació, es treu la solució de cada pou i s'afegeix 350 µl de Wash Buffer per dur a terme els rentats. Es remullen els pous durant 1-2 min i es retira la solució donant cops amb la placa sobre un paper net. Es repeteixen els rentats dues vegades més per eliminar els components lliures.

Posteriorment, s'afegeix 100 µl del conjugat HRP a cada un dels pous i s'incuba 30 min a 37°C. Després de la incubació es realitzen 5 rentats més. S'afegeix a cada pou 90 µl de la

solució del substrat i s'incuba la placa 15 min a 37°C protegida de la llum. Només els pous que contenen ANGPTL3 de rata, anticossos de detecció biotinilats i conjugat HRP apareixeran de color blau. Segons el canvi de color, es pot allargar aquesta última incubació fins a un màxim de 30 min.

Finalment, la reacció enzim-substrat s'acaba amb l'addició de solució de parada (Stop solution) i el color dels pous es torna groc. Per quantificar la concentració de la proteïna problema a cada un dels pous, es mesura espectrofotomètricament a una longitud d'ona de 450 nm la densitat òptica (DO). Es pot calcular la concentració de la proteïna a les mostres comparant la DO de les mostres amb la corba estàndard, ja que el valor de DO és proporcional a la concentració de la proteïna ANGPTL3.

3.9. Anàlisi estadística

Utilitzant el programa GraphPad Prism 8.0, amb el que també es van elaborar les gràfiques, es va realitzar l'anàlisi estadística de les dades obtingudes utilitzant un test ANOVA, fent les comparacions múltiples amb el test de Sidak. Es van assumir diferències significatives amb p-valors < 0,05.

4. RESULTATS I DISCUSSIÓ

4.1. Nivells de les proteïnes relacionades amb l'exportació de VLDL

4.1.1. Nivells de la proteïna ADPN al fetge

Tal com mostra la **Figura 6.B**, s'observa un augment significatiu de la quantitat total de la proteïna ADPN en la condició HFD-HFr respecte a la situació CT. En els animals tractats la quantitat total d'aquesta proteïna problema no presenta diferències significatives respecte al grup amb una dieta rica en greix.

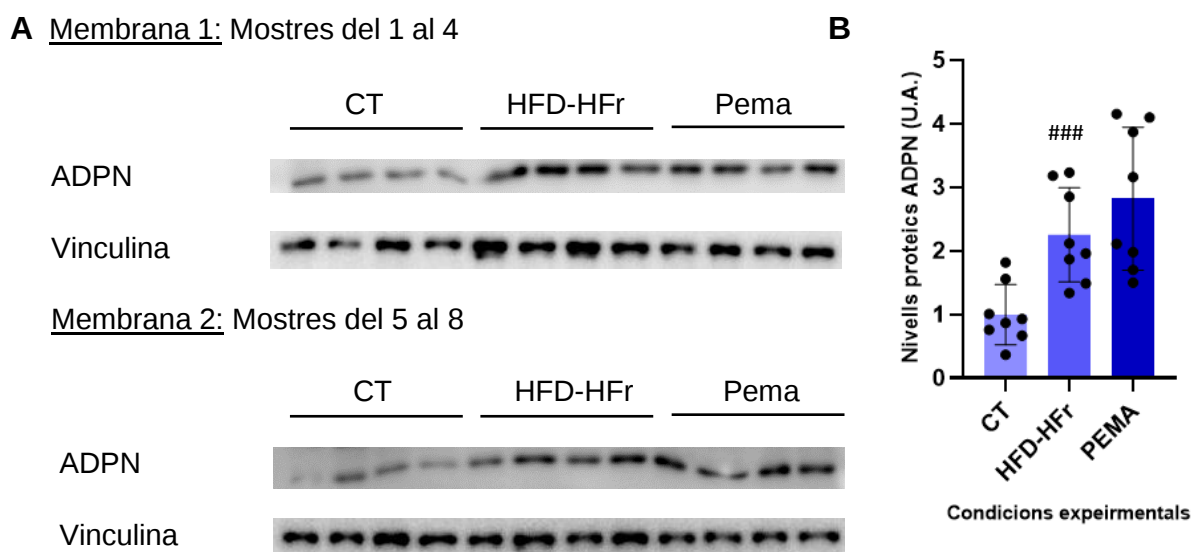


Figura 6. Anàlisi dels nivells de la proteïna ADPN (U.A.) en les mostres de fetge dels grups Control (CT), Dieta High-Fat amb Fructosa (HFD-HFr) i tractament amb Pemafibrat (Pema), mitjançant la tècnica de Western blot. **A.** Membranes revelades amb anticossos anti-ADPN i anti-Vinculina (control de càrrega) de les mostres de fetge (n=8). **B.** Gràfics de barres mostren la mitjana $\pm$ SD dels grups (n=8), expressada en unitats arbitràries (U.A.). ### indica diferències significatives entre el grup HFD-HFr i el grup CT amb un p-valor < 0,001. Gràfic realitzat amb GraphPad Prism 8.0. Els resultats s'analitzen amb un model ANOVA i les comparacions múltiples utilitzant el Test de Sidak. (Font pròpia)

L'increment de l'ADPN a causa de la dieta HFD-HFr ja s'havia descrit anteriorment en experiments del mateix grup de recerca en els que s'havia analitzat els nivells d'expressió del gen *Pnpla3* i el contingut de proteïna al fetge (Velázquez et al., 2022).

El pemafibrat no l'incrementa, per tant, podem suposar que el fàrmac no està afectant la hidròlisi dels TG hepàtics respecte al grup HFD-HFr i l'increment de TG a la sang no és causat per canvis en la modulació d'aquesta proteïna.

4.1.2. Nivells del gen *Mttp* al fetge

Segons els resultats mostrats a la **Figura 7** No hi ha diferències significatives entre les tres condicions experimentals, és a dir, els nivells d'expressió del gen *Mttp* no es veuen modificats a causa dels canvis en la dieta o el tractament.

