

# **DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR, FISIOLOGÍA E INMUNOLOGÍA**

Programa de Doctorado en Biomedicina



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

**Identificación de biomarcadores de disfunción del tejido  
adiposo en condiciones de resistencia a insulina**

**Identification of biomarkers of adipose tissue  
dysfunction in insulin resistance conditions**

**TESIS DOCTORAL**

María del Carmen Navarro Ruiz

**DIRECTORAS**

Dra. María del Mar Malagón Poyato

Dra. Rocío Guzmán Ruiz

**Córdoba, julio 2022**

TITULO: *IDENTIFICACIÓN DE BIOMARCADORES DE DISFUNCIÓN DEL  
TEJIDO ADIPOSEO EN CONDICIONES DE RESISTENCIA A INSULINA*

AUTOR: *María del Carmen Navarro Ruiz*

---

© Edita: UCOPress. 2022  
Campus de Rabanales  
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A  
14071 Córdoba

<https://www.uco.es/ucopress/index.php/es/>  
[ucopress@uco.es](mailto:ucopress@uco.es)

---

# DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR, FISIOLOGÍA E INMUNOLOGÍA

Programa de Doctorado en Biomedicina



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

## Identificación de biomarcadores de disfunción del tejido adiposo en condiciones de resistencia a insulina

Memoria de Tesis Doctoral presentada por **María del Carmen Navarro Ruiz**,  
Graduada en Bioquímica y Máster en Investigación Biomédica Traslacional, para  
optar al grado de **Doctora en Biomedicina** por la Universidad de Córdoba.

Las Directoras,

Firmado por MALAGON POYATO MARIA DEL  
MAR - 30499824F el día 16/07/2022 con  
un certificado emitido por AC FNMT  
Usuarios

Firmado por GUZMAN RUIZ ROCIO -  
30968445A el día 16/07/2022 con un  
certificado emitido por AC FNMT Usuarios

**Dra. María del Mar Malagón Poyato**  
Catedrática de Biología Celular de la  
Universidad de Córdoba

**Dra. Rocío Guzmán Ruiz**  
Investigadora Postdoctoral de la  
Universidad de Córdoba

En Córdoba, a 4 de julio de 2022







**TÍTULO DE LA TESIS:** Identificación de biomarcadores de disfunción del tejido adiposo en condiciones de resistencia a insulina

**DOCTORANDA:** María del Carmen Navarro Ruiz

### **INFORME RAZONADO DE LAS DIRECTORAS DE LA TESIS**

Durante el desarrollo de la presente Tesis Doctoral, la Doctoranda M<sup>a</sup> Carmen Navarro ha superado los objetivos científicos y formativos planteados al comienzo de la misma. Para ello, ha desarrollado y puesto a punto técnicas experimentales que han ampliado el campo de conocimiento en el grupo. Concretamente, su trabajo se ha centrado en el estudio de modificaciones postraduccionales que han permitido complementar los estudios proteómicos previamente realizados en el grupo. Durante esta puesta a punto, la doctoranda ha podido ir afrontando y superando preguntas conceptuales adicionales y ampliar su campo de conocimiento. Los resultados obtenidos de este trabajo le han permitido caracterizar por primera vez el acetiloma del tejido adiposo subcutáneo y omental de individuos delgados y de sujetos con obesidad con o sin resistencia a insulina, lo que ha permitido ampliar las semejanzas y diferencias entre estos dos principales depósitos grasos que contribuyen a ampliar el conocimiento de la biología del adipocito en condiciones normales y fisiopatológicas, como son la obesidad y la diabetes. Además, ha permitido identificar un biomarcador de disfunción del tejido adiposo asociado a la obesidad y el desarrollo de resistencia a insulina como ha sido el estado de acetilación de la proteína FABP4 (*fatty acid binding protein 4*). Para obtener estos resultados la doctoranda ha puesto a punto técnicas de

enriquecimiento e identificación de proteínas acetiladas y ha desarrollado proteínas mutantes en sitios específicos de residuos de lisina, mediante mutagénesis dirigida, para poder estudiar el papel de la acetilación en FABP4 en relación con la obesidad y la resistencia a insulina. Este trabajo ha dado lugar a la publicación de un artículo científico en la revista *Translational Research* (2022) siendo la doctoranda la primera autora. Además, también durante el desarrollo de su Tesis Doctoral, la doctoranda ha caracterizado el carboniloma en sujetos con obesidad y desarrollo de diabetes (normoglucemia-insulinorresistencia-diabetes). Nuevamente, ha llevado a cabo la puesta a punto de otra modificación postraducciona, estrechamente relacionada con el estrés celular, y la disfunción de proteínas clave para el metabolismo como es la transferrina. Este trabajo está en fase de redacción donde la doctoranda es también la primera autora.

Además, fruto de las diferentes colaboraciones con otros proyectos propios del grupo, la doctoranda ha colaborado en la caracterización de componentes de la matriz extracelular, como lumican, en el tejido adiposo en el desarrollo de obesidad y resistencia a insulina. Este trabajo ha sido publicado en la revista *Faseb Journal* (2020) donde la doctoranda es autora del mismo. También ha participado en colaboración con otros grupos de investigación, aportando su experiencia en los estudios proteómicos derivados directamente de su Tesis Doctoral. Así, se han podido identificar marcadores de mesotelio en muestras de tejido adiposo que han demostrado tener cierta interacción entre el tejido adiposo humano y el sistema inmunológico en pacientes con enfermedad de Crohn, mostrando que las células progenitoras del tejido adiposo presentan antígenos y pueden orquestar una respuesta inmune. Este trabajo ha dado lugar a una publicación en la que la doctoranda es autora en la revista *International Journal of Molecular Science* (2021). También ha colaborado en la aplicación del conocimiento biológico en otros campos de estudio. Así, ha participado activamente en la caracterización de nanopartículas, concretamente la viabilidad celular de puntos cuánticos o *quantum dots*, como posibles herramientas de imagen celular, para permitir el marcaje de proteínas clave y poder estudiar su distribución celular. Este trabajo ha dado lugar a la publicación de un

artículo científico en la revista *Applied Sciences* (2020) en el que la doctoranda es la primera autora.

Por último, además de los artículos científicos, la doctoranda ha presentado estos resultados en diferentes congresos de ámbito nacional (9) e internacional (2). Concretamente, la doctoranda ha presentado 15 comunicaciones a congresos, 7 tipo póster y 8 comunicaciones orales, recibiendo el premio a la Mejor Comunicación tipo Póster en un congreso nacional. Además, ha ampliado su formación asistiendo a 15 cursos de formación. Por último, ha participado en tareas de divulgación científica y docencia impartiendo un total de 11 créditos en los Grados de Biología y Bioquímica, así como la dirección de 2 trabajos de Fin de Grado, que le han permitido completar su capacidad formativa.

Por todo ello, se autoriza la presentación de la Tesis Doctoral.

Córdoba, 4 de Julio de 2022

Firma de las directoras

Firmado por MALAGON POYATO MARIA DEL MAR  
- 30499824F el día 16/07/2022 con un  
certificado emitido por AC FNMT Usuarios

Firmado por GUZMAN RUIZ ROCIO -  
30968445A el día 16/07/2022 con un  
certificado emitido por AC FNMT  
Usuarios

Fdo.: María del Mar Malagón Poyato

Fdo.: Rocío Guzmán Ruiz



Esta Tesis Doctoral ha sido realizada en el Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología de la Universidad de Córdoba y en el Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba (IMIBIC), bajo la dirección de las Dras. María del Mar Malagón Poyato y Rocío Guzmán Ruiz. Dicho trabajo ha sido subvencionado gracias a proyectos del Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades/FEDER (BFU2013-44229-R; BFU2016-76711-R; BFU2017-90578-REDT) y de la Conserjería de Salud y Bienestar Social/Junta de Andalucía/FEDER (PI-0200/2013, PI-0159-2016). El contrato de la Doctoranda ha sido financiado por el programa nacional de ayudas a la Formación del Profesorado Universitario (FPU, FPU14/04994, Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades/FEDER).





# ÍNDICE





<b>Resumen</b>	<b>1</b>
<b>Introducción</b>	<b>7</b>
Obesidad y enfermedad metabólica	7
1. Antecedentes	7
2. Causas	9
Tejido adiposo	10
1. Componentes celulares del tejido adiposo	11
1.1. Preadipocitos	12
1.2. Adipocitos	12
2. Diferenciación adipocitaria	13
3. Distribución del tejido adiposo	14
Alteraciones del tejido adiposo en obesidad	18
1. Expansión patológica del tejido adiposo	18
2. Regulación del metabolismo glucídico. Alteraciones en obesidad	20
2.1. Tráfico de GLUT4 y su relación con el metabolismo del hierro	21
3. Regulación del metabolismo lipídico. Alteraciones en obesidad	23
3.1. Lipogénesis	24
3.2. Lipólisis	25
4. Estrés oxidativo	27
5. Estrés del retículo endoplasmático	28
6. Respuesta inflamatoria	29
Búsqueda de biomarcadores de enfermedad metabólica en el tejido adiposo	31
1. Uso de las aproximaciones ómicas para la búsqueda de biomarcadores	32
2. Modificaciones postraduccionales	33
2.1. La acetilación	35
2.2. La carbonilación	38
3. Proteína de unión a ácidos grasos 4: FABP4	40
Nuevos avances metodológicos en la identificación de biomarcadores	45

<b>Objetivos</b>	50
<b>Materiales y métodos</b>	52
Cohortes de estudio	52
1. Cohorte 1	52
2. Cohorte 2	53
3. Cohorte 3	53
Cultivos celulares	54
1. Cultivos y diferenciación <i>in vitro</i> de preadipocitos primarios humanos	54
2. Línea celular 3T3-L1	55
Aproximaciones proteómicas	56
1. Aproximación ómica 1: enriquecimiento de proteínas acetiladas y análisis HPLC-MS/MS	56
1.1. Extracción de proteínas	57
1.2. Inmunoprecipitación (IP) de proteínas acetiladas	58
1.3. Digestión con tripsina y purificación peptídica	59
1.4. Análisis de péptidos por HPLC-MS/MS	59
1.5. Identificación de proteínas mediante el uso de la base de datos Proteome Discoverer 2.1	60
1.6. Estudios de anotaciones funcionales	61
2. Aproximación ómica 2: electroforesis bidimensional para la detección de proteínas carboniladas	63
2.1. Extracción de proteínas	63
2.2. Primera dimensión: Isoelectroenfoque (IEF)	64
2.3. Derivatización de las tiras IPG	65
2.4. Equilibrado de las tiras	66
2.5. Segunda dimensión: electroforesis e inmunodetección de proteínas carboniladas	66
2.6. Tinción de geles con Coomassie Brilliant Blue G250	67
2.7. Identificación de las proteínas carboniladas	68
Modelos <i>in vitro</i> de resistencia a insulina y tratamientos experimentales	70
1. Experimentos <i>in vitro</i> para el estudio del impacto de estímulos obesogénicos	70
1.1. Modelos de hipertrofia	70
1.2. Modelo de hiperglucemia e hiperinsulinemia (HGHI)	71

2. Estudios de vida media de las proteínas mutadas	71
3. Exposición de las células a medios condicionados	71
4. Exposición de las células a CQDs y SQDs	72
Mutagénesis dirigida mediante PCR	72
1. Análisis de dominios y motivos estructurales	72
2. Diseño de oligonucleótidos	73
3. Mutagénesis dirigida vía PCR	74
4. Transformación de bacterias competentes	76
5. Secuenciación y análisis de secuencias	77
Estudios de modelado molecular <i>in silico</i>	77
1. Modelado tridimensional de FABP4 <i>in silico</i>	77
2. Estudios de <i>docking</i> molecular	78
2.1. Estudios <i>in silico</i> de interacción entre FABP4 y la lipasa sensible a hormonas (HSL)	78
2.2. Estudios moleculares <i>in silico</i> de Transferrina (Tf) y su receptor (TfR)	78
Transfección celular	79
Análisis de expresión génica	80
1. Extracción de ARN	80
2. Retrotranscripción (RT)	81
3. Diseño y validación de <i>primers</i>	81
4. PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR)	83
Extracción de proteínas	84
1. Extracción de proteínas de tejido adiposo humano	84
2. Recogida de muestras proteicas de células 3T3-L1	85
Detección de proteínas por inmunotransferencia	86
1. Derivatización de los grupos carbonilo	86
2. Detección de 4-Hidroxinenal (4-HNE)	86
3. Inmunoprecipitación de FABP4 en muestras de tejido adiposo humano	87
4. Técnica de <i>dot blot</i>	88
5. Estudios de <i>Western Blot</i>	88

Estudios de microscopía	91
1. Estudios de localización intracelular de FABP4 endógena	91
2. Estudios de localización intracelular de las formas mutadas de FABP4	91
3. Estudios de traslocación del Receptor de Transferrina (TfR)	92
4. Tinción con Oil Red O	92
5. Microscopía confocal y análisis de imagen	93
6. Tinción Perl's Prussian Blue	94
Estudios funcionales	95
1. Medidas de ROS intracelular	95
2. Determinación de hierro en tejido adiposo SC y OM	95
3. Síntesis de los <i>quantum dots</i> de carbono (CQDs)	96
4. Espectros de fluorescencia y absorción de las CQDs y SQDs	96
5. Ensayo de citotoxicidad MTT	96
Análisis estadístico	97
<hr/>	
<b>Capítulo 1: Estudio del acetiloma del tejido adiposo en obesidad y resistencia a insulina</b>	<b>98</b>
Antecedentes	98
Resultados	100
1. Sujetos de estudio	100
2. Identificación del acetiloma del tejido adiposo humano	102
3. Diferencias específicas de depósito en el acetiloma del tejido adiposo humano	105
4. La resistencia a insulina induce cambios en el acetiloma específicos de cada depósito, SC y OM, en obesidad	108
5. La acetilación modula procesos de oxidación-reducción en el tejido adiposo	115
6. Papel de la acetilación en la diferenciación de los adipocitos	118
7. Efecto de la acetilación sobre las funciones de FABP4 en los adipocitos	122
8. Regulación de la acetilación de FABP4 en modelos <i>in vitro</i> de obesidad y resistencia a insulina	134
Discusión	139

---

<b>Capítulo 2: Efecto de la carbonilación de proteínas en la disfunción del tejido adiposo en obesidad y resistencia a insulina</b>	<b>151</b>
Antecedentes	151
Resultados	153
1. Características de los sujetos de estudio	153
2. Estado redox del tejido adiposo en la resistencia a la insulina asociada a la obesidad	157
3. Identificación del carboniloma del tejido adiposo en condiciones de obesidad y resistencia a insulina	159
4. El efecto de la hiperglucemia/hiperinsulinemia sobre el carboniloma del tejido adiposo	164
5. Impacto de la homeostasis del hierro en el tejido adiposo en la resistencia a la insulina asociada a la obesidad	166
6. Estudios de interacción entre receptor de transferrina-transferrina-hierro	169
Discusión	173

---

<b>Capítulo 3: Estudio comparativo del uso de <i>quantum-dots</i> semiconductores (SQDs) y <i>quantum-dots</i> de carbono (CQDs) en modelos celulares <i>in vitro</i></b>	<b>182</b>
Antecedentes	182
Resultados	184
1. Selección y caracterización óptica de las CQDs y SQDs	184
2. Evaluación de la toxicidad de las CQDs y las SQDs	185
2.1. Toxicidad de las CQDs y SQDs en la línea celular 3T3-L1	185
2.2. Estudios de interacción extracelular de las CQDs y SQDs. Influencia del medio de cultivo en el comportamiento de las <i>nanodots</i>	191
Discusión	195

---

<b>Conclusiones</b>	<b>201</b>
---------------------	------------

---

<b>Bibliografía</b>	<b>202</b>
---------------------	------------

---





# **ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS**





<b>Introducción</b>	7
<b>Figura 1.</b> Obesidad y comorbilidades	8
<b>Figura 2.</b> Factores que influyen en la disfunción del tejido adiposo	9
<b>Figura 3.</b> Componentes del tejido adiposo	11
<b>Figura 4.</b> Estadios de la adipogénesis: de preadipocitos a adipocitos maduros	13
<b>Figura 5.</b> Características del tejido adiposo subcutáneo, SC, vs. tejido adiposo omental, OM.	15
<b>Figura 6.</b> Expansión saludable y patológica del tejido adiposo	19
<b>Figura 7.</b> Mecanismos de acción de la insulina	21
<b>Figura 8.</b> Representación de las diferentes rutas de internalización de GLUT4 en adipocitos	22
<b>Figura 9.</b> Modelo del tráfico de GLUT4 junto con el receptor de transferrina, TfR	23
<b>Figura 10.</b> Representación de los procesos lipolíticos y lipogénicos	26
<b>Figura 11.</b> Cambios asociados a los marcadores de estrés oxidativo en el tejido adiposo	28
<b>Figura 12.</b> Acumulación ectópica de lípidos en el tejido adiposo y otros órganos y sus consecuencias metabólicas	30
<b>Figura 13.</b> Diversidad y complejidad proteómica debida a las modificaciones postraduccionales	34
<b>Figura 14.</b> Características de la acetilación	37
<b>Figura 15.</b> Funciones de FABP4 en los adipocitos	42
<b>Figura 16.</b> Ruta de secreción de FABP4	43
<b>Materiales y métodos</b>	52
<b>Figura 17.</b> Esquema de trabajo del enriquecimiento de proteínas acetiladas y análisis HPLC-MS/MS	62
<b>Figura 18.</b> Formación del DNP tras la reacción de derivatización del DNPH con los grupos carbonilos de las proteínas	66
<b>Figura 19.</b> Esquema de trabajo de la electroforesis bidimensional para la detección de proteínas carboniladas	69
<b>Tabla 1.</b> Secuencia de los <i>primers</i> utilizados para los estudios de mutagénesis dirigida	74
<b>Tabla 2.</b> Condiciones de PCR para la realización de los estudios de mutagénesis dirigida	75
<b>Figura 20.</b> Esquema del proceso de mutagénesis dirigida y generación de los vectores simples y triple de FABP4	76
<b>Tabla 3.</b> Vectores utilizados en los diferentes estudios de transfección	80

<b>Tabla 4.</b> Composición de la Máster Mix para la retrotranscripción de ARN a ADNc	81
<b>Tabla 5.</b> Lista de las secuencias de los <i>primers</i> utilizados en los estudios de RT-qPCR	82
<b>Tabla 6.</b> Condiciones de PCR utilizadas para la validación de <i>primers</i>	83
<b>Tabla 7.</b> Parámetros empleados para la realización de los estudios de RT-qPCR	84
<b>Figura 21.</b> Formación del 4-HNE a partir de la peroxidación lipídica provocada por las ROS	87
<b>Tabla 8.</b> Lista de anticuerpos utilizados para los estudios de <i>Western Blot</i>	90
<b>Tabla 9.</b> Lista de anticuerpos utilizados para los estudios de microscopía	92
<hr/>	
<b>Capítulo 1: Estudio del acetiloma del tejido adiposo en obesidad y resistencia a la insulina</b>	<b>98</b>
<b>Tabla 10.</b> Características antropométricas y bioquímicas de los sujetos de la cohorte 1	101
<b>Figura 22.</b> Validación del enriquecimiento de proteínas acetiladas mediante <i>dot blot</i>	102
<b>Figura 23.</b> Caracterización del acetiloma del tejido adiposo humano	103
<b>Figura 24.</b> Análisis funcional de anotaciones GO PANTHER del acetiloma del tejido adiposo humano	104
<b>Figura 25.</b> Análisis funcional de los procesos biológicos identificados mediante la base de datos ShinyGO	105
<b>Figura 26.</b> Distribución de las proteínas acetiladas en el tejido adiposo humano subcutáneo (SC) y omental (OM)	106
<b>Figura 27.</b> Análisis funcional de anotación GO PANTHER del acetiloma de SC y OM	107
<b>Figura 28.</b> Diagrama de Venn de las proteínas acetiladas comunes y específicas de depósito, SC y OM	108
<b>Figura 29.</b> Efecto de la obesidad y la resistencia a insulina en el perfil de proteínas acetiladas en los depósitos SC y OM humanos	110
<b>Figura 30.</b> Análisis funcional de anotación GO PANTHER del acetiloma de SC y OM de individuos delgados, Ob-NG y Ob-IR	112
<b>Figura 31.</b> Estudio del acetiloma en un modelo in vitro de resistencia a insulina en adipocitos 3T3-L1	114
<b>Figura 32.</b> Proteínas acetiladas identificadas e incluidas en los procesos de oxidación-reducción del análisis funcional GO PANTHER Procesos Biológicos	117
<b>Figura 33.</b> Proteínas acetiladas identificadas e incluidas en el proceso de adipogénesis	118
<b>Figura 34.</b> Niveles de expresión de FABP4 total y FABP4-Ac <sup>K</sup> en el tejido adiposo SC y OM	119
<b>Figura 35.</b> Imágenes confocales representativas de adipocitos primarios humanos de SC y OM	121

<b>Figura 36.</b> Caracterización de FABP4 en adipocitos 3T3-L1 durante adipogénesis	122
<b>Figura 37.</b> Alineamiento de la secuencia de FABP4 investigadas en el estudio	123
<b>Figura 38.</b> Estructura tridimensional de FABP4 WT registrada en PDB, la obtenida mediante el software Phyre2 y su estudio comparativo	124
<b>Figura 39.</b> Estructura tridimensional FABP4 WT y TM obtenida mediante el software Phyre2 y su estudio comparativo	125
<b>Figura 40.</b> Análisis de los niveles de expresión génica y proteica de FABP4 en adipocitos 3T3-L1 transfectados con las formas WT y TM	127
<b>Figura 41.</b> Análisis de la localización subcelular (núcleo/citosol) de FABP4 WT y las distintas construcciones mutadas de FABP4, TM, M1, M2 y M3	128
<b>Figura 42.</b> Estudio sobre la acumulación de gotas lipídicas en células 3T3-L1 transfectadas con FABP4 WT y con las distintas construcciones mutadas de FABP4, TM, M1, M2 y M3	130
<b>Figura 43.</b> Niveles de expresión de ARNm de marcadores de transcripción adipogénicos en adipocitos 3T3-L1 transfectados con FABP4 WT y con las distintas construcciones mutadas de FABP4, TM, M1, M2 y M3	131
<b>Figura 44.</b> Efectos de la forma triple mutante de FABP4 sobre la expresión de FAS (enzima lipogénica) y HSL (enzima lipolítica)	133
<b>Figura 45.</b> Análisis localización subcelular (núcleo/citosol) de FABP4 WT y TM en condiciones de sobrecarga lipídica con oleato o palmitato	135
<b>Figura 46.</b> Imágenes de microscopía confocal representativas (panel superior) de adipocitos 3T3-L1 transfectados con los vectores WT o TM marcados con GFP (verde) y teñidos con Oil-Red O (gotas lipídicas, rojo) en condiciones de sobrecarga lipídica con oleato o palmitato	136
<b>Figura 47.</b> Imágenes de microscopía confocal representativas (panel izquierdo) de adipocitos 3T3-L1 transfectados con los vectores WT o TM marcados con GFP (verde) y DAPI (núcleo, azul) en condiciones de HGHI	137
<b>Figura 48.</b> Imágenes de microscopía confocal representativas (panel superior) de adipocitos 3T3-L1 transfectados con los vectores WT o TM marcados con GFP (verde) y teñidos con Oil-Red O (gotas lipídicas, rojo) en condiciones de HGHI	138

---

**Capítulo 2: Efecto de la carbonilación de proteínas en la disfunción del tejido adiposo en obesidad y resistencia a la insulina** **151**

<b>Tabla 11.</b> Características antropométricas y bioquímicas de los sujetos de este estudio	154
<b>Figura 49.</b> Análisis de biomarcadores plasmáticos de estrés oxidativo en los sujetos de estudio subclasificados en tres grupos en función de sus niveles de glucosa en ayuna y su valor de hemoglobina glicosilada	155
<b>Figura 50.</b> Análisis de correlaciones mediante el coeficiente de correlación de Pearson	156
<b>Figura 51.</b> Estado redox del tejido adiposo en la resistencia a insulina asociada a la obesidad	158

<b>Figura 52.</b> Determinación del carboniloma del tejido adiposo en condiciones de obesidad y resistencia a insulina	160
<b>Tabla 12.</b> Proteínas carboniladas identificadas por MALDI-TOF/TOF en el tejido adiposo humano	161
<b>Figura 53.</b> Cuantificación de los <i>spots</i> identificados correspondientes a proteínas carboniladas	163
<b>Figura 54.</b> Estado redox y aproximación proteómica 2DE en adipocitos 3T3-L1 expuestos al modelo <i>in vitro</i> HGHI	165
<b>Tabla 13.</b> Proteínas carboniladas identificadas por MALDI-TOF/TOF en el modelo <i>in vitro</i> HGHI	165
<b>Figura 55.</b> Análisis del metabolismo del hierro en el tejido adiposo humano en condiciones de obesidad y resistencia a insulina	166
<b>Figura 56.</b> Estudio de la internalización del receptor de transferrina en condiciones de resistencia a insulina	168
<b>Figura 57.</b> Estudio de los aminoácidos susceptibles de carbonilación en la transferrina	170
<b>Figura 58.</b> Estudio <i>in silico</i> del efecto de la carbonilación de la transferrina en sus interacciones con el hierro y su receptor	172

---

**Capítulo 3: Estudio comparativo del uso de *quantum-dots* semiconductores (SQDs) y *quantum-dots* de carbono (CQDs) en modelos celulares *in vitro*** **182**

<b>Figura 59.</b> Curvas de absorbancia y emisión en sus máximos de $\lambda_{\text{excitación}}$ de las CQDs y SQDs	184
<b>Figura 60.</b> <i>Quenching</i> en la fluorescencia de las SQDs en presencia de las CQDs	185
<b>Figura 61.</b> Ensayo de viabilidad celular en células 3T3-L1 cultivadas en ausencia de suero y expuestas a CQDs y SQDs en concentraciones crecientes de 0,2-1600 mg/L durante 24 h	186
<b>Figura 62.</b> Imágenes de microscopía confocal obtenidas de células 3T3-L1 expuestas a 25 mg/L de CQDs o SQDs en ausencia de suero durante 24 h	187
<b>Figura 63.</b> Imágenes de microscopía confocal obtenidas de células 3T3-L1 expuestas a 0,2 mg/L de SQDs en ausencia de suero durante 24 h	188
<b>Figura 64.</b> Emisión de fluorescencia en cultivos celulares 3T3-L1 expuestos durante 1 h o 6 h a concentraciones crecientes de CQDs (0,2, 10 y 25 mg/L) en privación de suero	188
<b>Figura 65.</b> Ensayo de viabilidad celular en células 3T3-L1 cultivadas en presencia del 10% de FBS y expuestas a CQDs y SQDs en concentraciones crecientes de 0,2-1600 mg/L durante 24 h	190
<b>Figura 66.</b> Emisión de fluorescencia en cultivos celulares 3T3-L1 expuestos durante 1 h y 6 h a concentraciones crecientes de CQDs (0,2, 10 y 25 mg/L) en presencia de suero	191
<b>Figura 67.</b> Influencia del medio de cultivo en la fluorescencia de emisión de las CQDs y las SQDs	192

<b>Figura 68.</b> Estudio de la intensidad de fluorescencia de las CQDs expuestas a DMEM + 10% FBS	193
<b>Tabla 14.</b> Comparativa de los principales resultados toxicológicos obtenidos vs. bibliografía	194





# ACRÓNIMOS





## Acrónimos

2DE	Electroforesis bidimensional
3T3-L1	Línea celular de fibroblastos murinos
4-HNE	4-hidroxinonenal
ACCA2	3-cetoacil-CoA tiolasa
ACLY	ATP-citratoliasa
ADA	Comité de Expertos del Diagnóstico y Clasificación de Diabetes
ADIPOQ	Adiponectina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN copia
ADSC	Células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo
AGC	<i>Automatic Gain Control</i>
AKT	Proteína quinasa A
ALDOA	Aldolasa A fructosa-bifosfato
AMP	Adenosín monofosfato
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
ARNr	ARN ribosómico
ARNseq	Secuenciación del transcriptoma
ATCC	Colección americana de cultivos celulares
ATGL	Lipasa de triacilglicéridos
ATP	Adenosín trifosfato
BSA	Seroalbúmina bovina
BSA-FFA	Seroalbúmina bovina libre de ácidos grasos
C/EBPs	Proteínas de unión al potenciador CCAAT
<i>C/EBP<math>\alpha</math></i>	Gen de la proteína $\alpha$ de unión al potenciador CCAAT
CDS	Secuencia codificante de la proteína
CdTe	teluro de cadmio
CHX	Cicloheximida
CID	Disociación inducida por colisión
CLAP	Cóctel de inhibidores de proteasas
CORDIOPREV	Intervención Dietética CORonaria con aceite de Oliva y el estudio de la PREVención cardiovascular
CQDs	<i>Carbon-based quantum dots</i>
CS	Citrato sintasa
DAPI	2-(4-amidinofenil)-1H-indol-6-carboxamida
DHAP	Dihidroxiacetona fosfato
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>

## Acrónimos

DMEM/F-12	<i>Gibco Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNP	Dinitrofenilo
DNPB	2,4-dinitrofenilhidrazina
DO	Densidad óptica
D-PBS	<i>Dulbecco's phosphate-buffered saline</i>
DTT	Ditiotreitol
ECACC	Colección europea de cultivos celulares autenticados
ECHDC1	Etilmalonil-CoA decarboxilasa
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ER	Retículo endoplasmático
EtOH	Etanol
FABP4	Proteína de unión a ácidos grasos 4
FAS	Proteína ácido grasa sintetasa
<i>FASN</i>	Gen ácido graso sintetasa
FBS	Suero fetal bovino
FC	<i>Fold Changes</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FDR	<i>False discovery rate</i>
Fe	Hierro
FFA	Ácidos grasos libres
FRET	Técnica de transferencia de energía de resonancia fluorescente
G3P	Glicerol-3-fosfato
GFP	Proteína verde fluorescente
GLUT4	Transportador de glucosa tipo 4
GMP	Guanosín monofosfato
GMPc	GMP cíclico
GQDs	<i>Graphene quantum dot</i>
GSH	Proteína glutatión sintetasa
GSS	Gen glutatión sintetasa
GSVs	Vesículas de almacenamiento de GLUT4
GT	Glutatión total
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Ácido sulfúrico
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	Ácido fosfórico
HA	Hemaglutinina de la influenza humana
HADHA	Subunidad α de la enzima trifuncional
HADHB	Subunidad β de la enzima trifuncional

## Acrónimos

HA-TfR	Receptor de transferrina unido a HA como etiqueta
HbA1c	Hemoglobina glicosilada
HCl	Ácido clorhídrico
HDL	Lipoproteína de alta densidad
HepG2	Línea celular de carcinoma hepatocelular humano
HFD	Dieta rica en grasas
HGHI	Alta glucosa y alta insulina
HNO <sub>3</sub>	Ácido nítrico
HOMA-IR	Índice de resistencia a insulina
HPLC	Cromatografía líquida de alta afinidad
HPLC-MS/MS	HPLC acoplada a espectrometría de masas
HSL	Lipasa sensible a hormonas
HspA4	Proteína 4 de choque térmico de 70 KDa
Hspb5	Proteína de choque térmico $\beta$ -5
I	Isoleucina
IAA	Yodoacetamida
IBMX	3-isobutil-1-metilxantina
IEF	Isoelectroenfoque
IL-6	Interleuquina 6
Ile	Isoleucina
IMC	Índice de masa corporal
IPG	Gradiente de pH inmovilizado
IR	Resistencia a insulina
IRS	Receptores de insulina
IRS1	Receptor de insulina 1
IRS2	Receptor de insulina 2
JNK	Quinasas c-Jun N-terminal
K	Lisina
Kac	Proteínas acetiladas en residuos de lisinas
KADACs	Lisina desacetilasas
KATs	Lisina acetiltransferasas
KDa	kiloDalton
KO	<i>knockout</i>
LC-MS/MS	Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas
LDL	Lipoproteína de baja intensidad
LSD	Diferencia significativa mínima
Lys	Lisina

## Acrónimos

M1	Proteína FABP4 mutada en la posición K22I
M2	Proteína FABP4 mutada en la posición K32I
M3	Proteína FABP4 mutada en la posición K59I
MALDI-TOF/TOF	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time-Of-Flight</i>
MAPK	Quinasas activadas por mitógenos
MEM	<i>Minimum Essential Medium Eagle</i>
MGL	Lipasa de monoacilglicéridos
MPT	Modificación postraducciona
MTT	Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
MVB	Cuerpos multivesiculares
NaBH <sub>4</sub>	Borohidruro de sodio
NaHCO <sub>3</sub>	Bicarbonato de sodio
NBCS	Suero de neonato bovino
NG	Normogluemia
NLS	Señal de localización nuclear de FABP4
Ob-IR	Sujetos con obesidad y resistencia a insulina
Ob-NG	Sujetos con obesidad y normogluemia
Ob-T2D	Sujetos con obesidad con diabetes tipo 2
OM	Omental
<i>One-Way ANOVA</i>	Análisis de varianzas de un factor
P	Prolina
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PDK1	Piruvato deshidrogenasa quinasa 1
PDK2	Piruvato deshidrogenasa quinasa 2
PFA	Paraformaldehído
PGK1	Fosfoglicerato quinasa
pI	Punto isoeléctrico
PI3K	Fosfatidilinositol 3-quinasa
PIP2	Fosfatilinositol-3,4-bifosfato
PIP3	Fosfatidil-inositol-3,4,5-trifosfato
PKA	Proteína quinasa A
PKG	Proteína quinasa G
PKLR	Piruvato quinada PKLR
PLIN1	Perilipina 1
PMSF	Inhibidor de proteasas de serina

## Acrónimos

PPAR $\gamma$	Receptor de peroxisoma-proliferador activado $\gamma$
PRXL2A	Peroxiredoxina tipo 2
QDs	<i>Quantum dots</i>
R	Arginina
RMS	Desviación cuadrática media
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RT-qPCR	Retrotranscripción-PCR cuantitativa
SC	Subcutáneo
SCAI	Servicio Central de Apoyo a la Investigación
SDS	Dodecilsulfato sódico
SDS-PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia del detergente aniónico dodecilsulfato sódico
SEM	Error estándar de la media
SOD1	Superóxido dismutasa
SQDs	<i>Semiconductor quantum dots</i>
<i>SREBP-1</i>	Gen proteína 1 de unión a elementos reguladores de esteroides
SVF	Fracción del estroma vascular
SWCNTs	Nanotubos de carbono de pared múltiple
SWCNTs-PEG	SWCNTs recubiertos de polietilenglicol
T	Treonina
T2D	Diabetes tipo 2
TAGs	Triacilglicéridos
Tampón TAE	Disolución tampón formada por Tris, acetato y EDTA
Tf	Transferrina
TFA	Ácido trifluoroacético
TfR	Receptor de transferrina
Tf-TfR	Receptor de transferrina unido a transferrina
TGN	Red trans del Golgi
TM	Triple mutante (K22I, K32I, K59I) de FABP4
TNF $\alpha$	Factor de necrosis tumoral $\alpha$
TSA	Tricostatina A
TZD	Tiazolidinedionas
u.a.	Unidades arbitrarias
UCP1	Proteína desacoplante 1
VCP	ATPasa de retículo endoplasmático transicional
WT	FABP4 sin mutaciones





# RESUMEN





El constante incremento de la prevalencia de la obesidad a nivel mundial, que está alcanzando dimensiones epidémicas, constituye un grave problema de salud pública, debido al desarrollo de comorbilidades graves asociadas a esta patología, como la resistencia a insulina (IR), diabetes tipo 2 (T2D), enfermedad de hígado graso no alcohólico (NAFLD), dislipemias, enfermedades cardiovasculares, asma, hipertensión arterial, hipercolesterolemia, accidentes cerebrovasculares, artritis, enfermedades neurodegenerativas e incluso ciertos tipos de cáncer. Durante el desarrollo de la obesidad, ocurre un desequilibrio entre el gasto energético y la ingesta calórica producido por múltiples factores complejos y variables entre los que encuentran el sexo, la edad, el ambiente socio-cultural, una alimentación descontrolada –asociada, o no, a procesos emocionales–, y la actividad física. Independientemente del/los factor/es que provocan el desarrollo de obesidad, la disfunción del tejido adiposo subyace como causa biológica principal asociada a esta enfermedad.

El tejido adiposo es un órgano de gran complejidad, siendo esencial para el mantenimiento de la homeostasis energética del organismo por su papel como responsable del almacenamiento del exceso de energía y su posterior movilización según demandas energéticas. Además, tras el descubrimiento de la leptina en 1994, el tejido adiposo pasó a ser reconocido como un órgano endocrino productor de hormonas, citoquinas, factores de crecimiento y factores vasoactivos, denominados en su conjunto como adipoquinas, que regulan desde la homeostasis energética, hasta la ingesta, la inflamación, la reproducción o el crecimiento celular.

Si nos centramos en el tejido adiposo blanco (de aquí en adelante, denominado tejido adiposo), se distribuye fundamentalmente en dos localizaciones principales: depósito subcutáneo (SC) y depósito omental (OM), con diferencias celulares, fisiológicas, metabólicas y funcionales. Por ello, hay que destacar la importancia del estudio de las características de cada depósito del tejido adiposo ya que su distribución –independientemente de la cantidad de grasa corporal total– es un factor de riesgo para el desarrollo de las comorbilidades de la obesidad. Así, el incremento del depósito OM se asocia con un mayor riesgo cardiovascular, mientras que la acumulación de grasa en el depósito SC se relaciona con un perfil protector desde el punto de vista metabólico.

No obstante, la remodelación y disfunción de cada depósito también puede contribuir a la fisiopatología de la enfermedad metabólica relacionada con la obesidad. En concreto, las alteraciones en la adipogénesis del depósito SC se han relacionado con la falta de expansibilidad de dicho tejido y, con ello, al desarrollo de las complicaciones metabólicas asociadas a la obesidad.

En este contexto, el exceso de energía existente en condiciones de obesidad conlleva a una expansión patológica del tejido adiposo que conduce a otros procesos patogénicos en este tejido, entre los que se encuentran una desregulación del metabolismo glucídico y lipídico, aparición de estrés oxidativo y del retículo endoplasmático y un estado inflamatorio. Además, cuando se alcanza el límite de expansión del tejido adiposo, no es posible acumular más lípidos en este órgano, induciendo el depósito ectópico de grasa en otros tejidos involucrados en el mantenimiento de la homeostasis de la glucosa, un evento comúnmente definido como lipotoxicidad. La acumulación excesiva de lípidos en tejidos ectópicos conduce, en gran medida, al desarrollo de resistencia a insulina, siendo probablemente el contribuyente principal –junto a la inflamación– de la aparición de complicaciones metabólicas en los sujetos con obesidad.

A pesar de las múltiples evidencias que se han encontrado sobre la relación entre la disfunción del tejido adiposo y la aparición de enfermedades metabólicas –como la obesidad, la resistencia a insulina y la diabetes tipo 2–, aún se desconocen muchos de los mecanismos subyacentes y rutas biológicas que se alteran en el tejido adiposo y promueven el desarrollo de estas condiciones patológicas. Los últimos avances en la identificación de marcadores de disfunción del tejido adiposo en obesidad y su asociación con enfermedades metabólicas han sido posibles gracias, en parte, a las técnicas ómicas, incluyendo estudios genómicos, transcriptómicos y proteómicos en modelos animales y humanos en condiciones de obesidad. En el grupo donde se ha desarrollado esta Tesis Doctoral, se han llevado a cabo varios estudios proteómicos de tejido adiposo y de sus principales componentes: fracción del estroma vascular, precursores y adipocitos que se alteran en obesidad con o sin resistencia a insulina (IR)

o diabetes tipo 2 (T2D) o también, en respuesta a la pérdida de peso tras cirugía bariátrica.

Sin embargo, a pesar de los avances realizados en la identificación de nuevos marcadores de la disfunción del tejido adiposo en obesidad, son necesarios nuevos estudios que estén centrados no solo en los posibles cambios cuantitativos que puedan sufrir las proteínas, sino también en su localización y, especialmente, en el estado funcional/disfuncional de dichas proteínas. En este sentido, el estudio de las modificaciones postraduccionales de las proteínas puede proporcionar vías adicionales de identificación de biomarcadores potenciales que puedan ser útiles para el establecimiento de nuevas alternativas biomédicas. Actualmente, se acepta que la diferencia en complejidad que existe entre el genoma y el proteoma se debe, en gran parte, a las modificaciones postraduccionales (MPTs) que sufren las proteínas, ya que de los 25.000 genes aproximadamente que tiene el ser humano, se codifica un número final estimado de 1 millón de proteínas. La gran mayoría de proteínas están reguladas por MPTs (fosforilación, acetilación, carbonilación...) de las que poco se sabe en el tejido adiposo en obesidad.

Por ello, esta Tesis Doctoral ha tenido como objetivo explorar, identificar y caracterizar nuevos posibles marcadores del tejido adiposo regulados funcionalmente por modificaciones postraduccionales, una reversible –acetilación– y otra, irreversible –carbonilación–, e implicados en el desarrollo y progresión de enfermedad metabólica (IR y T2D) en condiciones de obesidad.

En concreto, la acetilación es una de las MPTs que más se ha relacionado con la obesidad, diabetes y cáncer, así como con enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas. En esta Tesis Doctoral se describe, por primera vez, el perfil de proteínas acetiladas (acetiloma) del tejido adiposo humano de los dos principales depósitos (subcutáneo y omental) bajo condiciones fisiológicas (individuos delgados) y en condiciones patológicas (obesidad y resistencia a insulina). Estos estudios muestran que el 25% del proteoma total del tejido adiposo humano está regulado por acetilación, demostrando la gran importancia que tiene esta MPT en el funcionamiento de este órgano. Al analizar el perfil de acetilación de proteínas específicas en los distintos grupos

de sujetos estudiados, se observó que la obesidad y la resistencia a insulina afectan de manera depósito-dependiente a la acetilación de proteínas en el tejido adiposo. La reducción total del estado de acetilación, así como la alteración de los niveles de acetilación en enzimas clave del metabolismo energético observadas entre individuos delgados y obesos con normoglucemia (Ob-NG) o resistencia a insulina (Ob-IR), podrían contribuir a la disfunción de los adipocitos y al desarrollo de enfermedades metabólicas asociadas a la obesidad.

Como se ha mencionado, el análisis del acetiloma mostró la existencia de diferentes patrones de acetilación entre los dos depósitos principales de tejido adiposo, SC y OM, destacando la complejidad molecular de este tejido. En concreto, este análisis mostró cambios en la acetilación de la chaperona lipídica y adipoquina, FABP4, en el depósito SC en relación con la resistencia a la insulina, revelando así un posible biomarcador de expansión disfuncional específica de depósito. Estudios previos han demostrado que FABP4 podría ser un marcador de resistencia a insulina debido a sus altos niveles circulantes en individuos obesos con resistencia a insulina.

FABP4 interviene en la captación, almacenamiento y movilización de ácidos grasos, además de participar en la regulación transcripcional mediada por lípidos en el núcleo y ejercer una acción señalizadora como adipoquina. La alteración de FABP4 en obesidad podría relacionarse con la acumulación alterada de lípidos que ocurre en el tejido adiposo en estas condiciones, debido a su papel en la modulación del metabolismo lipídico en los adipocitos. Sin embargo, se desconoce si esta función podría estar modulada por acetilación, lo que podría ayudar a definir realmente a FABP4 como biomarcador de estas patologías. Nuestros resultados indicaron que los cambios en el perfil de acetilación de FABP4 regulan su ubicación celular y alteran las funciones intracelulares de FABP4 (control de adipogénesis y de las rutas lipolítica/lipogénica), indicando la existencia de una regulación cualitativa, más allá de la cantidad de proteína disponible, que impacta en su función. Por tanto, no solo la proteína en sí, sino también su estado de acetilación, podrían constituir dianas terapéuticas en obesidad y resistencia a insulina.

Por otra parte, en la patogénesis de la obesidad, resistencia a insulina y diabetes tipo 2, juega un papel fundamental el estrés oxidativo, el cual se produce como consecuencia de un acúmulo citotóxico de especies reactivas de oxígeno (ROS). El exceso de ROS provoca daño celular como consecuencia de la inducción de procesos como la peroxidación de lípidos o la carbonilación de proteínas. Así, en esta Tesis Doctoral hemos explorado este último proceso, describiendo, por primera vez, el perfil diferencial de proteínas carboniladas (carboniloma) del tejido adiposo humano de los dos depósitos de grasa, subcutáneo y omental, en sujetos con obesidad y diferente grado de sensibilidad a insulina –sujetos con obesidad y normogluceemia (Ob-NG), con obesidad y resistencia a insulina (Ob-IR) o con obesidad y diabetes tipo 2 (Ob-T2D)–. Nuestros resultados proteómicos evidenciaron diferencias específicas de depósito en el carboniloma del tejido adiposo, proporcionando nuevos conocimientos sobre la participación del tejido adiposo omental en el desarrollo de resistencia a insulina asociada a la obesidad.

En concreto, nuestros resultados proteómicos mostraron un patrón de carbonilación diferencial de la transferrina entre los sujetos Ob-NG vs. Ob-IR y Ob-T2D en el depósito SC y OM, encontrando un aumento significativo de la transferrina carbonilada en pacientes Ob-IR vs. Ob-NG en el depósito OM. Adicionalmente, debido a la relación entre el metabolismo glucídico y del hierro analizamos la homeostasis del hierro en el tejido adiposo de nuestros sujetos de estudio, no encontrando diferencias significativas en el contenido de hierro total entre los grupos. Sin embargo, se encontraron cambios en la distribución del receptor de transferrina en adipocitos condiciones de exposición al ambiente existente en diabetes (i.e., exposición a medios condicionados procedentes de pacientes que desarrollan T2D) que podrían asociarse a una alteración en su unión con la transferrina. También identificamos los sitios potenciales de interacción entre transferrina y su receptor susceptibles de modificar dicha interacción. Así, nuestros estudios mostraron que la internalización del receptor de transferrina se altera en respuesta a un ambiente inductor de T2D, lo que sugiere que en el desarrollo de T2D podría contribuir, al menos en parte, la carbonilación de un residuo específico de la transferrina, P74, modificando sus propiedades electrostáticas y, por tanto, comprometiendo su unión con su receptor. En conjunto, estos resultados

muestran la posible relación entre la carbonilación de proteínas y la desregulación de la homeostasis del hierro que tiene lugar en condiciones de obesidad y enfermedad metabólica.

Por último, los estudios proteómicos en general, y de MPTs en particular, tienen limitaciones en cuanto a la falta de herramientas (por ejemplo, anticuerpos específicos de residuos, o inducción de MPTs en residuos específicos de proteínas concretas) que permitan profundizar para el diseño de estrategias de prevención o terapéuticas. En este contexto, la nanomedicina aparece como una línea de trabajo futuro para el diseño de estas estrategias, una línea que aún no ha sido muy explorada en relación al tejido adiposo en particular. Existe, por tanto, la necesidad de buscar nuevas estrategias metodológicas en este ámbito, tales como el uso de los *quantum dots*. En concreto, ya hay *quantum dots* conjugadas con proteínas comerciales (Qdot™ Streptavidin Sampler Kit, por ejemplo) para aplicaciones como *Western blot*, citometría de flujo, adquisición de imágenes por microscopía confocal e incluso en flujos de trabajo de purificación para lograr el fraccionamiento deseado. En esta Tesis Doctoral se llevó a cabo, por primera vez, un estudio comparativo *in vitro* totalmente paralelo del comportamiento de dos tipos de *quantum dots*, CQDs (*carbon-based quantum dots*) y SQDs (*semiconductor quantum dots*) en preadipocitos, como precursor del tipo celular maduro del tejido adiposo y por tanto, elemento fundamental en la expansión de dicho tejido.

Nuestros resultados mostraron que las CQDs podrían ser una buena herramienta para la caracterización y posible aplicación biomédica de proteínas de interés en condiciones de obesidad y resistencia a insulina, como FABP4 o transferrina, las cuales son reguladas funcionalmente por modificaciones postraduccionales. Más aún, independientemente del tipo de nanopartícula, hay que tener en cuenta la influencia de los distintos componentes del microentorno celular (i.e, medio de cultivo), ya que pueden alterar las características sintéticas de las mismas, otorgándoles nuevas propiedades biológicas que repercuten en su comportamiento a nivel celular. Estos resultados, por tanto, abren una nueva línea de futuro para el desarrollo no solo de estudios de caracterización básicos, sino para la puesta a punto de nuevas herramientas con aplicación potencial en el campo de la obesidad.









# **INTRODUCCIÓN**



---

# OBESIDAD Y ENFERMEDAD METABÓLICA

---

## 1. Antecedentes

La obesidad y el sobrepeso se definen, según la Organización Mundial de la Salud (OMS), como la acumulación anormal o excesiva de tejido adiposo que puede tener efectos perjudiciales para la salud. A partir de 2008, la Sociedad Americana de Obesidad comenzó a considerar la obesidad como una enfermedad crónica que conduce a anomalías estructurales, trastornos fisiológicos y deficiencias funcionales (Jastreboff et al., 2019). El aumento de la prevalencia a nivel mundial de esta enfermedad ha llevado a considerarla como una epidemia y un verdadero problema de salud. Si las tendencias continúan así, para 2030 se estima que el 38% de la población adulta mundial tendrá sobrepeso y otro 20% presentará obesidad (Hruby y Hu, 2015). Esta situación se ha convertido en un problema de salud mundial porque la obesidad afecta a casi todas las funciones fisiológicas del cuerpo (Chooi et al., 2019; López-Otín y Kroemer, 2021). Hoy en día, la obesidad se asocia con una disminución de la esperanza de vida y es responsable del 10-13% de las muertes prematuras (Leung et al., 2017).

La obesidad aumenta considerablemente el riesgo de sufrir enfermedades como la resistencia a insulina, lo que constituye un factor de riesgo principal en el desarrollo de diabetes tipo 2, hipertensión, dislipemia y enfermedad cardiovascular, incluidas en el síndrome metabólico, así como a ciertos tipos de cáncer (mama, ovario, próstata, hígado, entre otros), problemas de salud mental e infertilidad (Qureshi et al., 2007; Bruce y Hanson, 2010; Pischon et al., 2011; Singh et al., 2013; Stone et al., 2018; Mintziori et al., 2020) (**Figura 1**).