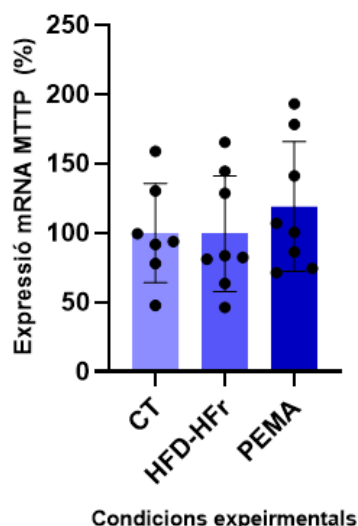


Figura 7. Nivells d'expressió de mRNA que codifica per la proteïna MTTP en les mostres de fetge dels grups Control (CT), Dieta High-Fat amb Fructosa (HFD-HFr) i tractament amb Pemafibrat (Pema), analitzades mitjançant RT-qPCR. Els gràfics de barres mostren la mitjana $\pm$ SD dels grups (n=8), expressada en %. Gràfic realitzat amb GraphPad Prism 8.0. Els resultats s'analitzen amb un model ANOVA i les comparacions múltiples utilitzant el Test de Sidak. (Font pròpia)

Aquest resultat suggereix que no hi ha una major transferència dels TG reesterificats cap a les apolipoproteïnes, i que la síntesi i exportació de VLDL no s'estan veient incrementades a causa del pemafibrat. Això concorda amb un estudi amb ratolins mascles en què s'estudiava l'eficàcia del pemafibrat per atenuar la hipertrigliceridèmia causada per una dieta rica en greix. L'expressió hepàtica del gen *Mttp* no es va veure incrementada per aquest modulador de PPAR- α , però sí que es va veure augmentada significativament en els animals tractats amb un altre fibrat: el fenofibrat, un modulador de receptors activats per proliferadors peroxisòmics molt més dèbil (Sairyo et al., 2018).

Un estudi realitzat també amb ratolins mascles de 8 setmanes d'edat mostrava que els nivells de mRNA dels gens implicats en la secreció de VLDL no van variar amb l'administració de pemafibrat a diferents dosis (a una dosi clínicament rellevant i a una dosi relativament alta) (Zhang et al., 2022).

Els resultats indiquen que no hi ha un increment de l'ADPN ni de l'expressió de la proteïna MTTP. És a dir, la hipertrigliceridèmia observada en el nostre model dietètic de fetge gras en rata femella tractat amb pemafibrat no és causada per canvis en la modulació de proteïnes relacionades amb l'exportació de VLDL.

4.2. Nivells de la proteïna UCP1 en BAT

Es van analitzar els nivells de la proteïna UCP1, implicada en la inducció de la termogènesi. Els resultats de la **Figura 8.B** mostren que l'increment de la UCP1 en el grup patogènic (HFD-HFr) no és significatiu respecte al grup control, ja que el p-valor és superior a 0,05. També podem observar que no hi ha diferències significatives entre el grup patològic (HFD-HFr) i el grup tractat (Pema).

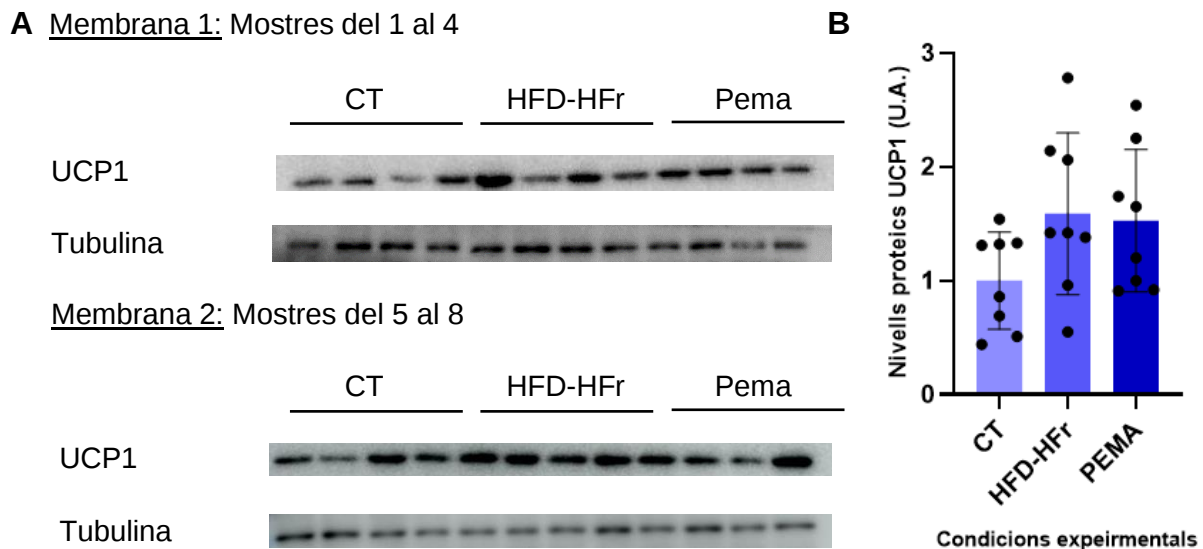


Figura 8. Anàlisi dels nivells de la proteïna UCP1 (U.A.) en les mostres de fetge dels grups Control (CT), Dieta High-Fat amb Fructosa (HDF-HFr) i tractament amb Pemafibrat (Pema), mitjançant la tècnica de Western blot. **A.** Membranes revelades amb anticossos anti-ADPN i anti- β -tubulina (control de càrrega) de les mostres de fetge (n=8). **B.** Gràfics de barres mostren la mitjana $\pm$ SD dels grups (n=8), expressada en unitats arbitràries (U.A.). Gràfic realitzat amb GraphPad Prism 8.0. Els resultats s'analitzen amb un model ANOVA i les comparacions múltiples utilitzant el Test de Sidak. (Font pròpia)

En un estudi amb ratolins C57BL/6J als que se'ls va administrar diferents dosis de pemafibrat, es va determinar que l'expressió gènica de la *Ucp1* no es va veure alterada pel tractament, ja que no hi havia diferències significatives amb el grup control (Zhang et al., 2022).

A més, en un altre estudi realitzat amb ratolins alimentats amb una dieta rica en greix, el pemafibrat tampoc va causar canvis significatius en el nivell d'expressió de gens involucrats en la termogènesi, inclòs el gen *Ucp1* en el BAT (Araki et al., 2018).

Una menor expressió de la UCP1 al BAT indicaria una disminució de la termogènesi, disminuint l'entrada de TG en aquest teixit i, finalment, augmentant els TG plasmàtics. Segons els nostres resultats, tampoc observem una disminució dels nivells de la proteïna UCP1, per tant, no podem justificar la hipertrigliceridèmia del nostre model dietètic de fetge gras per aquesta via.

4.3. Nivells d'expressió del gen de la LPL al fetge

Segons resultats mostrats a la **Figura 9** podem observar una disminució significativa de l'expressió del gen de la LPL en els animals amb fetge gras (HFD-HFr) en comparació a la situació control. Al gràfic també s'observa un augment significatiu de l'expressió del gen de la LPL en animals tractats amb pema fibrat en comparació amb els animals HFD-HFr, ja que el $p\text{-valor} < 0,05$.

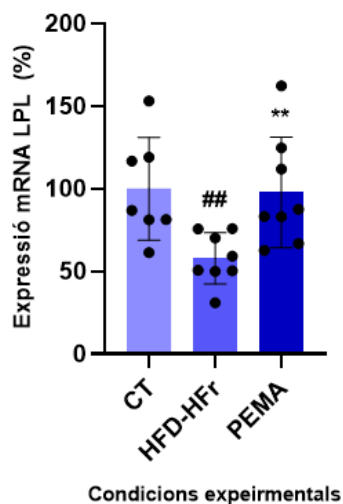


Figura 9. Nivells d'expressió de mRNA que codifica per la proteïna LPL en les mostres de fetge dels grups Control (CT), Dieta High-Fat amb Fructosa (HFD-HFr) i tractament amb Pema fibrat (Pema), analitzades mitjançant RT-qPCR. Els gràfics de barres mostren la mitjana $\pm$ SD dels grups ($n=8$), expressada en %. ## indica diferències significatives entre HFD-HFr i el control amb un $p\text{-valor} < 0,05$. **indica diferències significatives entre Pema i HFD-HFr amb un $p\text{-valor} < 0,05$. Gràfic realitzat amb GraphPad Prism 8.0. Els resultats s'analitzen amb un model ANOVA i les comparacions múltiples utilitzant el Test de Sidak. (Font pròpia)

Aquests resultats concorden amb els del mateix estudi mencionat a l'apartat 4.2, en què el pema fibrat va fer augmentar l'activitat de la LPL i també va disminuir l'expressió hepàtica d'Apo-CIII, que és un inhibidor fisiològic d'aquesta lipasa (Sairyo et al., 2018).

En un altre estudi, es va administrar pema fibrat a rates normals *Sprague Dawley*, i a continuació es va mesurar l'activitat de diverses proteïnes i la seva expressió gènica al fetge mitjançant la tècnica de RT-qPCR. Els resultats van mostrar una inhibició de la secreció de VLDL i una eliminació accelerada de TG mitjançant l'activació de LPL (Takizawa et al., 2013).

A més, en estudis recents amb pacients amb una hipertrigliceridèmia severa que van ser tractats amb pema fibrat, es va observar una millora de l'activitat de la LPL mitjançant un augment d'aquesta proteïna mediat per PPAR- α i una reducció d'Apo-CIII, promovent així el catabolisme dels QM i VLDL (Iitake et al., 2020) (Yamashita et al., 2020).

En la majoria dels casos, els canvis en l'expressió de la LPL estan directament relacionats amb l'increment de la hidròlisi de TG plasmàtics. Segons els resultats obtinguts en aquest treball, en el nostre model, no hi ha una disminució de la LPL a causa del tractament amb pema fibrat. Per tant, no és el factor que provoca la hipertrigliceridèmia observada en el nostre model dietètic de fetge gras en rata femella, sinó que el fàrmac modula l'expressió de la LPL tal com seria esperable per la seva acció agonista PPAR- α .

4.4. Nivells de la proteïna ANGPTL3 en sèrum

Es va dur a terme un assaig ELISA per determinar quantitativament la concentració de la proteïna ANGPTL3 de rata en sèrum. Els resultats de la **Figura 10** mostren que no hi ha diferències significatives entre el grup CT i el grup HFD-HFr, però hi ha un augment significatiu de la quantitat total de la proteïna ANGPTL3 en sèrum en el grup Pema respecte al grup HFD-HFr.

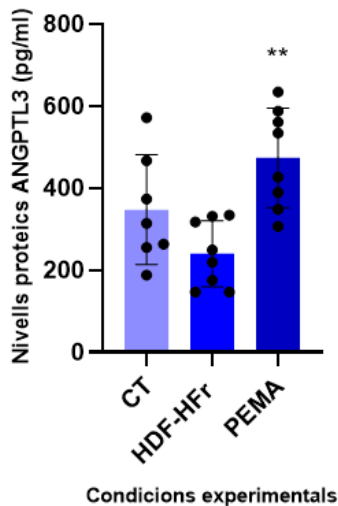


Figura 10. Anàlisi dels nivells de la proteïna ANGPTL3 en sèrum, en les mostres de fetge dels grups Control (CT), Dieta High-Fat amb Fructosa (HFD-HFr) i Tractament amb Pema fibrat (Pema), mitjançant un kit ELISA. Els gràfics de barres mostren la mitjana $\pm$ SD dels grups (n=8), expressada en %. **indica diferències significatives entre Pema i HFD-HFr amb un p-valor < 0,01. Gràfic realitzat amb GraphPad Prism 8.0. Els resultats s'analitzen amb un model ANOVA i les comparacions múltiples utilitzant el Test de Sidak. (Font pròpia)

Hi ha estudis que confirmen un augment dels TG plasmàtics en injectar ANGPTL3 recombinant o adenovirus que codifiquen per aquest inhibidor en ratolins KK/Snk que tenen una mutació recessiva al gen *Angptl3* (Ono et al., 2003) (Shimamura et al., 2003) (Ando et al., 2003). Es va observar el mateix resultat mitjançant la injecció d'aquesta proteïna purificada o la sobreexpressió d'aquest gen en ratolins normals C57BL/6J (Koishi et al., 2002).