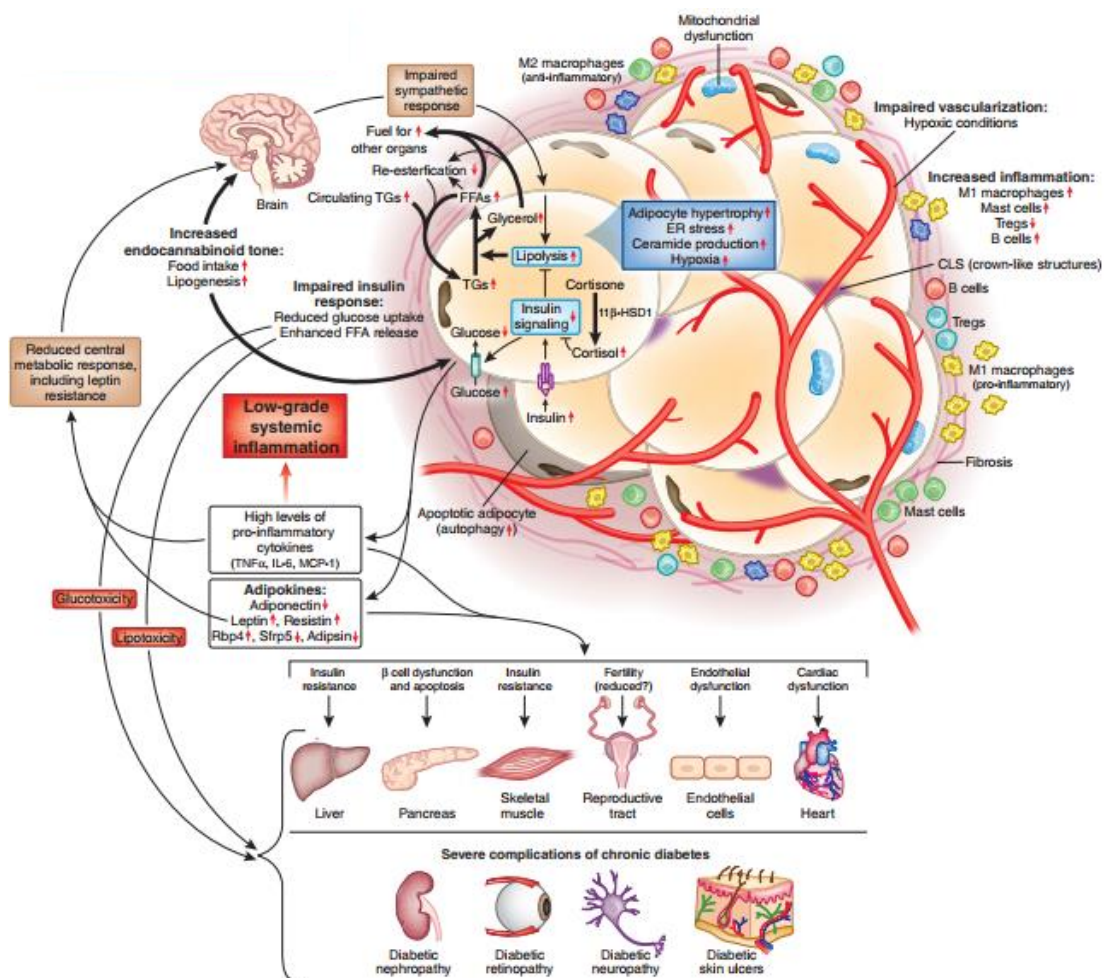


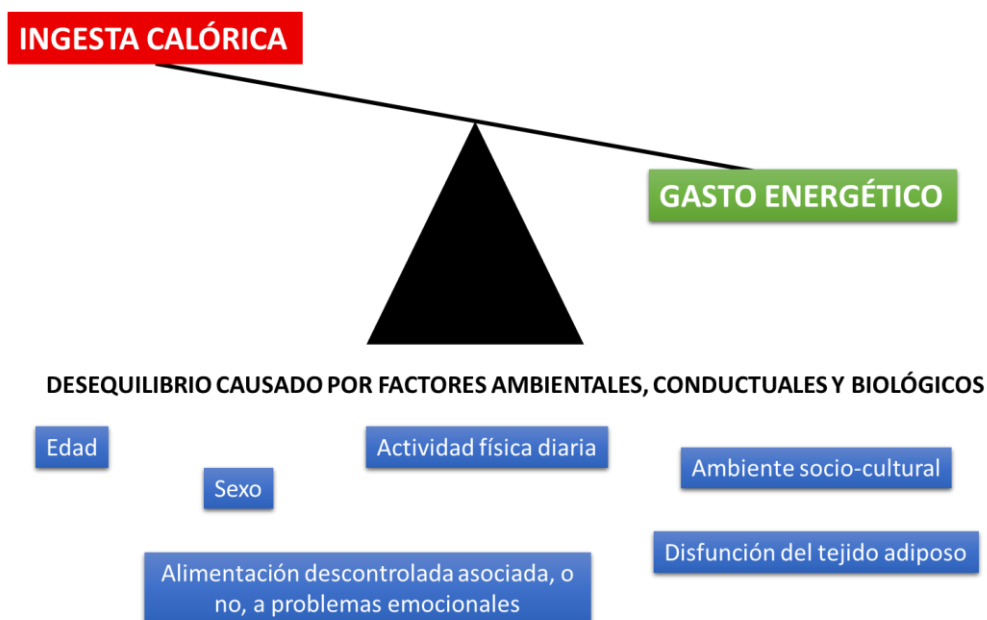
Figura 1. Obesidad y comorbilidades. Adaptado de Scherer, 2012.

Curiosamente, y a pesar de la acumulación de datos que apoyan una relación causal entre la obesidad y el desarrollo de enfermedad metabólica, existe un subgrupo de individuos con obesidad, conocidos como sujetos con obesidad metabólicamente sanos, que parecen mostrar resistencia al desarrollo de las complicaciones asociadas a la obesidad, al menos temporalmente (Denis y Obin, 2013; Xu et al., 2013). Estos individuos, que corresponden al 20-30% de la población con obesidad y se caracterizan por un exceso de tejido adiposo, son sensibles a insulina, no son hipertensos y presentan perfiles inmunológicos, hormonales, de inflamación, lípidos y de enzimas del hígado favorables en comparación con las personas con obesidad que desarrollan enfermedad metabólica (Denis y Obin, 2013; Xu et al., 2013; Blüher y Schwarz, 2014).

## 2. Causas

Durante la obesidad, se produce una descompensación del balance entre la ingesta calórica y el gasto energético (Oussaada et al., 2019). En el desarrollo de la obesidad intervienen factores ambientales, conductuales y biológicos, los cuales resultan extremadamente complejos y variables (Bray et al., 2018). Algunos de estos factores son la edad, el sexo, la actividad física diaria, el ambiente socio-cultural, una alimentación descontrolada asociada, o no, a procesos emocionales, así como la disfunción del tejido adiposo como causa biológica principal (Blüher, 2019) (**Figura 2**).

Todos los individuos poseen una capacidad máxima de expansión del tejido adiposo, que está determinada por factores genéticos y ambientales. Cuando se alcanza este límite (estado de obesidad), el tejido adiposo sufre una remodelación en respuesta a procesos patogénicos como la inflamación, fibrosis e hipoxia, que contribuyen a la disfunción del tejido adiposo inducida por la obesidad (Datta et al., 2018; Tanaka et al., 2018).



**Figura 2.** Factores que influyen en la disfunción del tejido adiposo.

---

## TEJIDO ADIPOSO

---

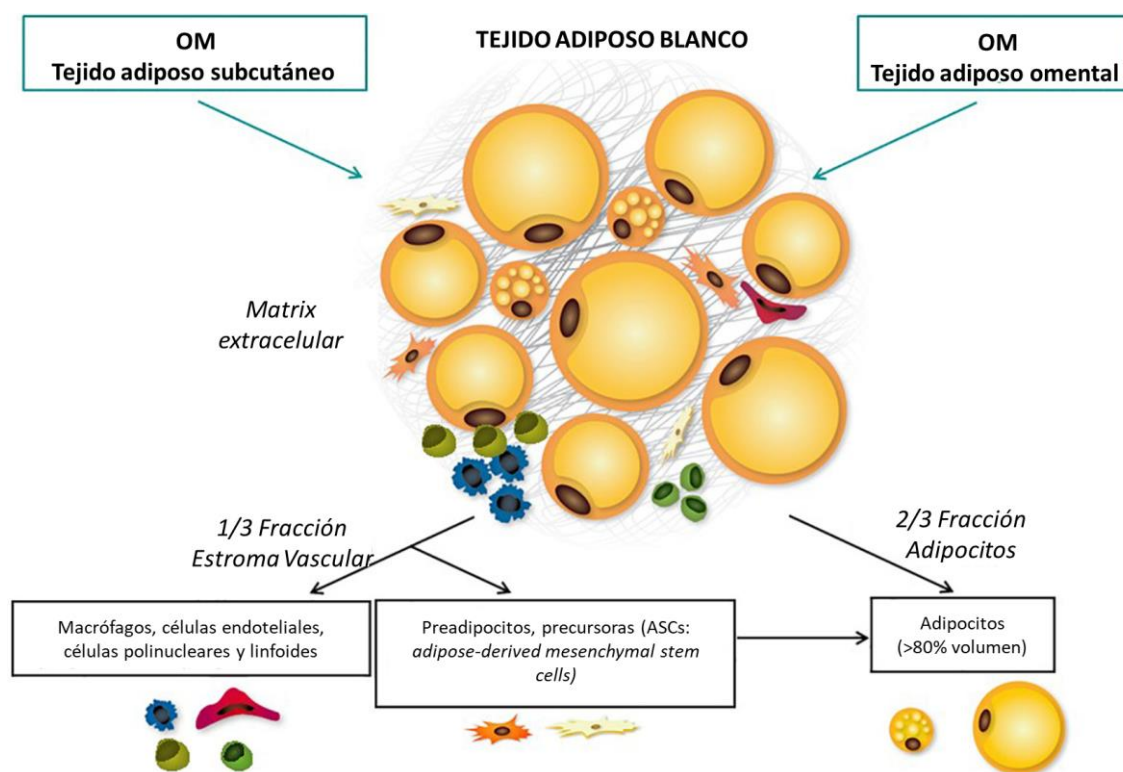
El tejido adiposo es un órgano de gran complejidad que juega un papel fundamental en el mantenimiento de la homeostasis energética del organismo, además de en numerosos procesos metabólicos e inmunes (Booth et al., 2016). Clásicamente considerado como un tejido estático cuya función principal era el almacenamiento del exceso de energía en forma de triacilglicéridos (TAGs), y de su posterior movilización según las demandas energéticas del organismo, el tejido adiposo también se encarga del aislamiento térmico del organismo y otras funciones mecánicas como amortiguador, protegiendo a los diferentes órganos (Mariman y Wang, 2010).

Fue a partir de la identificación de la leptina en el año 1994 (Zhang et al., 1994) cuando el tejido adiposo pasó a ser reconocido como un activo órgano endocrino, no solo con funciones autocrinas o paracrinas, sino también endocrinas mediante la producción de moléculas señalizadoras conocidas como adipoquinas (Peinado et al., 2012). El tejido adiposo secreta más de 60 adipoquinas (Lee et al., 2019) que, además de actuar sobre el tejido adiposo, tiene otras dianas como el cerebro, las células  $\beta$  pancreáticas, el hígado, músculo esquelético y el sistema cardiovascular (Zhu y Scherer, 2018). En el secretoma del tejido adiposo se encuentran adipoquinas de origen proteico como la leptina, adiponectina, resistina, factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), interleucina 6 (IL-6), entre otras (Hui y Feng, 2018), así como lípidos bioactivos (lipoquinas) y moléculas de ARN (Scheja y Heeren, 2019). Las adipoquinas regulan numerosos procesos biológicos, como, por ejemplo, la homeostasis energética, la ingesta, la inflamación, el crecimiento celular o la reproducción (Parrettini et al., 2020).

Por último, cabe destacar, que el tejido adiposo se encuentra innervado por el sistema nervioso central que, junto con la secreción de numerosos factores señalizadores, pone de manifiesto su carácter dinámico y la constante comunicación que mantiene con el resto de órganos (Booth et al., 2016).

## 1. Componentes celulares del tejido adiposo

El tejido adiposo se organiza formando un gran órgano con una anatomía discreta, una compleja citología y alta plasticidad fisiológica (Cinti, 2012). El tejido adiposo contiene numerosos tipos celulares que interaccionan entre sí, embebidas en una matriz extracelular (Lenz et al., 2020) (**Figura 3**). Entre ellos, se encuentran los adipocitos maduros, que representan el tipo celular principal del tejido adiposo, además de la denominada fracción de estroma vascular (SVF), que incluye fibroblastos, macrófagos, linfocitos y células vasculares, así como las células responsables de la renovación del tejido, las células madre mesenquimales y los preadipocitos (Cinti, 2012; Lago et al., 2018). Este último tipo celular, los preadipocitos, son los responsables de que el tejido mantenga su plasticidad funcional (Ghaben y Scherer, 2019). El conjunto de la actividad de sus distintos componentes celulares, que actúan de manera integrada, define las funciones básicas del tejido adiposo.



**Figura 3.** Componentes del tejido adiposo. Modificado de Bourgeois et al., 2019.

### 1.1. Preadipocitos

Las células madre multipotentes derivadas del tejido adiposo, o células madre derivadas del tejido adiposo (ADSCs) tienen potencial de diferenciación osteogénica, adipogénica y condrogénica (Moreno-Navarrete et al., 2017). Por su parte, el término “preadipocito” define a la célula progenitora, aislada de la SVF, con capacidad de proliferar constantemente y diferenciarse solo a adipocitos maduros a través del proceso de adipogénesis (Zuk, 2013).

Los preadipocitos se han caracterizado por su morfología, capacidad de diferenciación, secreción de proteínas, huella de metilación del ADN así como por su perfil epigenético, entre otras características (Ejarque et al., 2019). No obstante, estudios recientes han mostrado la existencia de diferentes subtipos de preadipocitos en el tejido adiposo, cuya distribución difiere entre los distintos depósitos grasos (Ferrero et al., 2020). En particular, estudios de ARNseq de este tipo celular ha permitido caracterizar las poblaciones de preadipocitos del tejido adiposo, proporcionando nuevos conocimientos sobre las subpoblaciones de estas células (Vijay et al., 2020).

### 1.2. Adipocitos

Los adipocitos, células diferenciadas a partir de preadipocitos, están especializados en la acumulación de lípidos cuyo tamaño puede ser desde <20 a 300  $\mu\text{m}$  de diámetro, variación que depende principalmente de su contenido de TAGs (Stenkula y Erlanson-Albertsson, 2018). Los adipocitos proporcionan un compartimento seguro y específico para la acumulación de lípidos, las gotas lipídicas (Gupta, 2014). Cuando hay exceso de energía, los ácidos grasos libres (FFA) presentes en el plasma se internalizan en los adipocitos, se esterifican con glicerol para dar lugar a TAGs y se almacenan en las gotas lipídicas del adipocito, proceso conocido como lipogénesis (Ducharme y Bickel, 2008). Además, los adipocitos también pueden sintetizar ácidos grasos a partir de la glucosa mediante el proceso de lipogénesis *de novo* (Song et al., 2018). Sin embargo, durante los periodos de demanda energética, como el ayuno, la actividad física o cualquier otra necesidad de energía, los adipocitos movilizan los lípidos almacenados en las gotas

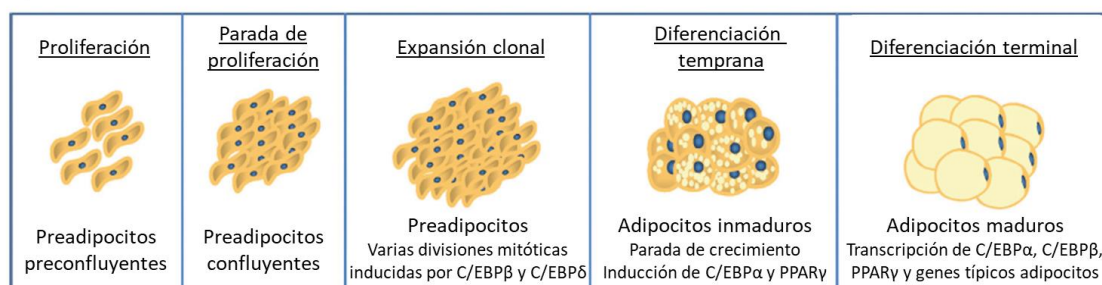


lipídicas mediante lipólisis, proceso mediante el cual cada molécula de TAG libera tres ácidos grasos y una molécula de glicerol (Saponaro et al., 2015; Song et al., 2018).

## 2. Diferenciación adipocitaria

La diferenciación adipocitaria, adipogénesis, es el proceso mediante el cual los preadipocitos se diferencian a adipocitos maduros con capacidad para almacenar TAGs y responder a la insulina (Ahmad et al., 2020). Este proceso consta de 4 etapas, que están controladas por una red de interacción de factores de transcripción que trabajan para coordinar la expresión de gran cantidad de proteínas responsables del establecimiento del fenotipo de adipocito maduro (Ghaben y Scherer, 2019) (**Figura 4**).

El primer paso consiste en la parada de la proliferación inducida mediante la inhibición por contacto una vez alcanzada la confluencia celular asumiendo, los preadipocitos, el compromiso para diferenciarse a adipocitos seguido de la expansión clonal provocada por señales hormonales, consiguiendo una sincronización del ciclo celular. A este compromiso le sigue un paso de diferenciación (diferenciación temprana) donde se detiene la división celular y comienza la expresión de genes característicos de los adipocitos, iniciando la acumulación de lípidos que finaliza en una diferenciación terminal que da lugar a adipocitos maduros funcionales (Esteve Ràfols, 2014).



**Figura 4.** Estadios de la adipogénesis: de preadipocitos a adipocitos maduros. Adaptado de Esteve Ràfols, 2014.

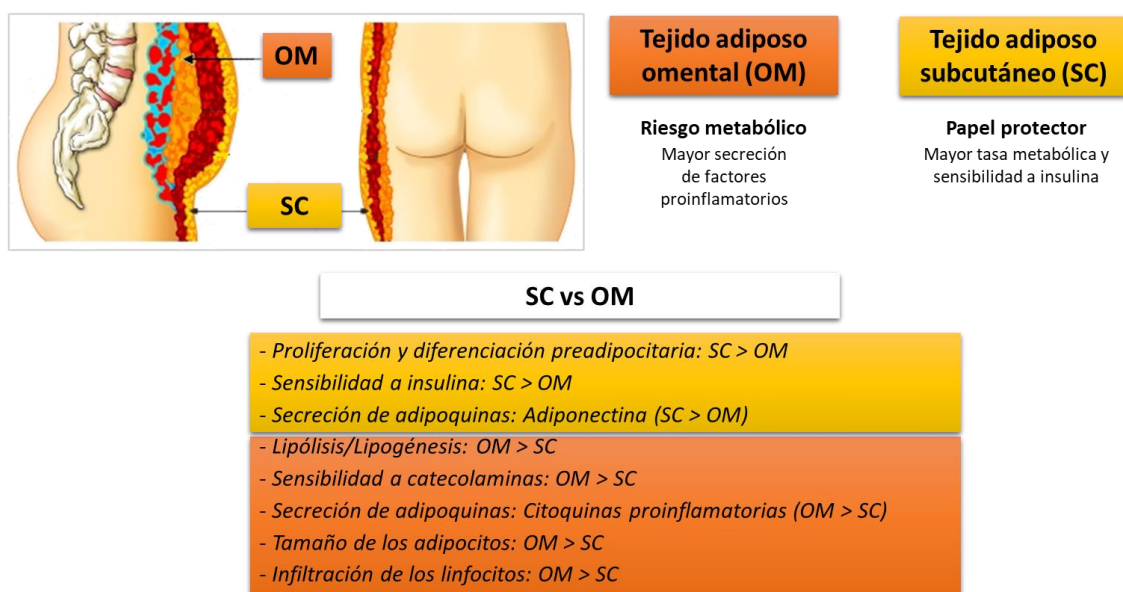
Entre las proteínas consideradas como marcadores tempranos de diferenciación se encuentran factores de transcripción clave, incluyendo a las proteínas C/EBPs (*CCAAT/enhancer-binding protein*) y PPAR $\gamma$  (*Peroxisome Proliferator- Activated Receptor  $\gamma$* ) (Lefterova y Lazar, 2009). Además, PPAR $\gamma$  y C/EBP $\alpha$  inducen la expresión de genes implicados en la diferenciación terminal de los adipocitos maduros, es decir, genes relacionados con la sensibilidad a la insulina, la lipogénesis y la lipólisis, incluidos el transportador de glucosa, GLUT4, la proteína de unión a ácidos grasos 4 (FABP4), la perilipina 1 (PLIN1) y adipoquinas como la adiponectina y leptina (Mosesti et al., 2016).

### 3. Distribución del tejido adiposo

Los adipocitos son las células mayoritarias del tejido adiposo, ricas en lípidos y contenidas en un órgano con una gran plasticidad cuya composición puede sufrir cambios fisiológicos llamativos (Cinti, 2018). En condiciones estándar, el tejido adiposo comprende adipocitos blancos y adipocitos marrones, que definen a los depósitos de grasa blanca y grasa parda, respectivamente, con diferencias morfológicas y funcionales claras. Ambos tipos de adipocitos almacenan la energía en forma de triacilglicéridos (TAGs); sin embargo, mientras que los adipocitos blancos acumulan los lípidos en una única gota lipídica, en los adipocitos marrones se distribuyen en varias gotas lipídicas (Vázquez-Vela et al., 2008). Los dos tipos de adipocitos cumplen funciones casi opuestas que son esenciales para la supervivencia, almacenar y disipar energía respectivamente (Giordano et al., 2014). Así, mientras que el tejido adiposo blanco tiene una mayor función de almacén de energía y movilización de los lípidos dependiendo de los requisitos metabólicos (Cinti, 2018), el tejido adiposo marrón se encarga de metabolizar los ácidos grasos con el fin de producir calor en respuesta al frío y las bajas temperaturas, proceso conocido como termogénesis (Cannon y Nedergaard, 2004). Además, el citoplasma de los adipocitos marrones contiene una gran cantidad de mitocondrias que están enriquecidas en la proteína desacoplante 1 (UCP1), encargada de interrumpir el acoplamiento de la cadena respiratoria a la ATP sintetasa, lo cual permite a su vez la liberación de calor (Lynes y Tseng, 2018).

Se ha descrito un tercer tipo de adipocito, *beige*, con características intermedias, que difiere de los adipocitos marrones tanto en los genes que expresa como en su origen, pero presenta capacidad termogénica (Mueller, 2014). De hecho, a diferencia de los adipocitos marrones, que derivan de precursores comunes a las células musculares, los adipocitos *beige* se propone que se generan mediante transdiferenciación de los adipocitos blancos (por ejemplo, en respuesta a frío, a catecolaminas, etc). Los adipocitos *beige* se sitúan entremezclados con los adipocitos de la grasa blanca y su cantidad disminuye con la obesidad (Cinti, 2018).

Los distintos depósitos de tejido adiposo se han considerado como mini-órganos específicos (Tchkonia et al., 2001). El tejido adiposo marrón es significativamente más pequeño que el tejido adiposo blanco y, en humanos, está localizado particularmente en la zona cervical-supraclavicular; ya en adultos, solo es reconocible bajo determinadas condiciones como una exposición a frío (Saito et al., 2016). Si nos centramos en el tejido adiposo blanco, el más abundante –que, a partir de ahora denominaremos de forma genérica como “tejido adiposo”–, se encuentra en dos localizaciones principales, depósito subcutáneo (SC) y depósito omental (OM) con diferencias entre ambos tipos de tejido adiposo (Khan et al., 2020) (Figura 5).



**Figura 5.** Características del tejido adiposo subcutáneo, SC, vs. tejido adiposo omental, OM.

De hecho, SC y OM incluyen distintos tipos de células precursoras de adipocitos (Sebo y Rodeheffer, 2019) que presentan diferencias intrínsecas en su genoma y proteoma (Schleinitz et al., 2020), en su composición lipídica (Hou et al., 2020) y en su perfil metabolómico (Ose et al., 2020), lo que proporciona diferencias fisiológicas entre ambos depósitos (Kwok et al., 2016). Además, SC y OM difieren en cuanto a la proliferación y capacidad de diferenciación de sus células precursoras, siendo superior en SC (Lafontan, 2014), mientras que la tasa de apoptosis está más aumentada en OM (Pellegrinelli et al., 2016).

Así, en cuanto a las características metabólicas, el depósito SC forma aproximadamente el 80% del tejido adiposo (Reddy et al., 2019). Este depósito tiene una mayor función de almacenamiento de lípidos, actuando como un tampón fisiológico en situaciones de exceso de ingesta de energía (Karastergiou y Fried, 2013). Por el contrario, el depósito OM es metabólicamente muy activo y libera constantemente ácidos grasos libres (FFA) al plasma (Tchkonina et al., 2013). Si comparamos los adipocitos maduros de ambos depósitos, el OM contiene adipocitos de mayor tamaño que los del SC (Belligoli et al., 2019). En el caso de la captación de glucosa, los niveles basales y el transporte de glucosa estimulado por insulina son mayores en el depósito OM que en el SC (Małodobra-Mazur et al., 2020). Así, los niveles de expresión de ARNm del transportador de glucosa, GLUT4, son mayores en adipocitos maduros del depósito OM que en el SC (Kojta et al., 2020). Finalmente, también existen diferencias entre el OM y el SC en cuanto a su capacidad de sintetizar y liberar adipoquinas (Dodson et al., 2014). El depósito OM está más infiltrado por células inflamatorias –como los macrófagos– (Liu y Nikolajczyk, 2019) y, por lo tanto, tiene mayor capacidad de generar citoquinas proinflamatorias como TNF $\alpha$ , proteína C- reactiva (PCR) e IL-6, entre otras (Mittal, 2019). Por el contrario, el depósito SC es la principal fuente de leptina y adiponectina (Konigorski et al., 2019).

Es importante el estudio de las características de cada depósito de tejido adiposo, ya que la distribución de este tejido adiposo es un factor de riesgo para las enfermedades asociadas a la obesidad, independientemente de la cantidad de grasa corporal total (Giordano et al., 2014). Así, la acumulación de tejido adiposo en el

depósito OM se asocia con el desarrollo de comorbilidades relacionadas con la obesidad y un mayor riesgo cardiovascular (Koster et al., 2015), mientras que la acumulación de grasa en el depósito SC se asocia con un perfil protector desde el punto de vista metabólico (McLaughlin et al., 2016). Sin embargo, la remodelación y disfunción del tejido adiposo de cada depósito también puede ser un factor clave en la fisiopatología de la enfermedad metabólica relacionada con la obesidad (Longo et al., 2019). En concreto, las alteraciones en la adipogénesis del depósito SC se han asociado con complicaciones metabólicas asociadas a la obesidad (Lessard et al., 2014).

## ALTERACIONES DEL TEJIDO ADIPOSO EN OBESIDAD

La obesidad se origina a partir del desequilibrio existente entre la energía ingerida y la consumida. Este exceso de energía acumulada conlleva a una expansión alterada del tejido adiposo, hecho que conduce al desarrollo de otros procesos patogénicos en este tejido, entre los que se encuentran una desregulación del metabolismo glucídico y lipídico, aparición de estrés oxidativo y del retículo endoplasmático y un estado inflamatorio (Sun et al., 2011; Tanaka et al., 2018; Kahn et al., 2019).

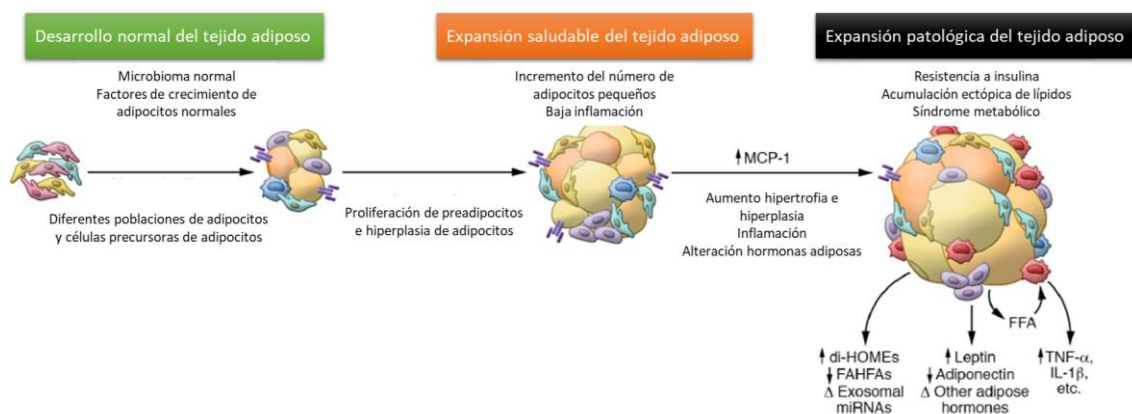
### 1. Expansión patológica del tejido adiposo

La plasticidad del tejido adiposo permite la adaptación del organismo a diversas situaciones metabólicas como, por ejemplo, el ayuno, el estrés o periodos de exceso energético (Booth et al., 2016). Así, la capacidad de expansión del tejido adiposo constituye un mecanismo de adaptación cuya función es hacer frente a una ingesta excesiva de calorías de manera crónica. La expansión "saludable" del tejido adiposo se consigue, principalmente, reclutando y diferenciando preadipocitos a adipocitos maduros, proceso conocido como hiperplasia y, en menor medida, con el aumento del tamaño de los adipocitos ya maduros existentes –hipertrofia– (Pellegrinelli et al., 2016) (**Figura 6**). Este tipo de expansión previene o retrasa la aparición de la resistencia a insulina y la acumulación ectópica de lípidos (Hepler y Gupta, 2017).

Concretamente, en obesidad se produce una expansión patológica del tejido adiposo (**Figura 6**). Durante esta expansión, es mayoritario el proceso de hipertrofia vs. hiperplasia del tejido adiposo. Así, la hipertrofia de los adipocitos se asocia con el desarrollo de enfermedades metabólicas asociadas a la obesidad (Longo et al., 2019). En condiciones de obesidad, el tamaño de los adipocitos maduros debe alcanzar un umbral crítico antes de reclutar a células precursoras para aumentar el número de adipocitos maduros (Cotillard et al., 2014). La hipertrofia de estos adipocitos induce situaciones de estrés en el tejido adiposo –estrés oxidativo y estrés del retículo endoplasmático, entre

otros– (Blüher, 2013) que, junto con el estrés mecánico, fruto de la acumulación de matriz extracelular –fibrosis– (Spencer et al., 2011), desencadenan una respuesta inflamatoria (Reilly Saltiel, 2017).

Estos procesos conducen a una limitación en la capacidad de almacenamiento del tejido adiposo, provocando que haya un exceso de lípidos en circulación y se almacenen en lugares ectópicos –hígado, músculo esquelético y corazón– (Kahn et al., 2019). La acumulación excesiva de lípidos en tejidos ectópicos conduce, en gran medida, al desarrollo de resistencia a insulina (Reilly y Saltiel, 2017) debido a procesos de lipotoxicidad, siendo probablemente el principal contribuyente a posteriores complicaciones metabólicas asociadas en un alto porcentaje de pacientes con obesidad (Czech, 2020).



**Figura 6.** Expansión saludable y patológica del tejido adiposo. Modificado de Kahn et al., 2019.

La mayoría de estudios proponen que los preadipocitos se vuelven disfuncionales en respuesta a la obesidad, mostrando patrones de expresión de marcadores de superficie alterados así como una disminución de la diferenciación, proliferación, migración y viabilidad celular (Pachón-Peña et al., 2016). En concreto, la expresión de genes adipogénicos como PPAR $\gamma$ , FABP4, ADIPOQ y FASN se observa disminuida en obesidad, indicando que el potencial adipogénico en estas condiciones se reduce y esto se exagera más aún en resistencia a insulina y diabetes tipo 2 (Belligoli et al., 2019). Sin embargo, los mecanismos moleculares específicos y los factores de señalización implicados en la pérdida de función de estas células en relación con la

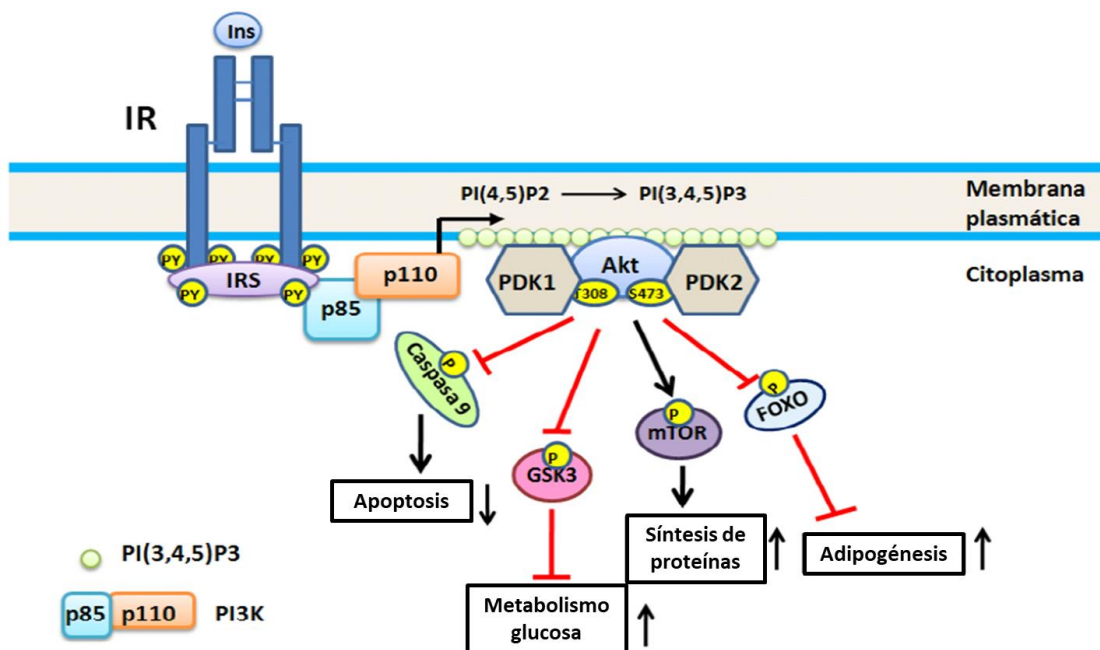
obesidad y las alteraciones metabólicas asociadas quedan por dilucidar por completo, lo que podría ser clave para desarrollar estrategias novedosas para promover la adipogénesis y, a su vez, la salud metabólica.

## 2. Regulación del metabolismo glucídico. Alteraciones en obesidad

Gracias, en parte, a la insulina que promueve la captación de glucosa por los adipocitos, los niveles de glucosa plasmática se mantienen dentro de un rango estrecho a pesar de nuestro consumo diario (Czech, 2017). La captación de glucosa tiene un papel clave en el control de la homeostasis energética de todo el cuerpo ya que regula el almacenamiento/utilización de glucosa (Krycer et al., 2017).

Tras una ingesta de alimentos, se produce la liberación de insulina por parte del páncreas. Esta hormona se une a su receptor provocando la autofosforilación del mismo. Dos vías principales de transducción son activadas por acción de la insulina: la vía de la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K) y la vía de las quinasas activadas por mitógenos (MAPK). La vía de la PI3K es el principal mecanismo por el que la insulina ejerce sus funciones en el metabolismo de la glucosa y de lípidos (Olivares-Reyes y Arellano-Plancarte, 2008). Tras la activación del receptor de insulina se produce la fosforilación rápida de los sustratos del receptor de insulina (IRS), IRS1 e IRS2 que conducen a la activación de la subunidad catalítica de la enzima fosfatidilinositol 3-quinasa –PI3K– (Klip et al., 2014). A consecuencia de ello, PI3K se localiza próxima a la membrana plasmática fosforilando al fosfatilinositol-3,4-bifosfato (PIP2) y produciendo fosfatidil-inositol-3,4,5-trifosfato (PIP3), que recluta a quinasas citosólicas –PDK1, PDK2 y AKT– a la membrana plasmática (Świdarska et al., 2020). AKT se encarga de controlar funciones biológicas como la apoptosis, el metabolismo de la glucosa así como la síntesis de proteínas (Petersen and Shulman, 2018). Por otro lado, AKT también está implicada en el control de la diferenciación adipocitaria (Ozaki et al., 2016) (**Figura 7**).





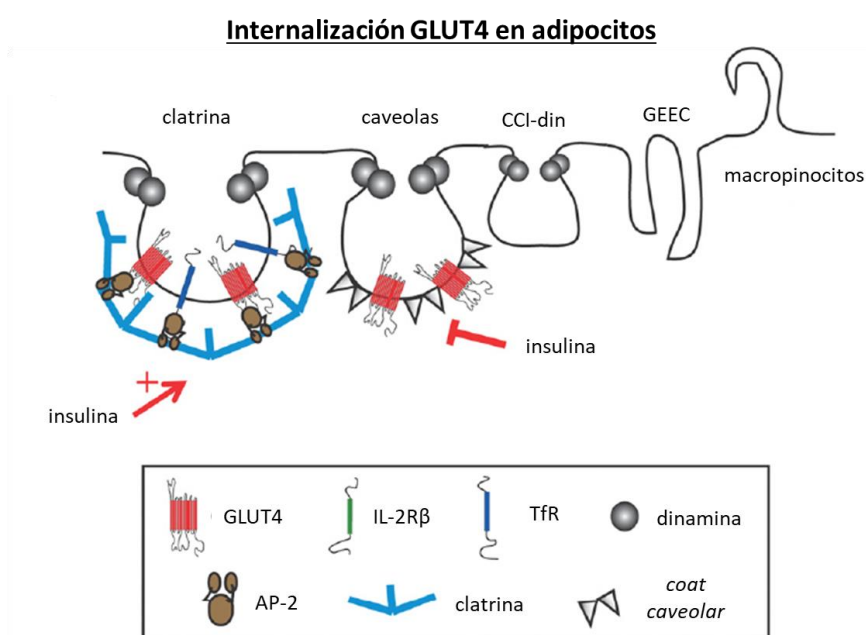
**Figura 7.** Mecanismos de acción de la insulina. Modificada de (Olivares-Reyes y Arellano-Plancarte, 2008).

Una reducción en la señalización de insulina, principalmente en el eje IRS/PI3K/AKT, conduce a una situación de resistencia a insulina que afecta a las acciones metabólicas mediadas por esta hormona (Wondmkun, 2020). Esta alteración en el inicio de la ruta de señalización de insulina en condiciones de obesidad y resistencia a insulina, conlleva, entre otros procesos, a que el transportador de glucosa GLUT4 se encuentre disminuido en el tejido adiposo en estas condiciones (Carvalho et al., 2005).

### 2.1. Tráfico de GLUT4 y su relación con el metabolismo del hierro

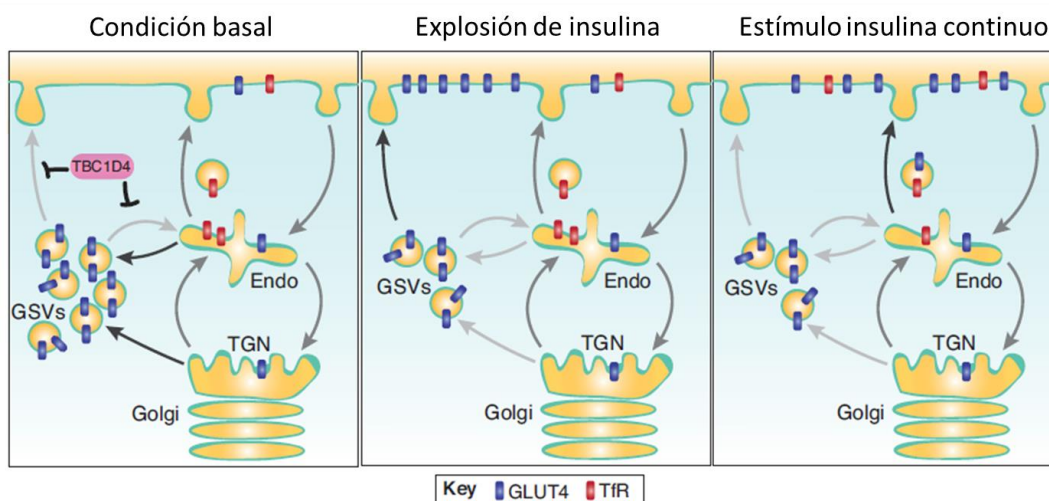
GLUT4 es un transportador de glucosa de alta afinidad, siendo el más abundante en los adipocitos (Klip et al., 2019). En el interior celular, GLUT4 se encuentra en vesículas citosólicas y solo entre un 5-10% de estos transportadores se encuentra expuesto en la superficie celular (Brewer et al., 2016). En respuesta a insulina, se produce la translocación de GLUT4 desde los compartimentos intracelulares hasta la membrana plasmática, proceso promovido por la insulina a través de la vía PI3K/AKT (Olivares-Reyes y Arellano-Plancarte, 2008).

Si nos centramos en la internalización de GLUT4 desde la membrana plasmática, hay varios mecanismos que lo explican: endocitosis mediada por clatrina, caveolas y otras rutas alternativas (Antonescu et al., 2009) (**Figura 8**). En concreto, en la endocitosis mediada por clatrina, el receptor de transferrina, TfR, y GLUT4 se encuentran dentro de las mismas vesículas de reciclaje. GLUT4 se separa de los receptores de transferrina en un compartimento especializado perinuclear de almacenamiento reticular de GLUT4 (GSVs).



**Figura 8.** Representación de las diferentes rutas de internalización de GLUT4 en adipocitos. Adaptada de Antonescu et al., 2009.

Así, el ciclo de endocitosis/exocitosis de GLUT4 consiste en que en ausencia de insulina (condiciones basales), se dirige hacia las vesículas de almacenamiento de GLUT4 (GSVs), derivadas de la red trans del Golgi (TGN) y de vesículas de endosomas tempranos, donde se encuentra junto con TfR. En presencia de insulina, estas GSVs se fusionan directamente con la membrana plasmática. Seguidamente, y en condiciones continuas de exposición a insulina, GLUT4 se recicla mediante endosomas tempranos y, junto con las proteínas GLUT4 almacenadas en el TGN, vuelven de nuevo a la membrana plasmática en unos compartimentos de reciclaje continuos. Cuando desaparece la señal de insulina, GLUT4 vuelve a ser acumulada en sus GSVs (Stöckli et al., 2011) (**Figura 9**).



**Figura 9.** Modelo del tráfico de GLUT4 junto con el receptor de transferrina, TfR. Modificada de Stöckli et al., 2011.

La alteración del ciclo de endocitosis/exocitosis de GLUT4 está asociada con la resistencia a insulina (Antonescu et al., 2009) y, debido a su relación con el TfR –proteína encargada de internalizar el hierro al interior celular gracias a su interacción con la transferrina–, también podría ser relevante en la alteración de la homeostasis del hierro en condiciones de obesidad y enfermedades metabólicas asociadas.

### 3. Regulación del metabolismo lipídico. Alteraciones en obesidad

El almacenamiento y movilización de los TAGs de las gotas lipídicas presentes en los adipocitos están regulados mediante un complejo sistema de control multifactorial. De forma general, el almacenamiento de los lípidos en forma de TAGs (lipogénesis) está principalmente regulado por la insulina; mientras que la movilización de los TAGs (lipólisis) está regulado especialmente por catecolaminas y péptidos natriuréticos (Moro et al., 2004; Czech et al., 2013).

### 3.1. Lipogénesis

La lipogénesis es un proceso anabólico y ocurre, principalmente, en el tejido adiposo, pero también en hígado, páncreas, músculo y corazón. El incremento postprandial de insulina ejerce un control de la respuesta anabólica en el tejido adiposo favoreciendo la captura de glucosa y ácidos grasos libres (FFA) y posterior síntesis de TAGs en los adipocitos (Cisa-Wieczorek y Hernández-Alvarez, 2020).

La síntesis de TAGs, lipogénesis, se lleva a cabo mediante la esterificación de tres ácidos grasos, que necesitan ser activados con acetil-CoA, para interaccionar posteriormente con glicerol-3-fosfato (G3P) y ser almacenados en la gota lipídica (Cisa-Wieczorek and Hernández-Alvarez, 2020). G3P y acetil-CoA se obtienen a partir del glicerol y ácidos grasos libres procedentes del plasma, pudiendo también ser sintetizados *de novo*. En el tejido adiposo, el G3P se obtiene a partir de la glucosa vía glicolisis mediante la metabolización de la dihidroxiacetona fosfato (DHAP) a G3P gracias a la glicerofosfato deshidrogenasa. Además, el G3P puede sintetizarse a partir de piruvato, lactato o aminoácidos mediante gliceroneogénesis, proceso importante en el tejido adiposo e hígado. Asimismo, los ácidos grasos pueden provenir de la dieta, de lipólisis periférica o lipogénesis *de novo* (Saponaro et al., 2015) (**Figura 10**).

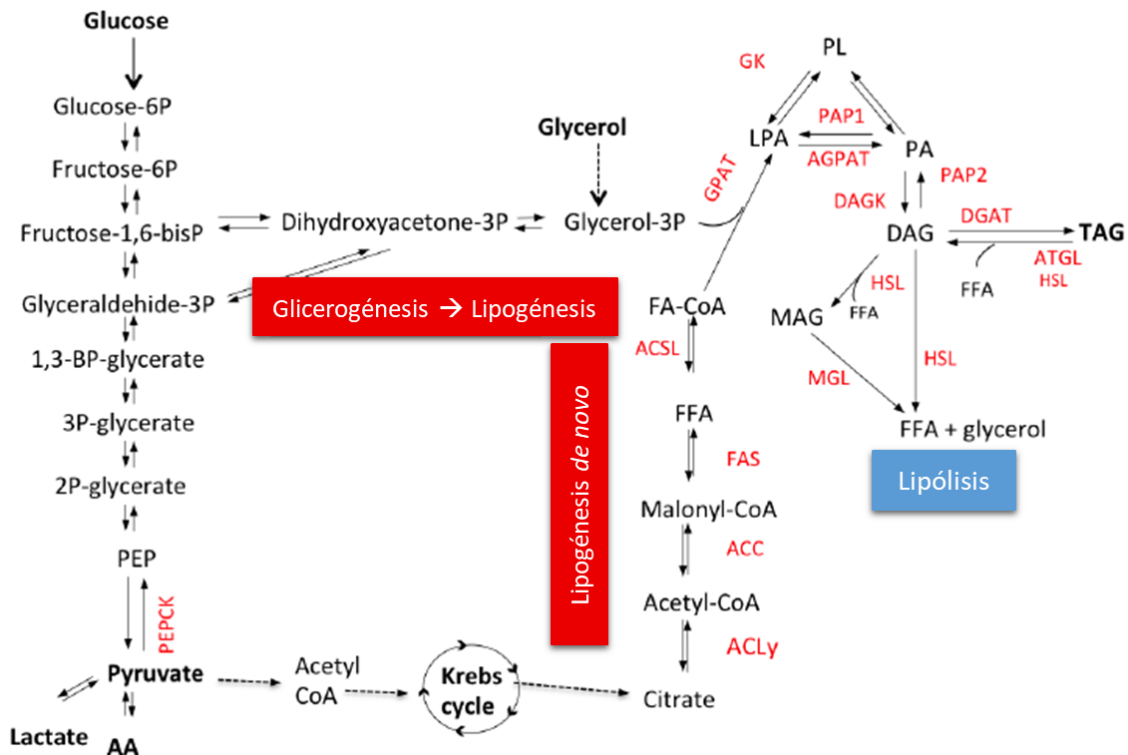
La lipogénesis *de novo* se lleva a cabo en hepatocitos y adipocitos. El citrato producido en el ciclo de Krebs se metaboliza a acetil-CoA por la ATP-citratoliasa (ACLY) y, posteriormente, se metaboliza a malonil-CoA, el cual se transforma en ácido palmítico o palmitato por la ácido graso sintasa (FASN) (Song et al., 2018). Por último, el palmitato sufre procesos de elongación y reacciones de saturación/desaturación para generar los distintos tipos de ácidos grasos (Solinas et al., 2015) (**Figura 10**).

En condiciones normales, la lipogénesis *de novo* es poco común en el tejido adiposo en comparación con el hígado (Letexier et al., 2003). No obstante, actualmente se acepta que este proceso, es importante para el mantenimiento de la homeostasis del tejido adiposo (Ameer et al., 2014), así como en la maduración de los adipocitos (Collins et al., 2011).

### 3.2. Lipólisis

La lipólisis es el proceso catabólico que promueve la movilización de reservas energéticas en forma de TAGs desde las gotas lipídicas de los adipocitos del tejido adiposo a órganos periféricos en respuesta a una demanda energética. La hidrólisis de TAGs tiene como resultado la liberación de ácidos grasos y glicerol al plasma. Este proceso se lleva a cabo por medio de tres lipasas diferentes que actúan de forma secuencial liberando uno a uno los ácidos grasos: ATGL –lipasa de triacilglicéridos–, la lipasa sensible a hormona –HSL–, encargada de la hidrólisis de diacilglicéridos a monoacilglicéridos, y MGL o lipasa de monoacilglicéridos (Saponaro et al., 2015) (**Figura 10**).

La lipólisis se desencadena por un aumento en la concentración intracelular de AMP cíclico (AMPc), que está regulado por la activación de receptores tipo proteína Gs, como los receptores  $\beta$ -adrenérgicos (receptores de adrenalina y noradrenalina). Los receptores acoplados a proteínas Gi (receptores de prostaglandinas o adenosina) inhiben a la adenilato ciclasa y disminuyen la concentración de AMPc. Además, la concentración de GMP cíclico (GMPc) también regula directamente la lipólisis. Los receptores de péptidos natriuréticos aumentan la concentración de GMPc. El AMPc activa a la proteína quinasa A (PKA) y el GMPc, a la proteína quinasa G (PKG). Ambas quinasas llevan a cabo la misma función, fosforilan a HSL, la lipasa sensible a hormonas, para provocar su translocación desde el citosol a la superficie de la gota lipídica. Además, ambas fosforilan a la perilipina 1 (proteína de la superficie de las gotas lipídicas) para causar una alteración en la gota lipídica que permite la acción de HSL. La chaperona lipídica FABP4 puede unirse a HSL fosforilada, favoreciendo la liberación de ácidos grasos libres (Lafontan and Langin, 2009). La insulina se une a su receptor y activa la fosfodiesterasa-3B (PDE-3B) que degrada el AMPc y, por lo tanto, inhibe la lipólisis (Czech et al., 2013).



**Figura 10.** Representación de los procesos lipolíticos y lipogénicos. Modificada de Saponaro et al., 2015.

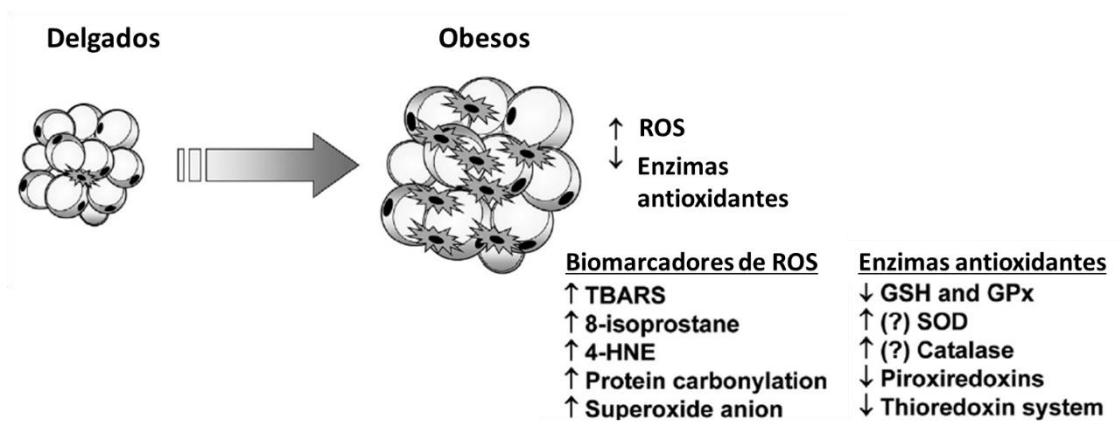
La acumulación excesiva de lípidos en el tejido adiposo conduce a un estado de lipotoxicidad, disfunción celular y alteración del metabolismo. Por tanto, el balance entre lipólisis y lipogénesis es crítico para el mantenimiento de la homeostasis, motivo por el que ambos procesos se encuentran altamente regulados por señales hormonales (Saponaro et al., 2015). En cuanto a la actividad de estos procesos en los dos depósitos grasos, el depósito OM muestra una menor sensibilidad a la insulina y a las tiazolidinedionas (TZD), fármacos antidiabéticos, pero son más sensibles a catecolaminas y glucocorticoides que el SC (Bódís y Roden, 2018). Por tanto, los adipocitos OM presentan una mayor actividad lipolítica que los SC, tanto en individuos delgados como obesos (Wajchenberg et al., 2002).

#### 4. Estrés oxidativo

En los adipocitos existe una alta actividad mitocondrial necesaria para mantener el equilibrio adecuado entre el almacenamiento y la movilización de energía. Este orgánulo, además de producir ATP, molécula energética, genera especies reactivas de oxígeno (ROS) en la cadena de transporte mitocondrial (Heinonen et al., 2020). La obesidad implica altos niveles de glucosa y lípidos circulantes, lo que conlleva a un exceso de sustratos energéticos. Este suministro excesivo de nutrientes puede, a su vez, aumentar la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), promoviendo el estrés oxidativo y el daño celular oxidativo posterior (Catalán et al., 2018).

Las especies reactivas de oxígeno, ROS, son moléculas químicamente reactivas que contienen algún átomo de oxígeno, como el radical superóxido ( $O_2^-$ ), el radical hidroxilo ( $OH^-$ ), el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), entre otras. Además de las ROS, las especies reactivas de nitrógeno, especies reactivas de azufre y especies reactivas de carbonilo también son en el desarrollo del estrés oxidativo (Sies et al., 2017).

El nivel de estrés oxidativo se puede conocer mediante la medición de las propias ROS, aunque su medición directa es laboriosa, fruto de su tiempo de vida. Por ello, se realizan habitualmente determinaciones del daño oxidativo como indicativo del estrés oxidativo existente en esas células. Por ejemplo, el 4-hidroxinon-2-enal (4-HNE o HNE) es un producto aldehído que sirve como marcador de la peroxidación lipídica. Otra medida del estrés oxidativo proviene del estudio de las enzimas antioxidantes, sistemas de defensa y eliminación de las ROS. Las enzimas superóxido dismutasa (SOD) o la glutatión sintetasa (GSS) se encuentran entre las más estudiadas. Finalmente, el estudio de la carbonilación de proteínas, modificación postraduccional inducida por ROS e irreversible, también es un buen marcador de la situación de estrés oxidativo del tejido adiposo (Catalán et al., 2018) (**Figura 11**).



**Figura 11.** Cambios asociados a los marcadores de estrés oxidativo en el tejido adiposo. Modificada de Catalán et al., 2018.

## 5. Estrés del retículo endoplasmático

El retículo endoplasmático (ER) es un orgánulo implicado en la síntesis de proteínas, lípidos, en la secreción de lipoproteínas, homeostasis del calcio y el metabolismo de la glucosa (Liu et al., 2015). El estrés del ER se genera por la acumulación de proteínas desplegadas o mal plegadas en la luz del ER fruto de que la maquinaria de degradación de proteínas no funciona correctamente, especialmente en condiciones de alta demanda de síntesis de proteínas (Mohan et al., 2019).

El estrés del ER en el tejido adiposo se ha asociado con enfermedades metabólicas como el desarrollo de diabetes tipo 2 en obesidad (Piperi et al., 2012). En nuestro grupo se ha demostrado que adipocitos maduros aislados de individuos obesos muestran cambios en marcadores del estrés del ER, con independencia del depósito de tejido adiposo, indicando que hay una disfunción de la maquinaria de degradación, del proteasoma, en condiciones de obesidad asociada al desarrollo de la resistencia a insulina (Díaz-Ruiz et al., 2015).

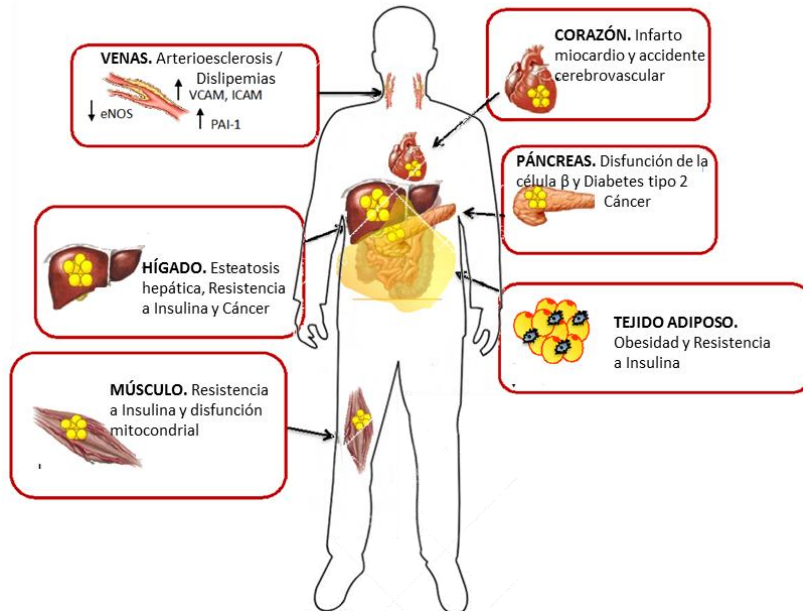


## 6. Respuesta inflamatoria

La obesidad se considera como una patología multifactorial y una enfermedad inflamatoria crónica de bajo grado (de Lorenzo et al., 2019). Los trabajos pioneros del grupo de Hotamisligil y Spiegelman demostraron la presencia de TNF $\alpha$  en el tejido adiposo OM de ratones obesos y cómo la neutralización de esta citoquina permitía recuperar la sensibilidad a insulina de los ratones estableciendo así las bases de la hipótesis de la inflamación como causa fundamental del desarrollo de resistencia a insulina en obesidad (Hotamisligil et al., 1994).

La acumulación excesiva de lípidos en los adipocitos altera la función de varios de sus orgánulos celulares, como el retículo endoplásmico (ER) y las mitocondrias, causando estrés del ER y un incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) –respectivamente– que, junto con las condiciones de hipoxia y el estrés mecánico provocado por la hipertrofia de estas células, inducen la activación de cascadas inflamatorias, incluyendo las rutas de señalización de las quinasas c-Jun N-terminal (JNK) e I $\kappa$ B (IKK)/NF $\kappa$ B. Esto, a su vez, incrementa la expresión y la secreción por parte de los adipocitos de citoquinas y quimioquinas (TNF $\alpha$ , IL-6 y MCP-1) que inducen la expresión de moléculas de adhesión (ICAM-1, VCAM-1) por las células endoteliales, lo que favorece la infiltración del tejido adiposo por macrófagos (Tanaka et al., 2018). Los macrófagos activados liberan citoquinas proinflamatorias que amplifican el efecto iniciado por los adipocitos. La suma de estos factores interfiere con la señalización a insulina causando resistencia a esta hormona, además de la disrupción de la adipogénesis y la muerte de estas células. Los ácidos grasos liberados por los adipocitos como resultado de la necrosis/apoptosis de adipocitos y/o incremento en la lipólisis como causa de la resistencia a insulina de los adipocitos, agravan la respuesta inflamatoria y se acumulan en localizaciones ectópicas, como músculo o hígado, donde inducen resistencia a insulina mediante un mecanismo lipotóxico (Gregor y Hotamisligil, 2007; Guilherme et al., 2008; Maury y Brichard, 2010; Virtue y Vidal-Puig, 2010). También se ha sugerido que, junto con los lípidos, las citoquinas proinflamatorias liberadas por el tejido adiposo contribuyen al desarrollo de la inflamación y apoptosis en otros órganos como el páncreas causando diabetes tipo 2. Además, también

promueven cambios en la presión sanguínea, coagulación, fibrinólisis e inflamación que conducen a la disfunción endotelial, aterosclerosis y, por tanto, desarrollo de la enfermedad cardiovascular (Saponaro et al., 2015) (**Figura 12**).



**Figura 12.** Acumulación ectópica de lípidos en el tejido adiposo y otros órganos y sus consecuencias metabólicas. Adaptada de Saponaro et al., 2015.

## **BÚSQUEDA DE BIOMARCADORES DE ENFERMEDAD METABÓLICA EN EL TEJIDO ADIPOSO**

En los últimos años, se han encontrado suficientes evidencias de que la disfunción del tejido adiposo está asociada a la aparición de enfermedades metabólicas como la obesidad, la resistencia a insulina y la diabetes tipo 2. Sin embargo, aún se desconocen muchos de los mecanismos subyacentes y rutas biológicas que se alteran en el tejido adiposo para desencadenar estas condiciones patológicas (Zhang et al., 2019a). Por este motivo, es necesario seguir investigando los mecanismos que subyacen en el desarrollo de la obesidad y sus comorbilidades asociadas (Peinado et al., 2014; López-Villar et al., 2015; Aleksandrova et al., 2020).

En adultos, el índice de masa corporal, IMC, se utiliza como un marcador de diagnóstico de la obesidad; sin embargo, su uso presenta limitaciones puesto que este marcador impide distinguir la masa asociada al tejido adiposo de la masa correspondiente a músculo (Bray et al., 2018). Por ello, en este escenario, es necesario identificar posibles biomarcadores que puedan ser útiles para el pronóstico, diagnóstico y/o terapia de la obesidad y las enfermedades metabólicas asociadas a la misma (O'Neill et al., 2016).

Para avanzar en el estudio de la disfunción del tejido adiposo, podríamos apoyarnos en los conocimientos obtenidos de otras enfermedades y procesos complejos como el cáncer o el envejecimiento. En concreto, el envejecimiento se caracteriza por el deterioro de las funciones celulares, siendo el principal factor de riesgo para el desarrollo de enfermedades humanas como la diabetes tipo 2, cáncer, patologías cardiovasculares y trastornos neurodegenerativos (López-Otín et al., 2013). López-Otín et al. propusieron un número de alteraciones esenciales en la fisiología celular que, de manera grupal, desencadenan la disfunción de un tejido y conducen al desarrollo de enfermedades (López-Otín et al., 2013). Entre estos marcadores de disfunción celular se encuentran la desregulación mitocondrial, la inestabilidad genómica, la pérdida de la proteostasis y la alteración de la comunicación intercelular, entre otros (López-Otín et al., 2013).

Tomando como base los marcadores ya descritos, se pueden añadir nuevos marcadores adicionales que deberían ser considerados en el contexto de la disfunción del tejido adiposo en condiciones de obesidad como la inflamación, la fibrosis, las condiciones de hipoxia (Crewe et al., 2017; Guzmán-Ruiz et al., 2020), las alteraciones en el metabolismo lipídico (López-Bascón et al., 2018; Fernández-Vega et al., 2020), así como modificaciones en la interacción entre los orgánulos (Pulido et al., 2011).

Sin embargo, a pesar de los avances realizados en la identificación de nuevos marcadores de la disfunción del tejido adiposo en obesidad, aún hay gran cantidad de mecanismos moleculares que se desconocen. En particular, en los últimos años, el uso de técnicas proteómicas ha permitido avanzar en el conocimiento de las proteínas que, por su ausencia o presencia excesiva en el tejido adiposo en obesidad, pueden contribuir a la disfunción de este órgano (Guzmán-Ruiz et al., 2020; Sánchez-Ceinos et al., 2021). No obstante, son necesarios nuevos estudios que estén centrados no solo en los posibles cambios cuantitativos que puedan sufrir proteínas clave, sino también en los posibles cambios en su localización o incluso en el estado funcional/disfuncional de dichas proteínas. En este sentido, el estudio de las modificaciones postraduccionales pueden proporcionar vías adicionales de identificación de posibles biomarcadores que puedan ser útiles para el establecimiento de nuevas alternativas biomédicas (Peinado et al., 2012; Lombard-Banek et al., 2016).

### **1. Uso de las aproximaciones ómicas para la búsqueda de biomarcadores**

La aplicación de técnicas ómicas al estudio del tejido adiposo, fundamentalmente de transcriptómica (Henegar et al., 2008; Dankel et al., 2010; Hurtado Del Pozo et al., 2011; Klimčáková et al., 2011) y, en menor medida, de proteómica (Peinado et al., 2012; Pérez-Pérez et al., 2012; Renes y Mariman, 2013; Díaz-Ruiz et al., 2015) han proporcionado una valiosa información sobre los genes y, en definitiva, de las proteínas cuya expresión precede o es causa de la alteración de la actividad de los adipocitos en obesidad.

En concreto, en el grupo donde se ha desarrollado esta Tesis Doctoral, se han llevado a cabo varios estudios proteómicos del tejido adiposo relacionados con el

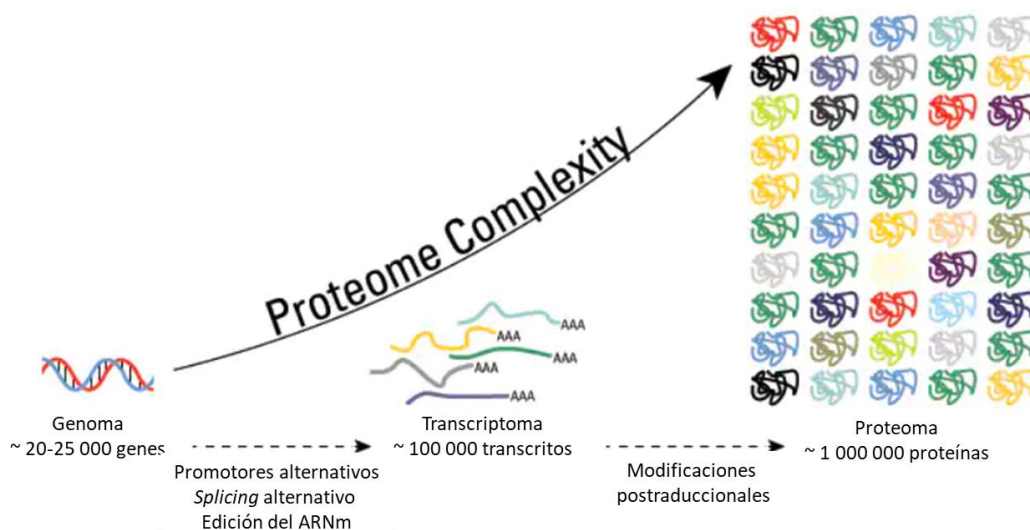
desarrollo de resistencia a insulina (IR) y diabetes tipo 2 (T2D) asociado a la obesidad, incluyendo la caracterización de componentes de dicho tejido que se alteran en estas condiciones patológicas (Peinado et al., 2011; Díaz-Ruiz et al., 2015; Guzmán-Ruiz et al., 2020; Sánchez-Ceinos et al., 2021), e incluso la repuesta a la pérdida de peso tras cirugía bariátrica (Moreno-Castellanos et al., 2016).

Por tanto, la proteómica ha demostrado ser útil para entender la complejidad biológica que hay detrás de la obesidad y sus comorbilidades asociadas, siendo una técnica que permite la identificación de nuevos biomarcadores proteicos. Sin embargo, a diferencia de la genómica y la transcriptómica, el análisis del proteoma permite la detección de modificaciones postraduccionales (MPT) de las proteínas, que podría ser fundamental a la hora de definir un buen biomarcador (Aleksandrova et al., 2020).

Aunque está ampliamente establecida la relevancia de las modificaciones postraduccionales (MPTs) de las proteínas en la estructura, dinámica y función de estas (Woodsmith y Stelzl, 2014), y a pesar de que cada vez existen más publicaciones sobre la importancia de las MPTs en el desarrollo de distintas enfermedades, incluida la diabetes (Kamath et al., 2011; Anbalagan et al., 2012; Hennrich y Gavin, 2015), aún son muy escasos los estudios sobre el papel de las MPTs; en concreto, sobre acetilación y carbonilación, en enfermedades metabólicas (IR y T2D) en condiciones de obesidad.

## 2. Modificaciones postraduccionales

Actualmente, se acepta que la diferencia en complejidad que existe entre el genoma y el proteoma se debe, en gran parte, a las modificaciones postraduccionales (MPTs) que sufren las proteínas, ya que de los 25.000 genes, que aproximadamente componen el genoma humano, se codifican un número final estimado de 1 millón de proteínas (**Figura 13**). Las MPTs son modificaciones químicas que tienen una influencia fundamental en la función de las proteínas, ya que regulan su localización, actividad e interacción con otras proteínas, cofactores, lípidos o ácidos nucleicos (Scott y Pawson, 2009).



**Figura 13.** Diversidad y complejidad proteómica debida a las modificaciones postraduccionales. Modificado de [www.thermofisher.com](http://www.thermofisher.com).

Concretamente, se han descrito alrededor de 400 modificaciones co- y postraduccionales de proteínas (MPTs) que, en conjunto, definen el perfil proteómico definitivo de tejidos y órganos (Ramazi y Zahiri, 2021). Dichas modificaciones actúan como interruptores celulares que regulan la actividad, estabilidad, localización e interacción entre diferentes proteínas, orquestando así la función proteica según los requerimientos celulares, por lo que juegan un papel relevante en el desarrollo de cáncer, enfermedades neurodegenerativas o diabetes tipo 2 (Kamath et al., 2011; Anbalagan et al., 2012).

Las MPTs ocurren en la cadena lateral de distintos aminoácidos o enlaces peptídicos, y son llevadas a cabo principalmente por la acción de enzimas, entre las que se incluyen quinasas, ligasas, fosfatasa y transferasas, que añaden o eliminan grupos funcionales, lípidos, azúcares o proteínas; además de proteasas, las cuales rompen enlaces peptídicos para eliminar subunidades regulatorias o secuencias específicas (Han et al., 2022). Debido a que regulan la actividad de numerosas proteínas, las MPTs permiten que el proteoma sea dinámico y pueda responder cambiando frente a los diversos estímulos que puedan ocurrir (Beltrao et al., 2013). De hecho, las MPTs pueden ocurrir en cualquier momento de la vida media de una proteína ya sea, por ejemplo,

para completar su plegamiento o regular su estabilidad, o para dirigir su transporte a diferentes compartimentos celulares. Igualmente, se ha comprobado que estas modificaciones pueden llegar a activar o inactivar a las proteínas, incluso marcarlas para su degradación. Además, dependiendo de la naturaleza de la modificación, estas pueden ser reversibles o irreversibles (Duan y Walther, 2015; Ke et al., 2016).

Entre las MPTs más conocidas se incluyen la fosforilación, acetilación, glicosilación, ubiquitinación, metilación y sumoilación, además de la carbonilación, que constituye una modificación irreversible que normalmente va asociada a la pérdida de función de la proteína (Choudhary et al., 2014; Ramazi y Zahiri, 2021). En esta Tesis Doctoral nos centraremos en el estudio de dos de estas MPTs: acetilación, como modificación reversible; y carbonilación, como modificación irreversible.

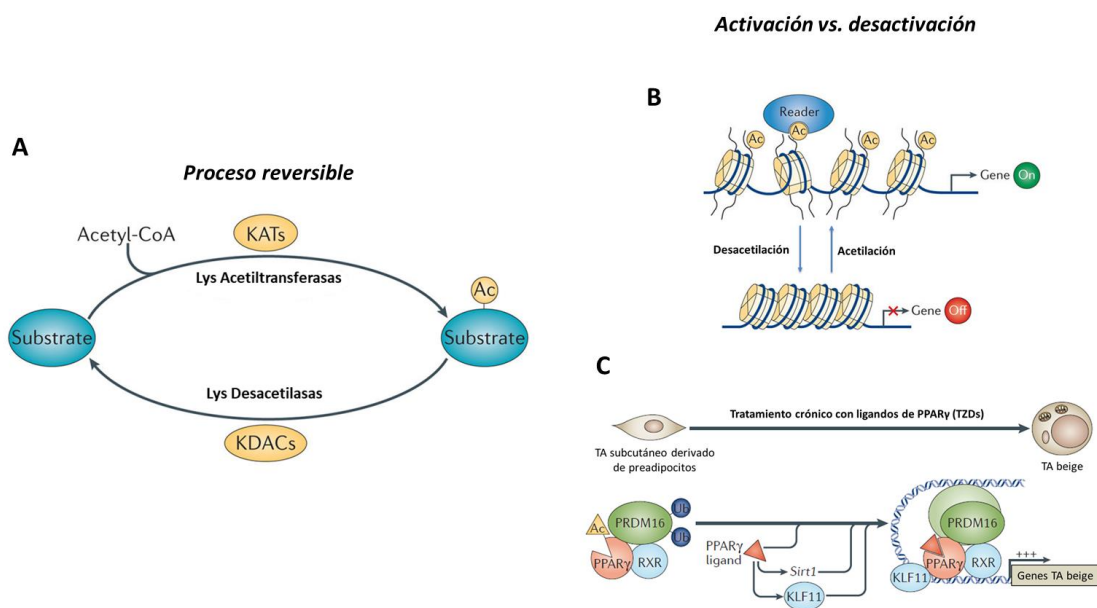
### 2.1. La acetilación

Una de las MPTs que más se está relacionando actualmente con el desarrollo de patologías como la diabetes, el cáncer o enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas (Anbalagan et al., 2012; Verdin y Ott, 2015; Drazic et al., 2016) es la acetilación. Esta MPT consiste en la adición de un grupo acetilo procedente del metabolito acetil-CoA a la cadena lateral de los residuos de lisina de las proteínas aunque también puede tener lugar en el amino N $\alpha$ -terminal de la proteína (Kamath et al., 2011; Verdin y Ott, 2015). De hecho, se considera que –aparte de la fosforilación– la acetilación constituye la MPT más importante y abundante en señalización celular y metabolismo (Drazic et al., 2016). Detectada por primera vez en histonas, la acetilación es una modificación reversible que parece jugar un papel fundamental en la actividad de proteínas no-histonas, como chaperonas, así como en la regulación de su localización, en las interacciones con otras proteínas, en la regulación de la transcripción, o incluso en procesos como el metabolismo, el tráfico celular y la señalización intracelular (Anbalagan et al., 2012; Choudhary et al., 2014). Cabe resaltar que existen residuos de lisina que son también susceptibles de modificarse por otras MPTs como la ubiquitinación o la carbonilación siendo marcadas las proteínas, en esta ocasión, para ser degradadas ([www.phosphoSite.org](http://www.phosphoSite.org)).

La acetilación de proteínas está controlada por lisina acetiltransferasas –KATs– y lisina desacetilasas –KDACs– (Choudhary et al., 2014) (**Figura 14A**). Entre estas últimas se encuentran las sirtuínas, que utilizan NAD<sup>+</sup> como cosustrato (Drazic et al., 2016). De hecho, se ha establecido que existe una relación entre el metabolismo y la acetilación, habiéndose asociado la abundancia de nutrientes con un incremento de la incorporación de grupos acetilo en las proteínas, debido al aumento de las concentraciones celulares de acetil-CoA (derivados del metabolismo de la glucosa y ácidos grasos), el cual es utilizado como sustrato de las enzimas acetiltransferasas (Verdin y Ott, 2015). Este hecho, junto con la evidencia de que la mayor parte de las enzimas que participan en el metabolismo de ácidos grasos y glucosa se encuentran acetiladas (Choudhary et al., 2014), convierte a la acetilación en un potencial sensor metabólico intracelular. En concreto, varios estudios han demostrado que gran cantidad de enzimas que participan en el metabolismo de la glucosa y de ácidos grasos, en el ciclo de Krebs o en el de urea, se acetilan (Choudhary et al., 2009; Spange et al., 2009; Fukushima y Lopaschuk, 2016; Zhang et al., 2019b; Zhao et al., 2020). Además, la expresión de enzimas metabólicas clave está determinada, entre otros factores, por la acetilación/desacetilación del factor de transcripción PCG1 $\alpha$ , implicado en el metabolismo y biogénesis mitocondrial (Zhang et al., 2012).

La acetilación/desacetilación de proteínas modula, indistintamente, la activación/desactivación funcional de las proteínas. Así, en el caso de las histonas, la acetilación de estas proteínas permite el desenrollamiento de la cadena de ADN activando la transcripción de genes (Verdin y Ott, 2015) (**Figura 14B**). Sin embargo, el tratamiento crónico del tejido adiposo subcutáneo con agonistas de PPAR $\gamma$  induce la activación de la sirtuína 1 (Sirt1), la cual desacetila PPAR $\gamma$  provocando la formación del complejo PRDM16-PPAR $\gamma$  que desencadena la cascada de señalización de factores de transcripción activando la transcripción de genes de diferenciación adipocitaria (Inagaki et al., 2016) (**Figura 14C**).





**Figura 14.** Características de la acetilación. **A.** La acetilación es una modificación postraduccional reversible (modificada de Choudhary, C. et al., 2014). La acetilación de histonas activa la transcripción génica (modificada de Verdin y Ott, 2015) **(B)**, mientras que la acetilación de PPARγ bloquea la transcripción de genes regulados por este factor de transcripción (modificada de Inagaki et al., 2016) **(C)**.

La acetilación de proteínas está implicada en la regulación de múltiples y diversos procesos celulares, por lo que actualmente se está planteando explotar el potencial que esta modificación está demostrando a nivel proteico tanto en condiciones fisiológicas como patológicas (Verdin y Ott, 2015). En particular, y en relación con la influencia de la acetilación sobre la actividad de las histonas y regulación epigenética, recientemente se aprobó por la FDA (*Food and Drug Administration*, EE.UU.) el uso de un inhibidor de desacetilasas de histonas, *Vorinostat*, para el tratamiento de linfoma de células T cutáneo primario y se han estudiado otros inhibidores (*Panabinstat*, *Romidepsin*) en un número importante de ensayos clínicos (Verdin y Ott, 2015).

Centrándonos en los estudios de acetilación relacionados con el tejido adiposo, Kim et al. han mostrado –mediante estudios proteómicos de acetilación diferencial de adipocitos 3T3-L1– que la acetilación de una proteína mitocondrial del ciclo de Krebs, la malato deshidrogenasa, es esencial para el desarrollo de la adipogénesis, lo que es especialmente relevante dado el papel clave de dicho proceso en el desarrollo de la resistencia a insulina (Kim et al., 2012). Más aún, se ha descrito que la sobreexpresión

específica en células 3T3-L1 de la lisina desacetilasa, KDAC9, inhibe la adipogénesis, proceso que se encuentra incrementado en preadipocitos procedentes de ratones *knockout* para esta desacetilasa (Schwer et al., 2009). Adicionalmente, Lundby et al. establecieron el acetiloma comparativo de 12 tejidos de rata y observaron, entre otros aspectos, que el tejido adiposo está particularmente enriquecido en proteínas acetiladas asociadas al espacio extracelular, lo que está en consonancia con la importancia de este compartimento en la disfunción del tejido adiposo (Lundby et al., 2012). Sin embargo, no hay estudios donde se describa el perfil exhaustivo del proteoma de proteínas acetiladas en residuos de lisina (acetiloma) de los dos depósitos de tejido adiposo, subcutáneo (SC) y omental (OM), en condiciones fisiológicas (individuos delgados) y durante el desarrollo de obesidad y resistencia a insulina.

## 2.2. La carbonilación

Numerosos artículos asocian la patogénesis de una gran variedad de estados metabólicos e inflamatorios como la enfermedad cardiovascular, obesidad, resistencia a insulina y diabetes tipo 2, con la existencia de estrés oxidativo, el cual se produce como consecuencia de un acúmulo citotóxico de especies reactivas de oxígeno (ROS) debido a un exceso en su producción, a una disminución de la capacidad antioxidante celular, o a la combinación de ambos procesos (Vincent y Taylor, 2006; Curtis et al., 2012; Masschelin et al., 2020).

El exceso de ROS provoca daño oxidativo en las células mediante su interacción con lípidos, provocando peroxidación lipídica o uniéndose a residuos aminoacídicos de proteínas causando la carbonilación de proteínas (Catalán et al., 2018). Concretamente, la carbonilación de proteínas corresponde a una modificación postraduccional (MPT) no enzimática inducida por ROS que se desarrolla en condiciones de estrés oxidativo, por lo que se trata de un marcador potencial de daño oxidativo del tejido adiposo en condiciones de obesidad. Esta modificación postraduccional no enzimática irreversible se genera por oxidación directa de las cadenas laterales de algunos residuos aminoacídicos, particularmente treonina (T), arginina (R), prolina (P) y lisina (K), transformándose en cetonas o derivados de aldehídos (Ghezzi y Bonetto, 2003). La

carbonilación altera la función de las proteínas y conduce a su degradación, afectando con ello a múltiples vías de señalización celular (Catalán et al., 2018).

Si analizamos trabajos realizados en el tejido adiposo sobre esta MPT, estudios proteómicos demostraron la presencia de proteínas carboniladas en el tejido adiposo de animales con obesidad y resistencia a insulina relacionadas con el metabolismo de los lípidos, glúcidos y ácidos nucleicos, así como asociadas a la síntesis y degradación de proteínas, enzimas antioxidantes y de respuesta a estrés celular, proteínas motoras y estructurales, y proteínas de señalización celular (Grimsrud et al., 2007).

Además, en otro estudio proteómico –en este caso, con individuos de diferentes IMC pero sin alteraciones en el patrón de sensibilidad a insulina–, mostraron una correlación positiva entre la acumulación de grupos carbonilo totales en el tejido adiposo humano con la concentración de lípidos circulantes en obesidad (Frohnert et al., 2011). Estudios de nuestro laboratorio en adipocitos humanos (Díaz-Ruiz et al., 2015) han permitido establecer que la resistencia a insulina lleva consigo un incremento global en los niveles de carbonilación proteica. Por otro lado, es necesario conocer y analizar el estado redox de cada uno de los depósitos del tejido adiposo, SC y OM. Un estudio llevado a cabo en muestras de tejido adiposo SC y OM de mujeres con normopeso y obesidad subclasificadas en metabólicamente sanas y metabólicamente obesas, donde se analizaron los sistemas antioxidantes, mostró que el depósito OM –en comparación con el SC– presentaba mayor actividad enzimática de la glutatión sintetasa (GSH) y actividades enzimáticas dependientes de GSH. Fruto de su implicación en la lipogénesis, estas diferencias interdepósito podrían deberse a la mayor actividad metabólica en OM (Jankovic et al., 2014). Sin embargo, hasta la fecha no se ha identificado el perfil de proteínas carboniladas en el tejido adiposo de individuos obesos, ni existen estudios que determinen de forma cuantitativa las diferencias en el perfil de proteínas carboniladas en ambos depósitos del tejido adiposo, SC y OM, en condiciones de resistencia a insulina asociadas a la obesidad.

### 3. Proteína de unión a ácidos grasos 4: FABP4

Las chaperonas lipídicas intracelulares, también conocidas como proteínas de unión a ácidos grasos (*Fatty Acid Binding Proteins*-FABPs), son un grupo de pequeñas moléculas (14-15 KDa) que se unen de forma reversible y con gran afinidad a ligandos hidrofóbicos como ácidos grasos saturados o insaturados de cadena larga, eicosanoides y otros lípidos (Furuhashi y Hotamisligil, 2008). Debido a la hidrofobicidad de la forma libre de los ácidos grasos, las FABPs son necesarias para unirse a los ácidos grasos de forma no covalente, permitiendo su movilización y regulando así sus funciones biológicas (Hotamisligil y Bernlohr, 2015). Además, se ha demostrado que las FABPs están involucradas en la regulación de procesos metabólicos e inflamatorios mediados por lípidos (Queipo-Ortuño et al., 2012).

Desde el descubrimiento inicial de las FABPs en 1972 (Ockner et al., 1972) se han identificado 9 miembros diferentes de esta familia que presentan un patrón único de expresión en tejidos relacionados con el metabolismo activo de lípidos (Furuhashi y Hotamisligil, 2008). Las FABPs presentan estructuras tridimensionales similares, constituidas por una estructura de barril  $\beta$  formada por 10 hebras  $\beta$  antiparalelas, donde las 5 primeras y las 5 segundas sufren un empaquetamiento ortogonal. Las dos láminas  $\beta$  resultantes se unen por una estructura hélice-bucle-hélice (Hotamisligil y Bernlohr, 2015).

En concreto, la proteína FABP4, también conocida como aP2 o A-FABP, es la principal proteína de esta familia que se expresa en adipocitos, aunque en menor cantidad también se expresa en otros tipos celulares como los macrófagos (Maeda et al., 2005). FABP4 se une reversiblemente a ácidos grasos de cadena larga, tanto saturados como insaturados, con alta afinidad y gran selectividad (Furuhashi et al., 2014). Su expresión está altamente inducida durante el proceso de diferenciación adipocitaria (Niu et al., 2016), lo que la hace idónea como marcador de adipogénesis. En el tejido adiposo, su transcripción está regulada por insulina, ácidos grasos y PPAR $\gamma$  o agonistas de estos receptores (Hotamisligil y Bernlohr, 2015).

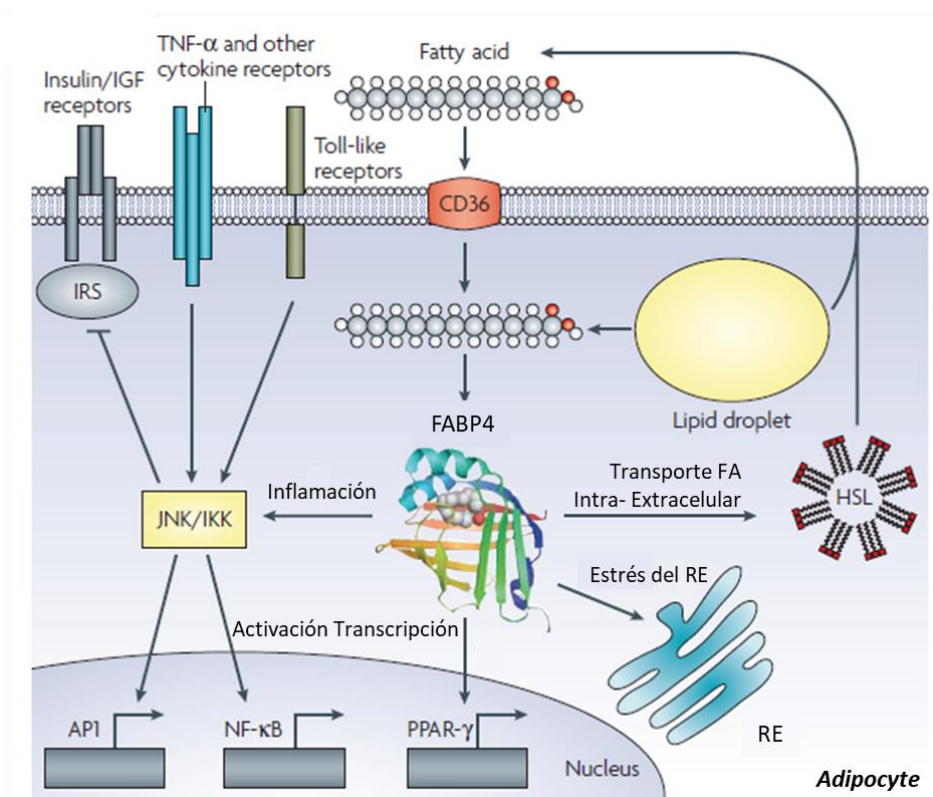
Esta proteína presenta una función dual participando como chaperona lipídica en el tráfico intracelular de lípidos (vía núcleo-citosol, citosol-gota lipídica-mitocondria) y también como molécula señalizadora tras su secreción por el tejido adiposo (Hotamisligil y Bernlohr, 2015; Furuhashi, 2019).

Como chaperona lipídica, FABP4 participa en la internalización de los ácidos grasos en los adipocitos, donde activa a la lipasa sensible a hormonas (HSL) e interviene, por tanto, en la regulación de la lipólisis. Asimismo, se ha visto que FABP4 está implicada en la transferencia de lípidos a receptores nucleares como PPAR $\gamma$ , para mediar programas de transcripción (Furuhashi et al., 2014) (**Figura 15**).

Estudios con ratones *knockout* para FABP4 mostraron deficiencia en la captación de ácidos grasos y en la eficiencia de la lipólisis (Makowski y Hotamisligil, 2005). FABP4 puede transportar ácidos grasos al núcleo regulando la transcripción mediada por lípidos. La proteína puede transportar ligandos específicos desde el citosol hasta el núcleo para su interacción con el receptor nuclear PPAR $\gamma$ . Esta unión potencia la actividad transcripcional del receptor, el cual modula la activación de genes implicados en rutas de diferenciación adipocitaria –adipogénesis, transporte de ácidos grasos y lipogénesis *de novo*– (Hotamisligil y Bernlohr, 2015). De hecho, en su estructura tridimensional, FABP4 muestra una señal de localización nuclear (*nuclear localization signal-NLS*) basada en tres residuos (K22, R31, K32) localizados en las hélices  $\alpha$  de la estructura hélice-bucle-hélice que cierra el barril  $\beta$ . Esta señal es necesaria para su translocación nuclear (Gillilan et al., 2007).

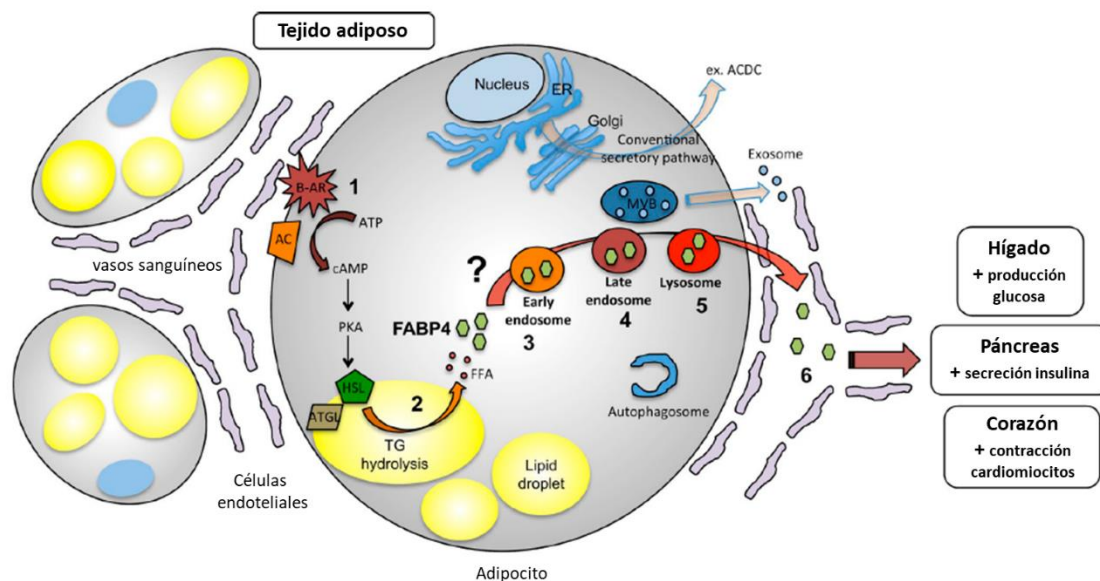
En relación a la lipogénesis *de novo*, la ausencia de FABP4 en adipocitos se traduce en un incremento de los niveles intracelulares de ácidos grasos, lo que podría explicar el aumento de peso corporal que experimentan los animales deficientes en FABP4. Sin embargo, a pesar de este incremento de peso, la ausencia de FABP4 se acompaña de una protección frente a la resistencia a insulina en obesidad genética o inducida por una dieta rica en grasa (Furuhashi et al., 2014). Curiosamente, en animales delgados no se observan cambios en la sensibilidad a insulina en ausencia de FABP4, aunque los ratones delgados *knockout* para FABP4 exhiben una disminución de la secreción de insulina en respuesta a la estimulación  $\beta$ -adrenérgica. Estos resultados han

conducido a sugerir que esta proteína tiene un papel en la modulación de la secreción de insulina (Hotamisligil y Bernlohr, 2015).



**Figura 15.** Funciones de FABP4 en los adipocitos. Modificada de Furuhashi y Hotamisligil, 2008.

Respecto a sus funciones como adipocina, FABP4 carece de péptido señal en el extremo N-terminal, necesario para su secreción por la ruta clásica vesicular. Recientemente, se ha demostrado que la secreción de FABP4 está mediada por un compartimento delimitado por membrana, independiente de la ruta de secreción convencional retículo endoplasmático-Golgi-membrana plasmática. Aunque los cuerpos multivesiculares (MVB) y los exosomas están implicados en la liberación de FABP4, no son las principales vías de secreción de esta proteína. Así, se ha observado que, tras una estimulación con un agonista lipídico, se produce la hidrólisis de TAGs, lo que conduce al empaquetamiento de FABP4 en compartimentos endosomales/lisosomales y finaliza con la liberación de FABP4 al espacio extracelular (Villeneuve et al., 2018) (**Figura 16**).



**Figura 16.** Ruta de secreción de FABP4. Modificado de Villeneuve et al., 2018.

La secreción de FABP4 se produce como respuesta a determinadas situaciones como el ayuno, la hipoxia y la administración de agonistas  $\beta$ -adrenérgicos siendo inhibida su secreción por la insulina (Wu et al., 2014; Hotamisligil y Bernlohr, 2015).

FABP4 representa el 1% de todas las proteínas solubles del tejido adiposo y, en humanos, sus niveles en plasma varían desde 10 hasta 50 ng/mL, lo que supone un valor elevado comparado con otras adipoquinas. Cabe destacar que sus niveles circulantes son superiores en mujeres que en hombres, posiblemente debido a la presencia de mayor cantidad de tejido adiposo en las primeras (Furuhashi et al., 2014). Una vez que FABP4 circula en plasma, puede actuar sobre diferentes tipos celulares regulando procesos como la producción de glucosa en hepatocitos, la secreción de insulina en las células  $\beta$ -pancreáticas o el control de la contracción de cardiomiocitos, entre otros (Villeneuve et al., 2018).

Diversos trabajos del grupo del Dr. Hotamisligil han mostrado que los niveles circulantes de FABP4 son mayores en modelos experimentales de obesidad y en pacientes con obesidad, especialmente si concurre con diabetes tipo 2 (Hotamisligil y Bernlohr, 2015). En esta línea, los niveles en plasma de dicha adipoquina se correlacionan con la resistencia a insulina, hipertensión, IMC, dislipemia y niveles

elevados de triglicéridos. Sobre la base de estos estudios, se ha propuesto que FABP4 podría predecir el desarrollo de diabetes tipo 2 (Hotamisligil y Bernlohr, 2015).

Respecto a los factores que regulan la producción de FABP4 en condiciones de obesidad, se ha observado que PPAR $\gamma$  promueve la expresión de FABP4 en macrófagos activados (Hotamisligil y Bernlohr, 2015), y su expresión también se encuentra inducida por LDL (*Low Density Lipoprotein*) y por ácidos grasos saturados, lo que conlleva a la acumulación intracelular de ésteres de colesterol en estas células y a la formación de células espumosas. También se ha comprobado que FABP4 participa en los mecanismos de inflamación mediante una retroalimentación positiva de la quinasa C-Jun N-terminal (JNK), una de las principales proteínas mediadoras de la resistencia a insulina. Por lo tanto, los estímulos inflamatorios inducen la activación de JNK en los macrófagos, lo que potencia la expresión de FABP4. A su vez, un aumento de esta adipoquina incrementa la fosforilación de JNK, lo que se traduce en un aumento de la liberación de citoquinas proinflamatorias (el Husseny et al., 2017).

Sobre FABP4 se han descrito diferentes MPTs como la fosforilación, la carbonilación y/o la acetilación, las cuales podrían regular o influir en la función de la proteína (Gillilan et al., 2007; Xu et al., 2013; Prentice et al., 2019). En concreto, la acetilación en residuos de lisina podría jugar un papel esencial en la modulación de sus funciones puesto que la señal de importación al núcleo de esta proteína contiene lisinas que podrían estar reguladas por esta modificación postraduccional.



## NUEVOS AVANCES METODOLÓGICOS EN LA IDENTIFICACIÓN DE BIOMARCADORES

Por último, los estudios proteómicos en general, y de MPTs en particular, presentan limitaciones en cuanto a la falta de herramientas para inducir MPTs en residuos específicos de proteínas concretas o anticuerpos específicos de residuos que permitan profundizar para el diseño de estrategias de prevención o terapéuticas. En este sentido, la nanomedicina aparece como un área de trabajo futuro para el diseño de estas estrategias, línea que aún no ha sido muy explorada en relación al tejido adiposo, concretamente. Por tanto, existe la necesidad de buscar nuevas estrategias metodológicas en este ámbito tales como el uso de los *quantum dots*. En concreto, ya hay *quantum dots* conjugadas con proteínas comerciales (Qdot™ Streptavidin Sampler Kit, por ejemplo) para aplicaciones como *Western blot*, citometría de flujo, adquisición de imágenes por microscopía confocal e incluso en flujos de trabajo de purificación para lograr el fraccionamiento deseado ([www.thermofisher.com](http://www.thermofisher.com)).

Además, recientemente, un estudio ha analizado los efectos de la encapsulación de la dibenzazepina, inhibidor de la señalización de Notch, en nanopartículas fluorescentes para destacar el posible papel terapéutico de la señalización de Notch en el tratamiento de la obesidad (Huang et al., 2020). Tras la administración del inhibidor encapsulado en nanopartículas fluorescentes se observó una mejora en la internalización celular del inhibidor, provocando una inhibición sostenida de Notch y reduciendo así la expansión del tejido adiposo subcutáneo. Estos resultados mostraron cómo la señalización de Notch juega un papel esencial en la regulación de la plasticidad del tejido adiposo en animales grandes (Huang et al., 2020). Por otro lado, el uso de SQDs conjugadas con anticuerpos para biomarcadores específicos (CD15, CD30, CD45, y Pax5) han ayudado, mediante microscopía confocal, al diagnóstico del linfoma de Hodgkin gracias a la identificación de células tumorales de baja abundancia en tejidos linfáticos (Liu et al., 2010).

Lo expuesto anteriormente son ejemplos del auge que han logrado los nanomateriales de alta luminiscencia en el campo de la nanomedicina por sus múltiples

aplicaciones y gracias a su bajo coste, su fácil preparación, su alta reactividad y sus excelentes propiedades fotoluminescentes. El término “*quantum dots*” (QDs) fue acuñado por primera vez para los *quantum dots* semiconductores (Ekimov y Onushchenko, 1982), pero posteriormente Cayuela et al. (2016) presentaron un nuevo marco para asignar la terminología adecuada a los diferentes tipos de *nanodots* fluorescentes que contienen un confinamiento cuántico: *semiconductor quantum dots* (SQDs) y *carbon-based quantum dots* (CQDs). Desde el descubrimiento de las SQDs (Ekimov y Onushchenko, 1982), su utilización para bioimagen, rastreo y administración de fármacos ha permitido la mejora en las tecnologías de etiquetado y detección de última generación, proporcionando grandes expectativas para la fabricación de nanoherramientas médicas innovadoras para su uso como una alternativa a las convencionales disponibles actualmente, como las basadas en las etiquetas orgánicas (Wu et al., 2003; Srinivasan et al., 2006; Liu et al., 2007).

Así, el número de aplicaciones publicadas con SQDs ha experimentado un incremento considerable, especialmente en biología y en clínica (Cayuela et al., 2016). En particular, se ha demostrado su potencial en análisis FRET (técnica de transferencia de energía de resonancia fluorescente), administración de fármacos, bioimágenes *in vivo* y seguimiento celular (Jamieson et al., 2007; Rosenthal et al., 2011). Sin embargo, su uso está limitado debido a su potencial toxicidad asociada con la liberación de metales pesados. La investigación al respecto está enfocada a la identificación de nuevas nanopartículas fluorescentes alternativas cuyas propiedades biológicas y médicas estén mejoradas con respecto a las SQDs.

En esta línea, la nueva generación de QDs consiste en nanomateriales biocompatibles que permiten el desarrollo de múltiples aplicaciones en nanomedicina. Así, las CQDs de grafito, descubiertas en 2004 durante la purificación de nanotubos de carbono (Xu et al., 2004) han sido unas excelentes candidatas para su aplicación en sistemas biológicos en estudios de detección e imagen. Estas generaciones de QDs muestran baja toxicidad superando, de esta manera, los efectos tóxicos de las SQDs y los colorantes orgánicos, lo que se une además a su bajo coste de producción y la facilidad para producirlas. Desde su descubrimiento, se han publicado numerosas

aplicaciones como para detección (bio)química, fotocátalisis, bioimagen o administración de fármacos (Wang y Hu, 2014; Xu et al., 2014; Fernando et al., 2015; Kargbo et al., 2015; Cayuela et al., 2016; Liu et al., 2016; Molaei, 2019; Panwar et al., 2019; Tian y Yin, 2019).

En los últimos años, las CQDs han sido analizadas para su uso en estudios de viabilidad celular. Ray et al. (2009) propusieron el uso de las nanopartículas fluorescentes de carbono como una sonda ideal para obtener imágenes celulares ya que son capaces de entrar a las células sin la necesidad de realizar una modificación específica de la superficie celular. Así, un estudio demostró la compatibilidad de las nanopartículas fluorescentes de carbono en fibroblastos y su uso como transportadoras y liberadores de genes para el tratamiento de cáncer (Wu et al., 2016). Finalmente, una evaluación de seguridad sistemática –realizada a través de toxicidades agudas y subagudas de *nanodots* de carbono– demostró que no tenían efectos tóxicos (Wang et al., 2013).

En concreto, las CQDs ya han sido analizadas en distintas líneas celulares y bajo diferentes condiciones experimentales. En este sentido, Blas-García et al. (2016) llevaron a cabo un estudio de toxicidad *in vitro* en el que demostraron una correlación positiva entre la concentración de QDs y el tiempo de exposición (24, 48 y 72 h). Por otro lado, también se ha analizado la influencia de la superficie de las CQDs en estudios toxicológicos. Así, un reciente estudio analizó los efectos de las CQDs con diferentes cargas en la superficie sobre la viabilidad, proliferación, diferenciación, la captación celular y estabilidad de las CDQs en células madre mesenquimales derivadas de cordón umbilical humano. Los resultados indicaron que las CDQs con baja carga positiva en la superficie mantenían un buen balance entre la biocompatibilidad de las CQDs y la captación celular en esas células (Yan et al., 2018). Jung et al. (2015) generaron CDs zwitteriónicas a través de la modificación de la superficie de CDs utilizando  $\beta$ -alanina y ácido cítrico y mostraron su internalización celular y traslocación celular con una baja toxicidad. En concordancia con los resultados anteriores, Havrdova et al. (2016) investigaron la citotoxicidad de CQDs de acuerdo con las cargas superficiales de dichas *nanodots* conferidas por los diferentes grupos funcionales añadidos. Estos resultados

demonstraron que una carga neutra de las CQDs no provoca estrés oxidativo en las células ni cambios en la morfología celular en comparación con las CQDs cargadas. De hecho, las QDs cargadas positivamente inducen una alta toxicidad a través de la generación de estrés oxidativo y cambios en la morfología celular (Havrdova et al., 2016).

Si bien es cierto que las dos familias de *quantum dots* fluorescentes han sido ampliamente estudiadas de manera individual para múltiples aplicaciones en el campo de la biomedicina, hasta el momento no se han realizado estudios comparativos de estas dos nanopartículas para determinar su comportamiento en un mismo tipo celular debido a las características específicas de cada célula y bajo las mismas condiciones. Como ejemplo, los fibroblastos, células que se diferencian a preadipocitos y posteriormente a adipocitos maduros, son células individuales ubicadas en el espacio intersticial y se consideran células quiescentes debido a su baja actividad metabólica, aunque se activan en condiciones de estrés como la inflamación aguda y crónica y la fibrosis tisular (Kalluri, 2016). Sin embargo, los hepatocitos, otro tipo celular relacionado con el metabolismo, constituyen aproximadamente el 80% del volumen hepático, están implicados en varios procesos como la captación de sustancias y su posterior metabolismo o desintoxicación y activación de la inmunidad innata (Schroeder y McNiven, 2014; Zhou et al., 2015). Además, la fagocitosis es el principal mecanismo de endocitosis de los fibroblastos (Behzadi et al., 2017) mientras que varios mecanismos de pinocitosis dependiente de clatrina o mediada por caveolas, entre otros, son los responsables de la internalización de sustancias en los hepatocitos (Schroeder y McNiven, 2014). Por tanto, es importante conocer la interacción de las CQDs y SQDs con los diferentes tipos celulares debido al interés de incorporar el uso de las nanopartículas a diferentes aplicaciones biomédicas como la liberación de fármacos o en bioimagen (McNamara y Tofail, 2017).