Probablement, l'increment dels nivells de l'inhibidor ANGPTL3 en el nostre model causa una disminució de l'activitat de la LPL. D'aquesta forma, l'augment en l'expressió de la LPL quedaria compensat per la inhibició de la seva activitat enzimàtica, provocant que la hidròlisi de TG associats a lipoproteïnes en sang es vegi reduïda. Aquests resultats podrien donar una explicació a la hipertrigliceridèmia que observem en el nostre model.

L'augment dels TG sanguinis és a diferència principal del nostre model dietètic de fetge gras en comparació amb altres models de NAFLD en rosegadors, perquè, com ja he comentat anteriorment, en estudis preclínics s'ha demostrat que el pema fibrat té un efecte reductor dels TG plasmàtics tant en ratolins com en rates *Sprague Dawley* (Takizawa et al., 2013) (Raza-Iqbal et al., 2015).

També en els estudis clínics realitzats es va mostrar una reducció significativa dels TG en plasma en els pacients tractats amb pema fibrat (Ishibashi et al., 2018) (Blair, 2017b)

(Yamashita et al., 2019a). A més, en un estudi del 2020 amb pacients amb NAFLD, el pemafibrat va millorar dràsticament els valors de les proves de funció hepàtica i va tendir a disminuir els TG sèrics (Ikeda et al., 2020). Per aquesta raó, tot i que el nostre model dietètic d'esteatosi hepàtica en rata és un bon model per estudiar l'efecte del pemafibrat sobre el NAFL, no sembla adequat per avaluar els efectes d'aquest fàrmac sobre la hipertrigliceridèmia.

Podem fer diverses suposicions sobre per què el nostre model no mimetitzava el que passa en altres assaigs preclínic i clínic. Els principals factors que poden estar involucrats en les diferències en la resposta al pemafibrat del nostre model són el tipus de soca, la dieta i el sexe de l'animal.

Podem suposar que les diferències en la modulació dels TG plasmàtics per pemafibrat no són degudes a la soca escollida perquè, encara que la majoria d'estudis han estat realitzats amb ratolins (Zhang et al., 2022), també hi ha estudis realitzats amb la soca *Sprague Dawley* en els que hi ha una reducció dels TG plasmàtics per l'acció d'aquest fàrmac (Takizawa et al., 2013) (Yamazaki et al., 2007).

També podem arribar a la conclusió que probablement no és la dieta perquè en un estudi amb ratolins wild-type alimentats amb una dieta HFD que contenia pemafibrat, aquest agonista va reduir significativament els nivells de TG i AG plasmàtics (Araki et al., 2018). Tanmateix, la dieta rica amb greixos amb la que van ser alimentats els animals, és cert que no estava acompanyada amb aigua de beguda suplementada amb fructosa, com en el nostre cas (HFD-HFr). A més, la dieta utilitzada en el nostre estudi és diferent de la majoria de les dietes HFD que s'utilitzen habitualment, ja que no conté greix d'origen animal i no té colesterol.

Per últim, podríem arribar a pensar que les diferències es deuen al sexe de les rates utilitzades al nostre model, ja que la majoria d'estudis preclínic es realitzen amb mascles en gairebé tots els àmbits de la ciència. El sexe pot influir en la resposta al fàrmac en relació als TG: a diferència del nostre estudi en rates *Sprague Dawley* femella, un estudi del 2007 amb rates mascles de la mateixa soca a les que s'administrava la mateixa dosi de pemafibrat (1 mg/kg), mostra una reducció del 50% dels TG en sang (Yamazaki et al., 2007).

Està demostrat que NAFLD/NASH és una malaltia amb dimorfisme sexual, que generalment té una prevalença més elevada en homes. Les dones tenen un risc més baix en edat fèrtil, però a partir de la menopausa tenen la mateixa prevalença que els homes (Burra et al., 2021). Independentment del clar dimorfisme sexual en aquesta malaltia, molt pocs estudis sobre possibles estratègies terapèutiques tracten les diferències de sexe o tenen en compte les fluctuacions hormonals naturals com un factor modificador de la malaltia. La incorporació de diferències a causa del sexe en el disseny de l'estudi i l'estratègia analítica presenta reptes

metodològics, ja que la inclusió de mascles i femelles fa augmentar el nombre d'animals necessaris per a l'experiment i fa augmentar el seu cost (Carreres et al., 2021).

Tanmateix, per dur a terme una investigació exhaustiva del NAFLD cal que s'inclogui el sexe com una variable independent. Per exemple, un estudi xinès del 2021 en el qual s'ha observat que la pioglitazona en pacients amb NAFLD és més eficient per reduir el contingut de greix hepàtic en dones que en pacients masculins (Yan et al., 2021).

En resum, tot i que existeixen deficiències de sexe en la prevalença, els factors de risc, la fibrosi i els resultats clínics del NAFLD, la nostra comprensió d'aquestes diferències s'ha mantingut més limitada fins ara, en comparació amb altres àrees de la medicina. Per cobrir aquest buit, calen més assaigs clínics i preclínics que aportin dades fisiopatològiques i epidemiològiques més precises (Seko et al., 2020).

5. CONCLUSIONS

Després d'analitzar els efectes del pema fibrat en un model dietètic de fetge gras en rata femella, podem arribar a les següents conclusions:

1. No es produeix un increment en l'expressió del gen *Mttp* ni dels nivells de la proteïna ADPN i, per tant, l'exportació de VLDL no es veu augmentada a causa del pema fibrat.
2. No es produeix una reducció dels nivells de la proteïna UCP1 en BAT i, en conseqüència, la termogènesi no s'ha vist disminuïda en els animals tractats amb pema fibrat.
3. Hi ha un increment en l'expressió del gen de la LPL al fetge.
4. Hi ha un increment en l'expressió de la proteïna l'ANGPTL3 per l'acció del pema fibrat i, com a resultat, l'activitat de la proteïna LPL està sent inhibida.

En conclusió, la hipertrigliceridèmia en el nostre model dietètic de fetge gras en rata femella no està causada per un augment en l'exportació de lipoproteïnes, sinó que es deu a la reducció de la hidròlisi dels TG associats a lipoproteïnes, provocada per una regulació negativa de la LPL per l'acció de l'inhibidor ANGPTL3.

6. BIBLIOGRAFIA

- Ando, Y., Shimizugawa, T., Takeshita, S., Ono, M., Shimamura, M., Koishi, R., & Furukawa, H. (2003). A decreased expression of angiopoietin-like 3 is protective against atherosclerosis in apoE-deficient mice. *Journal of Lipid Research*, 44(6), 1216-1223. <https://doi.org/10.1194/jlr.m300031-jlr200>
- Araki, M., Nakagawa, Y., Oishi, A., Han, S., Wang, Y., Kumagai, K., Ohno, H., Mizunoe, Y., Iwasaki, H., Sekiya, M., Matsuzaka, T., & Shimano, H. (2018). The Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α (PPAR α) Agonist Pemafibrate Protects against Diet-Induced Obesity in Mice. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(7), 2148. <https://doi.org/10.3390/ijms19072148>
- Berroeta, G. C., & Davidsson, P. (2012). Contribución de la apolipoproteína CIII a la aterogenicidad de las dislipidemias. *Clínica e Investigación en Arteriosclerosis*, 24(5), 252-260. <https://doi.org/10.1016/j.arteri.2012.02.006>
- Blair, H. A. (2017b). Pemafibrate: First Global Approval. *Drugs*, 77(16), 1805-1810. <https://doi.org/10.1007/s40265-017-0818-x>
- Bunu, S. J., Otele, D., Alade, T., & Dodoru, R. T. (2020). Determination of serum DNA purity among patients undergoing antiretroviral therapy using NanoDrop-1000 spectrophotometer and polymerase chain reaction. *Biomedical and biotechnology research journal*, 4(3), 214. https://doi.org/10.4103/bbrj.bbrj_68_20
- Burra, P., Bizzaro, D., Gonta, A., Shalaby, S., Gambato, M., Morelli, M. B., Trapani, S., Floreani, A., Marra, F., Brunetto, M. R., Taliani, G., & Villa, E. (2021). Clinical impact of sexual dimorphism in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and non-alcoholic steatohepatitis (NASH). *Liver International*, 41(8), 1713-1733. <https://doi.org/10.1111/liv.14943>
- Cannon, B., & Nedergaard, J. (2017). What Ignites UCP1? *Cell Metabolism*, 26(5), 697-698. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.10.012>
- Carreres, L., Jilkova, Z. M., Vial, G., Marche, P. N., Decaens, T., & Lerat, H. (2021). Modeling Diet-Induced NAFLD and NASH in Rats: A Comprehensive Review. *Biomedicines*, 9(4), 378. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9040378>
- Chakravarthy, M. V., Waddell, T. K., Mishra, R. S., & Guess, N. (2020). Nutrition and Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology Clinics of North America*, 49(1), 63-94. <https://doi.org/10.1016/j.gtc.2019.09.003>

- Compton, S. G., & Jones, C. G. (1985). Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. *Analytical Biochemistry*, 151 (2), 369-374. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(85\)90190-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(85)90190-3)
- Del Mar Gonzalez-Barroso, M., Ricquier, D., & Cassard-Doulcier, A. (2000). The human uncoupling protein-1 gene (UCP1): present status and perspectives in obesity research. *Obesity Reviews*, 1(2), 61-72. <https://doi.org/10.1046/j.1467-789x.2000.00009.x>
- Ginsberg, H. N., Hounslow, N., Senko, Y., Suganami, H., Bogdański, P., Ceska, R., Kalina, A., Libis, R. A., Supryadkina, T., & Hovingh, G. K. (2022). Efficacy and Safety of K-877 (Pemafibrate), a Selective PPAR α Modulator, in European Patients on Statin Therapy. *Diabetes Care*, 45(4), 898-908. <https://doi.org/10.2337/dc21-1288>
- Higuchi, N., Kato, M., Tanaka, M., Miyazaki, M., Takao, S., Kohjima, M., ... & Takayanagi, R. (2011). Effects of insulin resistance and hepatic lipid accumulation on hepatic mRNA expression levels of apoB, MTP and L-FABP in non-alcoholic fatty liver disease. *Experimental and therapeutic medicine*, 2(6), 1077-1081. <https://doi.org/10.3892/etm.2011.328>
- Iitake, C., Masuda, D., Koseki, M., & Yamashita, S. (2020). Marked effects of novel selective peroxisome proliferator-activated receptor α modulator, pemafibrate in severe hypertriglyceridemia: preliminary report. *Cardiovascular Diabetology*, 19(1). <https://doi.org/10.1186/s12933-020-01172-8>
- Ikeda, S., Sugihara, T., Hoshino, Y., Matsuki, Y., Nagahara, T., Okano, J., Kitao, S., Fujioka, Y., Yamamoto, K., & Isomoto, H. (2020). Pemafibrate Dramatically Ameliorated the Values of Liver Function Tests and Fibrosis Marker in Patients with Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Yonago Acta Medica*, 63(3), 188-197. <https://doi.org/10.33160/yam.2020.08.009>
- Ishibashi, S., Arai, H., Yokote, K., Araki, E., Suganami, H., & Yamashita, S. (2018). Efficacy and safety of pemafibrate (K-877), a selective peroxisome proliferator-activated receptor α modulator, in patients with dyslipidemia: Results from a 24-week, randomized, double blind, active-controlled, phase 3 trial. *Journal of Clinical Lipidology*, 12(1), 173-184. <https://doi.org/10.1016/j.jacl.2017.10.006>
- Kersten, S. (2017). Angiopoietin-like 3 in lipoprotein metabolism. *Nature Reviews Endocrinology*, 13(12), 731-739. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2017.119>