Por otra parte, la toxicidad de CQDs y SQDs depende de la capacidad de internalización de los *nanodots* en las células. Las propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas como forma, tamaño, carga superficial y composición, entre otras, influyen en el proceso de interacción *nanodots*-células (Behzadi et al., 2017). Se sabe

que el entorno extracelular como el pH, el contenido de proteína del suero o del plasma aislado puede afectar las interacciones *nanodots*-célula y en la internalización de los *nanodots* (Behzadi et al., 2017). Por ejemplo, Salvador-Morales et al. (2006) demostraron que los nanomateriales pueden interactuar con proteínas como fibrinógeno y apolipoproteínas (AI, AIV y CIII) presentes en el plasma.

En este sentido, las características sintéticas de los *nanodots* experimentan cambios cuando los nanomateriales entran en contacto con un entorno extracelular, obteniendo una identidad biológica diferente a la identidad sintética (Walkey y Chan, 2012). La interacción nanopartículas-células se produce debido a una cubierta de suero de proteínas, conocida como proteína “corona”, sobre la superficie de las nanopartículas, proceso que modifica tanto a la nanopartícula como a las propiedades de las biomoléculas e incluso su función proteica (Lynch y Dawson, 2008).

Así, algunos estudios han demostrado que la presencia de suero altera el tamaño y el potencial zeta de las nanopartículas (Ehrenberg et al., 2009). Dependiendo de qué proteínas del suero rodeen a las nanopartículas, la “corona” de proteína de nanopartículas ingresa en las células a través de un mecanismo de endocitosis específico –endocitosis mediada por clatrina, endocitosis mediada por caveolina, endocitosis independiente de clatrina/caveola, fagocitosis y micropinocitosis– (Sahay et al., 2010). No obstante, las nanopartículas pueden internalizarse en las células en ausencia de suero mediante la interacción con los receptores de la superficie celular (Lesniak et al., 2012).

Por lo tanto, las QDs podrían ser una buena herramienta para la caracterización y posible aplicación biomédica de proteínas de interés en condiciones de obesidad y resistencia a insulina, como FABP4 o transferrina, que son captadas por las células a través de diferentes mecanismos y son, además, reguladas funcionalmente por modificaciones postraduccionales.





# OBJETIVOS





En los últimos años, se ha avanzado en la identificación de marcadores de disfunción del tejido adiposo en obesidad gracias, en parte, a la aplicación de técnicas ómicas tales como genómica, transcriptómica y proteómica en modelos animales y humanos en condiciones de obesidad y sus comorbilidades asociadas (Novelle et al., 2017; Aleksandrova et al., 2020). En el grupo donde se ha desarrollado esta Tesis Doctoral, se han llevado a cabo varios estudios proteómicos relacionados con el desarrollo de resistencia a insulina (IR) y diabetes tipo 2 (T2D) asociado a la obesidad, incluyendo la identificación del proteoma del tejido adiposo (Guzmán-Ruiz et al., 2020) así como de sus principales componentes: fracción del estroma vascular, preadipocitos y adipocitos (Peinado et al., 2011; Díaz-Ruiz et al., 2015; Sánchez-Ceinos et al., 2021), que se ven alterados en estas condiciones patológicas o también, en respuesta a la pérdida de peso tras cirugía bariátrica (Moreno-Castellanos et al., 2016).

Sin embargo, no solo la mayor o menor expresión de proteínas puede afectar a su función, ya que la gran mayoría están reguladas por modificaciones postraduccionales (fosforilación, acetilación, carbonilación,...), un aspecto que ha sido aún poco estudiado en el tejido adiposo en obesidad. Por ello, esta Tesis Doctoral ha tenido como objetivo general explorar, identificar y caracterizar nuevos posibles marcadores regulados funcionalmente por modificaciones postraduccionales e implicados en el desarrollo y progresión de enfermedad metabólica (IR y T2D) en condiciones de obesidad.

Estos nuevos descubrimientos podrían convertirse en potenciales biomarcadores de pronóstico o dianas terapéuticas en IR y T2D, enfermedades que hoy en día presentan una alta prevalencia y suponen un alto riesgo para la salud a nivel mundial. Así, para poder alcanzar este objetivo principal, se plantearon los siguientes objetivos específicos:

1. Describir e identificar, mediante enriquecimiento de proteínas acetiladas y posterior análisis HPLC-MS/MS, el acetiloma del tejido adiposo humano subcutáneo (SC) y omental (OM) en condiciones fisiológicas (individuos delgados) y durante el desarrollo de obesidad y resistencia a insulina –sujetos con obesidad y normoglucemia (Ob-NG) y sujetos con obesidad y resistencia a insulina (IR)–. A partir

de estos resultados, caracterizar un posible biomarcador regulado funcionalmente por acetilación en el tejido adiposo en condiciones de obesidad y resistencia a insulina.

2. Describir e identificar, empleando una técnica proteómica 2D, el carboniloma del tejido adiposo humano subcutáneo (SC) y omental (OM) en condiciones de obesidad y resistencia a insulina en una cohorte de pacientes con obesidad y distintos grados de sensibilidad a insulina –sujetos con obesidad y normogluceemia (Ob-NG), con obesidad y resistencia a insulina (IR) y, por último, con obesidad y diabetes tipo 2 (T2D)–. Analizadas las proteínas carboniladas identificadas, caracterizar un posible biomarcador regulado funcionalmente por carbonilación en el tejido adiposo en condiciones de obesidad y resistencia a insulina.

Finalmente, como estudio adicional, planteamos iniciar el desarrollo de metodologías novedosas con uso potencial en estudios sobre accesibilidad y efecto de la administración de proteínas/fármacos de interés, basado en nanodispositivos, como sigue:

3. Analizar y comparar el uso de nanopartículas fotoluminiscentes, *semiconductor quantum dots* (SQDs) y *carbon-based quantum dots* (CQDs), en el campo de la biomedicina y su posible aplicación para el estudio de modificaciones postraduccionales.







# **MATERIALES Y MÉTODOS**



---

## COHORTES DE ESTUDIO

---

Esta Tesis Doctoral incluye dos estudios derivados de 3 cohortes diferentes, las cuales se describen a continuación. Todos los participantes incluidos en las cohortes dieron su consentimiento informado por escrito. Los protocolos de estudio fueron aprobados por los Comités de Ética e Investigación de los correspondientes hospitales siguiendo todos ellos la Declaración de Helsinki y el protocolo de buenas prácticas clínicas.

### **1. Cohorte 1**

Se recogieron muestras de tejido adiposo humano de subcutáneo (SC) y omental (OM) de individuos delgados y pacientes con obesidad mórbida procedentes de la Unidad de Endocrinología y Nutrición del Hospital Clínico Virgen de la Victoria (Málaga). En el caso de los individuos delgados, las muestras de tejido adiposo subcutáneo (SC) y omental (OM) se obtuvieron durante procedimientos quirúrgicos programados no agudos, como cirugía laparoscópica para reparar hernias de hiato o colecistectomías. En el caso de los pacientes con obesidad, las muestras fueron obtenidas durante procedimientos de cirugía bariátrica. Se consideraron los siguientes criterios de inclusión: hombres caucásicos sin patologías subyacentes en la exploración física y pruebas realizadas; y de exclusión: embarazos o lactancia, enfermedad inflamatoria aguda o crónica y algún tipo de enfermedad sistémica grave no relacionada con la obesidad (enfermedades infecciosas, cáncer, nefropatía o hepatopatía grave) así como enfermedad cardiovascular mayor en los 6 meses previos a la inclusión en el estudio.

En el caso de los pacientes con obesidad, fueron subclasificados en 2 grupos siguiendo los criterios del Comité de Expertos sobre el Diagnóstico y Clasificación de la Diabetes de la Asociación América de Diabetes (ADA, 2022): sujetos con obesidad normoglucémicos (Ob-NG) (Glucosa < 100 mg/dL y HbA1c < 5,7%) e individuos con obesidad insulinoresistentes (Ob-IR) (Glucosa 100 - 126 mg/dL y HbA1c 5,7 – 6,4%).

Durante las intervenciones quirúrgicas, se obtuvieron muestras pareadas de tejido adiposo subcutáneo (SC) y omental (OM) que, inmediatamente tras su extracción, fueron mantenidas a -80°C hasta su utilización.

## **2. Cohorte 2**

Se reclutaron pacientes con obesidad mórbida por parte de la Unidad de Lípidos y Ateroesclerosis del Hospital Universitario Reina Sofía (Córdoba). Los criterios de inclusión fueron hombres y mujeres caucásicos sometidos a cirugía bariátrica y sin patologías subyacentes en la exploración física y pruebas realizadas. Como criterios de exclusión: se incluyeron la presencia de diabetes mellitus tipo 2 (T2D) en tratamiento con insulina, embarazo o lactancia, algún tipo de enfermedad sistémica grave no relacionada con la obesidad (enfermedades infecciosas, cáncer, nefropatía o hepatopatía grave), así como enfermedad cardiovascular mayor en los 6 meses previos a la inclusión en el estudio y, por último, presentar enfermedad inflamatoria aguda o crónica.

Los pacientes fueron subclasificados en 3 grupos: obesos normoglucémicos (Ob-NG) (Glucosa < 100 mg/dL y HbA1c < 5,7%), obesos insulinoresistentes (Ob-IR) (Glucosa 100 - 126 mg/dL y HbA1c 5,7 – 6,4%) y obesos diabéticos tipo 2 (Ob-T2D) (Glucosa > 126 mg/dL, HbA1c > 6,4%) siguiendo los criterios de la ADA (2022). Las muestras pareadas de tejido adiposo subcutáneo (SC) y omental (OM) obtenidas durante la intervención de cirugía bariátrica fueron mantenidas a -80°C hasta su utilización.

## **3. Cohorte 3**

Se tomaron muestras de suero de pacientes incluidos en el estudio de intervención Dietética CORonaria con aceite de Oliva y estudio de PREVención cardiovascular (CORDIOPREV) registrado en ClinicalTrials.gov (NTC00924937). El estudio CORDIOPREV es un estudio prospectivo realizado en 1002 pacientes con enfermedad coronaria y alto riesgo cardiovascular (Delgado-Lista, 2022). Los pacientes incluidos en el estudio tuvieron su último evento coronario antes de los 6 meses previos a la inclusión en el estudio, edades comprendidas entre 20-75 años y sin otras enfermedades graves o, al menos, una esperanza de vida no menor de 5 años.



Los sujetos fueron aleatorizados en dos modelos dietéticos diferentes (dieta mediterránea y baja en grasas). Posteriormente, los pacientes que participaron en el estudio fueron subclasificados en 2 grupos: grupo sin T2D en los 60 meses de seguimiento de estudio y pacientes con T2D incidente, que incluye a aquellos pacientes que desarrollaron T2D (criterios ADA; Podadera-Herreros et al., 2022) durante los meses de seguimiento del estudio.

---

## CULTIVOS CELULARES

---

### 1. Cultivo y diferenciación *in vitro* de preadipocitos primarios humanos

Las muestras de tejido adiposo humano fresco (SC y OM) procedentes de la cohorte 2 fueron procesadas para aislar los adipocitos maduros (no utilizados en esta Tesis Doctoral) y la fracción del estroma vascular (SVF) (Díaz-Ruiz et al., 2015). Para ello, las muestras fueron lavadas con D-PBS para eliminar la sangre contaminante y dispersadas mecánicamente en DMEM/F-12 (1:1). A continuación, las muestras fueron dispersadas enzimáticamente mediante su incubación con DMEM/F-12 (1:1) conteniendo 400 unidades/mL de colagenasa tipo V a 37°C durante 30 min en un baño en agitación. Los restos de tejido no digeridos fueron eliminados mediante filtración con filtros de 100 µm de poro (sterile 100 µm pore Cell Strainer; BDFalcon; Glendale, AZ, EE.UU.) y los sobrenadantes fueron centrifugados a 600 g durante 10 min para separar la capa de adipocitos maduros flotantes y el *pellet* de SVF. La SVF fue resuspendida en DMEM/F-12, filtrada con filtros de 40 µm de poro (sterile 40 µm pore Cell Strainer; BDFalcon; Glendale, AZ, EE.UU.) y centrifugada a 400 g durante 5 min. El *pellet* SVF resultante fue resuspendido en 500 µL de tampón de lisis de eritrocitos, incubado durante 3 min a temperatura ambiente y, por último, centrifugado de nuevo a 400 g durante 10 min.

El *pellet* resultante contiene preadipocitos humanos, los cuales fueron cultivados y diferenciados *in vitro* hasta adipocitos maduros como se describió previamente (Serena et al., 2016). Así, el *pellet* de SVF fue sembrado en una botella de 25 cm<sup>2</sup> con medio de

cultivo de proliferación de preadipocitos –DMEM/F-12 (1:1) suplementado con 8 mM biotina, 18 mM de ácido pantoténico, 100 mM de ácido ascórbico y 1% de antibiótico estreptomycin-penicilina– con 10% NBS 37°C con una concentración de CO<sub>2</sub> del 5%. El medio de cultivo fue cambiado cada 48 h hasta alcanzar una confluencia del 70-80%. Una vez alcanzada la confluencia, las células fueron levantadas con solución de tripsina-EDTA y subcultivadas de nuevo en botellas de mantenimiento a una densidad de 4000 células/cm<sup>2</sup>, proceso que se repitió entre 2-3 veces para ampliar y purificar el cultivo celular siguiendo los protocolos establecidos previamente (Palumbo et al., 2018).

Una vez que se alcanzó el 70-80% de confluencia, tras 2-3 pases, los preadipocitos fueron subcultivados en placas individuales de 35 mm con cubreobjetos sobre el pocillo a una densidad de 4000 células/cm<sup>2</sup> para los estudios de imagen y, de nuevo, se esperó hasta que alcanzaran una confluencia del 70-80% para comenzar el proceso de diferenciación. Alcanzada dicha confluencia, el día 0 de diferenciación, los preadipocitos primarios humanos fueron diferenciados utilizando medio de diferenciación (medio de cultivo de proliferación de preadipocitos con 3% de NBS y 17,5 mM de glucosa) suplementado con 10 µg/mL de insulina, 0,1 µM de dexametasona, 1 µM de rosiglitazona y 0,5 mM de IBMX durante 3 días. A día 3 de diferenciación, el medio de cultivo fue sustituido por el medio de cultivo de diferenciación suplementado con 10 µg/mL de insulina y 0,1 µM de dexametasona durante 3 días. Alcanzado el día 6 de diferenciación, el medio de cultivo fue refrescado y manteniendo el mismo hasta alcanzar el día 10 de diferenciación.

## **2. Línea celular 3T3-L1**

En esta Tesis Doctoral se ha empleado la línea celular 3T3-L1 (ATCC; LGC Standards S.L.U., Barcelona, España), fibroblastos de ratón con capacidad de diferenciación a adipocitos maduros en presencia de un cóctel hormonal.

Así, las células fueron sembradas en botellas de 150 cm<sup>2</sup> a una densidad de 2000 células/cm<sup>2</sup> con medio de cultivo de mantenimiento –DMEM 4,5 g/L glucosa, 4 mM L-glutamina, 1% solución antibiótica-antimicótica (v/v), 1,5 g/L NaHCO<sub>3</sub> y 10% NBS (v/v)– e incubadas a 37°C con una concentración de CO<sub>2</sub> del 5% hasta alcanzar una confluencia

mínima del 70-80% con cambio de medio cada 2 días. En ese momento, se subcultivaron en el soporte específico para cada experimento (placas de Petri de 150 mm, placas de 6 pocillos, placas de 12 pocillos, pocillos individuales para imagen) a una densidad de 3000 células/cm<sup>2</sup> para iniciar el proceso de diferenciación. Los subcultivos se mantuvieron con medio de cultivo de mantenimiento durante 4 días hasta alcanzar el máximo grado de confluencia, día de inicio de la diferenciación. En el primer día de diferenciación, día 0, se incubaron las células con un medio base de diferenciación –DMEM 4,5 g/L glucosa, 4 mM L-glutamina, 1% solución antibiótica-antimicótica (v/v), 1,5 g/L NaHCO<sub>3</sub> y 10% FBS (v/v)– suplementado con 10 µg/mL insulina, 0,25 µM dexametasona y 0,5 mM IBMX durante 72 h. Transcurrido este tiempo, a día 3 de diferenciación, este medio se sustituyó por medio base de diferenciación suplementado con 10 µg/mL insulina y se mantuvieron durante 72 h, alcanzando el día 6 de diferenciación. A partir de entonces, el medio de cultivo fue refrescado cada 48 h (medio de diferenciación base) hasta alcanzar el día 10 de diferenciación, obteniendo adipocitos maduros.

## APROXIMACIONES PROTEÓMICAS

La proteómica, que permite la identificación de biomarcadores proteicos, ha demostrado ser útil para entender la compleja biología detrás de la obesidad y sus comorbilidades. A diferencia de la genómica y la transcriptómica, el análisis del proteoma permite la detección de modificaciones postraduccionales (MPT) y la interacción de proteínas (Aleksandrova et al., 2020).

### 1. Aproximación ómica 1: enriquecimiento proteínas acetiladas y análisis HPLC-MS/MS

La identificación del perfil de proteínas acetiladas, acetiloma, del tejido adiposo SC y OM se llevó a cabo mediante un enfoque proteómico centrado en la acetilación de proteínas en residuos de lisina (**Figura 17**).

### 1.1. Extracción de proteínas

Para los estudios en tejido adiposo humano, se utilizó una proporción de 50 mg de tejido (OM o SC)/200  $\mu$ L de tampón. Así, para el estudio del acetiloma, se emplearon 100 mg de TA y 400  $\mu$ L de tampón específico para proteínas acetiladas (20 mM HEPES pH 8, 0,2 M Urea, 1 mM vanadato de sodio, 2,5 mM pirofosfato de sodio, 1 mM  $\beta$ -glicerol-fosfato, 10 mM nicotinamida, 1 mM TSA, e inhibidores de proteasas 1  $\mu$ L/mL CLAP y 1  $\mu$ L/mL PMSF). Las muestras se homogenizaron utilizando dos series de sonicación (2 pulsos de 20 s/pulso) separadas por periodos en hielo (10 y 15 min) para favorecer la solubilización de las proteínas. Posteriormente, las muestras se centrifugaron 2 veces a 9.000 g durante 15 min a 4°C, recogiendo con cuidado en cada caso el sobrenadante donde se localizan las proteínas citosólicas y evitando coger la fase lipídica que queda por encima de este.

Los *pellets* sobrantes, que contienen la fracción nuclear de las células, fueron resuspendidos en un tampón que contenía 20 mM HEPES pH 7,9, 1,5 mM  $MgCl_2$ , 420 mM NaCl, 25% glicerol, 1 mM TSA e inhibidores de proteasas CLAP 1  $\mu$ L/mL y PMSF 1  $\mu$ L/mL, se agitaron en un vórtex y se incubaron durante 30 min en agitación a 4°C. Por último, se centrifugaron las muestras a 12.000 rpm en una microcentrífuga durante 10 min, conservando el sobrenadante que contenía los extractos proteicos nucleares para ser analizados mediante HPLC-MS/MS.

Así, tras la extracción de proteínas del tejido adiposo (citosólicas y nucleares), se tomaron 200  $\mu$ g de cada muestra y se realizaron dos pools (pool A = 3 muestras y pool B = 2 muestras). Las muestras se agruparon para superar las limitaciones del análisis de individuos aislados (gran heterogeneidad) como se describió anteriormente (Diz et al., 2009). Se añadió 1% de albúmina de suero bovino acetilada recombinante a las muestras como control de carga de proteína acetilada.

El estudio del acetiloma también se llevó a cabo en muestras de células 3T3-L1 expuestas a condiciones de alta glucosa y alta insulina (HGHI). Así, transcurrido el tiempo de tratamiento, se retiró el medio de cultivo y las células 3T3-L1 fueron lavadas con tampón PBS 1X frío para eliminar los restos de células muertas en suspensión y el medio

de cultivo. Posteriormente, se añadieron 150  $\mu\text{L}$  de tampón específico para proteínas acetiladas y, con la ayuda de un *scraper*, se procedió a levantar las células. Se recogieron las muestras y se sometieron a un proceso de sonicación de 3 s/pulso durante 3 pulsos, tras lo cual se mantuvieron en hielo durante 10-15 min. Finalmente, las muestras se centrifugaron 15 min a 9.000 g a 4°C y se recogieron los sobrenadantes de cada una de las muestras, que contenían los extractos proteicos.

De igual manera que con las muestras humanas, los *pellets* sobrantes de la extracción de proteínas de las células 3T3-L1, que contienen las proteínas nucleares, fueron extraídas siguiendo el mismo protocolo que con las muestras de TA humano.

La determinación de la cantidad de proteínas en las muestras se realizó utilizando el método Bradford (Bradford, 1976). Para ello, se mezclaron 5  $\mu\text{L}$  de muestra ajustada a la dilución adecuada con 200  $\mu\text{L}$  de reactivo de Bradford. Tras incubar durante 15 min la mezcla en oscuridad y a temperatura ambiente, se determinó el valor de densidad óptica (DO) a 595 nm mediante espectrofotometría. La proteína total de cada muestra se determinó en relación a una recta patrón con concentraciones conocidas de BSA.

## 1.2. Inmunoprecipitación (IP) de proteínas acetiladas

Para la inmunoprecipitación de proteínas acetiladas, las muestras fueron incubadas con 100  $\mu\text{L}$  de anticuerpo anti-acetil-Lys unido a *beads* de agarosa (ImmunoChemistry Technologies, Davis, CA, EE.UU.) durante toda la noche. Las *beads* fueron lavadas previamente con tampón PBS 1X frío 2 veces y 2 veces con tampón IP (50 mM MOPS, pH 7,2, 10 mM  $\text{NaHPO}_4$ , 50 mM NaCl) dejándolas 5 min en agitación, 10 min en hielo y 1 min de centrifugación a 1500 rpm a 4°C. Al día siguiente, se centrifugaron las muestras con las *beads* a 1500 rpm a 4°C, que fueron posteriormente lavadas con tampón IP 2 veces y otras 2 veces con  $\text{H}_2\text{O}$ . Las proteínas acetiladas inmunoprecipitadas fueron eluidas con 0,15% de TFA 2 veces para asegurar la elución de todas las proteínas unidas a las *beads*.

### 1.3. Digestión con tripsina y purificación peptídica

Los extractos proteicos acetilados fueron reducidos y alquilados con DTT e IAA a una concentración final de 10 mM y 12 mM, respectivamente. Posteriormente, se añadió una solución de tripsina (1 mg/mL) (Promega Corporation, Madison, Wisconsin, EE.UU.) en proporción 1:20 (enzima:proteína). De forma previa a la digestión con tripsina, los extractos proteicos se diluyeron en tampón HEPES (20 mM, pH 8,0) hasta una concentración final de urea por debajo de 1M. La digestión se llevó a cabo durante toda la noche a 37°C. Por otro lado, la purificación de los péptidos se realizó en varias etapas. En primer lugar, los extractos proteicos digeridos se acidificaron mediante la adición de 0,5% de TFA para detener la digestión. Posteriormente los péptidos fueron purificados en columnas Pierce C18 Spin de fase sólida (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante. Finalmente, los péptidos eluidos se secaron en un concentrador SpeedVac (Thermo Fisher Scientific) y se resuspendieron en fase móvil (2% acetonitrilo, 0,05% TFA) para su posterior inyección en el sistema de HPLC (*high performance liquid chromatography*).

### 1.4. Análisis de péptidos por HPLC-MS/MS

Las mezclas de péptidos trípticos se analizaron por espectrometría de masas de alta resolución en un Orbitrap Fusion (Thermo Fisher Scientific) equipado con una fuente de iones en modo "*Data Dependent Acquisition*". Previamente, los péptidos diluidos en 2% de acetonitrilo en 0,05% de TFA se separaron mediante cromatografía líquida (LC) en un Dionex Ultimate 3000 nano UHPLC (Thermo Fisher Scientific) usando las siguientes condiciones: preconcentración en precolumnas C18 (PepMap, 5  $\mu$ m, 300  $\mu$ m x 5 mm) (Thermo Fisher Scientific) a un flujo de 5  $\mu$ L/min durante 3 min en 98% de acetonitrilo y 0,1% TFA. El gradiente cromatográfico del 4-40% de acetonitrilo se realizó a un flujo de 300 nL/min en una nano-columna C18 (Acclaim PepMap RSLC 75  $\mu$ m x 50 cm) (Thermo Fisher Scientific) durante 60 min. El Orbitrap Fusion operó en modo positivo a un voltaje de 2 kV. El rango de masas en modo "análisis completo" ("*full scan*") fue de 400-1500 m/z a una resolución de 120 000, un AGC (*Automatic Gain Control*) de  $4 \times 10^5$  y un tiempo de inyección máximo de 50 ms. El análisis de péptidos se realizó operando en modo "*MS/MS Top Speed*", fragmentando el mayor número de iones posible de mayor

intensidad por cada “análisis completo” (“*full scan*”) en un tiempo de ciclo máximo de 3 s. Los espectros de fragmentación se adquirieron en trampa lineal por fragmentación CID (disociación inducida por colisión) a una energía de colisión del 35% con un tiempo de inyección de 75 ms y un AGC de  $1 \times 10^2$ . Se incluyó un tiempo de exclusión dinámico de 15 s para cada ion y así evitar la repetición de fragmentación de iones.

#### 1.5. Identificación de proteínas mediante el uso de la base de datos Proteome Discoverer 2.1

Proteome Discoverer 2.1 es una aplicación que utiliza flujos de trabajo para procesar y producir datos de espectrometría de masas. Su manera de trabajar es mediante la comparativa de los “*raw data*” que se adquieren en los equipos de espectrometría de masas o librerías espectrales para identificar proteínas desde una base de datos FASTA. Funciona con el motor de búsqueda SEQUEST HT y MASCOT, los cuales procesan datos de espectros procedentes de instrumentos de Thermo Fisher Scientific, en alta y baja resolución (Technical Publications, 2017). Así, las proteínas se identificaron mediante los motores de búsqueda citados anteriormente con las siguientes condiciones:

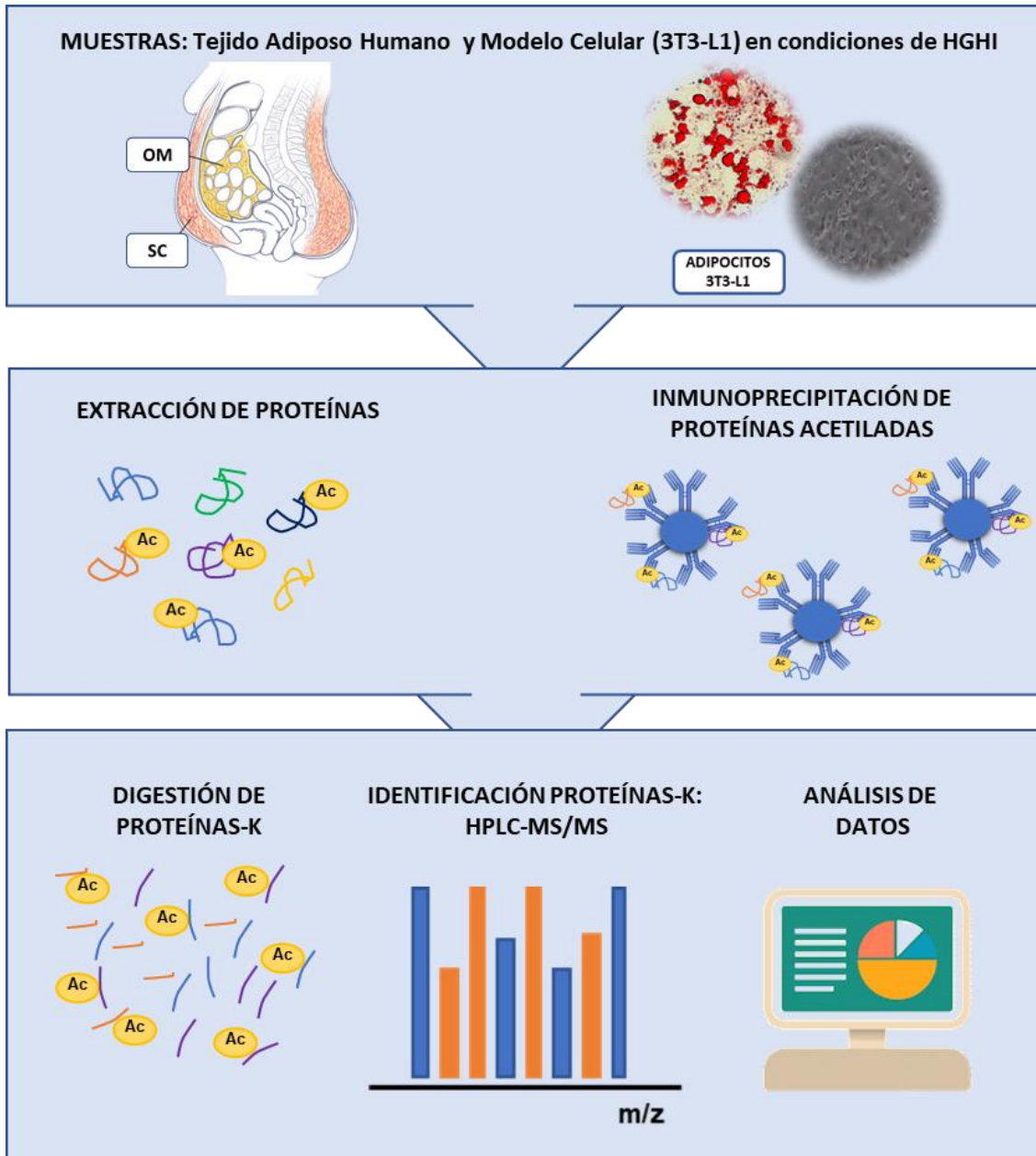
- Base de datos: *Human\_uniprot + BSA sequence*.
- Tolerancia: MS1 10 ppm para Orbitrap. MS2 10 ppm para Orbitrap.
- *Maximum misscleavage*: 3.
- Modificaciones dinámicas: Oxi (Met), Acetyl (Lys).
- Modificaciones fijas: Carbamidometil (Cys).
- Criterio de aceptación: Percolator (Delta CN<0,05).
- FDR: 1% frente a *decoy database*.

La digestión de proteínas, purificación de péptidos, análisis HPLC-MS/MS e identificación de proteínas fueron llevado a cabo por la Unidad de Proteómica del Servicio Central de Apoyo a la Investigación (SCAI) de la Universidad de Córdoba.

### 1.6. Estudios de anotaciones funcionales

Los análisis *GO enrichment* fueron realizados utilizando el sistema de clasificación PANTHER (<http://www.pantherdb.org/>) empleando como referencia el proteoma del *Homo Sapiens* (Mi et al., 2013). Los enriquecimientos de los términos GO (*Panther Go-Slim* Procesos Biológicos, Función Molecular y Componente Celular) se consideraron estadísticamente significativos para  $FDR < 0,05$  y fueron corregidos por múltiples pruebas utilizando el método de Bonferroni, analizando los 10 términos GO más significativos. Por otro lado, se llevó a cabo el análisis de la red GO de Procesos Biológicos y el árbol de agrupamiento jerárquico de proteínas acetiladas estadísticamente significativas utilizando la base de datos ShinyGO v.0,61 (<http://bioinformatics.sdstate.edu/go/>) (Xijin Ge and Jung, 2008). El número de proteínas acetiladas de ambos depósitos (SC y OM) y de cada grupo experimental (delgados, Ob-NG y Ob-IR) se obtuvo utilizando GraphPad Prism 7 (La Jolla, CA, EE.UU.). Se establecieron diagramas de Venn que representan las proteínas acetiladas comunes y específicas en todas las condiciones utilizando la herramienta web InteractiVenn (<http://www.interactivenn.net>) (Heberle et al., 2015). Además, se empleó Microsoft Excel para calcular los ratios y *fold change* (FC) seguido de la transformación de  $\log_2$ .





**Figura 17.** Esquema de trabajo del enriquecimiento de proteínas acetiladas y análisis HPLC-MS/MS de tejido adiposo humano procedente de individuos delgados, pacientes Ob-NG y Ob-IR y células 3T3-L1.

## 2. Aproximación ómica 2: electroforesis bidimensional para la detección de proteínas carboniladas

La identificación del perfil de proteínas carboniladas, carboniloma, del tejido adiposo SC y OM se llevó a cabo mediante un enfoque proteómico basado en una electroforesis bidimensional y posterior identificación por MALDI-TOF/TOF (**Figura 19**).

La electroforesis bidimensional (2DE) permite la separación de mezclas proteicas complejas a través de la aplicación de dos tipos de electroforesis sobre la misma muestra (Gygi et al., 2000). La primera dimensión consiste en un isoelectroenfoco (IEF), donde las proteínas se separan en función de su punto isoeléctrico (pI) sobre un gradiente continuo de pH. La segunda dimensión se lleva a cabo sobre geles de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE), donde se produce la separación de proteínas en función de su peso molecular. La primera electroforesis produce la separación de proteínas de forma horizontal sobre una tira de pH continuo, mientras que la segunda ocurre de manera perpendicular a la anterior, surgiendo de ambas un mapa de “manchas proteicas” (*spots*). Finalmente, se lleva a cabo la digitalización de las mismas y, por último, el análisis de los mapas bidimensionales (Görg et al., 2004).

### 2.1. Extracción de proteínas

En el caso de los estudios de carbonilación, se añadieron 400  $\mu$ L de tampón de lisis convencional (20 mM Tris-HCl pH 7,4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Tritón x100, inhibidores de proteasas CLAP 1  $\mu$ L/mL y PMSF 1  $\mu$ L/mL) a muestras de 100 mg de tejido adiposo. Las muestras se homogenizaron utilizando dos series de sonicación (2 pulsos de 20 s/pulso) separadas por periodos en hielo (10 y 15 min) para favorecer la solubilización de las proteínas. Posteriormente, las muestras se centrifugaron 2 veces a 9.000 g durante 15 min a 4°C, recogiendo con cuidado en cada caso el sobrenadante donde se localizan las proteínas citosólicas y evitando coger la fase lipídica que queda por encima de este.

La determinación del perfil de proteínas carboniladas, además de llevarse a cabo en muestras de tejido adiposo humano (SC y OM), también se realizó en células 3T3-L1 tras su exposición a condiciones de HGHI y sus correspondientes controles. Para ello,

finalizado el tiempo de tratamiento, se retiró el medio de cultivo y las células 3T3-L1 fueron lavadas con tampón PBS 1X frío para eliminar restos de células muertas en suspensión y medio de cultivo. Posteriormente, se añadieron 150  $\mu$ L de tampón de lisis convencional y, con la ayuda de un *scraper*, se procedió a levantar las células. Se recogieron las muestras y se sometieron a un proceso de sonicación de 3 s/pulso durante 3 pulsos, tras lo cual se mantuvieron en hielo durante 10-15 min. Finalmente, las muestras se centrifugaron 15 min a 9.000 g y a 4°C y se recogieron los sobrenadantes conteniendo los extractos proteicos.

La cuantificación de proteínas se llevó a cabo mediante el método de cuantificación Bradford, como se describió anteriormente. Finalmente, los extractos proteicos se procesaron con el kit 2D Clean-Up (2D Clean Up kit Manual; Ge Healthcare, Madrid, España) con el fin de obtener un extracto proteico lo más libre posible de lípidos, ya que estos pueden interferir en el proceso de isoelectroenfoque (IEF) de la electroforesis bidimensional (2DE).

## 2.2. Primera dimensión: Isoelectroenfoque (IEF)

Una vez que se obtuvieron los *pellets* tras la aplicación del kit 2D-Clean Up, estos se resuspendieron en el tampón para IEF –DeStreak Reagent (GE Healthcare), 20 mM DTT y 0,8% anfólitos–. Dependiendo del tamaño de la tira IPG (tira donde se encuentra adherida acrilamida y con un gradiente de pH inmovilizado), el volumen máximo de muestra que se puede añadir es diferente: 125  $\mu$ L para las tiras de pH 4-7 7 cm (Immobiline DryStrip Gels pH 4-7, 7 cm; Amersham Place, Buckinghamshire, Reino Unido), y 340  $\mu$ L para las tiras de pH 3-10 NL 18 cm (Immobiline DryStrip Gels pH 3-10 NL, 18 cm; Amersham Place). Así, las muestras resuspendidas en tampón IEF se incubaron durante 30-45 minutos en agitación a temperatura ambiente antes de ser cargadas sobre las tiras IPG. Las muestras se cargaron sobre el ánodo del sarcófago utilizado para el isoelectroenfoque (Ettan IPGphor Ceramic Strip Holders; GE Healthcare) y posteriormente la tira se situó sobre el sarcófago, haciendo coincidir ánodo y cátodo de la tira con el del sarcófago. Para finalizar, se añadió el aceite mineral (Mineral Oil Biotechnology Grade; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EE.UU.) para rehidratar la tira

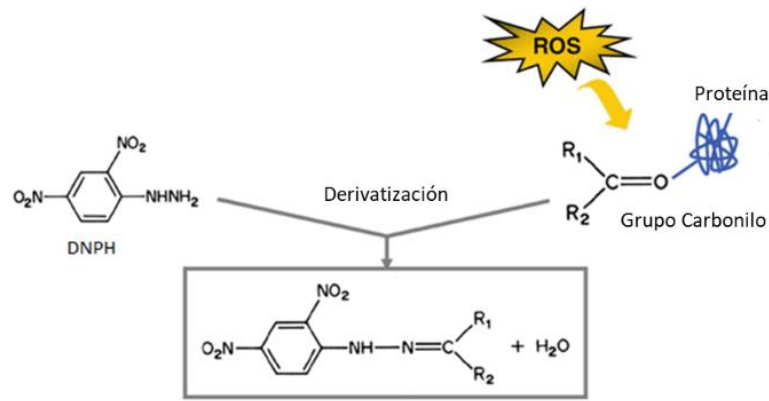
y los sarcófagos se situaron sobre el sistema de enfoque eléctrico Ettan IPGphor 3 (GE Healthcare).

El programa de enfoque varía en función de la longitud de la tira y del gradiente de pH utilizado. Así, las tiras de pH 4-7 7cm (empleadas para la 2DE de modelos en células 3T3-L1) se sometieron al siguiente programa de IEF: 15 h de rehidratación a 20°C, 1 h a 300 V, gradiente de voltaje durante 1 h hasta alcanzar 1000 V, otro gradiente hasta alcanzar los 5.000 V en 2 h y un paso final de 3000 V/h hasta su enfoque total, todo ello a 20°C y un máximo de 50 µA/tira. En el caso de las tiras de pH 3-10 NL 18 cm (utilizadas para la 2DE de muestras de tejido adiposo humano), los pasos fueron los siguientes: 15 h de rehidratación a 20°C, 3 h a 300 V, gradiente de voltaje durante 2 h hasta alcanzar 1.000 V, otro gradiente hasta alcanzar los 8000 V en 3 h y, por último, un paso de 40.000 V/h hasta su enfoque total, todo ello a 20°C y un máximo de 50 µA/tira.

### 2.3. Derivatización de las tiras IPG

Los grupos carbonilo (C=O) de las proteínas se detectaron a través de su derivatización con DNPH (2,4-dinitrofenilhidrazina) (Barceló-Batllo et al., 2008; Primeau et al., 2011). El DNPH se une covalentemente a los grupos carbonilo – formando una base de Schiff – para dar lugar a hidrazonas estables (**Figura 18**). El grupo dinitrofenilo (DNP) que se forma puede ser detectado mediante *Western Blot*, *dot blot*, inmunohistoquímica o ELISA (Irazusta et al., 2008).

Por tanto, una vez finalizado el IEF, se procedió a la derivatización de las tiras para detectar el perfil proteómico carbonilado. El protocolo de derivatización de los grupos carbonilo sobre las tiras es algo diferente a la derivatización sobre la muestra. En este caso, las tiras se situaron sobre un soporte que nos permitía añadir 1 mL de reactivo de derivatización (10 mM DNPH en 2 N HCl) y se mantuvieron sumergidas en dicha solución durante 20 min en agitación y oscuridad. Posteriormente, la reacción se bloqueó añadiendo 1 mL de tampón de equilibrado (50 mM Tris-HCl pH 8,8, 6M Urea, 20% glicerol, 2% SDS) durante 10 min en agitación y a temperatura ambiente.



**Figura 18.** Formación del DNP tras la reacción de derivatización del DNP con los grupos carbonilo de las proteínas.

#### 2.4. Equilibrado de las tiras

Es necesario equilibrar las tiras antes de la separación de las proteínas en una segunda dimensión. Para ello, se añadió 1 mL de tampón de equilibrado suplementado con 2% DTT sobre las tiras durante 15 min a temperatura ambiente y en agitación. Posteriormente, se añadió 1 mL de tampón de equilibrado con 2,5% de IAA bajo las mismas condiciones.

#### 2.5. Segunda dimensión: electroforesis e inmunodetección de proteínas carboniladas

Finalizado el tiempo de equilibrado de las tiras, estas se sometieron a la separación de las proteínas en geles de poliacrilamida. Dependiendo del tamaño de la tira, se utilizaron distintos geles ajustados a la longitud de la misma, pero el procedimiento a seguir es el mismo: se generaron geles de poliacrilamida (12%) con el gel separador solo y, sobre este, se situó la tira que fijamos al gel separador mediante el uso de agarosa (0,5% m/v) para que no se formaran burbujas sobre ambos. De igual forma, dependiendo del tamaño de los geles, los sistemas electroforéticos empleados fueron distintos: para los geles de 9 x 7 cm se llevó a cabo la electroforesis a 80 V durante 2 h en el sistema MINI PROTEAN Tetra (Bio-Rad Laboratories) mientras que para los geles de 20 x 20 cm se utilizó el sistema vertical de multigeles Ettan DALTsix (GE

Healthcare) y el proceso de electroforesis constó de un primer paso de 30 min a 5 W/gel y 5 h a 15 W/gel.

Los geles fueron transferidos a membranas de nitrocelulosa (BioTrace NT, Pall Corp., Pensacola, FL, EE.UU.). Dependiendo del tamaño de los geles se utilizaron sistemas de transferencia distintos: para los geles de 9 cm x 7 cm, la transferencia se realizó con el programa Turbo del sistema Trans-Blot Turbo Transfer System (Bio-Rad Laboratories) mientras que en el caso de los geles de 20 cm x 20 cm, la transferencia a membranas de nitrocelulosa (BioTrace NT) se llevó a cabo usando el sistema Trans-Blot Cell (Bio-Rad Laboratories) con un voltaje de 90 V durante 2 horas.

La inmunodetección de las proteínas carboniladas se realizó incubando las membranas de nitrocelulosa (BioTrace NT) con anticuerpo primario anti-DNP a 4°C durante toda la noche y posterior incubación de 1 h con anticuerpo secundario de conejo conjugado con peroxidasa (**Tabla 8**). Por último, las membranas se revelaron empleando el kit de detección comercial Clarity Western ECL Substrate (Bio-Rad Laboratories) en el sistema LAS 4000 (*Software* ImageQuant LAS 4000 V1.2; GE Healthcare) y las imágenes obtenidas fueron procesadas utilizando el programa ImageJ (v1.50b, NIH, Bethesda, MD, EE.UU.) para realizar el análisis cuantitativo de los *spots* detectados.

## 2.6. Tinción de geles con Coomassie Brilliant Blue G250

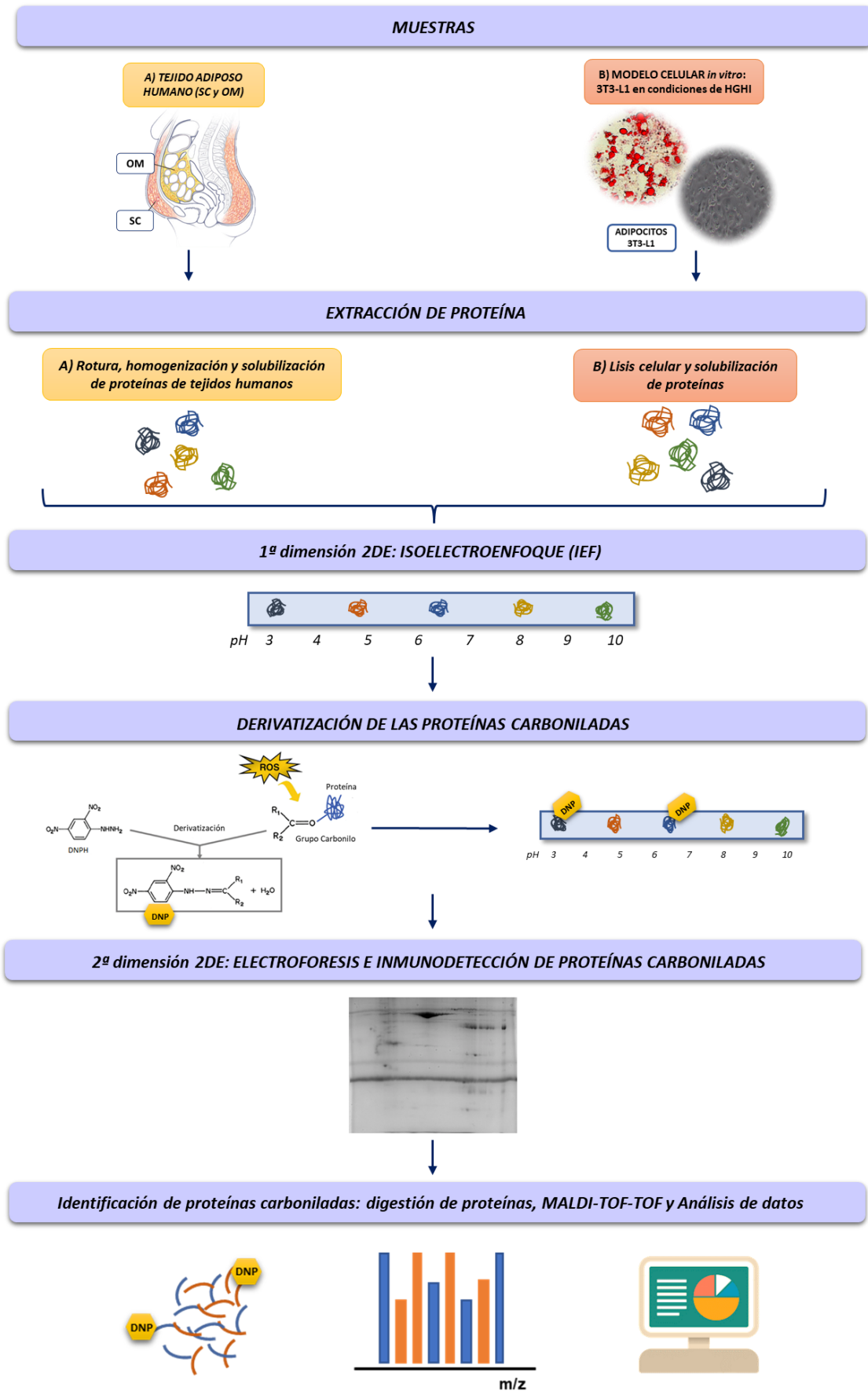
Para identificar las proteínas de interés, se prepararon geles adicionales que fueron teñidos con Coomassie. Para ello, las proteínas se fijaron al gel con una solución de fijación (7% v/v metanol, 10% v/v ácido acético) durante 30 min, en agitación y temperatura ambiente. Se retiró la solución de fijación y los geles se sumergieron en una solución de Coomassie Blue (0,6 M sulfato amónico, 0,1% m/v Coomasie Blue G-250, 20% v/v metanol, 22,5% v/v ácido fosfórico) durante 20 h en oscuridad, agitación y a temperatura ambiente. Tras esto, los geles se lavaron durante 3 min con una solución 0,1 M Tris-H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, pH 6,5. A continuación, se agitaron vigorosamente menos de 1 min con una solución al 25% v/v de metanol y, por último, se mantuvieron durante 24 h en

sulfato amónico al 20% v/v. Este proceso de tinción se repitió 2-3 veces para obtener un mayor contraste puesto que se trata de una tinción acumulativa.

## 2.7. Identificación de las proteínas carboniladas

Los *spots* de interés fueron escindidos automáticamente en una estación para picar geles (ProPic Station; Genomic Solutions Inc, Ann Arbor, MI, EE.UU.) en la Unidad de Proteómica del SCAI (Universidad de Córdoba). La digestión de los *spots* y análisis mediante MALDI-TOF/TOF (4800 MALDI TOF/TOF Analyzer; Applied Biosystem, Waltham, MA, EE. UU.) fueron llevados a cabo por el Laboratorio de Proteómica del Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago (Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela).

Los datos de los espectros MS y MS/MS fueron combinados a través del *software* GPS Explorer v3.6. Se empleó el *software* Mascot v2.2 (Matrix Science), que identifica, caracteriza y cuantifica proteínas datos de espectrometría de masas mediante la búsqueda en una base de datos humana no redundante (SwissProt release 56.0) con tolerancia de precursor de 30 ppm y tolerancia de fragmentos MS/MS de 0,2 Da. El análisis se limitó a péptidos de 6 o más aminoácidos y un máximo de un sitio de escisión erróneo. Como modificación variable se buscó la oxidación de metionina mientras que la carbamidometilación de cisteína se estableció como modificación fija. Todos los espectros y los resultados de la base de datos se revisaron manualmente en detalle.



**Figura 19.** Esquema de trabajo de la electroforesis bidimensional para la detección de proteínas carboniladas de tejido adiposo humano (SC y OM) y de células 3T3-L1.



## MODELOS *IN VITRO* DE RESISTENCIA A INSULINA Y TRATAMIENTOS EXPERIMENTALES

### 1. Experimentos *in vitro* para el estudio del impacto de estímulos obesogénicos

Con el fin de estudiar la contribución de diferentes estímulos obesogénicos (hiperglucemia e hiperinsulinemia, e hipertrofia de los adipocitos) de manera singular al desarrollo de obesidad y sus comorbilidades asociadas, se desarrollaron una serie de modelos *in vitro*: modelos de hipertrofia mediante la administración de una sobrecarga lipídica con ácidos grasos saturados (ácido palmítico) o monoinsaturados (ácido oleico), y un modelo de hiperglucemia e hiperinsulinemia, mediante la exposición a concentraciones elevadas de glucosa e insulina (HGHI).

#### 1.1. Modelos de hipertrofia

A lo largo de esta Tesis Doctoral, se han utilizado dos modelos de hipertrofia mediante la sobrecarga lipídica de dos ácidos grasos diferentes: un ácido graso saturado, ácido palmítico, que, además de generar hipertrofia en los adipocitos, provoca que las células desarrollen resistencia a insulina; y un ácido graso monoinsaturado, ácido oleico, que causa hipertrofia en los adipocitos, pero no resistencia a insulina (Díaz-Ruiz et al., 2015)

Así, células 3T3-L1 que alcanzaron el día 5 de diferenciación tras la transfección con las construcciones de interés *-pEGFP-C2-WTFABP4* (indicado como WT) *pEGFP-C2-TMFABP4* (indicado como TM); ver *Transfección celular*– se mantuvieron en condiciones de ayuno durante 2 h con un medio de pretratamiento –DMEM 1 g/L glucosa suplementado con 1,5 g/L bicarbonato de sodio, 2% BSA-FFA, 2% L-glutamina (v/v) y 1% solución antibiótica-antimicótica (v/v)– y, transcurrido ese tiempo, se administró el estímulo de ácidos grasos (500  $\mu$ M de palmitato o 500  $\mu$ M de oleato) en medio de pretratamiento durante 18 h.

## 1.2. Modelo de hiperglucemia e hiperinsulinemia (HGHI)

La exposición a condiciones de hiperglucemia e hiperinsulinemia, como ocurre comúnmente en condiciones de obesidad, se asocian con la aparición de resistencia a insulina en los adipocitos (Díaz-Ruiz et al., 2015). En este caso, células 3T3-L1 a día 5 de diferenciación tras la transfección celular con los correspondientes vectores de interés –*pEGFP-C2-WTFABP4* (indicado como WT) *pEGFP-C2-TMFABP4* (indicado como TM)– y células 3T3-L1 a día 6 de diferenciación para su utilización en las aproximaciones ómicas, se mantuvieron durante 2 h en medio de pretratamiento –DMEM 1 g/L glucosa, 1,5 g/L bicarbonato de sodio, 0,5% BSA-FFA, 2% L-glutamina (v/v) y 1% solución antibiótica-antimicótica (v/v)–. Posteriormente, las células se expusieron a altas concentraciones de glucosa (4,5 g/L) y de insulina (100 nM) durante 24 h.

## 2. Estudios de vida media de las proteínas mutadas

En este estudio, utilizamos técnicas de mutagénesis dirigida (ver *Mutagénesis dirigida mediante PCR*) para producir formas mutadas de una proteína en estudio, FABP4, y analizar la relevancia de residuos potencialmente acetilados en la secuencia de dicha proteína. Concretamente, para conocer si la sustitución de los residuos K22I, K32I y K59I podrían jugar un papel en la vida media de FABP4, se utilizó cicloheximida (CHX), un inhibidor de la síntesis proteica y MG132, un inhibidor del proteasoma. Así, en cada experimento realizado en este estudio, un set de células transfectadas con WT y TM se sometieron a un tratamiento de 10 µg/mL de CHX, otro grupo de células transfectadas se trataron con 10 µM de MG132 y, por último, una combinación de 10 µg/mL CHX y 10 µM de MG132 se añadió sobre otro set de células transfectadas durante 30 h.

## 3. Exposición de las células a medios condicionados

Para el análisis de la homeostasis del hierro, se midió la translocación del TfR. Para ello, adipocitos 3T3-L1 transfectados con el vector *pCMV6-AN-HA-TfR* (TfR-HA) se expusieron durante 24 h a un medio que contenía un 10% de suero inactivado por calor de pacientes con (Incidente-T2D) y sin diabetes tipo 2 (No-T2D) (Sánchez-Ceinos et al., 2021) siguiendo los protocolos previamente establecidos (Arias de la Rosa et al., 2018). Después del tratamiento, las células fueron expuestas a 25 mg/dL de Holo-transferrina

(Merck, Darmstadt, Alemania) durante 20 min y procesadas para la evaluación de la translocación de TfR por microscopía confocal.

#### **4. Exposición de las células a CQDs y SQDs**

Se analizó la respuesta de las 3T3-L1 a la exposición de las CQDs y SQDs en presencia y ausencia de FBS en el medio de cultivo. El día de los experimentos, el medio de cultivo fue retirado y las células fueron preincubadas a 37°C y un 5% de CO<sub>2</sub> durante 2 horas en cualquiera de las dos condiciones, con privación de suero o complementado con suero (10% v/v de FBS) en el medio de cultivo para la estabilización celular. Después, las células fueron expuestas a concentraciones crecientes (0-1600 mg/L) de CQDs o SQDs en el medio de cultivo conteniendo, o no, 10% v/v FBS durante 24 h a 37°C y un 5% de CO<sub>2</sub>.

## — MUTAGÉNESIS DIRIGIDA MEDIANTE PCR —

Con el fin de analizar el papel que juega la acetilación en el comportamiento de una proteína identificada en el estudio de acetilación de tejido adiposo humana, la chaperona lipídica FABP4, y basándonos en bibliografía previa sobre esta proteína (Gillilan et al., 2007), se seleccionaron 3 residuos de lisina (Lys o K) –debido a que es el aminoácido susceptible de ser acetilado– para ser sustituidos por residuos de isoleucina (Ile o I), aminoácido no susceptible de acetilación. De esta manera, se generaron versiones mutantes de la proteína que no pueden acetilarse.

#### **1. Análisis de dominios y motivos estructurales**

Para determinar la importancia funcional de la incorporación de grupos acetilo en la secuencia de FABP4, a continuación diseñamos y optimizamos un protocolo de mutagénesis dirigida por PCR con el fin de generar mutantes de FABP4 con sustituciones puntuales de los residuos de lisina a los que se asocian los grupos acetilo por otro aminoácido que no sufra esta modificación.

Tras una búsqueda *in silico* de las distintas lisinas que presenta FABP4 y de las que se ha descrito que pueden presentar acetilación utilizando la base de datos “Phosphosite” (<http://www.phosphosite.org>), se procedió a localizarlas en la estructura terciaria de la proteína para decidir cuáles podrían ser los mejores residuos candidatos para la acetilación.

A raíz de este análisis se concluyó que las lisinas en las posiciones 22, 32 y 59 podrían ser objeto de acetilación en condiciones fisiológicas al encontrarse en zonas de la proteína fácilmente accesibles para las enzimas encargadas de la acetilación. En concreto, las posiciones 22 y 32 corresponden a dos lisinas que se encuentran en las alfa-hélices de la proteína, y están implicadas en la señal de localización nuclear (NLS), por lo que podría ser una acetilación clave para la funcionalidad de la proteína (Gillilan et al., 2007). Se decidió estudiar también la Lys59 por su proximidad a nivel estructural a las otras dos Lys y su posibilidad de acetilarse.

## 2. Diseño de oligonucleótidos

Para la realización de la sustitución de residuos aminoacídicos, se diseñaron *primers* que permitieron introducir cambios en las lisinas (AAA) por isoleucinas (ATA) a través de mutagénesis dirigida (Vázquez-Martínez et al., 2007). Los *primers* se diseñaron utilizando el *software* Primer3 (v.0.4.0) fijando los siguientes parámetros: tamaño de los *primers* (18-23 nucleótidos), porcentaje G-C (45-55%), temperatura de alineamiento,  $T_m$ , (60-61°C) y rango del producto de PCR (80-200 nucleótidos).

Una vez obtenida la lista de posibles *primers* candidatos, se seleccionaron aquellas parejas que presentaban una mayor cobertura de exones en cada una de las secuencias de FABP4 donde se encontraban las Lys a sustituir, y se mandaron a sintetizar a la casa comercial StabVida (SatbVida, Caparica, Portugal) (**Tabla 1**).

**Tabla 1.** Secuencia de los *primers* utilizados para los estudios de mutagénesis dirigida.

Mutación	Primers	Secuencia
K22I	Forward	5' CTTCGATGATTACATG <b>ATAGA</b> AGTGGGAGTGGGC 3'
	Reverse	5' GCCCACTCCCACCTT <b>TAT</b> CATGTAATCATCGAAG 3'
K32I	Forward	5' CTTTGCCACAAGG <b>ATAG</b> TGGCAGGCATGG 3'
	Reverse	5' CCATGCCTGCCACT <b>TAT</b> CCTTGTGGCAAAG 3'
K59I	Forward	5' CGGTCAGAGAGTACTTTT <b>ATA</b> ACACCGAGATTTCTTC 3'
	Reverse	5' GAAGGAAATCTCGGTGTT <b>TATA</b> AAAGTACTCTTGACCG 3'

En rojo están marcados los tripletes que codifican para la Lys (AAA) sustituyendo la A en posición 2 del triplete por una T consiguiendo el triplete (ATA) que codifica Ile.

### 3. Mutagénesis dirigida vía PCR

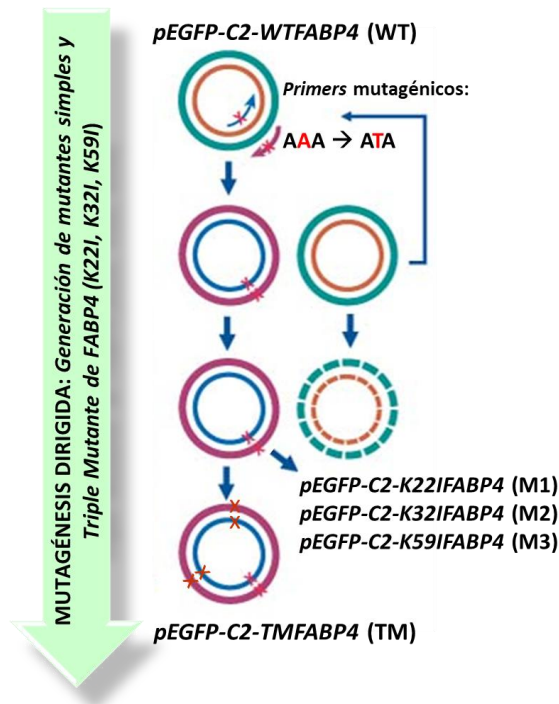
A partir de la construcción *pEGFP-C2-WTFABP4* (*wild type*, WT), que fue cedida por el Dr. Noy (Gillilan et al., 2007), se llevó a cabo la mutagénesis dirigida de la secuencia vía PCR para obtener los 3 mutantes simples: *pEGFP-C2-K22IFABP4* (mutante 1, M1), *pEGFP-C2-K32IFABP4* (mutante 2, M2), *pEGFP-C2-K59IFABP4* (mutante 3, M3). Para la generación del triple mutante se empleó la construcción *pEGFP-C2-K22IFABP4* sobre la que se realizó la mutación en la posición K32I y K59I a través de dos mutaciones dirigidas seguidas y generando, así, la construcción *pEGFP-C2-TMFABP4* (triple mutante, TM) (Figura 20).

Por tanto, el vector de partida para cada mutagénesis dirigida se amplificó mediante PCR convencional utilizando las parejas de *primers* de la **Tabla 1**. Para ello, se mezclaron 100 ng de ADN molde, 125 ng de *Foward primer*, 125 ng de *Reverse primer*, 0,5 µL de 1 U/µL KAPA HiFi HotStar ADN Polimerasa (Kapa Biosystem, Boston, MA, EE.UU.), 0,75 µL 10 mM del mix KAPA dNTP (Kapa Biosystem), 5 µL del tampón 5X KAPA HiFi (Kapa Biosystem) completando con H<sub>2</sub>O de ARNasas hasta los 25 µL. La amplificación se realizó por duplicado y se realizaron los controles negativos necesarios (control negativo de ADN molde sustituido por agua y control de *primers* utilizando solo *Forward primers* o *Reverse primers*). Las condiciones a las que se realizó la PCR se indican en la **Tabla 2**.

**Tabla 2.** Condiciones de PCR para la realización de los estudios de mutagénesis dirigida.

<b>Paso</b>	<b>Programa</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tiempo</b>
1	Desnaturalización inicial	95°C	3 min (1 ciclo)
2	Desnaturalización	98°C	20 s (35 ciclos)
3	Anillamiento	65°C	15 s (35 ciclos)
4	Extensión	72°C	5 min (35 ciclos)
5	Vuelve al paso 2 → 35 ciclos		
6	Extensión final	72°C	5 min (1 ciclo)

Al finalizar la amplificación, se purificó el producto de PCR utilizando el kit AccuPrep PCR Purification Kit (Bioneer, Daejeon, República de Korea). Posteriormente, se procedió a un proceso de digestión con la enzima DpnI (#ER1701, Thermo Fisher Scientific) –que permite eliminar el ADN molde ya que actúa sobre secuencias metiladas– durante 1 h a 37°C, y después 20 min a 80°C para inhibir a la enzima. A continuación, se volvió a purificar el producto de PCR para eliminar la presencia de restos de ADN molde utilizando el mismo kit de purificación anterior y se cuantificó la cantidad de ADN midiendo su absorbancia (relación 260/280 nm) en el espectrofotómetro Nano Drop DS-11 Spectrophotometer (DeNovix Inc, Wilmington, DE, EE.UU.).



**Figura 20.** Esquema del proceso de mutagénesis dirigida y generación de los vectores simples de FABP4: *pEGFP-C2-K22IFABP4* (M1), *pEGFP-C2-K32IFABP4* (M2) y *pEGFP-C2-K59IFABP4* (M3) y el triple mutante, *pEGFP-C2-TMFABP4* (TM).

#### 4. Transformación de bacterias competentes

El siguiente paso consistió en la transformación de bacterias competentes con el producto de PCR para aumentar el número de copias del vector mutado. Así, se añadieron 5  $\mu\text{L}$  de una mezcla de 25 mM  $\beta$ -mercaptoetanol:H<sub>2</sub>O destilada (proporción 1:50) en un tubo con 50  $\mu\text{L}$  de bacterias competentes, y se dejaron en hielo durante 10 min para generar poros en la pared bacteriana. Transcurrido este tiempo, se añadieron 50 ng del producto de PCR purificado (sin que el volumen del vector llegara a superar los 6  $\mu\text{L}$ ) y, de nuevo, se dejó la mezcla en hielo durante 30 min. A continuación, se provocó un choque térmico a las bacterias para permitir la entrada del ADN, dejando los tubos 3 min a 37°C e, inmediatamente, en hielo durante 2 min. Se añadieron 500  $\mu\text{L}$  de 2% LB Broth (m/v) (Sigma Aldrich, San Luis, MO, EE.UU.) y se mantuvieron 1 h a 37°C en agitación. Tras una centrifugación de 3 min a 3000 rpm para generar un *pellet* de bacterias, se sembraron por agotamiento en placas de Petri con 1,5% LB-Agar (m/v) (Sigma Aldrich,) y 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Kanamicina (Kanamycin sulfate; Sigma Aldrich) a una proporción 1  $\mu\text{L}/\text{mL}$ , y se dejaron a 37°C entre 14 y 16 h.

Una vez crecidas las bacterias, se seleccionaron colonias que se dejaron creciendo en medio líquido con 2% LB Broth (m/v) en agitación a 37°C durante 6-8 h dependiendo del ritmo de crecimiento de las bacterias. Finalmente, se lisaron las bacterias y se obtuvo el ADN plasmídico utilizando el kit Plasmid DNA Extraction Mini Kit (European Favorgen Biotech Corp., Viena, Austria). Por último, se cuantificaron las muestras (relación 260/280 nm) utilizando el espectrofotómetro Nano Drop DS-11 (Spectrophotometer DeNovix Inc, Wilmington, DE, EE.UU.).

## **5. Secuenciación y análisis de secuencias**

Todas las construcciones generadas en los diferentes vectores de expresión se mandaron a secuenciar (StabVida) para comprobar las distintas mutaciones dirigidas. Los cromatogramas resultantes de las reacciones de secuenciación fueron revisados y analizados con la ayuda del programa Chromas 2.11 (Technelysium, Gold Coast, Australia). Posteriormente, cada una de las secuencias fueron alineadas con la secuencia de FABP4 obtenida de la base de datos del NCBI (EE.UU.) empleando el programa CLC Sequence Viewer 7.6.1 (Qiagen, Alemania).

---

# **ESTUDIOS DE MODELADO MOLECULAR *IN SILICO***

---

## **1. Modelado tridimensional de FABP4 *in silico***

Para confirmar que la sustitución de las tres Lys en la versión mutada de FABP4 no altera la estructura tridimensional de FABP4 y, por tanto, que los cambios que se observan entre la forma mutada y silvestre de la proteína son debido a la menor capacidad de acetilación de la FABP4 mutada, procedimos al modelado *in silico* de la proteína.

Así, a partir de la estructura tridimensional de FABP4 registrada en la base de datos PDB (Protein Data Bank, EE.UU.) con el código 3P6D y haciendo uso del *software*



Phyre2 (Protein Fold Recognition Server, Reino Unido) se llevó a cabo el modelado de la estructura tridimensional de ambas construcciones, WT y TM. Para ello, se realizó la traducción *in silico* de las construcciones a partir de la secuencia aminoacídica obtenida tras la secuenciación génica. Una vez generadas las estructuras tridimensionales *in silico*, ambas se compararon con el programa Swiss PDB Viewer v4.1 (Suiza). Se utilizó la medida estadística RMS que corresponde a la raíz cuadrada de la media aritmética de los cuadrados de la distancia media existente entre los átomos de cada una de las estructuras, en ángstroms. Cuanto más cercano a 0 se encuentre el valor de RMS, mayor similitud existe entre las estructuras comparadas.

## 2. Estudios de *docking* molecular

### 2.1. Estudios *in silico* de interacción entre FABP4 y la lipasa sensible a hormonas (HSL)

Atendiendo a los datos publicados sobre la interacción existente entre FABP4 y la lipasa sensible a hormonas (HSL), que hidroliza diglicéridos a monoglicéridos (Hotamisligil and Bernlohr, 2015), se estudió la interacción entre GFP-FABP4-WT o GFP-FABP4-TM (modelados *in silico* realizados con Phyre2) y HSL (código AF-P54310, AlphaFold Protein Structure Database, Reino Unido) utilizando el *software* HADDOCK (Bijvoet Center for Biomolecular Research, Países Bajos)(Yan et al., 2017) bajo la configuración predeterminada. Se seleccionaron y se compararon las mejores posiciones de unión entre las proteínas. Los residuos que interactúan entre FABP4-HSL fueron evaluados en el programa Ligplot<sup>+</sup> (LigPlot<sup>+</sup> v.2.2, European Bioinformatics Institute) (Laskowski and Swindells, 2011) para identificar y generar diagramas esquemáticos de las interacciones proteína-proteína.

### 2.2. Estudios moleculares *in silico* de Transferrina (Tf) y su receptor (TfR)

Tras identificar a la transferrina, Tf, como una de las proteínas carboniladas en los estudios ómicos, se llevó a cabo un estudio *in silico* para localizar las posibles posiciones de carbonilación de la proteína utilizando el servidor iCarPS (Center for Informational Biology, Chengdú, China). Una vez identificados los residuos susceptibles

de carbonilación, se generó el alineamiento de las secuencias de Tf y Tf carbonilada con el *software* CLC Sequence Viewer (Qiagen, Alemania).

Por otro lado, se estudió la interacción entre el receptor de transferrina, TfR, y transferrina, Tf. Para ello, se utilizó el modelado molecular registrado en la base de datos PDB (Protein Data Bank, EE.UU.) del complejo receptor de transferrina 1 y transferrina con hierro conjugado en el lóbulo N (código de identificación PDB: 3S9L). Tras descargar el archivo PDB del complejo molecular, las estructuras de las proteínas se visualizaron usando UCSF Chimera 1.10.1 (Resource for Biocomputing, Visualization and Informatics, San Francisco, CA, EE.UU.).

Los residuos que interactúan entre TfR y Tf así como entre Tf y el hierro fueron evaluados con el programa Ligprot<sup>+</sup> (LigPlot<sup>+</sup> v.2.2). Este estudio *in silico* tiene como fin identificar y generar diagramas esquemáticos de las interacciones proteína-proteína (TfR-Tf) y proteína-ligando (Tf-hierro) y conocer si esos residuos son susceptibles de carbonilarse o se encuentran próximos a posiciones de carbonilación y evaluar, de esta manera, el posible efecto de la carbonilación en la funcionalidad de Tf. .

---

## TRANSFECCIÓN CELULAR

---

La transfección de células 3T3-L1 se llevó a cabo en el día 3 de diferenciación utilizando el reactivo Lipofectamine 2000 Reagent (Thermo Fisher Scientific) según las instrucciones del fabricante. Para ello, se mezclaron 2,5 µg de ADN plasmídico (**Tabla 3**) con 7,5 µL de lipofectamina, se incubó la mezcla durante 30 min para permitir la formación de los complejos ADN-lípido y, a continuación, se añadió a las células con medio de transfección –Gibco Opti-MEM I (Thermo Fisher Scientific)–.

Transcurridas 24 h (día 4 de diferenciación) se sustituyó el medio de cultivo de transfección por medio de transfección suplementado con 10 µg/mL de insulina para continuar con la diferenciación celular. Dependiendo del experimento, a día 5 se continuó con la diferenciación adipocitaria hasta fases más tardías de diferenciación o

se aplicaron los tratamientos de estudio. Posteriormente, las muestras se procesaron de manera específica para cada una de las metodologías a realizar.

**Tabla 3.** Vectores utilizados en los diferentes estudios de transfección.

Vectores de transfección	Etiqueta del vector
<i>pEGFP-C2</i>	GFP
<i>pEGFP-C2-WTFABP4</i>	GFP
<i>pEGFP-C2-K22IFABP4</i>	GFP
<i>pEGFP-C2-K32IFABP4</i>	GFP
<i>pEGFP-C2-K59IFABP4</i>	GFP
<i>pEGFP-C2-TMFABP4</i>	GFP
<i>pCMV6-AN-HA-TfR</i>	HA

## ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA

### 1. Extracción de ARN

Los análisis de expresión génica se realizaron sobre extractos de células 3T3-L1 a diferentes días de diferenciación (D0, D3, D6 y D9) y en células 3T3-L1 transfectadas con los vectores de expresión indicados. Para proceder a la extracción y purificación del ARN de estas células se siguió el protocolo establecido en el grupo (Pulido et al., 2011). Así, se retiró el medio de cultivo de las células y se administró un volumen determinado de TRIzol (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) (500  $\mu$ L/pocillo en placas de 12 pocillos y 1 mL/pocillo en placas de 6 pocillos) que rompe las células y mantiene la integridad del ARN.

A continuación, se añadieron 200  $\mu$ L de cloroformo/mL de TRIzol y las muestras se incubaron 2-3 min. A continuación, se centrifugaron a 12.000 g durante 15 min a 4°C diferenciándose dos fases, la orgánica (ADN y proteínas), en la parte inferior, y la que contiene el ARN, superior, de aspecto acuoso, que fue recogida y mezclada con isopropanol en una proporción 1:1. De nuevo, las muestras se centrifugaron a 4°C durante 10 min a 12.000 g, eliminando el sobrenadante y lavando el *pellet* con 1 mL de etanol al 75%. Tras una nueva centrifugación de 5 min a 4°C y 7.500 g, se dejó secar el *pellet* y se reconstituyó en 11  $\mu$ L de agua libre de ARNasas. Por último, las muestras se

calentaron 5 min a 65°C, y se cuantificaron utilizando el espectrofotómetro Nano Drop DS-11 (DeNovix Inc) comprobando tanto la concentración del ARN como su calidad, midiendo la absorbancia de cada extracto a 260 y 280 nm.

## 2. Retrotranscripción (RT)

Se llevó a cabo la retrotranscripción del ARN a ADN copia (ADNc) empleando el kit comercial RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific). En primer lugar, por cada reacción, se adicionó 1 µL del reactivo Random Hexamer primer (Thermo Fisher Scientific, junto con 1 µg de ARN, y se completó el volumen con H<sub>2</sub>O libre de ARNasas hasta 12 µL, incubándose las muestras a 65°C durante 5 minutos (**Tabla 4**). En función del número de muestras a procesar, se preparó un volumen de Máster Mix con un error del 8%, siguiendo las recomendaciones del fabricante.

**Tabla 4.** Composición de la Máster Mix para la retrotranscripción de ARN a ADNc.

Compuesto	Volumen por reacción (µL)
5X Reaction buffer	4
RiboLock RNase Inhibitor (20 U/µL)	1
10 mM mezcla de dNTP	2
RevertAid M-MuIV RT (200 U/µL)	1
Volumen final	20

A cada muestra, se le añadieron 8 µL de Máster Mix, se incubaron a 25°C durante 5 min, y después 1 h a 42°C. Para finalizar la reacción, se calentaron las muestras 5 min a 70°C, y, a continuación, se cuantificó el producto obtenido en el espectrofotómetro Nano Drop DS-11 (DeNovix Inc).

## 3. Diseño y validación de primers

Para diseñar las parejas de primers se utilizó el *software* Primer3 (v. 0.4.0), bajo unos parámetros fijados, como el tamaño de los primers (18-23 nucleótidos), el rango del producto de PCR (80-200 nucleótidos), porcentaje G-C (45-55%), la temperatura de alineamiento, T<sub>m</sub>, (60-61°C) y la no formación de dímeros entre los primers. Además de tener en cuenta esas características, las parejas que se escogieron fueron aquellas con

una mayor cobertura de exones en cada una de las secuencias de nuestros genes diana. Por último, antes de seleccionar las secuencias de *primers* definitivas, se utilizó el buscador BLAST (NCBI) para comprobar la posible homología de los *primers* con secuencias distintas del gen diana. Así, obtenida la lista de *primers* candidatos, se mandaron a sintetizar a la casa comercial StabVida (SatbVida) (Tabla 5).

**Tabla 5.** Secuencias de los *primers* utilizados en los estudios de RT-qPCR.

<b>Gen</b>	<b>Primers</b>	<b>Secuencia</b>
<i>Gapdh</i>	<i>Forward</i>	5' GTGGCAAAGTGGAGATTGTTG 3'
	<i>Reverse</i>	5' CTCCTGGAAGATGGTGATGG 3'
<i>Hprt</i>	<i>Forward</i>	5' TGGATACAGGCCAGACTTTGTT 3'
	<i>Reverse</i>	5' TTGCGCTCATCTTAGGCTTT 3'
<i>FABP4</i>	<i>Forward</i>	5' AGCGTAAATGGGGATTTGGT 3'
	<i>Reverse</i>	5' ATGATGCTCTTCACCTTCCTGT 3'
<i>SREBP1</i>	<i>Forward</i>	5' AGGTCACCGTTTCTTTGTGG 3'
	<i>Reverse</i>	5' AATACAGTTCAACGCTCGCTCT 3'
<i>C/EBP<math>\alpha</math></i>	<i>Forward</i>	5' GTGGACAAGAACAGCAACGA 3'
	<i>Reverse</i>	5' TCACTGGTCAACTCCAGCAC 3'
<i>PPAR<math>\gamma</math></i>	<i>Forward</i>	5' ACAGGAAAGACAACGGACAAA 3'
	<i>Reverse</i>	5' AGGCTCCATAAAGTCACCAAAG 3'

Los *primers* se validaron mediante PCR convencional antes de llevar a cabo la PCR cuantitativa (qPCR). Las condiciones a las que se realizó la PCR fueron las siguientes:

**Tabla 6.** Condiciones de PCR utilizadas para la validación de *primers*.

Paso	Programa	Temperatura	Tiempo
1	Desnaturalización inicial	94°C	5 min (1 ciclo)
2	Desnaturalización	94°C	20 s (40 ciclos)
3	Anillamiento	60°C	15 s (40 ciclos)
4	Extensión	72°C	1 min (40 ciclos)
5	Vuelve al paso 2 → 40 ciclos		
6	Extensión final	72°C	10 min (1 ciclo)

Durante la PCR convencional, se preparó un gel de agarosa al 2% en tampón TAE 1X (40 mM Tris, 20 mM ácido acético y 1mM EDTA), mezclado con Red Safe Nucleic Acid Staining Solution (iNtRON Biotechnology), para teñir los ácidos nucleicos. Para permitir que las muestras migren en el gel, se añadió 5 µL de tampón de carga 5X –500 mM Tris-HCl, 7,5% SDS (m/v), 10 mM EDTA, 50% sacarosa (m/v), 5% β-mercaptoetanol (v/v), 250 mM DTT, 5 mg/mL azul de bromofenol, pH 6,8– a cada producto de PCR. Además, se cargaron 5 µL de marcador de pares de bases Biotools DNA Marker 100 bp Ladder (Biotools Biotechnological & Medical Laboratories SA, Madrid, España). La electroforesis migró durante 30 min a un voltaje constante de 80 V. Para la visualización y procesamiento de los geles, se utilizó la cámara ultravioleta Bio-Rad ChemiDoc™ XRS y el *software* Quantity One 4.6.6 (Bio-Rad Laboratories).

#### 4. PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR)

Los niveles de expresión génica en las muestras se cuantificaron mediante PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR) tratando las muestras con el reactivo Máster Mix GoTaq® qPCR Máster Mix (Promega Corporation, Madison, WI, EE.UU.) según las instrucciones del fabricante. Cada muestra se cargó, por duplicado, en placas de 96 pocillos para RT-qPCR (Bioplastics, Landgraaf, Países Bajos) y se midieron utilizando el

equipo LightCycler 480 II (Roche, Basilea, Suiza). El ADNc fue amplificado bajo las condiciones indicadas en la **Tabla 7**.

**Tabla 7.** Parámetros empleados para la realización de los estudios de RT-qPCR.

Paso	Programa	Temperatura	Tiempo
1	Activación de la DNasa (1 ciclo)	95°C	2 min
2	Desnaturalización	95°C	15 s
	Amplificación (45 ciclos)	60°C	1 min
3	Ciclo de disociación de los <i>primers</i> (1 ciclo)	95°C	1 s
		60°C	15 s
		95°C	1 s
4	Enfriamiento (1 ciclo)	40°C	30 s

Los datos de expresión fueron procesados utilizando el *software* del equipo (LightCycler 96 SW 1.1, Roche; Basilea, Suiza) y la cuantificación relativa fue calculada utilizando la fórmula  $\Delta\Delta CT$ . Los niveles de expresión génica de *FABP4*, *SREBP-1*, *C/EBP $\alpha$*  y *PPAR $\gamma$*  fueron normalizados utilizando un factor de normalización obtenido a partir de los niveles de expresión génica de *Hprt* y *Gapdh* (genes constitutivos utilizados como referencia).

## EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS

### 1. Extracción de proteínas de tejido adiposo humano

Además de los estudios llevados a cabo en el tejido adiposo humano SC y OM para el enriquecimiento de proteínas acetiladas y análisis HPLC-MS/MS y determinación del perfil de proteínas carboniladas, se realizaron otros estudios de proteínas en muestras de tejido humano: inmunoprecipitación de FABP4, determinación del grado de peroxidación lipídica mediante la medida de aductos de 4-HNE, contenido de proteínas carboniladas totales, análisis de proteínas específicas mediante *Western Blot*, determinación de ROS y contenido de hierro en el tejido adiposo. Para ello, se tomaron

50 mg de tejido adiposo/200  $\mu$ L de tampón de lisis convencional (el mismo que para los estudios de carbonilación). Las muestras se homogenizaron utilizando dos series de sonicación (2 pulsos de 20 s/pulso) separadas por periodos en hielo (10 y 15 min) para favorecer la solubilización de las proteínas. Posteriormente, las muestras se centrifugaron 2 veces a 9.000 g durante 15 min a 4°C, recogiendo con cuidado en cada caso el sobrenadante donde se localizan las proteínas citosólicas y evitando coger la fase lipídica que queda por encima de este. La cuantificación de proteínas se llevó a cabo mediante el método de cuantificación Bradford, como se describió anteriormente.

## 2. Recogida de muestras proteicas de células 3T3-L1

Los extractos de células 3T3-L1 empleados para los estudios de *Western Blot* se obtuvieron de la siguiente manera: las células se lavaron con tampón PBS 1X frío y se lisaron añadiendo 300  $\mu$ L de tampón SDS-DTT (0,5 M Tris-HCl pH 7,4, 4% SDS, 20% glicerol puro, 1 M DTT, azul de bromofenol y H<sub>2</sub>O destilada) calentado previamente a 65°C. Después, las muestras se sonicaron durante 30 s y se calentaron 5 min a 95°C para desnaturalizar las proteínas. Este extracto proteico corresponde al contenido proteico intracelular de nuestras células.

Debido a que la proteína FABP4 se secreta al medio extracelular, se llevó a cabo la recogida tanto de las células 3T3-L1 como del medio de cultivo durante los días de diferenciación celular (D0, D3, D6 y D9) y tras la transfección celular con los vectores *pEGFP-C2-WTFABP4* (WT) y *pEGFP-C2-TMFABP4* (TM). Así, el medio de cultivo recogido (secreción de nuestras células) se centrifugó a 5.000 rpm durante 5 min a 4°C y el sobrenadante obtenido se precipitó con acetona durante toda la noche a -20°C. Al día siguiente, se centrifugaron los medios a 1.000 rpm durante 5 min a 4°C y, tras retirar el sobrenadante, se lavaron con metanol para eliminar los restos de acetona, centrifugándolos de nuevo durante 5 min a 1.000 rpm, 4°C. Posteriormente, el *pellet* se resuspendió en tampón de lisis convencional y se cuantificó el contenido proteico mediante el método de Bradford.



Para realizar la separación electroforética de las proteínas secretadas, se prepararon las muestras mezclando 4 volúmenes de extracto proteico con un volumen de tampón de carga 5X (500 mM Tris-HCl, 7,5% SDS (m/v), 10 mM EDTA, 50% sacarosa (m/v), 5%  $\beta$ -mercaptoetanol (v/v), 250 mM DTT y 5 mg/mL azul de bromofenol pH 6,8) e hirviéndolas a 95°C durante 5 min para desnaturalizar las proteínas.

---

## DETECCIÓN DE PROTEÍNAS POR INMUNOTRANSFERENCIA

---

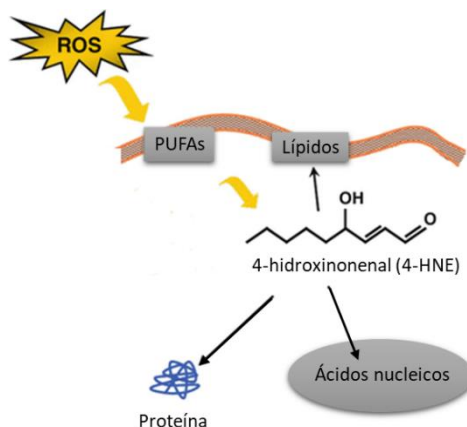
### 1. Derivatización de los grupos carbonilo

La derivatización de los grupos carbonilo en muestras difiere del protocolo llevado a cabo en la derivatización de las tiras IPG empleadas para el IEF. En este caso, se añadieron 20  $\mu$ L del reactivo de derivatización (10 mM DNPH en 2 N HCl) a 10  $\mu$ L de muestra cuya concentración era 1  $\mu$ g proteína/ $\mu$ L. La mezcla se incubó durante 15 min a temperatura ambiente. Posteriormente, la reacción se bloqueó con tampón de neutralización (2 M Tris-HCl en 30% de glicerol) y se procedió a la detección de los grupos carbonilos mediante *Western Blot*.

### 2. Detección de 4-Hidroxinenal (4-HNE)

Uno de los productos de la peroxidación lipídica, 4-HNE, forma aductos covalentes con grupos funcionales de las proteínas (Zhong and Yin, 2015) (**Figura 21**). Así, los niveles de proteínas modificadas por 4-HNE fueron determinados en muestras de tejido adiposo SC y OM de pacientes con obesidad NG, IR y T2D, siguiendo protocolos del grupo (Díaz-Ruiz et al., 2015). Por tanto, una vez que las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa (BioTrace NT) –mediante la técnica de *Western Blot*–, las membranas fueron incubadas con una solución de 250 mM de NaBH<sub>4</sub> en 100 mM de MOPS, pH 8,0 durante 15 min. Las membranas fueron lavadas 3 veces con H<sub>2</sub>O y posteriormente otras 3 veces con PBS 1X. A continuación, se bloquearon las membranas con tampón de bloqueo –leche desnatada en polvo (Bio-Rad Laboratories) al 5% en TTBS (m/v)– finalizando el proceso de inmunodetección de los niveles de

proteínas conjugadas con 4-HNE continuando con el protocolo detallado en el apartado *Estudios de Western Blot*, empleando como anticuerpo primario anti-4-HNE y anticuerpo secundario de ratón conjugado con peroxidasa (**Tabla 8**).



**Figura 21.** Formación del 4-HNE a partir de la peroxidación lipídica provocada por las ROS.

### 3. Inmunoprecipitación de FABP4 en muestras de tejido adiposo humano

Para comprobar el grado de acetilación de FABP4 en tejido adiposo SC de pacientes Ob-NG y Ob-IR, se llevó a cabo la inmunoprecipitación (IP) de la proteína. Para ello, se tomaron 40  $\mu\text{L}$ /muestra de *beads* de proteína A-sefarosa (Thermo Fisher Scientific) y se lavaron 3 veces con 1 mL de tampón IP (20 mM Tris-HCl, 135 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1,5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 10% glicerol, 1% CHAPS), dejando las muestras durante 10 min en agitación orbital, 5 min en hielo y centrifugación a 1.400 rpm, a 4°C, durante 1 min sin apurar mucho para no perder las *beads* descartando el sobrenadante en cada lavado. A continuación, se mezclaron las *beads* lavadas con 50  $\mu\text{g}$  de proteína de tejido adiposo SC en tampón IP con 1  $\mu\text{L}/\text{mL}$  CLAP, 1  $\mu\text{L}/\text{mL}$  PMSF y 1 mM TSA durante 1 h a 4°C en agitación orbital. Se centrifugaron las muestras a 1.400 rpm durante 1 min a 4°C. En este caso, se descartó el *pellet* que correspondía a las proteínas unidas de forma inespecífica a las *beads* y se guardó el sobrenadante (muestra de extracto proteico). A continuación, el sobrenadante se incubó con 8  $\mu\text{g}$  de anticuerpo anti-FABP4 (**Tabla 8**) durante toda la noche a 4°C en agitación orbital. Al día siguiente, se centrifugaron las muestras a 1.400 rpm durante 1 min, descartando el sobrenadante. A continuación, el *pellet* (*beads* + FABP4) se lavó 4 veces con tampón IP que contenía 1  $\mu\text{L}/\text{mL}$  CLAP, 1  $\mu\text{L}/\text{mL}$  PMSF y 1 mM TSA de la misma forma que anteriormente (10 min en agitación

orbital, 5 min en hielo y 1 min de centrifugación a 1.400 rpm a 4°C). Al *pellet* final se le añadió tampón de carga Laemmli 2X para la visualización de las muestras en el gel y se desnaturalizaron durante 5 min a 95°C. Por último, se llevó a cabo la inmunodetección de los niveles de FABP4 y su grado de acetilación mediante *Western Blot* utilizando como anticuerpos primarios anti-FABP4 y anti-acetil-Lys y anticuerpo secundario de conejo conjugado con peroxidasa (**Tabla 8**).

#### **4. Técnica de dot blot**

La técnica de *dot blot* consiste en un método de detección, análisis e identificación de proteínas similar a la técnica de *Western Blot*, pero difieren en el hecho de que las muestras proteicas no se separan electroforéticamente antes de la inmunodetección. Esta técnica se empleó para la validación de la IP de proteínas acetiladas en SC y OM previa al análisis por HPLC-MS/MS.

Así, se recogieron las fracciones de los extractos crudos, volumen de los lavados de las distintas fases de la IP y extractos de proteínas acetiladas finales de las muestras de cada grupo (SC: delgados, Ob-NG y Ob-IR; OM: delgados, Ob-NG y Ob-IR), que fueron analizados por *dot blot* como se describió previamente (Díaz-Ruiz et al., 2015). Para ello, se cargaron 10 µL de muestra directamente sobre las membranas de nitrocelulosa (BioTrace NT). Una vez secas, las membranas se tiñeron con Rojo Ponceau –0,1% de rojo Ponceau (m/v) en 1% de ácido acético glacial (v/v)–, para tener una referencia de la carga. A continuación, se realizó el proceso de inmunodetección siguiendo el protocolo detallado en el apartado *Estudios de Western blot* utilizando, en este caso, el anticuerpo primario anti-acetil-Lys y el anticuerpo secundario de conejo conjugado con peroxidasa (**Tabla 8**).

#### **5. Estudios de Western Blot**

La separación y cuantificación de proteínas específicas de cada muestra se llevó a cabo mediante la técnica de *Western Blot*. Para ello, se cargaron 20 µg de proteína/pocillo (cada muestra ajustada a 1 µg/µL) y un marcador de peso molecular como referencia –Marcador Precision Plus Protein Dual Color (Rango 10-250 kDa), Bio-

Rad Laboratories– en geles SDS-PAGE utilizando el sistema de electroforesis Mini-PROTEAN Tetra (Bio-Rad Laboratories) con tampón de electroforesis que contenía 0,25 M Tris, 0,03 M SDS y 1,9 M glicina. El porcentaje de poliacrilamida del gel varió en función de las proteínas de estudio: 12,5% para FABP4, 4-20% para proteínas humanas y 10% para proteínas con un peso molecular igual o superior a 40 kDa y para la medición de proteínas carboniladas y acetiladas totales.

Las muestras se separaron a un voltaje constante de 80 V (en el caso de FABP4) o a 80 V (30 min) y 120 V (hasta llegada del frente al final del gel). Una vez finalizada la electroforesis desnaturalizante, se transfirieron las proteínas a una membrana de nitrocelulosa (BioTrace NT) mediante transferencia húmeda con recirculación continua del tampón de transferencia –25 mM Tris, 190 mM glicina, 0,2% SDS (m/v), 20% metanol (v/v)–, durante 1 h en frío, a un amperaje constante de 330 mA empleando el sistema de transferencia Wet Tank Blotting Systems (Bio-Rad Laboratories).

A continuación, para poder observar el patrón de bandas, se tiñeron las membranas con Rojo Ponceau durante 10 min en agitación. Una vez digitalizadas, se destiñeron las membranas con 3 lavados de 5 min con el tampón de lavado TTBS –25 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl pH 7,5 y 0,05% Tween-20 (v/v)–. Una vez eliminados los restos de Rojo Ponceau, se bloquearon las membranas durante 1 h en agitación a temperatura ambiente con tampón de bloqueo y se incubaron a 4°C durante toda la noche en agitación con el anticuerpo primario correspondiente (**Tabla 8**), diluido en tampón de bloqueo. Al día siguiente, se lavaron las membranas 3 veces durante 10 min cada lavado, con TTBS en agitación, y después se incubaron 1 h con el anticuerpo secundario correspondiente preparado en tampón de bloqueo. A continuación, se volvieron a lavar las membranas con TTBS en agitación 3 veces, durante 10 min cada lavado.

**Tabla 8.** Lista de anticuerpos utilizados para los estudios de *Western Blot*.

<b>Anticuerpo</b>	<b>Huésped</b>	<b>Referencia</b>	<b>Casa Comercial</b>	<b>Dilución</b>
Anti-4-HNE	Ratón	MAB3249	RD Systems	1:2000
Anti-acetyl-Lysine	Conejo	#9452	Cell Signaling	1:1000
Anti-Akt	Conejo	#9272	Cell Signaling	1:500
Anti-DNP	Conejo	A6435	Invitrogen	1:1000
Anti-FABP4	Conejo	#3544	Cell Signaling	1:1000
Anti-FAS	Cabra	Sc-16147	Santa Cruz	1:1000
Anti-GFP	Conejo	ab290	Abcam	1:1000
Anti-GSS	Conejo	ab290	Abcam	1:1000
Anti-HSL	Conejo	ab45422	Abcam	1:1000
Anti-pAkt	Conejo	#4060	Cell Signaling	1:500
Anti-SOD1	Conejo	ab45422	Abcam	1:1000
Anti-conejo IgG peroxidasa	Conejo	111035144	Jackson Immunoresearch	1:10000
Anti-ratón IgG peroxidasa	Conejo	A9044	Sigma Aldrich	1:2500
Anti-cabra IgG peroxidasa	Goat	A-9452	Sigma Aldrich	1:2500

Finalmente, las membranas de nitrocelulosa incubadas con los anticuerpos se revelaron utilizando el kit de detección comercial de la peroxidasa basado en quimioluminiscencia Clarity Western ECL Substrate (Bio-Rad Laboratories) en el sistema LAS 4000 (*Software* ImageQuant LAS 4000 V1.2; GE Healthcare). Las imágenes obtenidas fueron procesadas utilizando el programa ImageJ (v1.50b, NIH) para llevar a cabo el análisis cuantitativo de las bandas inmunorreactivas detectadas. Los datos fueron normalizados con respecto a la tinción de Rojo Ponceau, normalización estandarizada en el grupo (Sánchez-Ceinos et al., 2021).

## ESTUDIOS DE MICROSCOPIA

### 1. Estudios de localización intracelular de FABP4 endógena

FABP4 presenta dos localizaciones intracelulares: núcleo y citosol (Hotamisligil y Bernlohr, 2015). El estudio de localización celular de FABP4 endógena durante diferenciación se llevó a cabo mediante microscopía confocal. Para ello, las células 3T3-L1 sembradas en cubreobjetos y ubicadas en pocillos de placas de 12 pocillos se lavaron 3 veces con PBS 1X frío y se fijaron con 4% de PFA (m/v) en tampón PBS durante 10 min. A continuación, se volvieron a lavar 3 veces con PBS 1X frío y se incubaron durante 1 h con tampón de bloqueo (0,3% saponina (v/v) y 1% BSA-FFA (m/v) en PBS). Transcurrido este tiempo, las células se lavaron 3 veces con PBS 1X frío y se incubaron toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario Anti-FABP4 (**Tabla 9**) diluido en tampón de anticuerpo (0,3% saponina (v/v) y 0,5% BSA-FFA (m/v) en PBS). Al día siguiente, se eliminó el exceso de anticuerpo lavando 3 veces con PBS 1X frío y después, se incubaron las células con el anticuerpo secundario conjugado con el fluorocromo Alexa 488 (**Tabla 9**) en tampón de anticuerpo durante 2 h a temperatura ambiente y en oscuridad. Finalmente, las células se lavaron 3 veces con tampón PBS 1X frío. Los núcleos de las células se tiñeron con 1µg/mL DAPI (Sigma Aldrich, San Luis, MO, EE.UU.) en PBS durante 5 minutos a 37°C y se montaron los cubreobjetos utilizando el medio de montaje Fluorescent Mounting Medium (Dako, Carpinteria, CA. EE.UU.).

### 2. Estudios de localización intracelular de las formas mutadas de FABP4

Para conocer si la localización de FABP4 puede estar modulada por la acetilación, analizamos la distribución de las diferentes formas mutadas de FABP4 que se han generado en esta Tesis Doctoral y se comparó con la localización de la forma de FABP4 silvestre, utilizando los vectores correspondientes y microscopía confocal.

Así, células 3T3-L1 transfectadas con las distintas construcciones se lavaron 3 veces con PBS 1X frío y se fijaron con 4% de PFA en PBS durante 10 min. Posteriormente, se volvieron a lavar 3 veces con PBS 1X frío. Gracias a la presencia del gen reportero, GFP, en las construcciones no fue necesario el marcaje con anticuerpos

inmunofluorescentes. A continuación, se tiñeron los núcleos (1µg/mL DAPI (Sigma Aldrich) en PBS durante 5 minutos a 37°C) y se montaron los cubreobjetos empleando el medio de montaje Fluorescent Mounting Medium (Dako) para su visualización por microscopía confocal.

### 3. Estudios de traslocación del Receptor de Transferrina (TfR)

El receptor de Transferrina (TfR) permite la internalización de hierro al interior celular tras su interacción con la transferrina (Tf), proteína transportadora de hierro (Cheng y Lim, 2004). Para conocer si la traslocación del TfR se ve influenciada por la resistencia a insulina, células 3T3-L1 transfectadas con el vector TfR-HA, tratadas durante 24 h con suero de pacientes No-T2D e Incidente-T2D y recibieron un estímulo de 20' de Holotransferrina. Tras el estímulo, los pocillos se lavaron 3 veces con PBS 1X frío y se siguió el protocolo de inmunocitoquímica descrito en el apartado *Estudios de localización intracelular de FABP4 endógena*. Realizamos estudios de localización celular de FABP4 endógena empleando un anticuerpo primario anti-HA y un anticuerpo secundario conjugado con el fluorocromo Alexa 488 (**Tabla 9**).

**Tabla 9.** Lista de anticuerpos utilizados para los estudios de microscopía.

Anticuerpo	Huésped	Referencia	Casa Comercial	Dilución
Anti-FABP4	Conejo	#3544	Cell Signaling	1:200
Anti-HA tag	Conejo	ab9110	Abcam	1:200
Anti-conejo Alexa fluor 488	Burro	A-21206	Thermo Fisher Scientific	1:500

### 4. Tinción con Oil Red O

Las células 3T3-L1 transfectadas con las construcciones de interés (WT, TM, M1, M2 y M3) se tiñeron con la tinción de Oil Red O para conocer si la función de FABP4 como chaperona lipídica (i.e., acumulación de lípidos) está regulada por acetilación.

Para ello, las células se lavaron 3 veces con PBS 1X frío, se fijaron con 4% de PFA durante 10 min y se volvieron a lavar 3 veces con PBS 1X frío. A continuación, se añadió 60% de isopropanol, se retiró y se dejaron secar los cubreobjetos durante 30 min aproximadamente (hasta que se evaporó todo el isopropanol). Mientras tanto, se

preparó una solución *stock* de Oil Red O (0,35 g de Solvent Red 27 *dye*, C<sub>26</sub>H<sub>24</sub>N<sub>4</sub>O, (Sigma Aldrich) disueltos en 100 mL de 100% de isopropanol). La solución *stock* fue diluida 6:4 con agua destilada y filtrada posteriormente (solución de trabajo de Oil Red O). Así, secado el isopropanol, se añadió sobre las células la solución de trabajo de Oil Red O durante 30 min a temperatura ambiente y en oscuridad. Transcurrido el tiempo, los cubreobjetos se lavaron entre 4-6 veces con agua destilada con el objetivo de eliminar los restos de colorante y, por último, se montaron en el portaobjetos con el medio de montaje Fluorescent Mounting Medium (Dako) para su visualización por microscopía confocal.

## **5. Microscopía confocal y análisis de imagen**

Las preparaciones obtenidas para imagen se visualizaron en un microscopio confocal espectral LSM 710 (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemania). Para la visualización del gen reportero GFP de las construcciones (WT, TM, M1, M2 y M3) y del anticuerpo secundario conjugado con el fluorocromo Alexa 488, las muestras se excitaron a una  $\lambda = 488$  nm y se recogió la emisión a una  $\lambda = 500-550$  nm. Para la visualización de los núcleos marcados con DAPI, las muestras se excitaron a una  $\lambda = 305$  nm y se recogió su emisión a una  $\lambda = 350-460$  nm. Las muestras teñidas con Oil Red O para la visualización de las gotas lipídicas se excitaron a una  $\lambda = 594$  nm y se recogió la emisión entre 600 y 700 nm.

Los análisis cuantitativos se llevaron a cabo tomando entre 10-20 planos confocales por cada canal, basándose en el tamaño celular y la localización de la señal fluorescente. Además, se eligieron entre 10-15 campos microscópicos al azar de cada una de las preparaciones adquiriendo imágenes que fueron procesadas *off-line* con el programa ImageJ (v1.50b, NIH).

Para la cuantificación de la localización celular de FABP4, se generó la proyección máxima de planos en el eje Z de cada imagen y se analizó la señal del área correspondiente al núcleo y al citosol. Para los estudios de traslocación de TfR, se generó la proyección máxima de planos en el eje Z de cada imagen y se analizó la señal del área correspondiente a la membrana y a la región perinuclear de las células. Para la cuantificación de las gotas lipídicas, se obtuvo la proyección máxima de planos en el eje



Z de cada imagen y se convirtió la imagen de 8 bits en una imagen binaria, comprimiendo los pixels de la imagen en las gotas lipídicas. Tras la binarización, la imagen se procesó mediante un proceso de transformación divisoria o “*watershed*” para identificar las líneas divisorias de las gotas lipídicas. La cuantificación del número y el tamaño de las gotas lipídicas (en  $\mu\text{m}^2$ ) de cada célula se realizó mediante la función “Analizar partículas” que ofrece el *software* ImageJ. La suma de las áreas de todas las gotas lipídicas presentes en una célula se utilizó como contenido total de lípidos.