- Kim, Y. S., Park, S. S., & Lee, S. H. (2006). Apolipoprotein C-II is a novel substrate for matrix metalloproteinases. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 339(1), 47-54. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.10.182>
- Kinnunen, P. K., Jackson, R. J., Smith, L. C., Gotto, A. M., & Sparrow, J. T. (1977). Activation of lipoprotein lipase by native and synthetic fragments of human plasma apolipoprotein C-II. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(11), 4848-4851. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.11.4848>
- Kleiner, D. E., Brunt, E. M., Van Natta, M., Behling, C., Contos, M. J., Cummings, O. W., Ferrell, L. D., Liu, Y., Torbenson, M. S., Unalp-Arida, A., Yeh, M., McCullough, A. J., & Sanyal, A. J. (2005). Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*, 41(6), 1313-1321. <https://doi.org/10.1002/hep.20701>
- Koishi, R., Ando, Y., Ono, M., Shimamura, M., Yasumo, H., Toshihiko, F., Horikoshi, H., & Furukawa, H. (2002). Angptl3 regulates lipid metabolism in mice. *Nature Genetics*, 30(2), 151-157. <https://doi.org/10.1038/ng814>
- Li, X. M., Yang, X. Y., & Zhang, S. S. (2008). Electrochemical enzyme immunoassay using model labels. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 27(6), 543-553. <https://doi.org.sire.ub.edu/10.1016/j.trac.2008.04.002>
- Mead, J. F., Irvine, S. A., & Ramji, D. P. (2002). Lipoprotein lipase: structure, function, regulation, and role in disease. *Journal of Molecular Medicine*, 80(12), 753-769. <https://doi.org/10.1007/s00109-002-0384-9>
- Moreno Cano, J. (2012). Metabolismo lipídico: LPL. *CORE*. <https://core.ac.uk/works/22662645>
- Nedergaard, J., Golozoubova, V., Matthias, A., Asadi, A., Jacobsson, A., & Cannon, B. (2001). UCP1: the only protein able to mediate adaptive non-shivering thermogenesis and metabolic inefficiency. *Biochimica Et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1504(1), 82-106. [https://doi.org/10.1016/s0005-2728\(00\)00247-4](https://doi.org/10.1016/s0005-2728(00)00247-4)
- Ni, D., Xu, P., & Gallagher, S. R. (1998). Immunoblotting and Immunodetection. *Current protocols in cell biology*, 52(1). <https://doi.org/10.1002/0471143030.cb0602s52>
- Ono, M., Shimizugawa, T., Shimamura, M., Yoshida, K., Noji-Sakikawa, C., Ando, Y., ... & Furukawa, H. (2003). Protein region important for regulation of lipid metabolism in angiopoietin-like 3 (ANGPTL3): ANGPTL3 is cleaved and activated in vivo. *Journal of Biological Chemistry*, 278(43), 41804-41809. <https://doi.org/10.1074/jbc.M302861200>
- Panadero, M. A. T., Del Carmen González, M., Herrera, E. A., & Bocos, C. (2008). Modulación del PPAR α por agentes farmacológicos y naturales y sus implicaciones metabólicas.

Clínica e Investigación en Arteriosclerosis, 20(6), 259-289.
[https://doi.org/10.1016/s0214-9168\(08\)75789-9](https://doi.org/10.1016/s0214-9168(08)75789-9)

- Pydyn, N., Miekus, K., Jura, J., & Kotlinowski, J. (2020). New therapeutic strategies in nonalcoholic fatty liver disease: a focus on promising drugs for nonalcoholic steatohepatitis. *Pharmacological Reports*, 72(1), 1-12. <https://doi.org/10.1007/s43440-019-00020-1>
- Qiu, Y. Y., Zhang, J., Zeng, F. Y., & Zhu, Y. Z. (2023). Roles of the peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Pharmacological Research*, 106786. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2023.106786>
- Raza-Iqbal, S., Tanaka, T., Anai, M., Inagaki, T., Matsumura, Y., Ikeda, K., Taguchi, A., Gonzalez, F. J., Sakai, J., & Kodama, T. (2015). Transcriptome Analysis of K-877 (a Novel Selective PPAR α Modulator (SPPARM α))-Regulated Genes in Primary Human Hepatocytes and the Mouse Liver. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*, 22(8), 754-772. <https://doi.org/10.5551/jat.28720>
- Roshanravan, N., Ostadrahimi, A., Saghafi-Asl, M., Hosseinzadeh-Attar, M. J., Shakeri, A. B., Jafarabadi, M. A., Farrin, N., Naemi, M., & Hasankhani, M. (2020). Oleoylethanolamide supplementation in obese patients newly diagnosed with non-alcoholic fatty liver disease: Effects on metabolic parameters, anthropometric indices, and expression of PPAR- α , UCP1, and UCP2 genes. *Pharmacological Research*, 156, 104770. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2020.104770>
- Sairyo, M., Kobayashi, T., Masuda, D., Kanno, K., Zhu, Y., Okada, T., Koseki, M., Ohama, T., Nishida, M., Sakata, Y., & Yamashita, S. (2018). A Novel Selective PPAR α Modulator (SPPARM α), K-877 (Pemafibrate), Attenuates Postprandial Hypertriglyceridemia in Mice. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*, 25(2), 142-152. <https://doi.org/10.5551/jat.39693>
- Seko, Y., Yamaguchi, K., Umemura, A., Yano, K., Takahashi, A., Okishio, S., Kataoka, S., Okuda, K., Moriguchi, M., Okanoue, T., & Itoh, Y. (2020). Effect of pemafibrate on fatty acid levels and liver enzymes in non-alcoholic fatty liver disease patients with dyslipidemia: A single-arm, pilot study. *Hepatology Research*, 50(12), 1328-1336. <https://doi.org/10.1111/hepr.13571>
- Shimamura, M., Matsuda, M., Kobayashi, S., Ando, Y., Ono, M., Koishi, R., Furukawa, H., Makishima, M., & Shimomura, I. (2003). Angiopoietin-like protein 3, a hepatic secretory