## **6. Tinción Perl's Prussian Blue**

Para la visualización del hierro presente en las muestras de tejido adiposo humano, se llevó a cabo la tinción de Perl's Prussian Blue sobre cortes histológicos (Dongiovanni et al., 2013). Así, las muestras de tejido adiposo humano fresco SC y OM de los pacientes obesos (Ob-NG, Ob-IR y Ob-T2D) se fijaron con 10% de PFA y se incluyeron en parafina siguiendo protocolos del grupo (Guzmán-Ruiz et al., 2020a). Así, se desparafinaron los cortes (60°C durante 30 min, 2 lavados con xilol de 15 min/lavado y 2 lavados con etanol de 5 min cada lavado) y se rehidrataron mediante su incubación en concentraciones decrecientes de alcohol durante 5 min cada incubación (EtOH a 90°C, EtOH a 70°C y H<sub>2</sub>O destilada). A continuación, se trataron los cortes durante 30-60 min con una mezcla del 2% de ferrocianuro de potasio y 2% de HCl (proporción 1:1) y se lavaron 3 veces con agua destilada. La tinción de los núcleos se llevó a cabo con la aplicación de una solución acuosa del 3% de rojo neutro durante 3 min. Posteriormente, los cortes se lavaron 3 veces con H<sub>2</sub>O destilada y se procedió a la deshidratación de los mismos mediante la exposición a concentraciones crecientes de alcohol durante 5 min (agua destilada, EtOH 70°C, EtOH 90°C, EtOH absoluto) y 2 últimos lavados con xilol de 15 min. Finalmente, los cubreobjetos se montaron sobre portaobjetos con medio de montaje DPX (Merck, Darmstadt, Alemania) y se visualizaron en el microscopio óptico Leica DM2000 (Leica Biosystems, Wetzlar, Alemania) tomando las imágenes ópticas con una cámara (Moticam 1080; Motic, Barcelona, España) acoplada al microscopio. El área total teñida (u.a.) fue cuantificada utilizando el *software* ImageJ.

---

## ESTUDIOS FUNCIONALES

---

### 1. Medidas de ROS intracelular

Los niveles intracelulares de las especies reactivas de oxígeno (ROS) fueron medidos, como se describió previamente, por el grupo (Guzmán-Ruiz et al., 2020b). Así, 50 µg de proteína de tejido adiposo SC y OM de pacientes Ob-NG, Ob-IR y Ob-T2D fueron mezclados con 25 µM de diacetato de 6-carboxi-2',7'-diclorodihidrofluoreceína (H<sub>2</sub>DCFDA) (Sigma Aldrich) e incubados a 37°C durante 30 min en oscuridad. La membrana plasmática de las células es permeable a este fluorocromo, el cual es convertido a diclorodihidrodifluoresceína (H<sub>2</sub>DCF) en el interior celular por las esterasas intracelulares. Este producto, al interaccionar con las ROS, emite una fluorescencia, señal que fue recogida a  $\lambda = 485/535$  nm en un espectrofotómetro (FlexStation3, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EE.UU.).

### 2. Determinación de hierro en tejido adiposo SC y OM

El contenido de hierro total intracelular fue medido empleando el kit Iron Assay Kit (Sigma Aldrich) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Así, entre 17-23 mg de tejido adiposo SC y OM fueron homogeneizados en frío utilizando el tampón de ensayo del hierro (proporcionado por el kit) seguido de una centrifugación de 10 min a 16.000 g a 4°C para eliminar el material insoluble. Los sobrenadantes fueron recogidos e incubados con el reductor de hierro durante 30 min a 25°C. A continuación, se añadió 100 µL de la sonda de hierro y se mezclaron bien en un agitador horizontal durante 60 min a 25°C. Por último, la absorbancia fue medida a  $\lambda = 593$  nm en un espectrofotómetro (FlexStation3, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EE.UU.) y se determinó la cantidad de hierro por gramo de tejido empleado en cada muestra.

### 3. Síntesis de los *quantum dots* de carbono (CQDs)

Las SQDs, compuestas de CdTe, fueron adquiridas comercialmente (PlasmaChem GmbH, Berlín, Alemania). Sin embargo, las CQDs fueron sintetizadas en el grupo del Dr. Miguel Valcárcel –grupo con el que se colaboró para la realización de este estudio–, como describieron previamente (Cayuela et al., 2013), haciendo uso de la técnica *top-down*. Para ello, se mezclaron 0,1 g de nanotubos de carbono de pared múltiple (MWCNTs) (Bayer AG, Leverkusen, Alemania) con 10 mL de una mezcla ácida de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>:HNO<sub>3</sub> (3:1) que se calentó a 140°C en condiciones de reflujo durante 7 h. Un paso de pasivación con acetona permitió introducir los grupos carboxílicos en la superficie de las CQDs con el fin de mejorar su fluorescencia. Una vez que las CQDs fueron purificadas, se neutralizaron con carbonato de sodio, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Finalmente, el exceso de sales se eliminó por coprecipitación con etanol a 4°C. Las CQDs cargadas negativamente obtenidas fueron almacenadas a 4°C hasta su uso.

### 4. Espectros de fluorescencia y absorción de las CQDs y SQDs

Tanto las CQDs como las SQDs son solubles en agua. Por ello, se analizaron los espectros de fluorescencia y absorción de ambas QDs en solución acuosa (200 mg/L) y se registraron utilizando un espectrofluorómetro (PTI QuantaMaster™; Photon Technology International, Birmingham, NJ, EE. UU.) equipado con una lámpara de arco corto de xenón de 75 W. El máximo de  $\lambda_{\text{excitación}}$  = 365 nm para las CQDs y 390 nm para las SQDs mientras que el máximo de  $\lambda_{\text{emisión}}$  = 450 nm y 650 nm para las CQDs y SQDs, respectivamente. Los espectros obtenidos fueron registrados y procesados por el *software* PTI Felix32 (Photon Technology International, Birmingham, NJ, EE.UU.).

### 5. Ensayo de citotoxicidad MTT

La viabilidad celular de las células 3T3-L1 después de 24 h de exposición a concentraciones crecientes de CQDs y SQDs con deprivación, o no, de suero se midió con el ensayo de MTT como previamente había sido descrito (Caballero-Díaz et al., 2014). Este ensayo consiste en la reducción metabólica del reactivo MTT (bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol) por acción de la enzima mitocondrial

succinato deshidrogenasa en un cristal de color azul (formazán) por parte de las células vivas. Brevemente, los medios de cultivo fueron eliminados tras los tratamientos y se incubaron con 500  $\mu\text{L}$  de 0,1 mg/mL MTT sobre las células. Después de un período de incubación (entre 2 h y 5 h dependiendo de la actividad metabólica de las células y su rapidez para formar los cristales de formazán) a 37°C y un 5% de  $\text{CO}_2$ , la solución de MTT fue retirada. A continuación, se añadieron 500  $\mu\text{L}$  de DMSO para disolver los cristales de formazán. El formazán disuelto en DMSO fue medido a  $\lambda = 570 \text{ nm}$  en un espectrofotómetro (FlexStation3, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EE.UU.). Como controles (100% de viabilidad celular) se utilizaron células sometidas a las mismas condiciones experimentales que las células tratadas con CQDs y SQDs expresando la viabilidad celular de estas últimas como un porcentaje relativo al control.

---

## **ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

---

Los experimentos fueron repetidos, al menos, tres veces. Se analizaron un mínimo de 3 réplicas por tratamiento en cada experimento. Los resultados de los experimentos fueron expresados como la media  $\pm$  SEM. Las diferencias estadísticas entre dos grupos experimentales fueron determinadas aplicando la prueba estadística t-Student (para datos que siguen una distribución normal) o test Mann-Whitney para datos no paramétricos. Para comparaciones múltiples, se empleó el análisis de la varianza one-way ANOVA seguido del método LSD (método de la diferencia menos significativa) de Tukey o Bonferroni en el caso de datos paramétricos. Se llevó a cabo el test Kruskal-Wallis seguido del método LSD Dunn para datos no paramétricos. Por otro lado, para las correlaciones se utilizó el test de correlaciones Pearson. Las diferencias significativas se consideraron con un nivel de confianza superior al 95%, es decir, el valor de  $p < 0,05$ . Los análisis estadísticos fueron realizados utilizando el programa GraphPad Prism 7 (La Jolla, CA, EE.UU.).





A thick, hand-drawn style green border frames the page, starting from the top left and ending at the bottom right, leaving the central text area open.

# **CAPÍTULO 1**

**Estudio del acetiloma del tejido adiposo  
en obesidad y resistencia a insulina**





---

## ANTECEDENTES

---

El tejido adiposo juega un papel fundamental en el desarrollo de obesidad y sus comorbilidades asociadas. Este órgano se encarga de almacenar el exceso de energía así como de producir moléculas señalizadoras que son secretadas por los adipocitos y que ejercen funciones sobre otras células, conocidas como adipocinas (Unamuno et al., 2018). Además, es conocido que el tejido adiposo muestra diferencias específicas de depósito, muchas de las cuales están relacionadas con su distinta capacidad de expansión, incluyendo su distinta asociación al riesgo metabólico asociado a obesidad (Pellegrinelli et al., 2016; Vishvanath y Gupta, 2019). Así, la acumulación de tejido adiposo omental (OM) se asocia con resistencia a insulina mientras que la expansión del depósito subcutáneo (SC) parece jugar un papel protector desde el punto de vista metabólico (Vishvanath y Gupta, 2019). Sin embargo, los mecanismos moleculares subyacentes a estas diferencias aún no son del todo conocidos.

Por otro lado, la proteómica ha demostrado ser útil para entender la complejidad biológica que hay detrás de la obesidad y sus comorbilidades asociadas, siendo una técnica que permite la identificación de nuevos biomarcadores proteicos. A diferencia de la genómica y la transcriptómica, el análisis del proteoma permite la detección de modificaciones postraduccionales (MPT) de las proteínas que podría ser fundamental a la hora de definir un buen biomarcador (Aleksandrova et al., 2020). Dentro de las MPTs, la acetilación es fundamental en la regulación de la actividad de enzimas reguladoras del metabolismo energético. La acetilación de proteínas depende en gran parte de la disponibilidad de acetil-CoA, compuesto derivado del metabolismo energético de la célula producido en la glucólisis y la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos y también a partir de acetato (Drazic et al., 2016).

La ampliación de nuestro conocimiento sobre la biología del tejido adiposo podría permitirnos superar algunas limitaciones del diagnóstico de las enfermedades metabólicas asociadas a la obesidad, basadas en la medida de los índices antropométricos tradicionales. Por tanto, la identificación de posibles biomarcadores del metabolismo lipídico específicos de depósito servirían como dianas terapéuticas que

podrían ayudar a contrarrestar el desarrollo de obesidad y complicaciones metabólicas asociadas a la misma.

Por tanto, teniendo en cuenta lo mencionado anteriormente, a continuación se describe el estudio proteómico comparativo de los depósitos SC y OM de individuos delgados y pacientes con obesidad y diferentes grados de sensibilidad a insulina realizado en esta Tesis Doctoral, con el que se pretende conseguir los siguientes objetivos:

1. Identificar, mediante enriquecimiento de proteínas acetiladas y posterior análisis HPLC-MS/MS, el acetiloma del tejido adiposo humano SC y OM en condiciones fisiológicas (individuos delgados) y durante el desarrollo de obesidad y resistencia a insulina –sujetos con obesidad y normogluceemia (Ob-NG) y pacientes con obesidad y resistencia a insulina (Ob-IR).
2. Describir y comparar el acetiloma de ambos depósitos del tejido adiposo, SC y OM.
3. Describir y comparar el acetiloma de tejido adiposo SC y OM de individuos delgados, pacientes Ob-NG y Ob-IR.
4. Caracterizar el posible papel modulador de la acetilación en el desarrollo de las funciones de FABP4 en el tejido adiposo mediante el desarrollo de diferentes modelos *in vitro*.

---

## RESULTADOS

---

### 1. Sujetos de estudio

Se reclutaron individuos delgados y pacientes con obesidad mórbida procedentes de la Unidad de Endocrinología y Nutrición del Hospital Clínica Virgen de la Victoria (Málaga) (Cohorte 1). En el caso de los pacientes con obesidad, fueron subclasificados en 2 grupos siguiendo los criterios del ADA (2022): sujetos con obesidad y normoglucémicos (Ob-NG) (Glucosa < 100 mg/dl y HbA1c < 5,7%) y con obesidad e insulinoresistencia (Ob-IR) (Glucosa 100 - 126 mg/dl y HbA1c 5,7 – 6,4%). En la **Tabla 10** se detallan los parámetros antropométricos y clínicos asociados a los individuos incluidos en este estudio. Adicionalmente, se incluyó una segunda cohorte (Cohorte 2) con parámetros antropométricos y clínicos similares a la Cohorte 1 para la validación de los estudios proteómicos.

Entre los parámetros analizados en los pacientes, solo se observaron diferencias significativas en los parámetros antropométricos y clínicos que nos permitieron su estratificación. Así, entre el grupo de delgados y obesos (Ob-NG y Ob-IR) se diferencian estadísticamente en su peso y en su IMC. Por otro lado, los niveles de glucosa, insulina y el índice HOMA-IR mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los sujetos Ob-NG y Ob-IR, parámetros que permiten la subclasificación de los sujetos con obesidad en diferentes grupos dependiendo de su grado de sensibilidad a insulina. Por último, no se observaron diferencias en cuanto a su edad ni a los parámetros del metabolismo lipídico medidos (colesterol, HDL y triglicéridos) (**Tabla 10**).

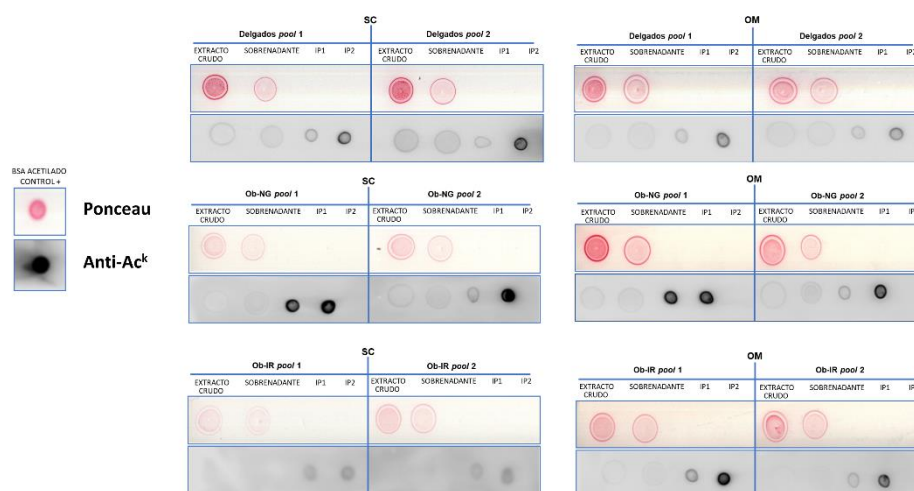
**Tabla 10.** Características antropométricas y bioquímicas de los sujetos de la cohorte 1.

	<b>Delgados (n=5)</b>	<b>Ob-NG (n=16)</b>	<b>Ob-IR (n=16)</b>	<b>ANOVA</b>
<b>Sexo(hombre/mujer)</b>	5/0	9/7	8/8	
<b>Edad (años)</b>	43,4 ± 5,2	45,1 ± 4,6	43,0 ± 4,7	ns
<b>Peso (kg)</b>	71,8 ± 4,3	146,6 ± 13,6 <sup>aaa</sup>	153,6 ± 8,2 <sup>aaa</sup>	<0,001
<b>IMC (kg/m<sup>2</sup>)</b>	22,96 ± 0,7	51,7 ± 3,3 <sup>aaa</sup>	53,1 ± 2,1 <sup>aaa</sup>	<0,001
<b>Glucosa (mg/dL)</b>	89,2 ± 2,1	91,8 ± 5,2	106,5 ± 7,3 <sup>a,b</sup>	<0,01
<b>Insulina (mU/L)</b>	5,96 ± 1,0	13,7 ± 1,8	29,4 ± 3,3 <sup>aaa</sup>	<0,001
<b>HOMA-IR</b>	1,32 ± 0,2	2,7 ± 0,5	8,1 ± 1,1 <sup>aaa,b</sup>	<0,001
<b>Colesterol (mg/dL)</b>	212 ± 21,2	169,0 ± 16,2	191,2 ± 17,4	ns
<b>HDL (mg/dL)</b>	55,0 ± 6,8	39,6 ± 4,4	43,1 ± 5,4	ns
<b>Triglicéridos(mg/dL)</b>	99,4 ± 26,4	125,7 ± 19,5	129,9 ± 23,2	ns

IMC: índice de masa corporal; HOMA-IR: índice de resistencia a insulina; HDL: lipoproteína de alta densidad. Ob-NG: obesos normoglucémicos; Ob-IR: obesos insulinoresistentes. Los datos se representan como la media ± SEM. *p value* fue analizado utilizando el análisis de varianzas One-Way (ANOVA) y su correspondiente test post-hoc. <sup>a</sup>p<0,05, <sup>aa</sup>p<0,01, <sup>aaa</sup>p<0,001 vs. individuos delgados; <sup>b</sup>p<0,05, <sup>bb</sup>p<0,01, <sup>bbb</sup>p<0,001 vs. Ob-NG; ns, no significativo.

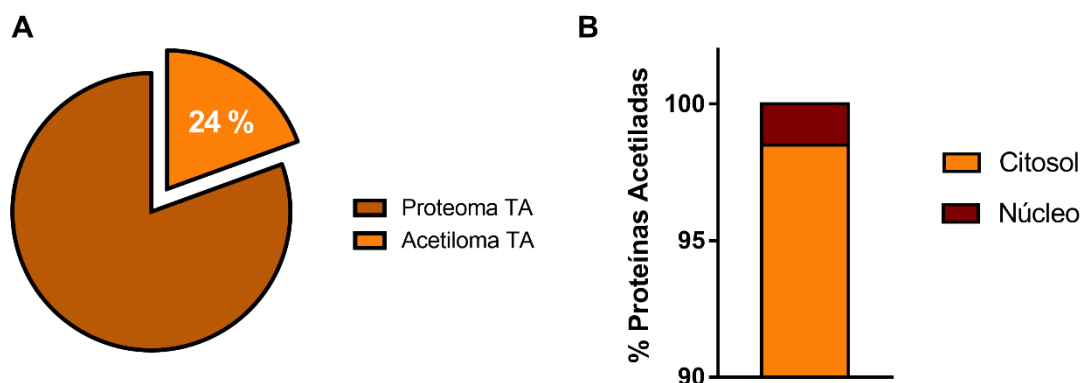
## 2. Identificación del acetiloma del tejido adiposo humano

Para identificar el acetiloma del tejido adiposo humano en ambos depósitos, SC y OM, se llevó a cabo una aproximación proteómica basada en el enriquecimiento de proteínas acetiladas en residuos de lisina (proteínas acetiladas de aquí en adelante) mediante inmunoprecipitación (**Figura 17**), proceso que fue validado mediante técnica *dot blot* (**Figura 22**), y posterior identificación de los péptidos por HPLC-MS/MS. Para ello, las muestras de individuos delgados y sujetos con obesidad (Ob-NG y Ob-IR) fueron mezcladas en pools para obtener la mayor representación de la variabilidad biológica de las muestras. En paralelo, para confirmar que las proteínas acetiladas identificadas también estaban representadas en el proteoma global de los individuos, se llevó a cabo la identificación del proteoma total del tejido adiposo de estos sujetos. Los datos proteómicos obtenidos en el estudio se depositaron en Mendeley Data y están disponibles a través del doi: 10.17632/nhb5fdr453.1.



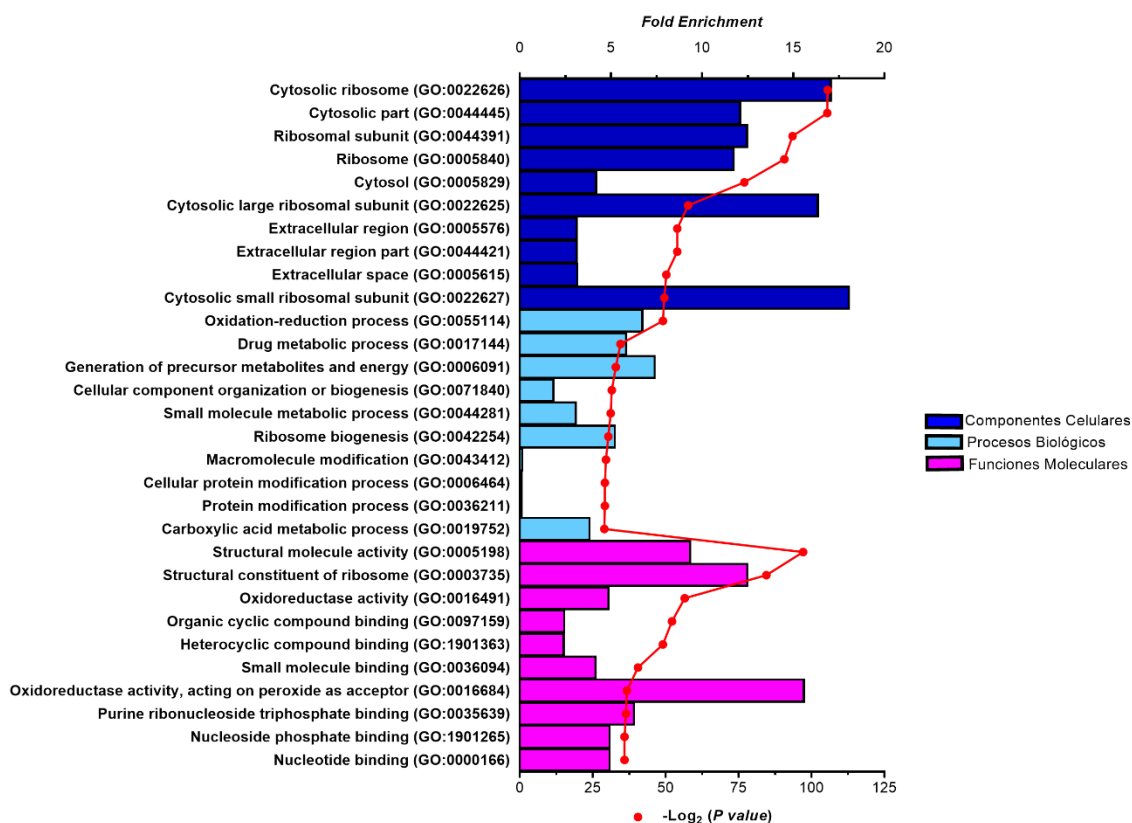
**Figura 22.** Validación del enriquecimiento de proteínas acetiladas mediante *dot blot*.

Así, el análisis proteómico identificó un total de 539 proteínas acetiladas del total de 2774 proteínas que componen el proteoma global del tejido adiposo humano, correspondiendo el acetiloma al 24% del proteoma total del tejido adiposo humano (**Figura 23A**). Además, estudios adicionales utilizando el *software* Panther (<http://www.pantherdb.org/>) sobre la distribución subcelular de las proteínas acetiladas en residuos de lisina (Kac) mostraron que las proteínas acetiladas tienen una localización predominantemente citosólica (**Figura 23B**).



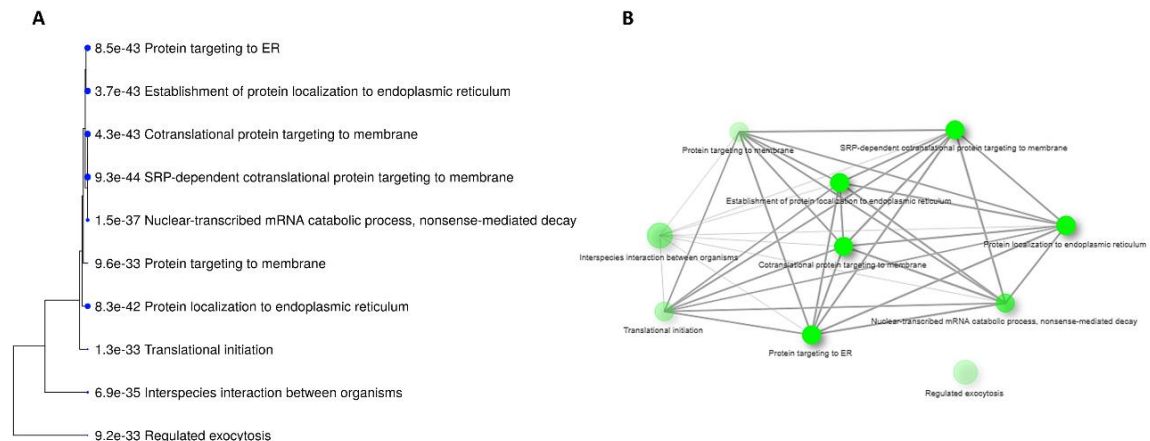
**Figura 23.** Caracterización del acetiloma del tejido adiposo humano. **A.** Porcentaje de proteínas acetiladas (acetiloma) vs. proteínas totales (proteoma) del tejido adiposo humano. **B.** Localización subcelular (en porcentaje) de las proteínas acetiladas identificadas en el tejido adiposo humano atendiendo a la clasificación dada por Panther (<http://www.pantherdb.org/>).

A continuación, se llevaron a cabo estudios funcionales de anotación GO PANTHER confirmando que las proteínas acetiladas identificadas se localizaban de manera significativa en el citosol, principalmente asociadas a ribosomas (ribosomas citosólicos y subunidades de los ribosomas) y en el glicocálix de las células –región extracelular correspondiente a la capa externa de la membrana plasmática– (**Figura 24, barras azules**). En el caso de los procesos biológicos en los que están implicadas las proteínas acetiladas, se identificó el proceso de oxidación-reducción como el proceso biológico más significativo (**Figura 24, barras cian**). Por último, se observó la actividad oxidorreductasa como una de las 10 funciones moleculares principales llevadas a cabo por el acetiloma del tejido adiposo humano (**Figura 24, barras magenta**).



**Figura 24.** Análisis funcional de anotaciones GO PANTHER del acetiloma del tejido adiposo humano. Las categorías analizadas para las proteínas acetiladas identificadas en el estudio proteómico corresponden a Componentes Celulares (azul), Procesos Biológicos (cian) y Funciones Moleculares (magenta). En el eje X superior, se representa el *Fold Enrichment* en relación a la base de datos de referencia *Homo Sapiens* de PANTHER; en el eje X inferior se representa el *p valor* ajustado ( $-\log_2$ ); y en el eje Y se muestra el top 10 de los procesos GO más significativos de cada una de las anotaciones analizadas.

Para poder profundizar en estos datos, se incluyeron análisis adicionales como un árbol jerárquico y una red de interacción proteica, que permiten visualizar una relación en red de los distintos procesos obtenidos por enriquecimiento de proteínas. Para ello, se empleó la base de datos ShinyGO (<http://bioinformatics.sdstate.edu/go/>). Así, tanto el árbol jerárquico (**Figura 25A**) como la red de interacción (**Figura 25B**) mostraron procesos relacionados con el retículo endoplasmático y con la exocitosis regulada. Estos procesos están de acuerdo con los componentes celulares que forman las proteínas acetiladas identificadas –ribosomas y glicocálix - (**Figura 24, barras azules**).

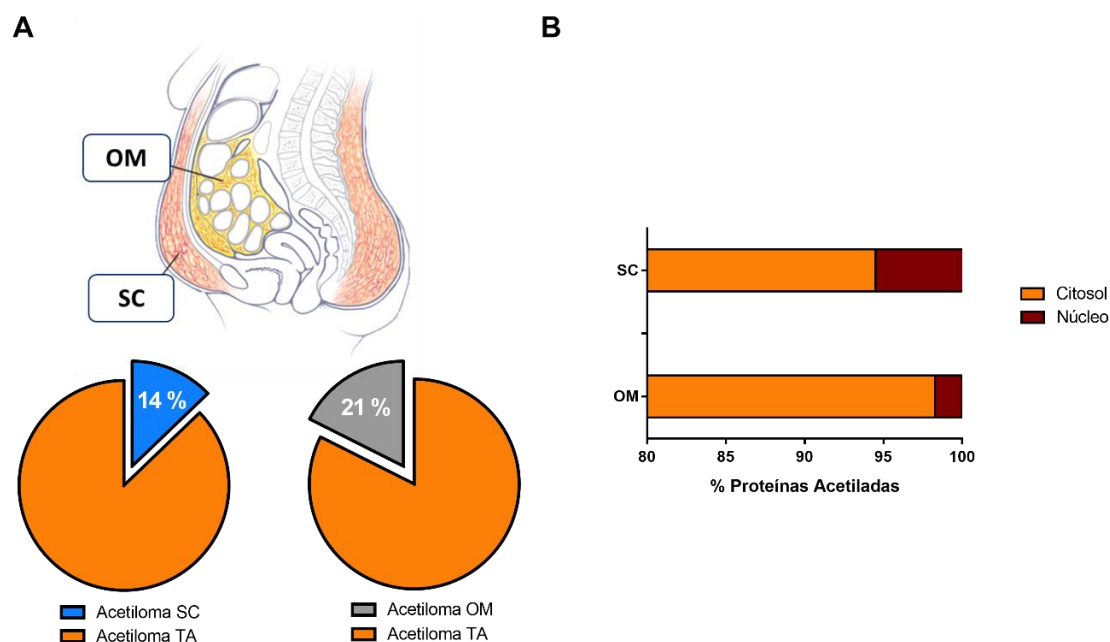


**Figura 25.** Análisis funcional de los procesos biológicos identificados mediante la base de datos ShinyGO (<http://bioinformatics.sdstate.edu/go/>). **A.** Árbol de agrupamiento jerárquico. **B.** Red del acetiloma del tejido adiposo humano utilizando la base de datos ShinyGO.

### 3. Diferencias específicas de depósito en el acetiloma del tejido adiposo humano

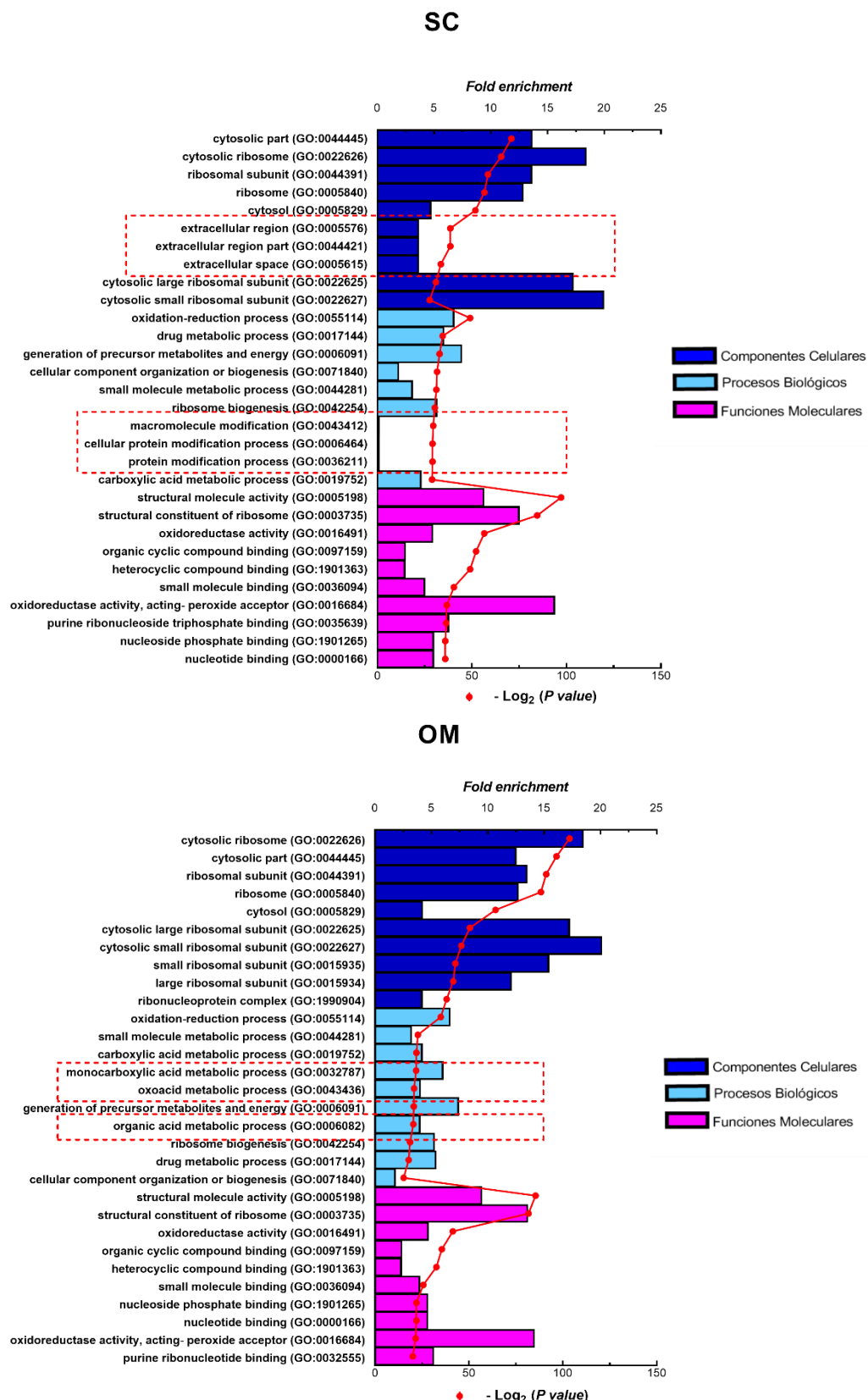
Para identificar posibles diferencias entre los dos principales depósitos de grasa blanca, SC y OM, se llevaron a cabo análisis adicionales del acetiloma identificado. Estos estudios demostraron que hay claras diferencias en el contenido y la naturaleza de las proteínas acetiladas detectadas entre el tejido adiposo SC y OM. En primer lugar, el depósito OM mostró mayor cantidad de proteínas acetiladas que el depósito SC (21%-OM vs. 14%-SC) (**Figura 26A**). Por otro lado, la localización celular de estas proteínas acetiladas también mostró diferencias ya que, si bien la mayoría son fundamentalmente citosólicas en ambos depósitos (98,3%-OM vs. 94,5%-SC), se detectó un aumento de proteínas acetiladas nucleares en el depósito SC vs. OM (5,6% y 1,7%, respectivamente) (**Figura 26B**).





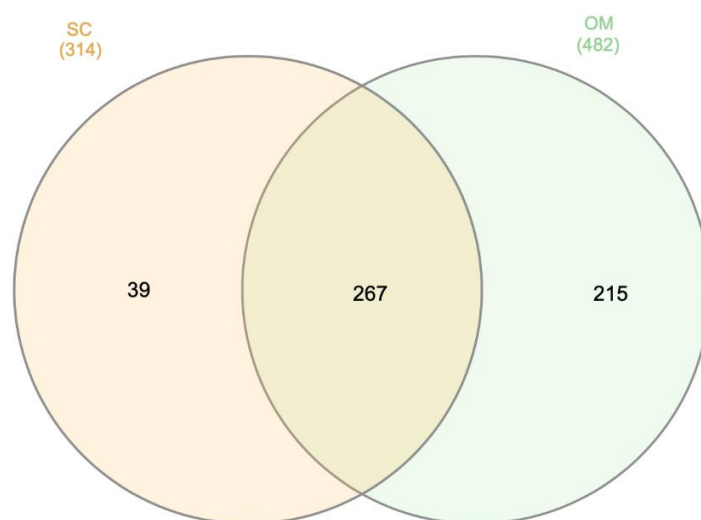
**Figura 26.** Distribución de las proteínas acetiladas en el tejido adiposo humano subcutáneo (SC) y omental (OM). **A.** Proporción de proteínas acetiladas globales identificadas en el depósito SC (en azul) y OM (en gris) respecto al proteoma total del tejido adiposo. **B.** Localización subcelular (porcentaje) de las proteínas acetiladas identificadas en el estudio proteómico en los dos depósitos grasos estudiados, SC y OM.

Los estudios posteriores funcionales de anotación GO PANTHER también mostraron diferencias entre los depósitos. Así, según el análisis de anotación por componentes celulares, las proteínas acetiladas identificadas en el depósito SC se asociaban principalmente a ribosomas, citosol y glicocálix, mientras que en el depósito OM, ribosomas y citosol son los compartimentos donde se localizan más proteínas acetiladas (**Figuras 27 SC y OM; barras azules**). El análisis de procesos biológicos mostró que las proteínas acetiladas identificadas en el depósito SC participan en procesos relacionados con las modificaciones de proteínas (cotraduccionales y postraduccionales) mientras que en el depósito OM, se observó una asociación con el metabolismo de los compuestos oxoácidos y ácidos monocarboxílicos (**Figura 27 SC y OM; barras cian**), grupos funcionales importantes en la mayoría de las biomoléculas (extremo C-terminal de las proteínas y lípidos). En cuanto a las funciones moleculares no se observaron diferencias entre los depósitos, siendo la actividad oxidorreductasa una de las principales funciones moleculares identificadas en ambos depósitos (**Figura 27 SC y OM; barras magenta**).



**Figura 27.** Análisis funcional de anotación GO PANTHER del acetiloma de SC y OM. Se analizaron los Componentes Celulares (azul) que forman las proteínas acetiladas, los Procesos Biológicos (cian) en los que están implicadas y las Funciones Moleculares (magenta) que realizan. En el eje X superior se representa el *Fold Enrichment* en relación a la base de datos *Homo Sapiens* mientras que en el eje X inferior se representa el *p valor* ajustado ( $-\text{Log}_2$ ) y en el eje Y aparece el top 10 más significativo de cada uno de los análisis realizados.

Por último, el análisis comparativo de las proteínas acetiladas en cada uno de los dos depósitos mostró un total de 314 y 482 proteínas en tejido adiposo SC y OM, respectivamente; de ellas, 267 proteínas eran comunes entre ambos depósitos, 39 proteínas eran específicas del tejido adiposo SC y 215 proteínas eran específicas del tejido adiposo OM (**Figura 28**). Todos estos datos evidencian que hay una amplia variedad de proteínas acetiladas propias de cada uno de los dos depósitos de grasa, siendo más abundantes las específicas del depósito OM.



**Figura 28.** Diagrama de Venn de las proteínas acetiladas, comunes y específicas de depósito, identificadas en el depósito subcutáneo (SC) y omental (OM) humano.

#### 4. La resistencia a insulina induce cambios en el acetiloma específicos de cada depósito, SC y OM, en obesidad

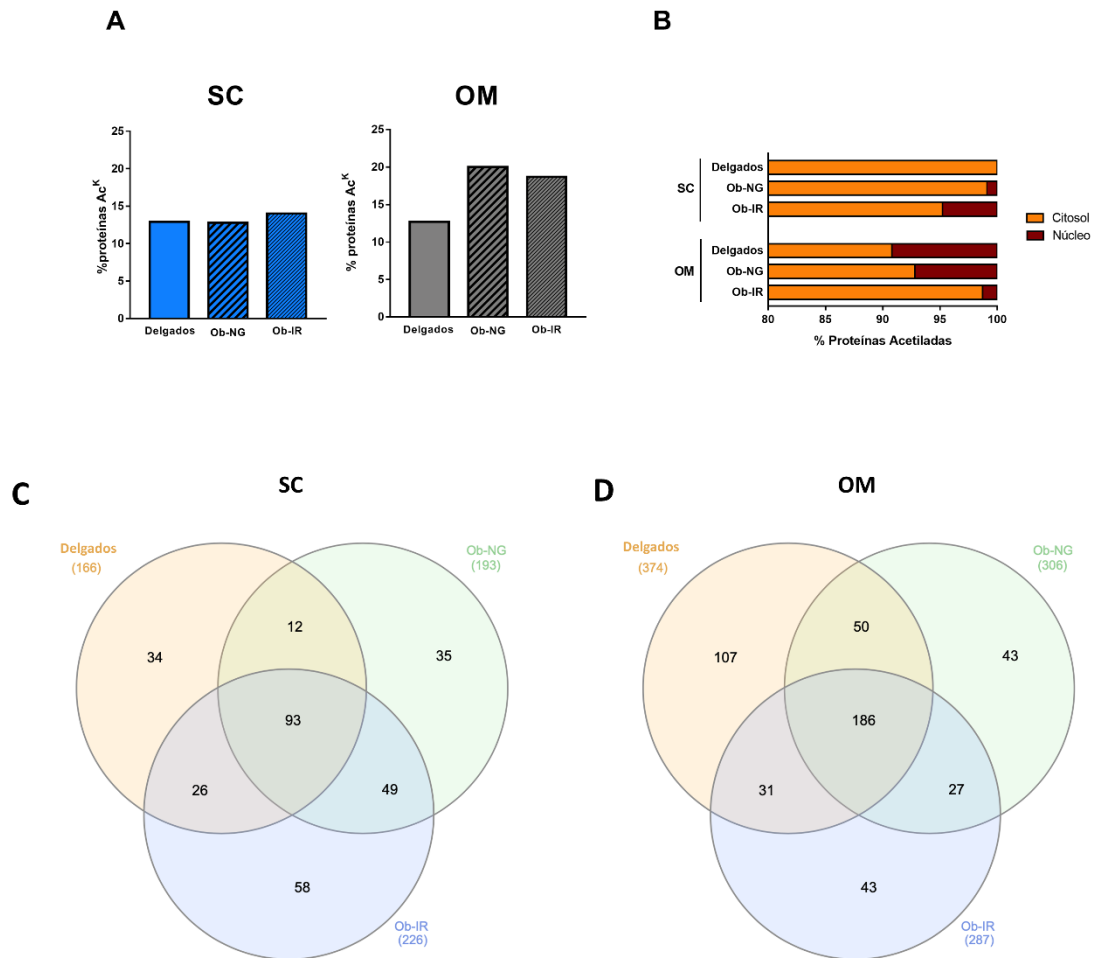
Para analizar el efecto de la resistencia a insulina durante la obesidad, los sujetos fueron subclasificados según sus características clínicas en individuos delgados (Delgados; IMC < 25; Glucosa < 100 mg/dL; HbA1c < 5,7%), sujetos con obesidad normoglucémicos (Ob-NG; IMC > 40; Glucosa < 100 mg/dL; HbA1c < 5,7%), y con obesidad resistentes a insulina (Ob-IR; IMC > 40; Glucosa = 100-125 mg/dL; HbA1c > 5,7%) (**Tabla 10**).

Así, en relación a la proporción de proteínas acetiladas con respecto al total de proteínas identificadas, no se observaron diferencias en el depósito SC entre individuos delgados (%) y Ob-NG (%). Sin embargo, los individuos Ob-IR mostraron un ligero aumento en la cantidad de proteínas acetiladas (1%) con respecto a los individuos delgados y los Ob-NG (**Figura 29A**). Por el contrario, se observó un incremento de proteínas acetiladas con respecto al total de proteínas identificadas en el depósito OM en individuos con obesidad vs. delgados (%), siendo mayor el número de proteínas acetiladas en Ob-NG que en Ob-IR (7% vs. 5%, respectivamente) (**Figura 29A**). Puesto que los cambios en el porcentaje de proteínas acetiladas no fueron muy elevados, nos planteamos analizar qué cantidad de proteínas acetiladas son comunes entre los grupos para comprender realmente la variación del acetiloma entre ellos.

Así, el análisis comparativo de proteínas acetiladas en cada uno de los grupos mostró un total de 93 proteínas acetiladas comunes en los 3 grupos de individuos (delgados, Ob-NG y Ob-IR) en el depósito SC y 186 comunes en el depósito OM (**Figura 29C-D**). Por otro lado, aunque los individuos delgados y Ob-NG no mostraron diferencias en el porcentaje de proteínas acetiladas con respecto al total de proteínas identificadas en el depósito SC, solo un total de 12 proteínas acetiladas eran comunes en ambos grupos, mientras que los Ob-IR presentaban un total de 58 proteínas acetiladas específicas (**Figura 29C**). En el caso del depósito OM, un total de 186 proteínas acetiladas eran comunes en los 3 grupos, encontrándose un mayor número de proteínas específicas en los individuos delgados (107 proteínas acetiladas) con respecto a las encontradas en individuos Ob-NG y Ob-IR (43 proteínas acetiladas) (**Figura 29D**). Todos estos datos evidencian que el acetiloma sufre modificaciones en condiciones de obesidad y resistencia a insulina en ambos depósitos, SC y OM. Por otro lado, la localización de las proteínas acetiladas fue mayoritaria en el citosol vs. núcleo en ambos depósitos (**Figura 28B**), siendo estos resultados similares a los mostrados anteriormente en el análisis global del acetiloma del tejido adiposo humano (**Figura 26B**).

No obstante, es interesante resaltar que se evidenció un cambio en el ratio citosol/núcleo entre los depósitos SC y OM en los distintos grupos experimentales de estudio (**Figura 29B**). Así, se observó que el número de proteínas acetiladas citosólicas

vs. nucleares disminuyó en el depósito SC durante el desarrollo de obesidad y resistencia a insulina (**Figura 29B, panel superior**). El depósito OM mostró el efecto contrario, incrementando el ratio de localización citosol/núcleo de las proteínas acetiladas identificadas en relación a la obesidad y la resistencia a insulina (**Figura 29B**).



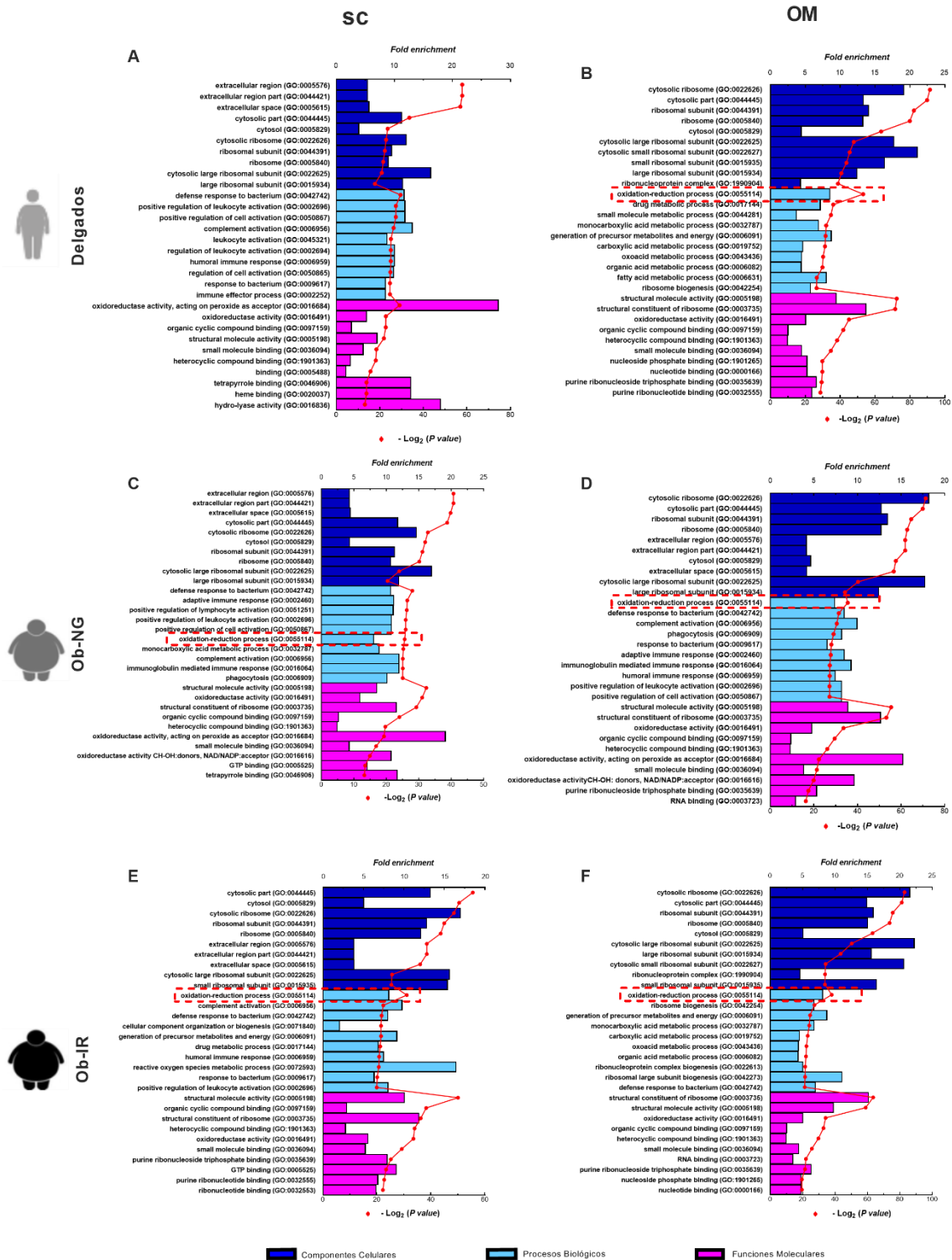
**Figura 29.** Efecto de la obesidad y la resistencia a insulina en el perfil de proteínas acetiladas en los depósitos subcutáneo (SC) y omental (OM) humanos. **A.** Distribución de las proteínas acetiladas (porcentaje) en individuos delgados, Ob-NG y Ob-IR en los depósitos SC y OM. **B.** Localización subcelular de proteínas acetiladas (porcentaje) en tejido adiposo SC y OM de individuos delgados, Ob-NG y Ob-IR. Diagramas de Venn de las proteínas acetiladas, comunes y específicas de depósito, identificadas en el tejido adiposo subcutáneo (SC) (**C**) y omental (OM) (**D**) de individuos delgados, sujetos con obesidad normoglucémicos (Ob-NG) y con obesidad y resistencia a insulina (Ob-IR).

Estos datos ponen en evidencia la importancia de describir, además de la acetilación de las proteínas como factor clave para poder comprender diferencias entre depósitos grasos del tejido adiposo, también su implicación en los procesos que se modifican durante el desarrollo de obesidad y resistencia a insulina. Por tanto, no solo es interesante ver qué proteínas se alteran en estas condiciones patológicas sino además analizar si dichas proteínas pueden sufrir una modificación postraducciona que module su función. De ahí que resulte fundamental describir el acetiloma del tejido adiposo humano en estos individuos.

Por último, se realizó el análisis funcional de anotación GO PANTHER de las proteínas acetiladas identificadas. Este análisis mostró que en el depósito OM de los individuos delgados y Ob-IR, las proteínas acetiladas se localizaban principalmente en ribosomas y citosol mientras que en el depósito SC, formaban parte de los ribosomas y citosol incluyendo también la región extracelular (**Figura 30A-B-E-F, barras azules**). Por otro lado, las proteínas acetiladas de los individuos Ob-NG se ubicaban en citosol, ribosomas y glicocálix en ambos depósitos (**Figura 30C-D, barras azules**). Estos resultados confirmaron las diferencias dependientes de depósito descritas previamente para el acetiloma del tejido adiposo humano global (**Figura 27**).