- factor, activates lipolysis in adipocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 301(2), 604-609. [https://doi.org/10.1016/s0006-291x\(02\)03058-9](https://doi.org/10.1016/s0006-291x(02)03058-9)
- Soca, P. E. M. (2009). Dyslipidemias. *Revista Cubana de Información en Ciencias de la Salud (ACIMED)*, 20(6), 265-273. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1024-94352009001200012
- Staels, B., Dallongeville, J., Auwerx, J., Schoonjans, K., Leitersdorf, E., & Fruchart, J. (1998). Mechanism of Action of Fibrates on Lipid and Lipoprotein Metabolism. *Circulation*, 98(19), 2088-2093. <https://doi.org/10.1161/01.cir.98.19.2088>
- Sylvers-Davie, K. L., & Davies, B. S. (2021). Regulation of lipoprotein metabolism by ANGPTL3, ANGPTL4, and ANGPTL8. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 321(4), E493-E508. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00195.2021>
- Takizawa, T., Inokuchi, Y., Goto, S., Yoshinaka, Y., Abe, K., Inoue, K., & Tanabe, S. (2013). The mechanism of K-877, a highly potent and selective pparalpha modulator, on regulation of synthesis, secretion and metabolism of triglycerides and cholesterol. *Circulation*. https://www.ahajournals.org/doi/abs/10.1161/circ.128.suppl_22.a12867
- Trépo, E., Romeo, S., Moreau, R., & Nahon, P. (2016). PNPLA3 gene in liver diseases. *Journal of Hepatology*, 65(2), 399-412. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.03.011>
- Utzschneider, K. M., & Kahn, S. E. (2006). The role of insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 91(12), 4753-4761. <https://doi.org/10.1210/jc.2006-0587>
- Velázquez, A. L., Bentanachs, R., Sala-Vila, A., Lázaro, I., Rodríguez-Morató, J., Sánchez, R. M. G., Pallàs, M., Roglans, N., & Laguna, J. C. (2022). ChREBP-driven DNL and PNPLA3 Expression Induced by Liquid Fructose are Essential in the Production of Fatty Liver and Hypertriglyceridemia in a High-Fat Diet-Fed Rat Model. *Molecular Nutrition & Food Research*, 66(7), 2101115. <https://doi.org/10.1002/mnfr.202101115>
- Villarroya, F., Iglesias, R., & Giralt, M. (2007). PPARs in the Control of Uncoupling Proteins Gene Expression. *Ppar Research*, 2007, 1-12. <https://doi.org/10.1155/2007/74364>
- Wang, Z., Ye, M., Zhang, X., Zhang, P., Cai, J., Li, H., & She, Z. (2022). Impact of NAFLD and its pharmacotherapy on lipid profile and CVD. *Atherosclerosis*, 355, 30-44. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2022.07.010>

- Winberg, M. E., Motlagh, M. K., Stenkula, K. G., Holm, C., & Jones, H. A. (2014). Adiponutrin: A multimeric plasma protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 446(4), 1114-1119. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.03.078>
- Yamashita, S., Arai, H., Yokote, K., Araki, E., Matsushita, M., Nojima, T., Suganami, H., & Ishibashi, S. (2019a). Efficacy and Safety of Pemafibrate, a Novel Selective Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α Modulator (SPPARM α): Pooled Analysis of Phase 2 and 3 Studies in Dyslipidemic Patients with or without Statin Combination. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(22), 5537. <https://doi.org/10.3390/ijms20225537>
- Yamashita, S., Masuda, D., & Matsuzawa, Y. (2019b). Clinical Applications of a Novel Selective PPAR α Modulator, Pemafibrate, in Dyslipidemia and Metabolic Diseases. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*, 26(5), 389-402. <https://doi.org/10.5551/jat.48918>
- Yamashita, S., Masuda, D., & Matsuzawa, Y. (2020). Pemafibrate, a New Selective PPAR α Modulator: Drug Concept and Its Clinical Applications for Dyslipidemia and Metabolic Diseases. *Current Atherosclerosis Reports*, 22(1). <https://doi.org/10.1007/s11883-020-0823-5>
- Yamazaki, Y., Abe, K., Toma, T., Nishikawa, M., Ozawa, H., Okuda, A., Araki, T., Oda, S., Inoue, K., Shibuya, K., Staels, B., & Fruchart, J. (2007). Design and synthesis of highly potent and selective human peroxisome proliferator-activated receptor α agonists. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 17(16). <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2007.05.066>
- Yan, H., Wu, W., Chang, X., Xia, M., Ma, S., Wang, L., & Gao, J. (2021). Gender differences in the efficacy of pioglitazone treatment in nonalcoholic fatty liver disease patients with abnormal glucose metabolism. *Biology of Sex Differences*, 12(1). <https://doi.org/10.1186/s13293-020-00344-1>
- Zhang, Q., Wang, J., Deng, F. M., Yan, Z., Xia, Y., Wang, Z., Ye, J., Deng, Y., Zhang, Z., Qiao, M., Li, R., Denduluri, S. K., Wei, Q., Zhao, L., Lu, S., Wang, X., Tang, S., Liu, H., Luu, H. H., . . . Jiang, L. J. (2015). TqPCR: A Touchdown qPCR Assay with Significantly Improved Detection Sensitivity and Amplification Efficiency of SYBR Green qPCR. *PLOS ONE*, 10(7), e0132666. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0132666>
- Zhang, Z., Diao, P., Zhang, X., Nakajima, T., Tanaka, N., & Tanaka, N. (2022). Clinically Relevant Dose of Pemafibrate, a Novel Selective Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α Modulator (SPPARM α), Lowers Serum Triglyceride Levels by Targeting

Hepatic PPAR α in Mice. *Biomedicines*, 10(7), 1667.
<https://doi.org/10.3390/biomedicines10071667>

7. ANNEXOS

7.1. Annex I: Assaig de Bradford

A					
Concentració proteica del BAT (µg/ml)					
C1	16,95	F1	21,1	P1	17,1
C2	18,6	F2	21,9	P2	22,05
C3	16,7	F3	21,25	P3	22,1
C4	21,05	F4	23,95	P4	17,75
C5	23,1	F5	16,65	P5	17,6
C6	20,8	F6	25,7	P6	21,45
C7	22,9	F7	18,65	P7	17,75
C8	17,1	F8	20	P8	18,35

Taula 2a. Resultats de l'assaig de Bradford que ens permeten conèixer la concentració de proteïna de les mostres de BAT: les mostres control (C), fructosa (F) i Pema fibrat (P).