Así, tras la realización del análisis de los procesos biológicos, cabe destacar que el proceso de oxidación-reducción fue detectado en 5 de las 6 condiciones estudiadas (a excepción del depósito SC en individuos delgados) (**Figura 30B-F, barras cian**), lo que sugiere que la acetilación de las proteínas implicadas en este proceso en OM y, en menor medida, en SC, podría estar involucrada en el desarrollo de obesidad y resistencia a insulina.

En cuanto a las funciones moleculares, no se observaron diferencias entre los depósitos, siendo la actividad oxidorreductasa, que está asociada al proceso de óxido-reducción, como una de las principales funciones moleculares identificadas en todos los grupos (**Figura 30; barras magenta**).



**Figura 30.** Análisis funcional de anotación GO PANTHER del acetiloma de tejido adiposo SC y OM de individuos delgados, Ob-NG y Ob-IR. Se estudiaron los Componentes Celulares (azul) que forman las proteínas Kac, Procesos Biológicos (cian) en los que están implicadas y Funciones Moleculares (magenta) que realizan. En el eje X superior se representa el *Fold Enrichment* en relación a la base de datos *Homo Sapiens* mientras que en el eje X inferior se representa el *p* valor ajustado ( $-\log_2$ ) y en el eje Y aparece el top 10 más significativo de cada uno de los análisis realizados.

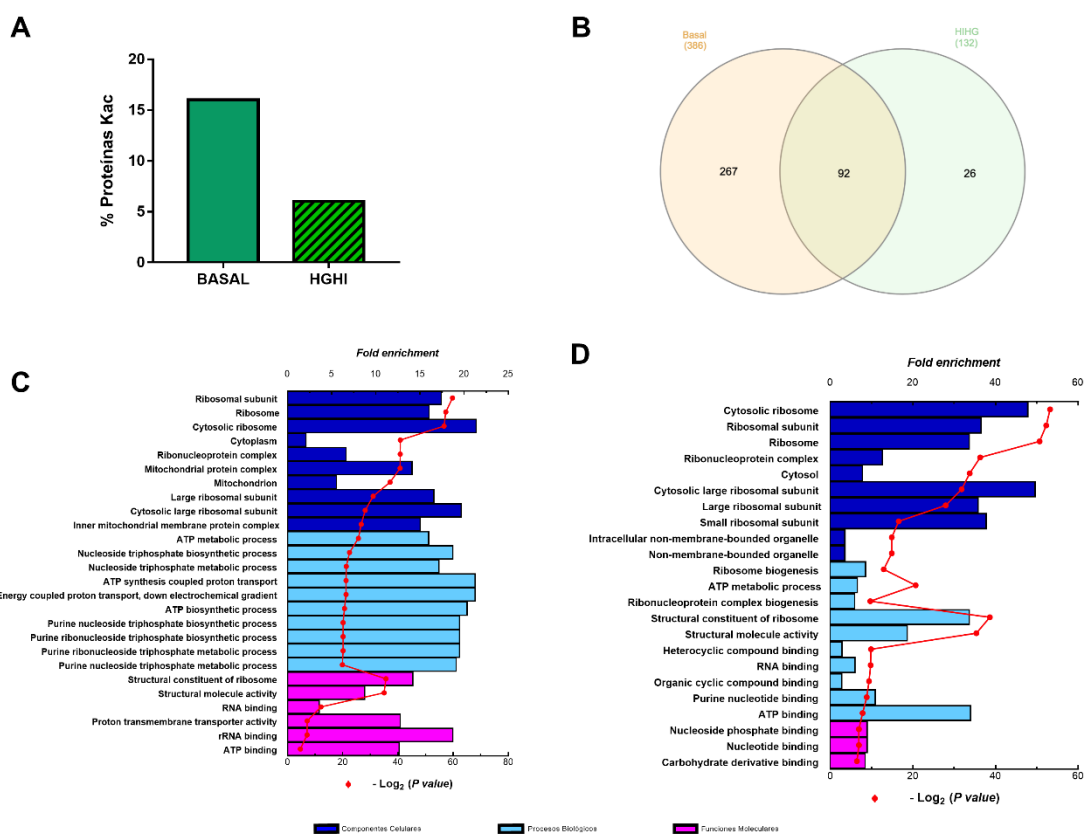
Con el fin de poder profundizar en el efecto que podría tener la resistencia a insulina sobre el proceso de acetilación/desacetilación en el tejido adiposo, se llevó a cabo un estudio proteómico para describir el acetiloma de adipocitos 3T3-L1 expuestos a elevadas concentraciones de glucosa e insulina (modelo HGHI), como modelo de la hiperglucemia/hiperinsulinemia que sufren los sujetos Ob-IR. Es importante destacar que estudios previos del grupo han demostrado que el tratamiento HGHI induce resistencia a insulina en los adipocitos (Díaz-Ruiz et al., 2015). Los datos proteómicos obtenidos en el estudio se depositaron en Mendeley Data y están disponibles a través del doi: 10.17632/w4zscr6n6s.1.

Tras el análisis HPLC-MS/MS realizado en el modelo *in vitro* de resistencia a insulina, se observó una disminución de las proteínas integradas en el acetiloma en las condiciones de HGHI frente a las condiciones basales (**Figura 31A**). Esta disminución se reflejó también en el estudio comparativo, donde se observó un menor número de proteínas acetiladas comunes (92) y específicas (26) de respuesta a HGHI, respecto al estado basal (267) (**Figura 31B**). Este cambio del número de proteínas acetiladas pone de manifiesto un claro efecto de la resistencia a insulina sobre la acetilación total de proteínas en los adipocitos 3T3-L1.

El análisis funcional de anotación GO PANTHER llevado a cabo con los datos proteómicos de este modelo *in vitro* mostró que en condiciones basales, las proteínas acetiladas se localizaban principalmente en ribosomas, citosol y mitocondrias mientras que en condiciones de hiperglucemia e hiperinsulinemia se ubicaban en citosol y ribosomas (**Figura 31C-D, barras azules**). La mayoría de las localizaciones celulares de las proteínas acetiladas de este modelo coinciden con las localizaciones de las proteínas acetiladas humanas (**Figura 30**). Por otro lado, los procesos biológicos donde participan las proteínas acetiladas identificadas en condiciones basales son procesos mitocondriales, como el transporte de protones acoplado a la síntesis de ATP o el proceso de síntesis de ATP, mientras que en condiciones de HGHI están implicadas en procesos implicados en la biogénesis de ribosomas y procesos metabólicos donde se requiere el uso de ATP (**Figura 31C-D, barras cian**). El proceso de oxidación-reducción detectado en 5 de las 6 condiciones humanas no fue detectado dentro de los procesos



biológicos de este modelo *in vitro*, lo que podría deberse a diferencias dependientes de especie (ratón vs. humano) (Figura 31C-D). Por el contrario, otros procesos biológicos como la biogénesis de ribosomas o la biogénesis del complejo ribonucleoproteico, identificado en Ob-IR vs. Ob-NG en tejido adiposo OM, también fueron detectados en adipocitos 3T3-L1 expuestos a condiciones de HGHI, lo que muestra un posible efecto de acción específico de la insulina en estos procesos (Figura 30D-F y Figura 31C-D). Por último, en cuanto a las funciones moleculares, se identificaron actividades relacionadas con la unión a ARN y, en concreto, del ARNr en las condiciones basales, y funciones de unión a nucleósidos y nucleótidos en condiciones de hiperglucemia/hiperinsulinemia. Las funciones moleculares de unión también fueron identificadas en los distintos grupos de pacientes (Figura 30).



**Figura 31.** Estudio del acetiloma en un modelo *in vitro* de resistencia a insulina en adipocitos 3T3-L1. **A.** Distribución de las proteínas acetiladas (%) en condiciones basales y tras la exposición a condiciones de HGHI. **B.** Diagrama de Venn donde se muestra el número de proteínas acetiladas identificadas comunes y específicas en condiciones basales HGHI. Análisis funcional de anotación GO PANTHER del acetiloma en un modelo *in vitro* de resistencia a insulina en condiciones basales (**C**) y en condiciones de HGHI (**D**), incluyendo los Componentes Celulares (azul) que forman las proteínas acetiladas, los Procesos Biológicos (cian) en los que están implicadas y las Funciones Moleculares (magenta) que realizan. En el eje X superior se

representa el *Fold Enrichment* en relación a la base de datos *Homo Sapiens* mientras que en el eje X inferior se representa el *p valor* ajustado ( $-\text{Log}_2$ ) y en el eje Y aparece el top 10 más significativo de cada uno de los análisis realizados.

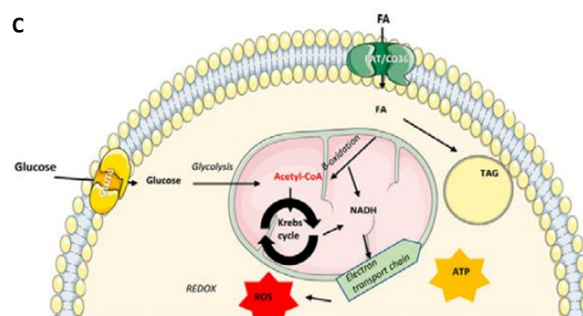
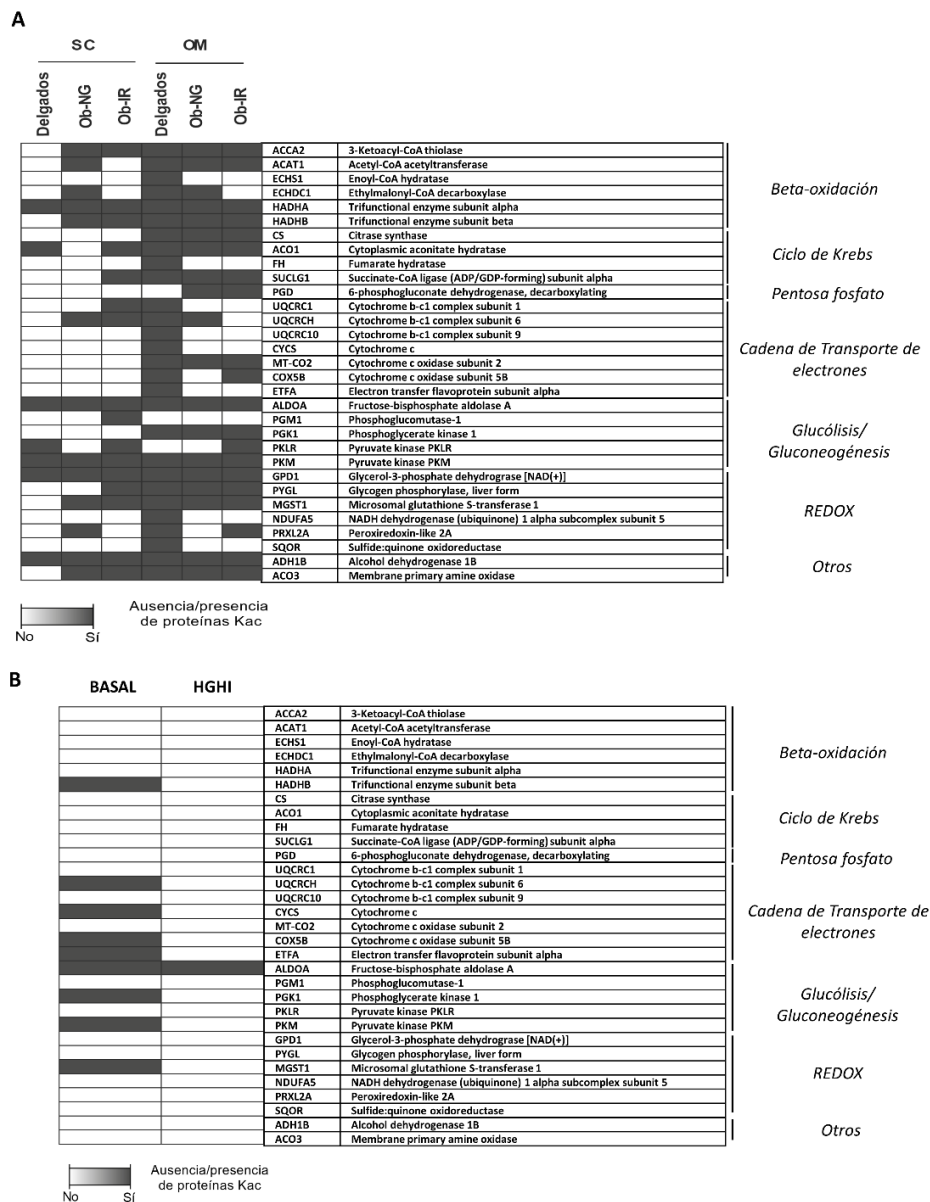
## 5. La acetilación modula procesos de oxidación-reducción en el tejido adiposo

Las proteínas acetiladas englobadas en el proceso de oxidación-reducción fueron subcategorizadas de acuerdo a los procesos biológicos específicos en los que participan (**Figura 32**), y analizadas en ambos depósitos, SC y OM, en los diferentes grupos de individuos estudiados (delgados, Ob-NG y Ob-IR) (**Figura 32A**). Adicionalmente, aunque el análisis funcional de anotaciones GO PANTHER no mostró el proceso de oxidación-reducción dentro de los principales procesos biológicos donde participaban las proteínas acetiladas identificadas en el modelo de resistencia a insulina, se analizó individualmente, en este modelo, el perfil de acetilación de las proteínas identificadas en humano en esta categoría (**Figura 32B**).

En primer lugar, se observó que las proteínas acetiladas en el tejido adiposo participaban principalmente en procesos metabólicos relacionados con ácidos grasos ( $\beta$ -oxidación de ácidos grasos, ciclo de Krebs y cadena de transporte de electrones), glucosa (glucólisis y gluconeogénesis) y con el estado redox (glutación y homeostasis celular redox) (**Figura 31A-C**). Gracias a esta subclasificación, se observó una desregulación en la acetilación de proteínas específicas dependiendo del estado de resistencia a insulina y del depósito de grasa en particular. Si bien algunas proteínas mantuvieron su perfil de acetilación independientemente del depósito de grasa (ACCA2-Ac<sup>K</sup>, HADHA-Ac<sup>K</sup>, HADHB-Ac<sup>K</sup>, ALDOA-Ac<sup>K</sup>, etc.), otras mostraron un perfil de acetilación opuesto dependiendo del depósito de tejido adiposo considerado (PRXL2A-Ac<sup>K</sup> solo se detectó en Ob-NG-SC y Ob-IR-OM, por ejemplo). Por otra parte, varias proteínas mostraron diferentes patrones de acetilación en función del estado de resistencia a insulina (ECHDC1-Ac<sup>K</sup> se identificó en pacientes Ob-NG mientras que PKLR-Ac<sup>K</sup> estaba presente en condiciones de obesidad y resistencia a insulina –Ob-IR–) (**Figura 32A**).

Por último, la proteína ALDOA mostró una acetilación continua en todas las condiciones estudiadas, tanto en humanos, SC y OM, como en el modelo *in vitro* de resistencia a insulina, lo que sugiere que la acetilación de esta proteína es relevante para el correcto funcionamiento de la misma (**Figura 11B**).

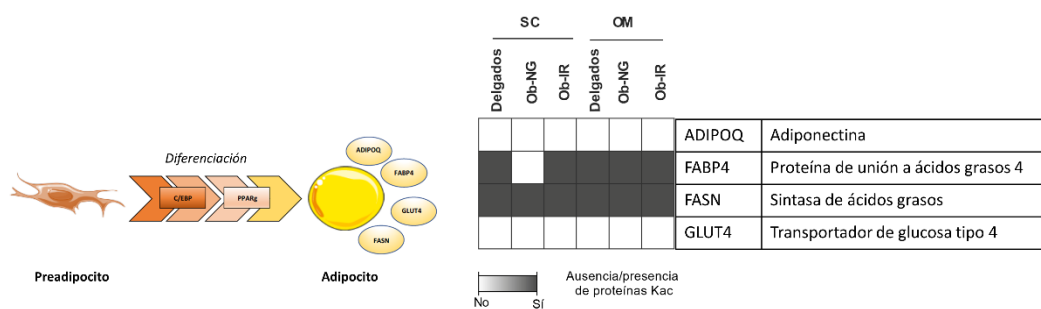
Todos estos datos evidencian una compleja y global desregulación de la acetilación de proteínas que conforman el proteoma del tejido adiposo en condiciones de enfermedad metabólica. Sin embargo, el efecto de la resistencia a insulina sobre la acetilación de proteínas podría ser más evidente que el de la obesidad *per se*. Esta observación se ha visto replicada en el modelo HGHI, en el que observamos una fuerte disminución de proteínas acetiladas en el desarrollo de resistencia a insulina en adipocitos 3T3-L1. Por ello, todos estos resultados ponen en evidencia la importancia de las modificaciones postraduccionales, en concreto, de la acetilación, en el correcto funcionamiento celular.



**Figura 32.** Proteínas acetiladas identificadas e incluidas en los procesos de oxidación-reducción del análisis funcional GO PANTHER Procesos Biológicos. **A.** Proteínas acetiladas identificadas en el tejido adiposo humano subcutáneo (SC) y omental (OM) en individuos delgados, Ob-NG y Ob-IR e incluidas en el grupo de procesos de oxidación-reducción del análisis funcional GO PANTHER Procesos Biológicos. **B.** Proteínas acetiladas identificadas en el modelo *in vitro* de resistencia a insulina incluidas en el grupo de procesos de oxidación-reducción del análisis funcional GO PANTHER Procesos Biológicos. **C.** Esquema de los procesos biológicos incluidos dentro de los procesos de oxidación-reducción. Imagen creada con elementos del repositorio SMART (Servier Medical Art).

## 6. Papel de la acetilación en la diferenciación de los adipocitos

Estudios previos llevados a cabo en adipocitos 3T3-L1 demostraron la importancia de la acetilación en el proceso de adipogénesis (Xu et al., 2013). Sin embargo, aún no hay evidencias disponibles de la importancia de la acetilación en el proceso de adipogénesis. Por ello, en este trabajo, se realizaron estudios adicionales para analizar el impacto de la acetilación en la adipogénesis como moduladora de la distribución y remodelación saludable del tejido adiposo en obesidad. Concretamente, se analizaron marcadores específicos de adipogénesis como la adiponectina, FASN, FABP4 y GLUT4 en el acetiloma de ambos depósitos. Entre todos ellos, solo FABP4 mostró diferencias en el número de péptidos acetilados identificados en el análisis proteómico (**Figura 33**).

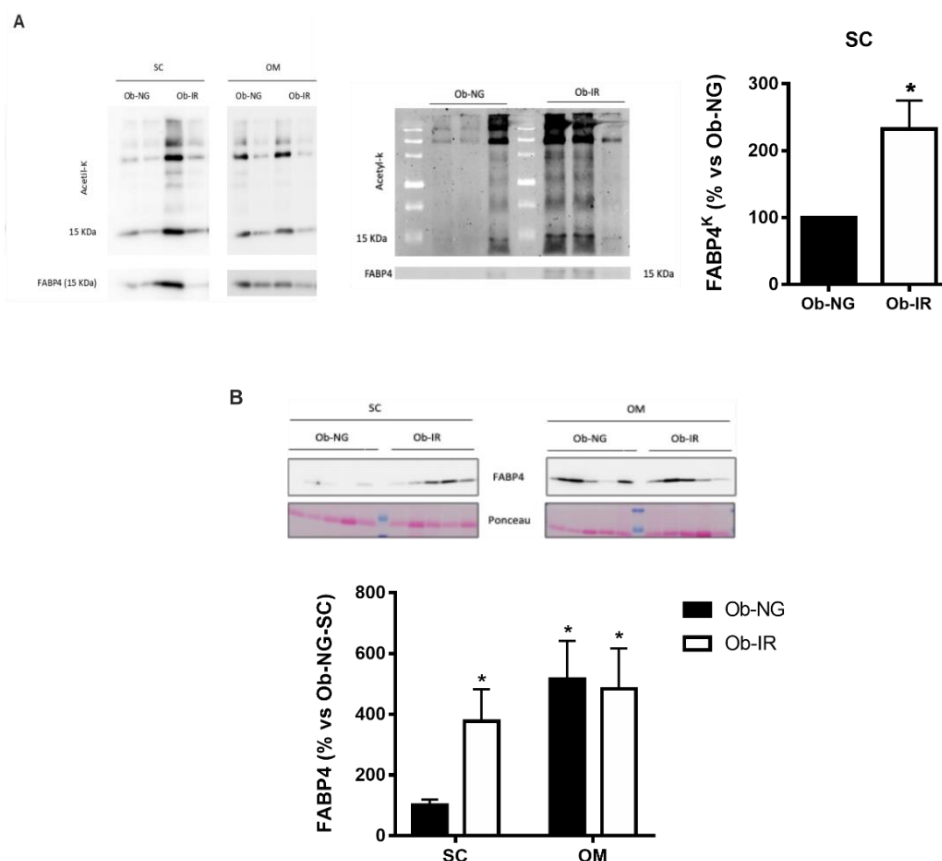


**Figura 33.** Proteínas acetiladas que intervienen en el proceso de adipogénesis y que fueron identificadas en el proteoma de tejido adiposo humano subcutáneo (SC) y omental (OM) de individuos delgados (Delgados), pacientes con obesidad normoglucémicos (Ob-NG) y pacientes con obesidad y resistentes a insulina (Ob-IR). Imagen izquierda creada con elementos del repositorio SMART (Servier Medical Art).

En concreto, no se detectaron péptidos acetilados de FABP4 en el depósito SC de pacientes Ob-NG con respecto al mismo depósito en pacientes Ob-IR. En el caso del depósito OM, no se observaron diferencias entre los grupos estudiados (**Figura 33**). Estos datos fueron validados en muestras adicionales de tejido adiposo humano mediante inmunoprecipitación de FABP4 y posterior detección de la proteína y determinación de su grado de acetilación por *Western Blot* (**Figura 34**).

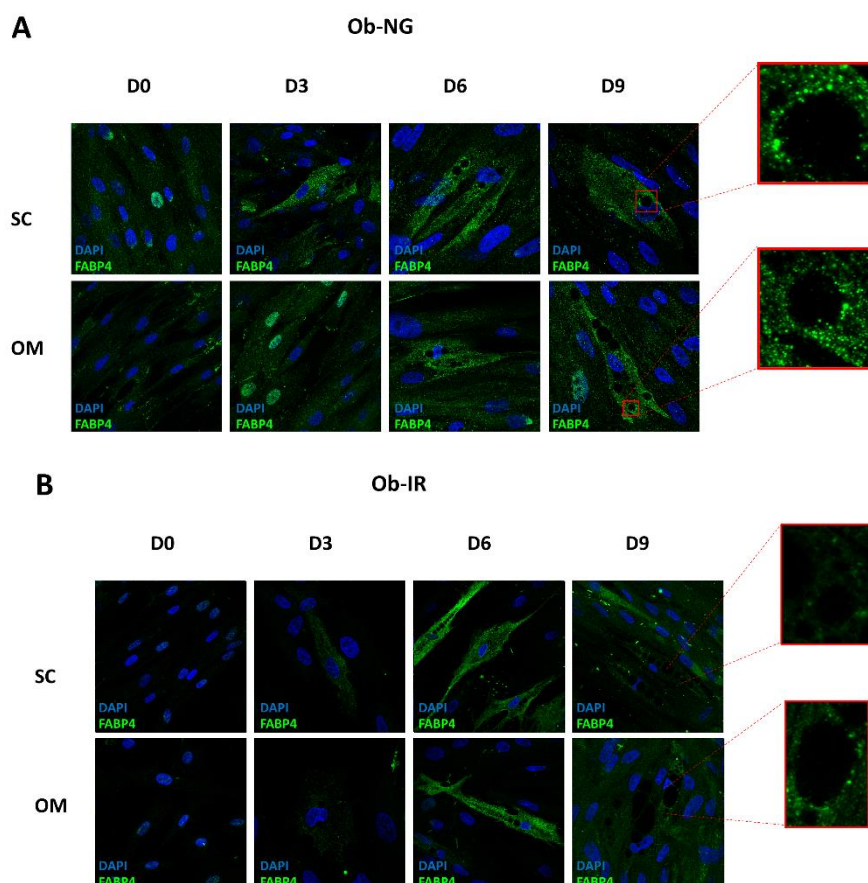
Los resultados mostraron niveles más altos de FABP4-Ac<sup>K</sup> en pacientes Ob-IR vs. Ob-NG en el depósito SC. Por el contrario, no se observaron diferencias en el contenido de FABP4-Ac<sup>K</sup> en el depósito OM mediante el análisis de inmunoprecipitación (**Figura**

**34A).** Además, también se midió el contenido total de proteína FABP4 en estos pacientes, obteniendo resultados similares: mayores niveles de FABP4 en Ob-IR con respecto a Ob-NG en el depósito SC (**Figura 34B**). Por otro lado y, de acuerdo con los datos de acetilación, no se detectaron diferencias significativas en la expresión de FABP4 total entre los grupos de estudio en el depósito OM (**Figura 34B**).



**Figura 34.** Niveles de expresión de FABP4 total y FABP4-Ac<sup>K</sup> en el tejido adiposo SC y OM. **A.** Bandas inmunorreactivas de acetilación de proteínas en residuos de lisina y niveles de expresión de proteína FABP4 en extractos proteicos de tejido adiposo subcutáneo (SC) y omental (OM) humano (panel izquierdo, Ac<sup>K</sup> en SC y OM) de sujetos con obesidad normoglucémicos (Ob-NG) y pacientes con obesidad y resistencia a insulina (Ob-IR), bandas inmunorreactivas de acetilación de proteínas en residuos de lisina y niveles de expresión de proteína FABP4 en extractos proteicos de tejido adiposo subcutáneo (SC) (panel central, Ac<sup>K</sup> en SC) de sujetos con obesidad normoglucémicos (Ob-NG) y pacientes con obesidad y resistencia a insulina (Ob-IR) y análisis de las bandas inmunorreactivas de FABP4 acetilada en residuos de lisina del depósito SC (panel derecho) normalizada mediante tinción de Ponceau. Los datos están representados como la media  $\pm$  SEM (n = 5 individuos). Las diferencias significativas están indicadas como \*p < 0,05 vs. Ob-NG SC. **B.** Bandas inmunorreactivas de los niveles de expresión proteica de FABP4 en extractos proteicos de tejido adiposo SC y OM humano (panel izquierdo, Ac<sup>K</sup> en SC y OM) de sujetos con obesidad normoglucémicos (Ob-NG) y pacientes con obesidad y resistencia a insulina (Ob-IR) y análisis de las bandas inmunorreactivas de FABP4 acetilada en residuos de lisina del depósito SC (panel derecho) normalizada mediante tinción de Ponceau. Los datos están representados como la media  $\pm$  SEM (n = 5 individuos/grupo). Las diferencias significativas están indicadas como \*p < 0,05 vs. Ob-NG SC.

La localización de FABP4 es clave para el desarrollo de sus funciones celulares ya que puede participar como una chaperona intracelular (citosol) de ácidos grasos de cadena larga o actuar como ligando dependiente para la activación de PPAR $\gamma$  a través del tráfico de ácidos grasos de cadena larga (como oleato) al núcleo promoviendo de esta manera la expresión de genes relacionados con la maduración de los adipocitos (Siebert et al., 2016). Por ello, a continuación, se analizó la localización intracelular de FABP4 en adipocitos primarios humanos en condiciones Ob-NG y Ob-IR durante adipogénesis. Como se muestra en la **Figura 35**, FABP4 mostró cambios en su localización entre los depósitos SC y OM, en los estadios tempranos del proceso de diferenciación en Ob-NG y Ob-IR. En el depósito SC, FABP4 se localizó principalmente en el núcleo de los preadipocitos (D0) mientras que su localización pasó a ser fundamentalmente citosólica a medida que avanzaba la diferenciación (D3-D9). En el depósito OM la localización de FABP4 se observó, con claridad, en preadipocitos (D3) en el núcleo, y su localización en citosol ocurrió principalmente a partir de D6 (**Figura 35A**). En condiciones Ob-IR, la localización nuclear de FABP4 fue tenue a D0 de diferenciación, observándose en el citosol a partir del D3 en ambos depósitos, SC y OM (**Figura 35B**). Los cambios en la localización de FABP4 entre los dos tipos de pacientes indican que existe una desregulación de la proteína en condiciones de resistencia a insulina afectando, posiblemente, a su función como moduladora de la diferenciación adipocitaria.

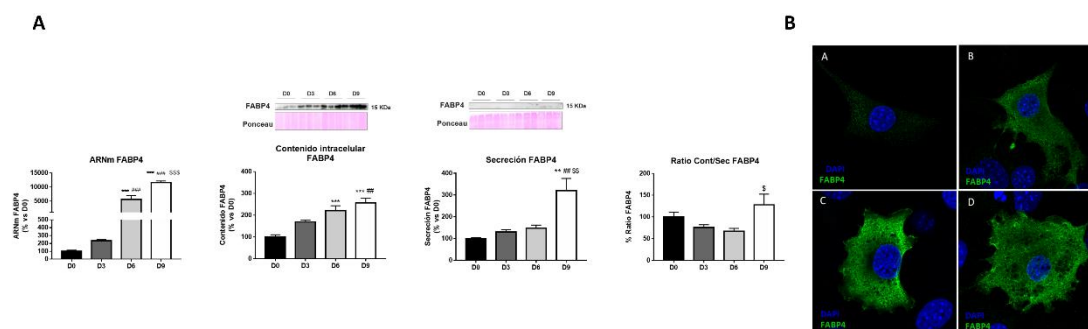


**Figura 35.** Imágenes confocales representativas de adipocitos primarios humanos del depósito subcutáneo (SC) y omental (OM) de un paciente con obesidad y normoglucemia (Ob-NG) **(A)** y un paciente con obesidad y resistencia a insulina (Ob-IR) **(B)**. Se observa la señal de FABP4 endógena (verde) y DAPI (núcleo, azul) durante el proceso de diferenciación (D0-D9).

Con el fin de poder extender nuestro conocimiento sobre los cambios observados en FABP4 en células humanas, se llevó a cabo la caracterización de FABP4 en adipocitos 3T3-L1. Observamos que los niveles de expresión génica y proteica intracelular de FABP4 aumentaron durante la diferenciación de los adipocitos 3T3-L1, exhibiendo niveles máximos en adipocitos maduros (D9) **(Figura 36)**. Además, se analizó la cantidad de FABP4 en el medio extracelular, como una medida de secreción, siendo significativamente mayor en los adipocitos maduros (D9) con respecto a estadios anteriores de la diferenciación **(Figura 36A)**.

Con relación a la localización de la proteína, FABP4 se localizó predominantemente en el citosol de los adipocitos 3T3-L1 a lo largo de la adipogénesis **(Figura 36B)**. En este caso, no se observó el cambio de localización núcleo-citosol como se observaba en los adipocitos humanos.





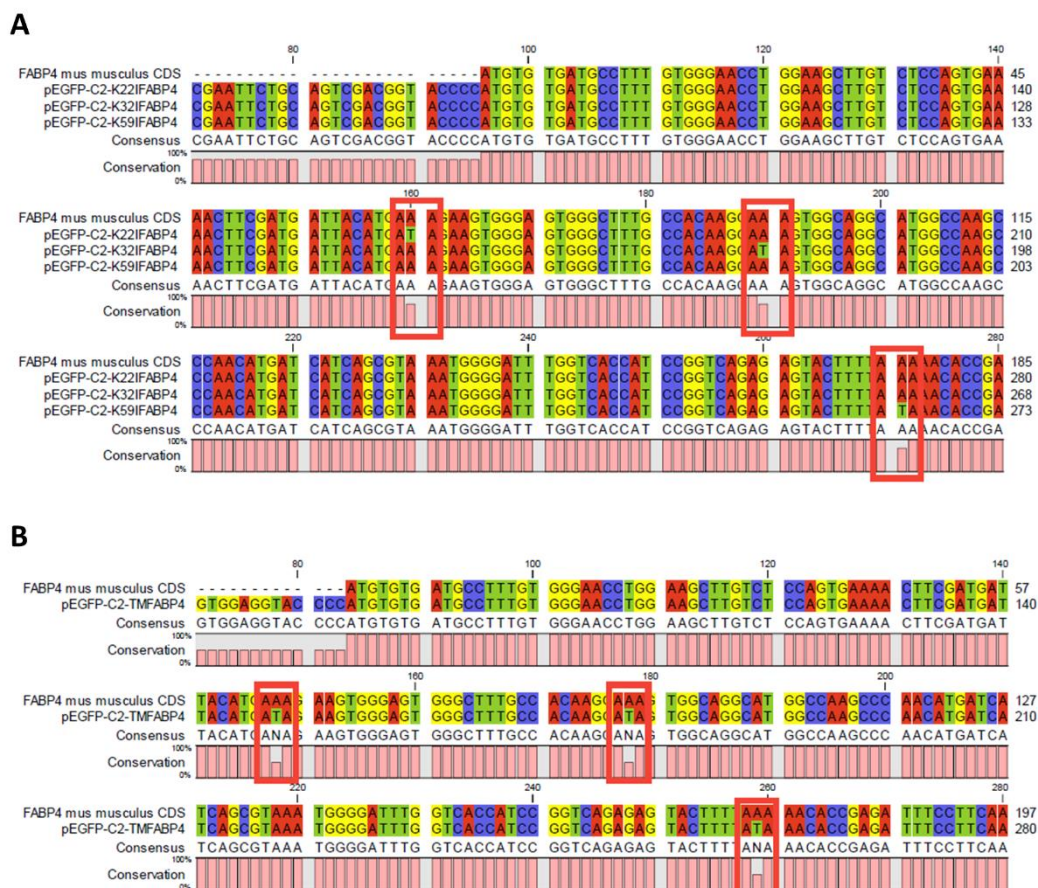
**Figura 36.** Caracterización de FABP4 en adipocitos 3T3-L1 durante adipogénesis. **A.** Expresión de ARNm y niveles de proteína (bandas inmunorreactivas) de FABP4 en extractos de células 3T3-L1 durante la adipogénesis (D0-D9). Para la cuantificación, los niveles de proteína fueron normalizados utilizando la tinción Ponceau. Los datos están representados como la media  $\pm$  SEM ( $n = 3$  réplicas/día de diferenciación). Las diferencias significativas están indicadas como  $**p < 0,01$ ,  $***p < 0,001$  vs. D0;  $\#p < 0,05$ ,  $\#\#p < 0,01$ ,  $\#\#\#p < 0,001$  vs. D3;  $\$p < 0,01$ ,  $\$\$\$p < 0,001$  vs. D6. **B.** Imágenes de microscopía confocal representativas de adipocitos 3T3-L1 marcados para la detección de FABP4 (verde) y DAPI (núcleo, azul) durante el proceso de diferenciación (D0-D9).

Atendiendo a las ventajas proporcionadas por las líneas celulares, en cuanto a la mayor facilidad de obtención de cultivos y homogeneidad, dado que las células humanas disponibles además proceden de individuos con obesidad mórbida, decidimos profundizar en el estudio de caracterización de FABP4 en células 3T3-L1.

## 7. Efecto de la acetilación sobre las funciones de FABP4 en los adipocitos

Para dilucidar el posible papel que juega la acetilación en las funciones de FABP4 en adipocitos, se llevó a cabo un estudio de mutagénesis dirigida sobre lisinas específicas de la proteína. A partir de una búsqueda *in silico* de las distintas lisinas que forman la secuencia de FABP4 y utilizando la base de datos PhosphoSite (<http://www.phosphosite.org>), se concluyó que las lisinas en posiciones 22, 32 y 59 podrían ser objeto de acetilación en condiciones fisiológicas, ya que se encuentran en zonas de la proteína fácilmente accesibles para las enzimas encargadas de la acetilación. Así, se sustituyeron estos tres residuos de lisina susceptibles de acetilarse por tres residuos de isoleucina, dada la similitud espacial e igual polaridad de ambos aminoácidos, además de por la incapacidad de reconocimiento de la isoleucina por las enzimas acetilasas/desacetilasas. Concretamente, se generó, mediante mutagénesis dirigida, la forma triple mutante de FABP4 (K22I, K32I y K59I) así como formas mutadas

individuales para cada una de las posiciones: K22I-FABP4, K32I-FABP4 y K59I-FABP4. En la **Figura 37** se muestra el alineamiento de la secuencia de las construcciones, FABP4 silvestre (*wild type*, WT) y formas mutadas, con las lisinas específicas mutadas marcadas en rojo [A→T; Lys (AAA) → Ile (ATA)].

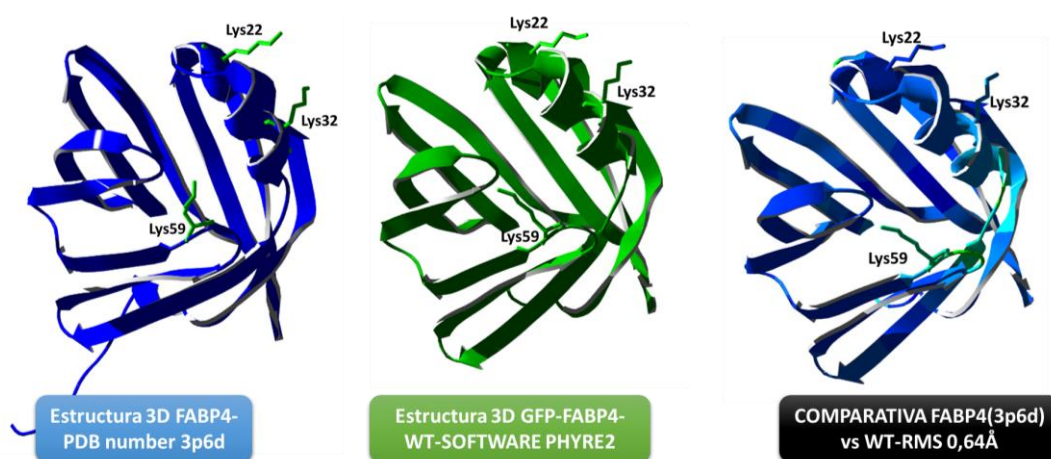


**Figura 37.** Alineamiento de las secuencias de las proteínas FABP4 investigadas en el estudio. **A.** Alineamiento de la secuencia de FABP4 silvestre (CDS *Mus musculus*, NCBI, EE.UU.) con los 3 mutantes simples: *pEGFP-C2-K22IFABP4*, *pEGFP-C2-K32IFABP4* y *pEGFP-C2-K59IFABP4*. **B.** Alineamiento de la secuencia de FABP4 silvestre (CDS *Mus musculus*, NCBI, EE.UU.) con el triple mutante *pEGFP-C2-TMFABP4*.

A continuación, se realizó un análisis *in silico* de la estructura de la proteína sin mutar, WT, y la proteína mutada en las 3 regiones elegidas (triple mutante, TM), para evaluar si la sustitución de las lisinas por isoleucinas provocaba cambios en la estructura 3D de la proteína que pudieran afectar a su función (**Figura 37**). Para ello, se utilizó el *software* de predicción de estructuras de proteínas Phyre2 que utiliza métodos avanzados de detección de homología para construir modelos 3D y analizar variantes de

aminoácidos en una secuencia proteica. Actualmente, Phyre2 se ha convertido en uno de los servidores de predicción de estructuras de proteínas más utilizados debido a su facilidad de uso y la precisión de sus predicciones (Kelley et al., 2015).

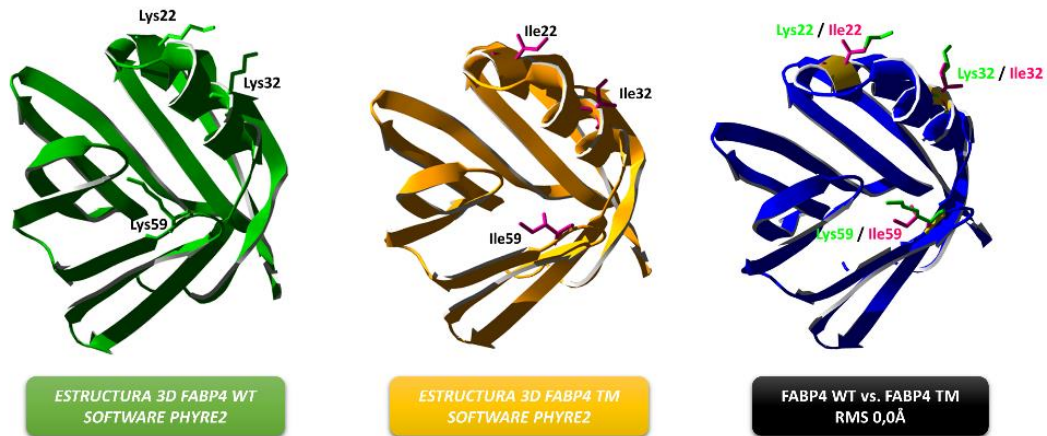
Así, por medio del *software* Phyre2 se realizó un modelado *in silico* de la construcción GFP-FABP4-WT utilizada a lo largo de esta Tesis Doctoral, con el objetivo de comparar el resultado con la estructura cristalizada almacenada en la base de datos PDB (Protein Data Bank). Una vez obtenida la estructura tridimensional de la versión WT mediante Phyre2, se comparó con la estructura recogida en PDB (PDB number FABP4: 3P6D) a través del *software* Swiss PDB Viewer. Estos estudios demostraron que la estructura predicha y la almacenada en la base de datos son prácticamente iguales, con un valor de RMS de 0,64 ángstroms (**Figura 38**).



**Figura 38.** Estructura tridimensional de FABP4 WT registrada en PDB, la obtenida mediante el software Phyre2 y su estudio comparativo. Estructura tridimensional (3D) de FABP4 de ratón (PDB) que muestra la distribución de Lys22, Lys32 y Lys59 en la proteína nativa (**WT, estructura azul**). Estructura tridimensional de FABP4 de ratón (*Software* Phyre2), que muestra la distribución de Lys22, Lys32 y Lys59 en la proteína WT (**WT, estructura verde**). En gama de tonos fríos se muestra la comparativa de la estructura tridimensional de FABP4 nativa.

Una vez confirmado que el *software* Phyre2 es válido y fiable para el modelado tridimensional de proteínas, se llevó a cabo el modelado de la construcción FABP4-TM (en amarillo), que contiene las tres mutaciones de interés respecto al modelo silvestre (GFP-FABP4-WT; en verde). El resultado de la interacción (azul) mostró una superposición en toda la estructura salvo en los 3 residuos aminoácidos que son distintos entre las dos proteínas (K22, K32 y K59 vs. I22, I32 y I59), con un valor de RMS de 0,0 ángstroms. Estos resultados demostraron que la forma silvestre (GFP-FABP4-WT)

y la forma mutante (GFP-FABP4-TM) de FABP4 presentan una estructura tridimensional idéntica y que, por tanto, la triple mutación introducida modifica la capacidad de acetilación en la proteína sin provocar cambios en su estructura 3D (**Figura 39**).



**Figura 39.** Estructura tridimensional de FABP4 WT y TM obtenida mediante el *software* Phyre2 y su estudio comparativo. Estructura tridimensional (3D) de FABP4 de ratón que muestra la distribución de Lys22, Lys32 y Lys59 en la proteína nativa (**WT, estructura verde**). Estructura tridimensional de FABP4 de ratón que muestra la distribución de Ile22, Ile32 e Ile59 en la proteína mutada (**TM, estructura amarilla**). En gama de tonos fríos se muestra la comparativa de la estructura tridimensional de FABP4 nativa.

Confirmada la conservación de la estructura tridimensional en la versión mutada de FABP4, y con el fin de validar el uso de las herramientas moleculares generadas, se analizó la eficacia de transfección de los dos plásmidos que codifican a cada una de las proteínas estudiadas en células 3T3-L1. Observamos que, tras la transfección, los niveles de ARNm de ambas construcciones eran comparables, lo que validaba el comportamiento similar de ambos plásmidos en cuanto a eficiencia de transcripción (**Figura 40A**). Estos resultados, junto con el mantenimiento de la estructura tridimensional en la versión mutada de FABP4, aseguraban que los cambios observados en los estudios posteriores se pudieran asignar a los cambios en el grado de acetilación de cada proteína.

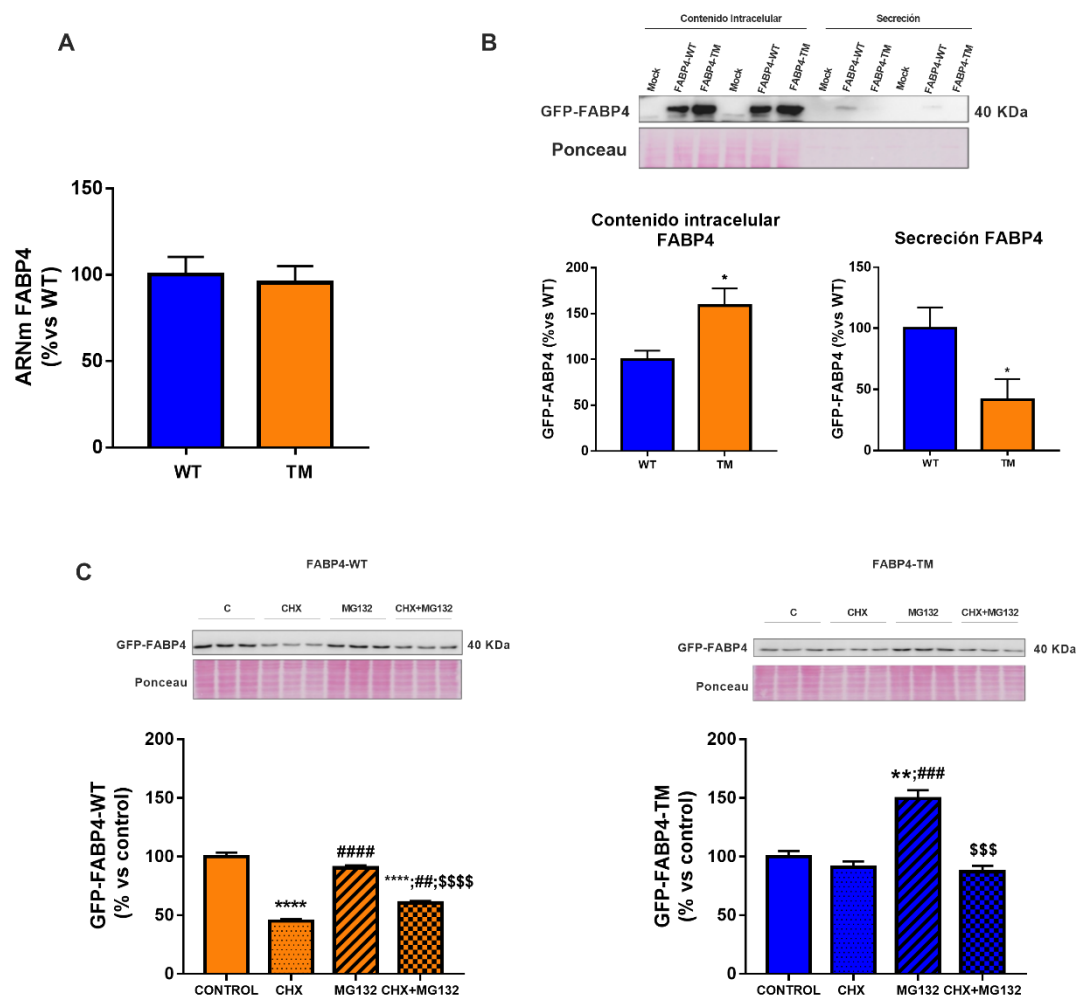
Así, a continuación, se midieron los niveles de proteína GFP-FABP4 (intracelular y extracelular) en adipocitos 3T3-L1 transfectados con las formas de FABP4 WT y TM. Los datos indicaron que la forma mutada, TM, mostraba una mayor acumulación intracelular y una reducción de su liberación extracelular en comparación con la

construcción WT (**Figura 40B**). Estos datos sugieren que la acetilación podría ser fundamental para la secreción de FABP4 al medio extracelular.

Por otro lado, también se realizó un ensayo de degradación de proteínas con el fin de analizar el efecto de la acetilación sobre la vida media de FABP4 ya que se ha descrito que esta proteína que puede sufrir varias MPTs como acetilación y ubiquitinación (<http://www.phosphosite.org>). Así, adipocitos transfectados con el vector WT fueron expuestos a cicloheximida (CHX), un inhibidor de la síntesis de proteínas. Como se observa en la **Figura 40C**, el tratamiento con CHX redujo los niveles de FABP4 WT, lo que se podría asociar a la detención de su síntesis y a la degradación concomitante de la proteína preexistente. Sin embargo, cuando los adipocitos transfectados con la proteína WT se expusieron al inhibidor del proteasoma, MG132, no se detectaron cambios en el contenido de la proteína en los adipocitos, lo que indicaría que la disminución observada en condiciones basales podría estar relacionada con el aumento de la liberación de FABP4 al medio extracelular y/o a la degradación a través de una vía alternativa al proteasoma (**Figura 40C**). Finalmente, la combinación del tratamiento CHX + MG132 indujo una disminución en el contenido de FABP4 (**Figura 40C**), igual a lo observado tras la exposición a CHX.

Por su parte, en adipocitos transfectados con la forma TM de FABP4 no se detectaron diferencias después del tratamiento con CHX (**Figura 40C**). Sin embargo, se observó un incremento del contenido de FABP4 tras la incubación con MG132, lo que sugiere que la degradación de la forma mutada de FABP4 ocurre a través del proteasoma (**Figura 39C**). Estos datos sugieren la acumulación de la forma mutada en el citosol y su menor secreción al medio extracelular, lo que está de acuerdo con los resultados previos obtenidos mediante *Western Blot* (**Figura 39B**). En esta línea, la combinación de CHX + MG132 no tuvo efecto sobre el contenido de FABP4 TM (**Figura 40C**).