Concentració proteica del fetge (µg/ml)					
C1	15,58	F1	10,65	P1	12,30
C2	17,01	F2	12,97	P2	12,81
C3	13,80	F3	16,35	P3	17,76
C4	22,77	F4	15,94	P4	15,80
C5	16,44	F5	13,56	P5	12,10
C6	17,44	F6	16,26	P6	13,58
C7	16,14	F7	19,84	P7	11,35
C8	15,85	F8	15,66	P8	23,91

Taula 2b. Resultats de l'assaig de Bradford que ens permeten conèixer la concentració de proteïna de les mostres de fetge: les mostres control (C), fructosa (F) i Pema fibrat (P).

7.2. Annex II: Western Blot

Reactius	Gel concentrador (5%)	Gel separador (12%)
Acrilamida-Bisacrilamida 40%	1,875 ml	13,68 ml
Tris-HCl 1 M pH 6,8	1,875 ml	-
Tris-HCl 1,5 M pH 8,8	-	11,25 ml
SDS al 10%	0,15 ml	0,51 ml
H ₂ O Milli-Q	11,01 ml	19,23 ml
TEMED	15 µl	30 µl
PSA 10%	75 µl	300 µl

Taula 3a. Volums dels reactius per preparar 4 gels d'electroforesi de 1,5 mm de gruix, formats per un gel concentrador del 5% i un gel separador del 12%.

Reactius	Gel concentrador (4%)	Gel separador (10%)
Acrilamida-Bisacrilamida 40%	1,5 ml	11,4 ml
Tris-HCl 1 M pH 6,8	1,875 ml	-
Tris-HCl 1,5 M pH 8,8	-	11,25 ml
SDS al 10%	0,15 ml	0,51 ml
H ₂ O Milli-Q	11,385 ml	21,51 ml
TEMED	24 µl	30 µl
PSA 10%	90 µl	300 µl

Taula 3b. Volums dels reactius per preparar 4 gels d'electroforesi de 1,5 mm de gruix, formats per un gel concentrador del 4% i un gel separador del 10%.

Nombre de mostra	Mostra proteïna (µl)	Tris-HCl (µl)	Nombre de mostra	Mostra proteïna (µl)	Tris-HCl (µl)
C1	1,77	10,23	C5	1,3	10,7
C2	1,61	10,39	C6	1,44	10,56
C3	1,8	10,2	C7	1,31	10,69
C4	1,43	10,57	C8	1,75	10,25
F1	1,42	10,58	F5	1,8	10,2
F2	1,37	10,63	F6	1,17	10,83
F3	1,41	10,59	F7	1,61	10,39
F4	1,25	10,75	F8	1,5	10,5
P1	1,75	10,24	P5	1,7	10,29
P2	1,36	10,64	P6	1,4	10,6
P3	1,36	10,64	P7	1,69	10,31
P4	1,69	10,31	P8	1,63	10,34

Taula 4a. Volums a pipetejar de les mostres de BAT i de tampó Tris-HCl 50mM pH=7,5.

Nombre de mostra	Mostra proteïna (µl)	Tris-HCl (µl)	Nombre de mostra	Mostra proteïna (µl)	Tris-HCl (µl)
C1	4,81	5,19	C5	4,56	5,44
C2	4,41	5,59	C6	4,30	5,70
C3	5,43	4,57	C7	4,65	5,35
C4	3,29	6,71	C8	4,73	5,27
F1	7,04	2,26	F5	5,53	4,47
F2	5,78	4,22	F6	4,61	5,39
F3	4,59	5,41	F7	3,78	6,22
F4	4,71	5,29	F8	4,79	5,21
P1	6,10	3,90	P5	6,20	3,80
P2	5,85	4,15	P6	5,52	4,48
P3	4,22	5,78	P7	6,61	3,39
P4	4,75	5,25	P8	3,14	6,86

Taula 4b. Volums a pipetejar de les mostres de fetge i de tampó Tris-HCl 50mM pH=7,5.

Anticòs primari						Anticòs secundari	
Proteïna reconeguda	Pes	Origen	Fabricant	Dilució en BSA 5%	Temps incubació	Dilució	Temps d'incubació
UCP1	32	Mouse	Santa Cruz	1:3.000	O/N	1:3.000	1h
β -tubulina	55	Rabbit	Abcam	1:1.000	O/N	1:3.000	1h
ADPN	43	Goat	Everest	1:15.000	O/N	1:3.000	1h
Actina	125	Mouse	Santa Cruz	1:10.000	O/N	1:3.000	1h

Taula 5. Anticossos primaris i secundaris emprats en l'experiment de immunodetecció de la UCP1.

7.3. Annex III: RT-qPCR

Gen d'interès	Número del GenBank TM	Primer FORWARD (5' → 3')	Primer REVERSE (5' → 3')
<i>Mttp</i>	NM_001107727.1	GCTACCGGATCTCATCGGAC	TCTCTGCTGACCCGCATTTT
<i>Lpl</i>	NM_012598.2	CTCCAGAGTTTGACCGCCTT	TTCAGGGGTCCTTAGGGCAA

Taula 6. Seqüències dels primers utilitzats a la RT-qPCR. Dissenyats amb el Primer-BLAST del NCBI.