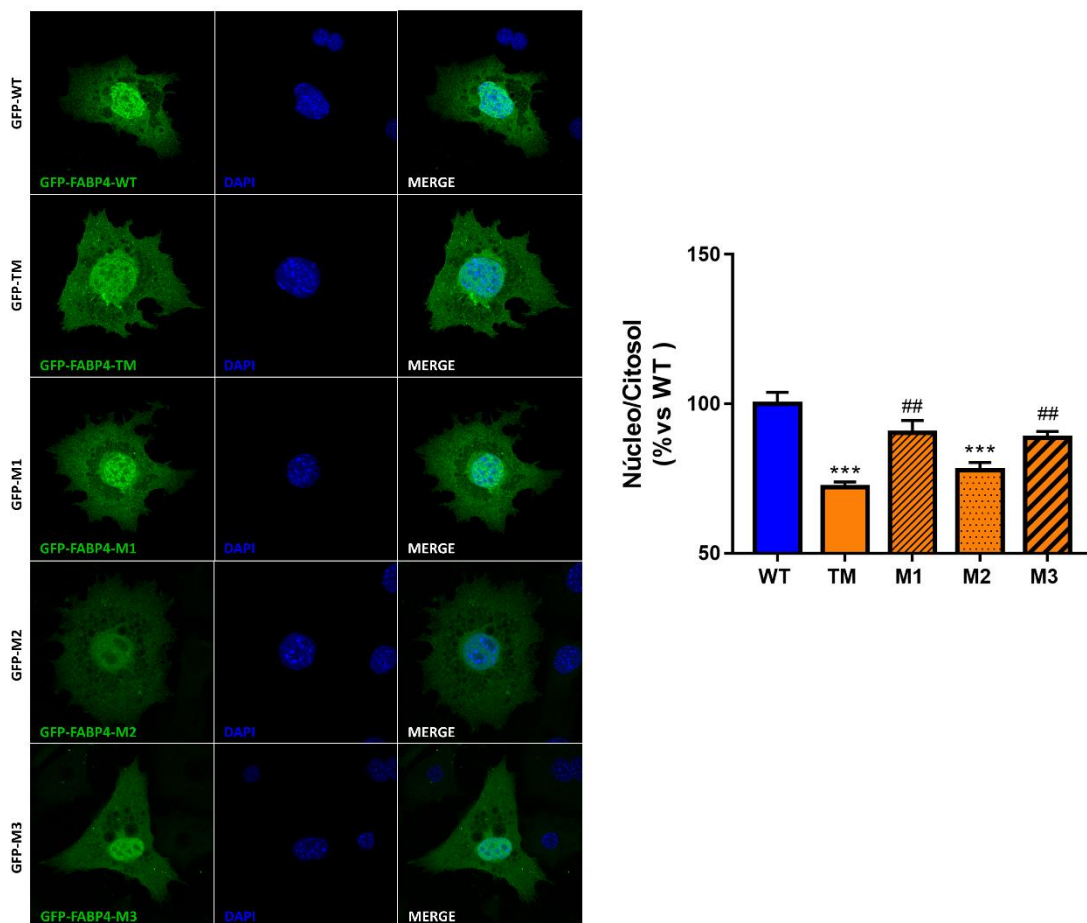




**Figura 40.** Análisis de los niveles de expresión génica y proteica de FABP4 en adipocitos 3T3-L1 transfectados con las formas WT y TM. **A.** Expresión de ARNm de FABP4 en adipocitos 3T3-L1 transfectados con los vectores GFP-FABP4-WT (WT) o GFP-FABP4-TM (TM). **B.** Bandas inmunorreactivas en extractos proteicos (intracelulares) y sobrenadantes (extracelulares) de cultivos de células 3T3-L1 transfectadas con los vectores de expresión para FABP4 WT y TM. Para la cuantificación, los niveles de proteína se normalizaron respecto a la tinción de Ponceau. Los datos están representados como la media  $\pm$  SEM (3-4 repeticiones/grupo). Las diferencias significativas están indicadas como \* $p < 0,05$  vs. WT. **C.** Bandas inmunorreactivas en extractos proteicos de adipocitos 3T3-L1 transfectados con los vectores WT o TM y tratados con cicloheximida (CHX) y/o el inhibidor del proteasoma, MG132, durante 30 horas. La condición control (C) se llevó a cabo manteniendo los adipocitos 3T3-L1 transfectados con las formas WT o TM en medio de cultivo solo durante 30 h. Los datos están representados como la media  $\pm$  SEM (3 repeticiones/condición en cada grupo). Las diferencias significativas están indicadas como \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  frente al control; ### $p < 0,01$ , #### $p < 0,001$  vs. CHX; \$\$\$ $p < 0,001$  vs. MG132.

Con el fin de poder identificar qué residuo puede tener una mayor o menor implicación biológica en los efectos observados sobre la acetilación de FABP4, adipocitos 3T3-L1 se transfectaron con la forma silvestre y con las distintas

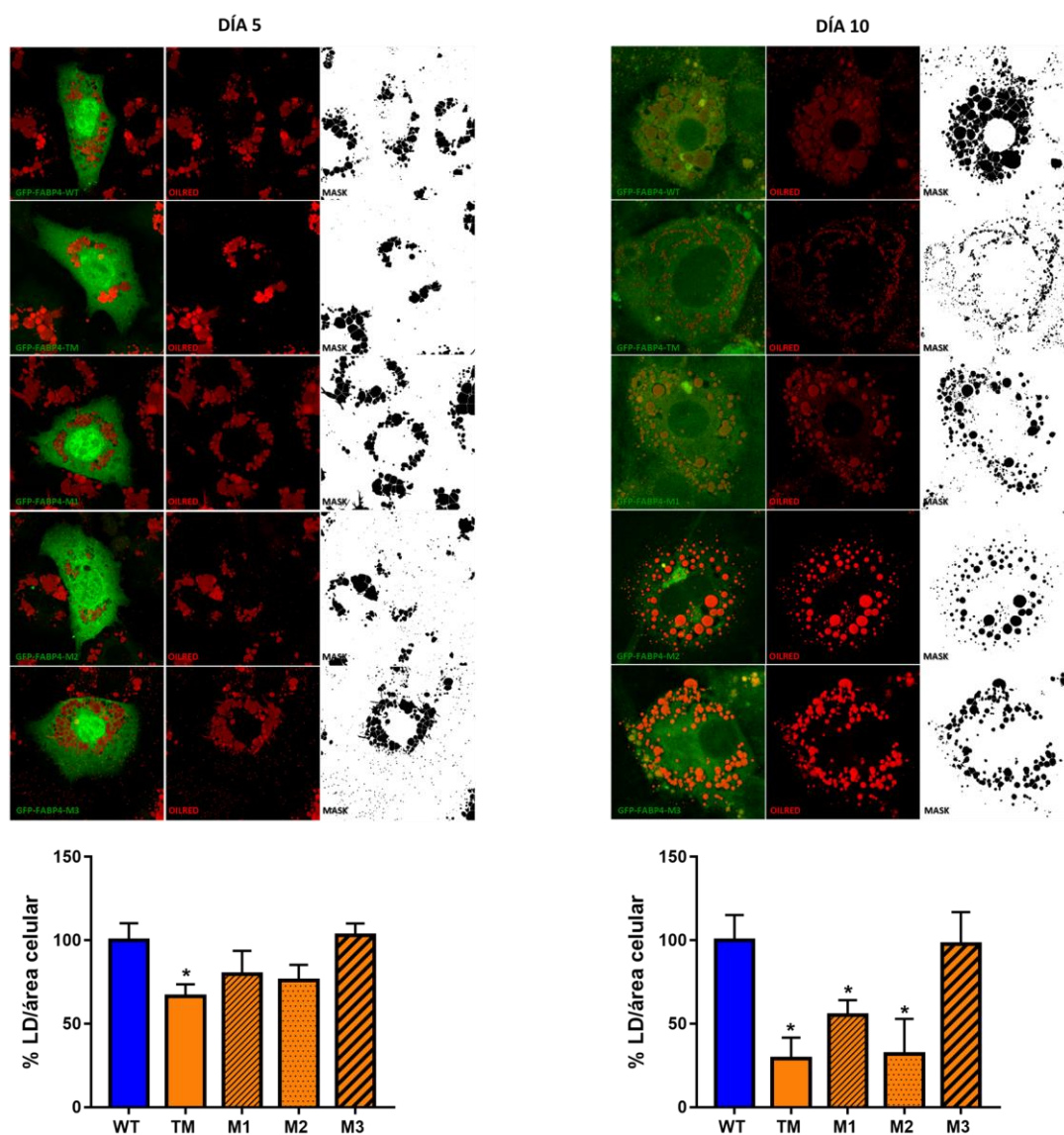
construcciones individuales de FABP4 generadas por mutagénesis dirigida: las formas simples mutadas de FABP4 –M1 (K22I), M2 (K32I) y M3 (K59I)– y la forma triple mutada de FABP4 –TM (K22I, K32I y K59I)–. En cuanto a la localización subcelular de las distintas variantes de FABP4 generadas, TM se acumuló menos en el núcleo que la forma WT (**Figura 41**). Por otro lado, de las formas simples mutadas de FABP4, solo M2 indujo cambios significativos en el ratio núcleo/citosol vs. WT, mientras que no se observaron diferencias entre M1 o M3 y WT (**Figura 41**).



**Figura 41.** Análisis de la localización subcelular (núcleo/citosol) de FABP4 WT y las distintas construcciones mutadas de FABP4, TM, M1, M2 y M3. Imágenes de microscopía confocal representativas (panel izquierdo) de adipocitos 3T3-L1 transfectados con los vectores de FABP4 (marcados en verde): GFP-FABP4-WT (WT), GFP-FABP4-TM (TM), GFP-FABP4-M1 (M1), GFP-FABP4-M2 (M2) o GFP-FABP4-M3 (M3) y DAPI (núcleo, azul). Las imágenes confocales se analizaron cuantificando la intensidad de señal de GFP-FABP4 en núcleo y citosol (panel derecho). Los datos están representados como la media  $\pm$  SEM (8-10 imágenes confocales/condición). Las diferencias significativas están indicadas como \*\*\* $p < 0,001$  vs. GFP-FABP4-WT; ## $p < 0,01$  vs. GFP-FABP4-TM.

A continuación, se analizó la acumulación de lípidos en adipocitos 3T3-L1 transfectados con las diferentes construcciones en estudio. Así, los adipocitos transfectados con la forma TM contenían gotas lipídicas más pequeñas que las células 3T3-L1 transfectadas con FABP4 WT. La cuantificación del área celular ocupada por las gotas lipídicas confirmó que la presencia de FABP4 TM redujo significativamente la acumulación de lípidos en comparación con las células transfectadas con la forma WT (**Figura 42**). Este efecto fue observado tanto en etapas tempranas de diferenciación (D5) como a término (D10). Por otro lado, también se realizó el análisis de gotas lipídicas tras la transfección con los mutantes simples de FABP4 y se observó que la variante M2 de FABP4 indujo respuestas similares a las mostradas por la variante de FABP4 TM (**Figura 42 DÍA 5**). Sin embargo, no se observaron cambios en el tamaño y el área ocupada por las gotas lipídicas para las variantes M1 y M3 de FABP4 exceptuando una reducción de la acumulación de lípidos en la etapa final de la diferenciación (D10) (**Figura 42**).

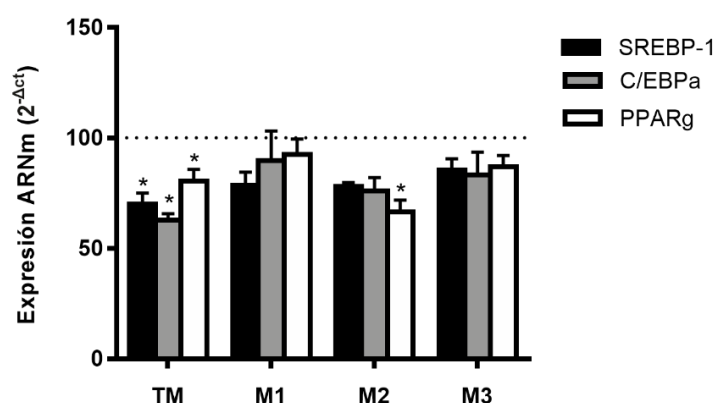




**Figura 42.** Estudio sobre la acumulación de gotas lipídicas en células 3T3-L1 transfectadas con FABP4 WT y con las distintas construcciones mutadas de FABP4, TM, M1, M2 y M3. Imágenes de microscopía confocal representativas de adipocitos 3T3-L1 transfectados con los vectores GFP-FABP4-WT (WT), GFP-FABP4-TM (TM), GFP-FABP4-WT (WT), GFP-FABP4-TM (TM), GFP-FABP4-M1 (M1), GFP-FABP4-M2 (M2) o GFP-FABP4-M3 (M3) mantenidos en cultivo hasta día 5 de diferenciación (panel superior izquierda) o hasta día 10 de diferenciación (panel superior derecha), marcados con GFP (verde) y teñidos con Oil-Red O (gotas lipídicas, rojo). Las imágenes se analizaron cuantificando el área ocupada por las gotas lipídicas (LD) / área celular total (panel inferior izquierda). Los datos están representados como la media  $\pm$  SEM (8-10 imágenes confocales/condición). Las diferencias significativas están indicadas como  $*p < 0,05$  vs. WT basal.

De acuerdo con los resultados obtenidos sobre la diferencia en la acumulación de lípidos entre las distintas formas de FABP4 estudiadas (inferior en TM vs. WT), se midieron a continuación los niveles de expresión de los factores de transcripción que guían la adipogénesis, *SREBP-1*, *C/EBP $\alpha$*  y *PPAR $\gamma$* . Como muestra la **Figura 43**, encontramos que los niveles de expresión de dichos marcadores también se redujeron

en las células transfectadas con TM vs. la variante WT de FABP4. Estos resultados indican que la falta de acetilación de FABP4 afecta a la capacidad de almacenamiento de lípidos en las gotas lipídicas. De las posiciones estudiadas, la mutación en la posición K32 (M2) parece ser fundamental en la acetilación de FABP4. No obstante, la mutación de los otros residuos analizados incrementa su efecto, siendo menor el contenido lipídico y la expresión de los factores de transcripción adipogénicos para FABP4 TM que para la variante M2.



**Figura 43.** Niveles de expresión de ARNm de los factores de transcripción adipogénicos, *SREBP-1*, *C/EBPα*, y *PPARγ* en adipocitos 3T3-L1 transfectados con FABP4 WT y con las distintas construcciones mutadas de FABP4, TM, M1, M2 y M3. Los datos están representados como la media  $\pm$  SEM (3-4 réplicas/grupo). Las diferencias significativas están indicadas como \* $p < 0,05$  vs. WT.

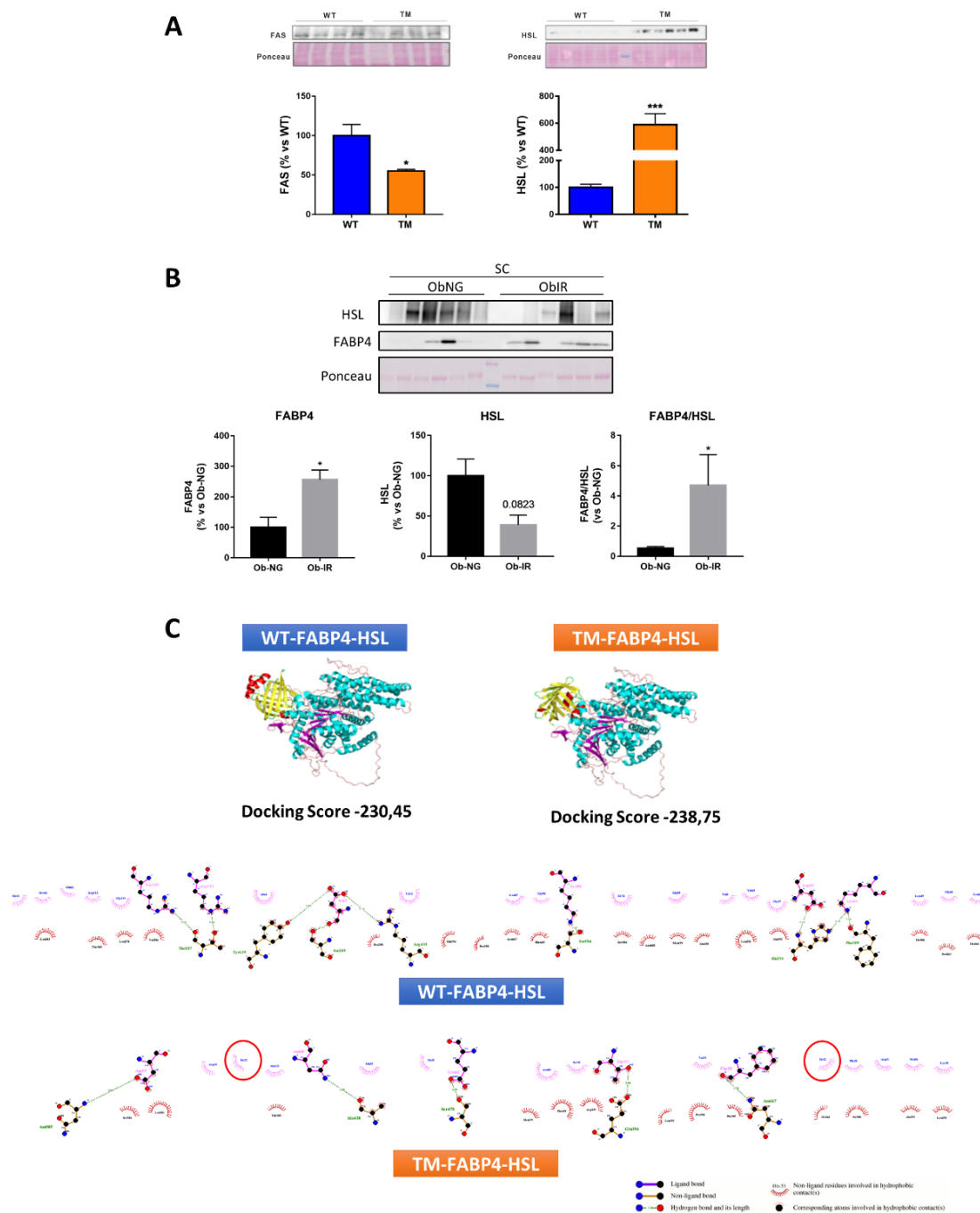
Teniendo en cuenta los resultados anteriores, se analizaron dos de las principales enzimas implicadas en los procesos de lipólisis/lipogénesis: FAS (ácido graso sintetasa) implicada en el proceso de lipogénesis y HSL (lipasa sensible a hormonas), en la lipólisis. Así, observamos que la transfección con la forma TM de FABP4 indujo una disminución del contenido de FAS en las células 3T3-L1 (**Figura 44A**), lo que podría estar relacionado con el efecto de la forma mutada sobre *PPARγ*, dado que este factor induce la transcripción de FAS (Ma et al., 2018).

Así, se evaluó el contenido de FAS en muestras de tejido adiposo SC de sujetos Ob-NG y Ob-IR, en los que también se midieron los niveles de FABP4. Los resultados confirmaron nuestros hallazgos previos sobre el aumento en los niveles de FABP4 en el depósito SC en individuos Ob-IR vs. Ob-NG (**Figura 34**); sin embargo, no se obtuvieron resultados de FAS en los mismos *Western Blots*, probablemente debido al alto peso

molecular de esta proteína (272 KDa) y las condiciones especiales de electroforesis que son necesarias para visualizar FABP4 (15 kDa). Sin embargo, estudios previos sobre tejido adiposo SC humano han demostrado que la expresión de FAS está disminuida en individuos obesos vs. delgados (Fryk et al., 2021) y en Ob-NG y Ob-IR vs. delgados (Ortega et al., 2010).

Por otro lado, existen evidencias previas que demuestran la relevancia de la interacción entre HSL y FABP4 para una lipólisis eficiente (Jenkins-Kruchten et al., 2003; Maynard-Smith et al., 2007; Furuhashi and Hotamisligil, 2008). Los resultados en adipocitos 3T3-L1 transfectados con el vector de expresión FABP4-TM indican que la desacetilación de FABP4 puede afectar la lipólisis mediante el aumento de la expresión de HSL (**Figura 44A**). Por otro lado, cuando analizamos HSL en muestras de tejido adiposo SC humano, observamos una tendencia a la disminución del contenido de la proteína en sujetos Ob-IR, los cuales presentaban una mayor acetilación y expresión de FABP4, con respecto a sujetos Ob-NG (**Figura 44B**). De hecho, el ratio FABP4:HSL en el depósito graso SC fue significativamente mayor en individuos obesos con resistencia a insulina que en individuos obesos normoglucémicos (**Figura 44B**).

Finalmente, y con el fin de profundizar si la acetilación podría afectar a la interacción HSL-FABP4, se llevó a cabo un análisis de acoplamiento (*docking*) entre la molécula HSL y las dos formas de FABP4, WT y TM utilizando los servidores HDock (<http://hdock.phys.hust.edu.cn/>) y Ligplot+ (<https://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/software/LigPlus/>). Este análisis mostró una puntuación de acoplamiento más negativa entre HSL/TM (-238,75) frente a HSL/WT (-230,45), lo que indica una mayor afinidad entre la forma TM-FABP4 y HSL. Esto podría estar relacionado con los puentes de hidrógeno que se pueden establecer entre Ile22 (reemplazando a Lys22 en la forma WT) e Ile32 (reemplazando a la Lys32 en la forma WT) de la forma FABP4-TM con la proteína HSL (**Figura 44C**).



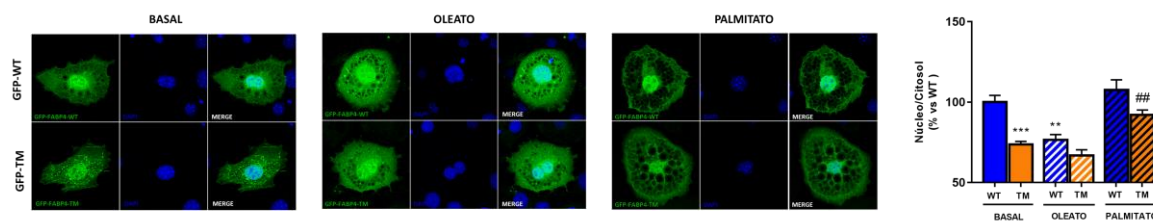
**Figura 44.** Efectos de la forma triple mutante de FABP4 sobre la expresión de FAS (enzima lipogénica) y HSL (enzima lipolítica). **A.** Bandas inmunorreactivas y análisis de la expresión de la proteína sintasa de ácidos grasos (FAS) y de la lipasa sensible a hormonas (HSL) en extractos proteicos de adipocitos 3T3-L1 transfectados con los vectores GFP-FABP4-WT (WT) o GFP-FABP4-TM (TM). Para la cuantificación, los niveles de proteína se normalizaron mediante tinción de Ponceau. Los datos están representados como la media  $\pm$  SEM (4-5 repeticiones/grupo). Las diferencias significativas están indicadas como \* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$  vs. WT. **B.** Bandas inmunorreactivas y análisis de los niveles de expresión de HSL y FABP4 y la relación FABP4/HSL en tejido adiposo humano subcutáneo (SC) de sujetos con obesidad normoglucémicos (Ob-NG) y pacientes con obesidad y resistencia a insulina (Ob-IR), normalizada mediante tinción de Ponceau. Los datos están representados como la media  $\pm$  SEM (5-6 individuos/grupo). Las diferencias significativas están indicadas como \* $p < 0,05$  vs. Ob-NG SC. **C.** La calidad del

acoplamiento del modelo de interacciones para WT y HSL y TM y HSL fue confirmada por HDock (<http://hdock.phys.hust.edu.cn/>) (panel superior) y representación 2D (panel inferior) usando Ligplot+ (<https://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/software/LigPlus/>). Las cadenas laterales de FABP4 y HSL se muestran en representación de bola y palo, con los enlaces de ligando (WT o TM) coloreados en rosa y los enlaces HSL en marrón. Los enlaces de hidrógeno se muestran como líneas de puntos verdes; los arcos radiales representan residuos involucrados en contactos hidrofóbicos y los átomos con líneas cortas corresponden a átomos implicados en contactos hidrofóbicos. Los aminoácidos clave están rodeados en rojo (Ile22, Ile32). Estos residuos están en posiciones 3D equivalentes cuando se superponen los dos modelos estructurales.

## 8. Regulación de la acetilación de FABP4 en modelos *in vitro* de obesidad y resistencia a insulina

Además de lo descrito anteriormente, se analizó el posible impacto de la obesidad y la resistencia a insulina sobre la acetilación de FABP4 y las distintas funciones de la proteína. Para ello, los adipocitos transfectados con la forma FABP4 WT o TM fueron expuestos a diferentes insultos obesogénicos mimetizados en modelos *in vitro* desarrollados por nuestro grupo (Díaz-Ruiz et al., 2015; Guzmán-Ruiz et al., 2020). En concreto, los adipocitos se expusieron a dos modelos de hipertrofia mediante la sobrecarga lipídica de dos ácidos grasos diferentes: un ácido graso saturado, palmitato, que, además de generar hipertrofia en los adipocitos, provoca que las células desarrollen resistencia a insulina; y un ácido graso monoinsaturado, oleato, que causa hipertrofia en los adipocitos, pero no resistencia a insulina (Díaz-Ruiz et al., 2015). También se incluyó el modelo de exposición a altas concentraciones de glucosa e insulina (HGHI), que, además de la hiperglucemia/hiperinsulinemia, también genera resistencia a insulina (Díaz-Ruiz et al., 2015; Guzmán-Ruiz et al., 2020).

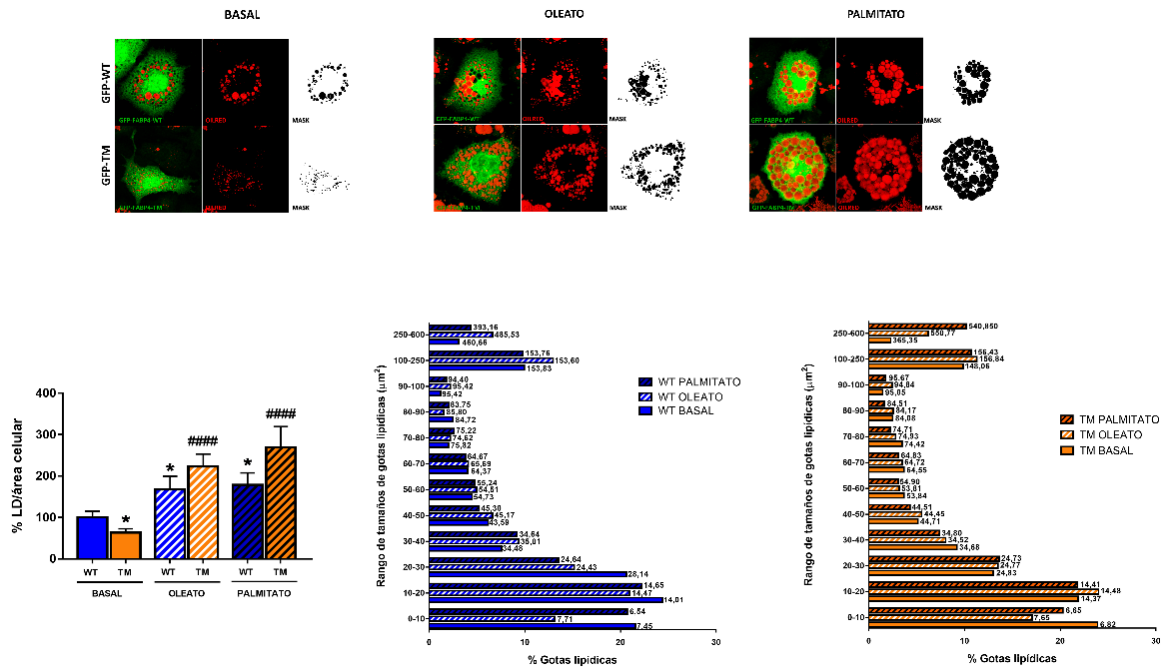
En primer lugar, se analizó la localización celular de FABP4 y se observó que, en comparación con las condiciones basales, el tratamiento con oleato disminuyó la localización de FABP4 WT en el núcleo mientras que el estímulo con palmitato no tuvo ningún efecto sobre la relación de la señal núcleo/citosol de FABP4 WT (**Figura 45**). Por otro lado, la forma FABP4 TM no mostró diferencias en su localización entre las condiciones basales y tras la administración de oleato. Sin embargo, el tratamiento con palmitato indujo un aumento significativo del ratio núcleo/citosol en células transfectadas con el triple mutante de FABP4 en comparación con la variante WT (**Figura 45**).



**Figura 45.** Análisis de localización subcelular (núcleo/citosol) de FABP4 WT y TM en condiciones de sobrecarga lipídica tras exposición a oleato o palmitato. Imágenes de microscopía confocal representativas (panel izquierdo) de adipocitos 3T3-L1 transfectados con los vectores GFP-FABP4-WT (WT) o GFP-FABP4-TM (TM) marcados con GFP (verde) y DAPI (núcleo, azul). Los adipocitos 3T3-L1 transfectados se trataron con 500 mM de oleato o palmitato durante 18 h. Las imágenes confocales se analizaron cuantificando la intensidad de señal de GFP-FABP4 en núcleo y citosol (panel derecho). Los datos están representados como la media  $\pm$  SEM (8-10 imágenes confocales/condición). Las diferencias significativas están indicadas como \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  vs. WT basal; ## $p < 0,01$  vs. WT tratamiento con palmitato.

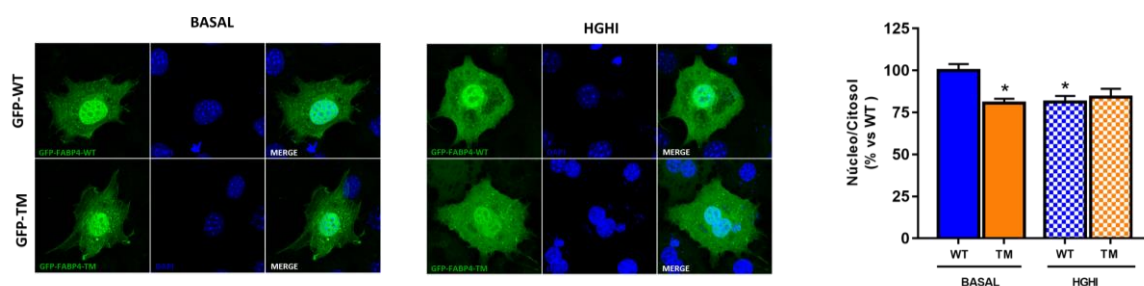
Además, también se llevó a cabo la cuantificación del área que ocupan las gotas lipídicas con respecto al área celular en todos los modelos experimentales. En línea con los resultados anteriores, los adipocitos transfectados con la forma FABP4 TM mostraron una reducción de la acumulación de lípidos en condiciones basales. Sin embargo, tras los tratamientos con ácidos grasos (oleato o palmitato), los adipocitos exhibieron un aumento de la acumulación lipídica independientemente del grado de acetilación de FABP4 (**Figura 46**). Por tanto, estos resultados sugerían que la acetilación de FABP4 no modifica la acumulación de lípidos ante una sobrecarga lipídica, con independencia del ácido graso utilizado.





**Figura 46.** Imágenes de microscopía confocal representativas (panel superior) de adipocitos 3T3-L1 transfectados con los vectores GFP-FABP4-WT (WT) o GFP-FABP4-TM (TM) marcados con GFP (verde) y teñidos con Oil-Red O (gotas lipídicas, rojo). Los adipocitos 3T3-L1 transfectados se trataron con 500 mM de oleato o palmitato durante 18 h. Las imágenes confocales se analizaron cuantificando el área ocupada por las gotas lipídicas (LD)/área celular total (panel abajo izquierda). Los datos están representados como la media  $\pm$  SEM (8-10 imágenes confocales/condición). Las diferencias significativas están indicadas como \* $p < 0,05$  vs. WT basal; #### $p < 0,0001$  vs. TM basal. Tamaño de las gotas de lipídicas en adipocitos 3T3-L1 transfectados con WT (azul) o TM (naranja) y tratados con estímulo de 500 mM de oleato o 500 mM de palmitato durante 18 h (panel inferior derecha).

Por otro lado, se analizó el efecto de la exposición a altas concentraciones de glucosa e insulina. De nuevo, se observó la disminución del ratio núcleo/citosol observado en la **figura 45** en las comparativas WT vs. TM en condiciones basales. Por otro lado, se observó que HGHI disminuyó el ratio núcleo/citosol en adipocitos transfectados con FABP4 WT (**Figura 47**). Sin embargo, dicho tratamiento no provocó efectos sobre la localización de FABP4 TM (**Figura 47**).

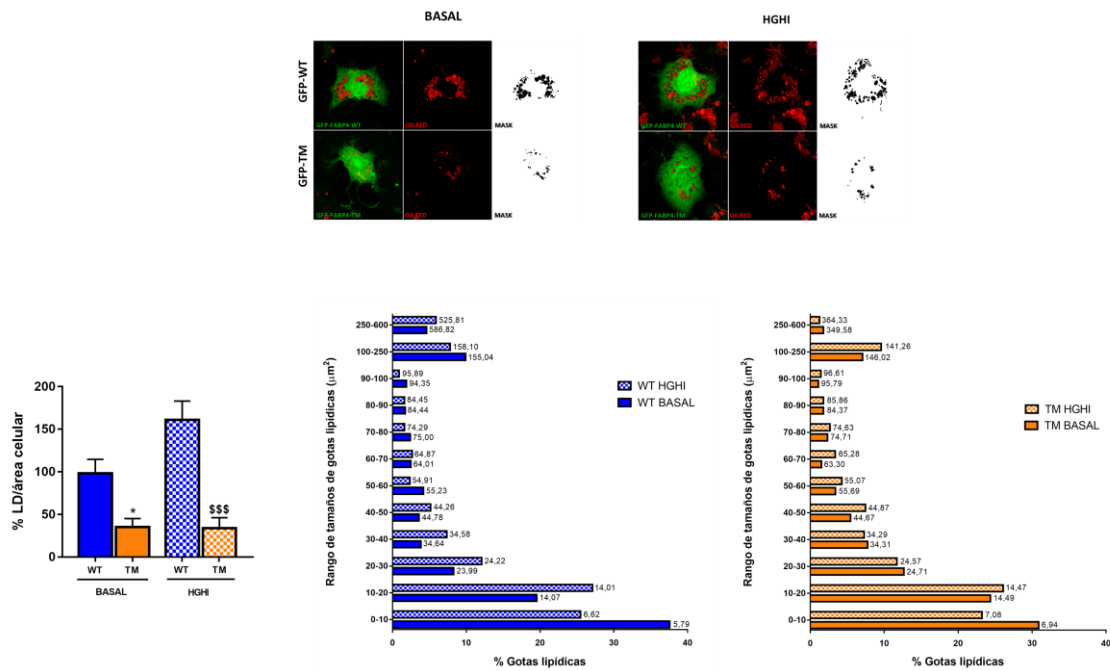


**Figura 47.** Imágenes de microscopía confocal representativas (panel izquierdo) de adipocitos 3T3-L1 transfectados con los vectores GFP-FABP4-WT (WT) o GFP-FABP4-TM (TM) marcados con GFP (verde) y DAPI (núcleo, azul). Los adipocitos 3T3-L1 transfectados se trataron con altas concentraciones de glucosa (4,5 g/L) e insulina (100 nM) (HGHI) durante 24 h. Las imágenes confocales se analizaron cuantificando la intensidad de señal de GFP-FABP4 en núcleo y citosol (panel derecho). Los datos están representados como la media  $\pm$  SEM (8-10 imágenes confocales/condición). Las diferencias significativas están indicadas como \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  vs. WT basal.

En cuanto a la acumulación de lípidos, el modelo HGHI no modificó la repuesta de las células transfectadas con la forma triple mutada de FABP4 en comparación con las condiciones basales (**Figura 48**), mostrando resultados similares a los anteriores descritos (**Figura 46**). De nuevo, estas observaciones apoyan la propuesta de que la ausencia de acetilación de FABP4 provoca una alteración de la diferenciación adipocitaria y el metabolismo lipídico de los adipocitos. Este efecto es más pronunciado en condiciones de hiperglucemia/hiperinsulinemia, donde se observó una disminución significativa de la acumulación de lípidos inducida por HGHI (**Figura 48**).

En conclusión, los resultados obtenidos en la caracterización de FABP4, con menor o mayor grado de acetilación, junto a los datos en los diferentes modelos *in vitro* de obesidad y resistencia a insulina, que apoyan un papel modulador de la acetilación de FABP4 sobre las funciones de esta proteína sugieren que esta MPT juega un papel regulador esencial en las mismas (i.e., transportadora de ácidos grasos regulando los procesos de lipólisis/lipogénesis en el adipocito, la diferenciación adipocitaria y su papel como adipocina sobre otros tejidos diana).





**Figura 48.** Imágenes de microscopía confocal representativas (panel superior) de adipocitos 3T3-L1 transfectados con los vectores GFP-FABP4-WT (WT) o GFP-FABP4-TM (TM) marcados con GFP (verde) y teñidos con Oil-Red O (gotas lipídicas, rojo). Los adipocitos 3T3-L1 transfectados se trataron con altas concentraciones de glucosa (4,5 g/L) e insulina (100 nM) (HGHI) durante 24 h. Las imágenes confocales se analizaron cuantificando el área ocupada por las gotas lipídicas (LD) / área celular total (panel inferior izquierda). Los datos están representados como la media  $\pm$  SEM (8-10 imágenes confocales/condición). Las diferencias significativas están indicadas como \*\* $P < 0,05$  vs. WT basal; \$\$\$ $p < 0,001$  vs. WT HGHI. Tamaño de las gotas de lipídicas en adipocitos 3T3-L1 transfectados con FABP4 WT (azul) o TM (naranja) y tratados con altas concentraciones de glucosa (4,5 g/L) e insulina (100 nM) (HGHI) durante 24 h (panel inferior derecha).

---

## DISCUSIÓN

---

El estudio de las modificaciones postraduccionales de proteínas puede ser de gran interés para entender los mecanismos moleculares implicados en la disfunción del tejido adiposo en obesidad. En concreto, la acetilación de proteínas en residuos de lisina ha surgido como una modificación postraducciona (MPT) clave debido a su capacidad para regular la actividad de las enzimas que intervienen en el metabolismo energético. Así, gran cantidad de enzimas implicadas en la glucólisis, gluconeogénesis, el ciclo de Krebs o en el metabolismo lipídico están acetiladas en diferentes tejidos (Fukushima y Lopaschuk, 2016; Zhang et al., 2019; Zhao et al., 2020). Esta MPT tiene lugar mediante la transferencia del grupo funcional acetilo ( $\text{CH}_3\text{CO}^-$ ) desde acetil-CoA (Ac-CoA) a lisinas específicas de las cadenas polipeptídicas de las proteínas (Lee et al., 2018).

El primer objetivo de este trabajo fue establecer, por primera vez, el acetiloma del tejido adiposo humano subcutáneo (SC) y omental (OM) de individuos delgados y sujetos con obesidad con diferentes niveles de sensibilidad a insulina –normoglucémicos (Ob-NG) y resistentes a insulina (Ob-IR)–. Así, el análisis global de proteínas acetiladas mostró que una cuarta parte del proteoma total del tejido adiposo está sometido a acetilación, mostrando, de esta manera, la gran importancia que tiene esta MPT en el funcionamiento de este órgano. Específicamente, en el tejido adiposo, estudios *in vivo* e *in vitro* en modelos animales han evidenciado la importancia de la acetilación de proteínas concretas en residuos de lisina en el correcto funcionamiento de la diferenciación (o adipogénesis) de los adipocitos (Xu et al., 2013) y han sugerido además su posible papel en el desarrollo de condiciones patológicas como la obesidad o la diabetes (Iyer et al., 2012; Sun y Zhang, 2021).

Es importante el estudio de las características de cada depósito de tejido adiposo, ya que está bien establecido que la distribución de este tejido es un factor de riesgo importante para las enfermedades asociadas a la obesidad, independientemente de la cantidad de grasa corporal total (Giordano et al., 2014). Así, la acumulación de tejido adiposo en el depósito OM se asocia con el desarrollo de comorbilidades asociadas con la obesidad (Koster et al., 2015), mientras que la acumulación de grasa en

el depósito SC se ha propuesto que cumple un efecto protector desde el punto de vista metabólico por su papel como almacenador de lípidos mediado por su capacidad de expansión. Se ha propuesto que esta característica reduciría la acumulación ectópica de lípidos (hígado, músculo, páncreas), evitando así los fenómenos de lipotoxicidad asociados a la obesidad y, con ello, una disminución de la enfermedad cardiovascular y metabólica (McLaughlin et al., 2016). Sin embargo, la remodelación y disfunción del tejido adiposo de cada depósito también puede ser un factor clave en la fisiopatología de la enfermedad metabólica relacionada con la obesidad (Longo et al., 2019). En concreto, las alteraciones en la adipogénesis del depósito SC se han asociado con complicaciones metabólicas asociadas a la obesidad (Lessard et al., 2014).

Por ello, como segundo objetivo, se planteó la comparativa del perfil de acetilación del proteoma de los dos depósitos, SC y OM, encontrando un acetiloma específico de cada depósito. En concreto, el depósito OM mostró una mayor proporción de proteínas acetiladas que el depósito SC, encontrando gran cantidad de proteínas acetiladas en el citosol y ribosomas. Por su parte, el depósito SC mostró menor número de proteínas acetiladas totales y estas se localizan, además de en citosol y ribosomas, en el glicocálix (medio extracelular). Por otro lado, las proteínas acetiladas en tejido adiposo OM parecen estar más relacionadas con la regulación metabólica, concretamente con vías del metabolismo alternativas como el metabolismo de ácidos carboxílicos. Recientemente, se ha propuesto que el lactato podría ser una fuente de energía alternativa a la glucosa, regulada por el transportador de monocarboxilatos MCT1 en condiciones de resistencia a insulina (Lagarde et al., 2021). Además, se ha visto que la activación de este transportador y el consumo de lactato se correlacionan con una mayor población de adipocitos termogénicos (*beige*) en la grasa blanca, lo que podría suponer un mecanismo compensatorio para combatir el metabolismo energético en el depósito OM en condiciones de resistencia a insulina (Lagarde et al., 2021). Por su parte, las proteínas acetiladas del depósito SC participan más en procesos de modificación de proteínas (cotraduccionales y postraduccionales). Estos resultados sugieren que la acetilación puede modular respuestas diferentes en función del depósito graso, las cuales podrían estar relacionadas con las funciones de ambos depósitos. De hecho, el depósito OM es más dinámico en cuanto al intercambio de lípidos mientras

que el depósito SC se considera un depósito más propiamente de almacenamiento (Giordano et al., 2014).

Como objetivo fundamental de este estudio también se planteó el análisis de las proteínas acetiladas identificadas en cada uno de los grupos de estudio, individuos delgados, pacientes con obesidad y normoglucemia (Ob-NG) y sujetos con obesidad y resistencia a insulina (Ob-IR). Nuestros estudios mostraron que una considerable proporción de las proteínas acetiladas se clasificaban en localizaciones y procesos comunes encontrando que, en 5 de las 6 condiciones estudiadas, las proteínas acetiladas se englobaron en procesos de oxidación-reducción (todos a excepción del depósito SC de individuos delgados). Estos procesos están íntimamente relacionados con el metabolismo energético, incluyendo enzimas que participan en la glucólisis, gluconeogénesis, el ciclo de los ácidos tricarboxílicos o el metabolismo de los ácidos grasos tejidos (Fukushima y Lopaschuk, 2016; Zhang et al., 2019; Zhao et al., 2020). Aunque los procesos de oxidación-reducción fueron comunes en todos los grupos, a excepción del depósito SC de los individuos delgados, se observaron diferencias específicas de depósito. Por ejemplo, en el depósito OM de pacientes Ob-NG predominaban proteínas acetiladas relacionadas con la respuesta inmune mientras que en el mismo depósito pero en sujetos Ob-IR, las proteínas acetiladas estaban, principalmente, implicadas en procesos metabólicos. Por otro lado, en el depósito SC, las proteínas acetiladas identificadas estaban relacionadas, sobre todo, con la respuesta inmune en ambas condiciones obesogénicas (Ob-NG y Ob-IR). Es posible que estas diferencias puedan reflejar la respuesta adaptativa que induce la obesidad en el tejido adiposo OM que, según muestran numerosos estudios, es el depósito que presenta una mayor infiltración por células inmunes, tanto en individuos delgados como obesos (Liu and Nikolajczyk, 2019; Jia et al., 2020; Li et al., 2020). Estos mecanismos adaptativos podrían perderse, al menos en el tejido adiposo OM, cuando se produce la transición de NG a IR en condiciones de obesidad, contribuyendo quizás a que esta se produzca.

Cuando centramos el análisis en proteínas concretas, se evidenciaron mayores diferencias entre los distintos grupos de sujetos y los depósitos del tejido adiposo. Así, proteínas clave relacionadas con el metabolismo energético como la citrato sintasa (CS),

del ciclo de Krebs, o la fosfoglicerato quinasa (PGK1), de la glucólisis, estaban acetiladas en residuos de lisina únicamente en el depósito OM, independientemente de las condiciones de obesidad y resistencia a insulina. Curiosamente, un estudio reciente caracterizó 10 variantes acetiladas en sitios específicos de la CS en *E. coli*, demostrando que la acetilación en residuos de lisina de la CS podría disminuir la actividad general de la enzima (Venkat et al., 2019). Dada la conservación de la secuencia y funciones de la CS, cabe la posibilidad que la presencia diferencial de formas acetiladas de esta proteína en los dos depósitos contribuya a las diferencias metabólicas existentes entre tejido adiposo OM y SC (Venkat et al., 2019). Por otro lado, se observaron resultados similares para PGK1-Ac<sup>K</sup>, para la que se ha propuesto un posible papel de la acetilación en residuos específicos de lisina sobre la actividad de esta enzima. Wang et al. (2015) mostraron que PGK1 acetilada en K220 presenta una menor actividad que la forma desacetilada (Wang et al., 2015). Además, estos autores demostraron que la insulina promovió la desacetilación de K220, provocando con ello el incremento de la actividad de PGK1 y, en consecuencia, el aumento del flujo glucolítico (Wang et al., 2015). Por otro lado, Qian et al. describieron la relevancia de la acetilación en el residuo K338 de PGK1 sobre la promoción de la autofagia a través de la activación de beclin-1 (Qian et al., 2017). Estos datos resaltan la importancia de identificar los sitios específicos de acetilación de las proteínas y su relación con la actividad de las mismas.

En resumen, el análisis del acetiloma del tejido adiposo SC y OM, y en los diferentes grupos de sujetos revelan la importancia de la acetilación de proteínas en este tejido y sus posibles implicaciones en la función del mismo en respuesta a obesidad y resistencia a insulina. Además, estos resultados ponen en evidencia la importancia de conocer la regulación de los procesos celulares por acetilación, hasta ahora poco descritos, en cuanto a su posible importancia como nueva diana terapéutica en el desarrollo de estrategias contra la obesidad y la resistencia a insulina. No obstante, es cierto que nuestro estudio proteómico presenta ciertas limitaciones que es importante resaltar. En primer lugar, no se ha podido realizar el estudio de validación comparativo de proteínas acetiladas de interés debido principalmente a la escasez de muestra de tejido adiposo humano, sobre todo procedente de individuos delgados. Tampoco se ha podido realizar un análisis de residuos de lisinas acetilados específicos de cada una de

las proteínas identificadas, como se ha hecho en algunos estudios anteriores dirigidos a caracterizar proteínas concretas (Wang et al., 2015; Qian et al., 2017; Venkat et al., 2019).

Por otra parte, en ocasiones la falta de recursos metodológicos dificulta el estudio de las proteínas acetiladas. Así la ausencia de anticuerpos comerciales para la mayoría de las proteínas acetiladas puede suponer una barrera en este tipo de estudios. A pesar de estas dificultades, el uso de aproximaciones proteómicas, como las empleadas en nuestro estudio, abren una nueva vía de oportunidades para identificar posibles biomarcadores diferenciales de la función de los dos depósitos, SC y OM. Nuestros resultados ponen en valor la importancia del análisis de la acetilación y complementan nuestro conocimiento sobre la complejidad biológica del tejido adiposo y la funcionalidad de estos dos depósitos histológicamente similares, pero funcionalmente diferentes. Además, nuestro estudio apoya la noción de que la acetilación puede regular procesos clave en el desarrollo de obesidad y comorbilidades como la resistencia a insulina, y podría permitir la búsqueda de biomarcadores de disfunción del tejido adiposo que ayuden en la clínica.

En este sentido, como último objetivo de esta parte de la presente Tesis Doctoral, nos planteamos caracterizar el impacto de la acetilación de una proteína fundamental del tejido adiposo, FABP4. Esta proteína, también conocida como aP2 o A-FABP, se une reversiblemente a ácidos grasos de cadena larga, tanto saturados como insaturados, con alta afinidad y gran selectividad (Furuhashi et al., 2014). Su expresión está altamente inducida durante el proceso de diferenciación adipocitaria (Niu et al., 2016), lo que la hace idónea como marcador de diferenciación adipocitaria. En el tejido adiposo, su transcripción está regulada por insulina, ácidos grasos y PPAR $\gamma$  o agonistas de estos receptores (Hotamisligil y Bernlohr, 2015). Esta proteína presenta una función dual participando en el tráfico intracelular (vía núcleo-citosol, citosol-gota lipídica-mitocondria) de lípidos como chaperona lipídica y también como molécula señalizadora tras su secreción por parte de los adipocitos (Furuhashi y Hotamisligil, 2008; Furuhashi, 2019). Como chaperona lipídica, FABP4 participa en la internalización de los ácidos grasos en los adipocitos, donde activa a la lipasa sensible a hormonas, HSL, e interviene

por tanto en la regulación de la lipólisis. Asimismo, se ha visto que FABP4 está implicada en la transferencia de lípidos a receptores nucleares como PPAR $\gamma$ , para mediar programas de transcripción (Furuhashi et al., 2014).

Estudios previos han demostrado que FABP4 podría ser un marcador de resistencia a insulina ya que se ha observado una correlación positiva entre los niveles de FABP4 plasmáticos en sujetos con obesidad y distintos grados de sensibilidad a insulina (Queipo-Ortuño et al., 2012; Furuhashi, 2019). La alteración de FABP4 en estas condiciones patológicas podría relacionarse con la acumulación alterada de lípidos en el tejido adiposo en condiciones de obesidad debido a su papel en la modulación del metabolismo lipídico en los adipocitos (Furuhashi et al., 2014). Sin embargo, se desconoce si esta función podría estar modulada por acetilación, lo que podría ayudar a definir realmente a FABP4 como biomarcador de estas patologías.

En esta Tesis Doctoral se describe, por primera vez, las diferencias específicas de depósito de FABP4-Ac<sup>K</sup> en tejido adiposo de individuos delgados e individuos en condiciones fisiopatológicas, como la obesidad y resistencia a insulina. En este estudio, mostramos que FABP4 se acetila en el depósito OM independientemente de las condiciones de obesidad y resistencia a insulina mientras que en el depósito SC, se detectó FABP4 acetilada solo en individuos delgados y sujetos obesos con resistencia a insulina. Gracias a las diferencias descritas entre los dos depósitos de tejido adiposo y, sobre la base del papel protector que desempeña la expansibilidad del depósito SC en obesidad (Pellegrinelli et al., 2016; Longo et al., 2019), los cambios detectados en la acetilación de FABP4 en este depósito podrían representar un marcador de obesidad específico de depósito y de resistencia a insulina.

FABP4 presenta múltiples MPTs incluyendo, además de acetilación, fosforilación, carbonilación y ubiquitinación (Xu et al., 2013; Prentice et al., 2019), que pueden regular su actividad. En concreto, en esta Tesis Doctoral y, gracias a la utilización de modelos *in vitro*, estudiamos si las funciones de FABP4 en adipocitos podrían depender de su perfil de acetilación. Así, a partir de estudios bibliográficos y utilizando la base de datos PhosphoSite (<http://www.phosphosite.org>), se llevó a cabo la mutagénesis dirigida de 3 residuos de lisina susceptibles de acetilarse (K22, K32 y K59)

por tres residuos de isoleucina, aminoácidos que no se acetilan, generando una forma triple mutante de FABP4 (TM; K22I, K32I y K59I).

La estructura tridimensional de las proteínas determina su función, por lo que el mantenimiento de esta es fundamental para evitar la pérdida de sus funciones. Además, la estructura tridimensional puede jugar también un papel fundamental en los procesos de transporte al núcleo y su regulación (Christie et al., 2016). Por ello, se realizó un análisis *in silico* de la estructura de FABP4 en su versión silvestre (WT, proteína sin mutar) y en la versión mutada (TM). Este estudio mostró que ambas estructuras tridimensionales mostraban una homología idéntica, por lo que los cambios observados con la forma TM a lo largo de este estudio no se relacionarían con cambios en su estructura sino al menor grado de acetilación.

Del mismo modo, se estudió la liberación, síntesis y degradación de la proteína en su forma silvestre y la forma mutada, así como su localización celular, ya que esta es fundamental para definir su función. En relación a su secreción, los resultados mostraron que la forma mutada de FABP4, TM, presentaba una mayor acumulación intracelular y menor liberación al medio extracelular en comparación con la forma silvestre de la proteína, WT. Estas observaciones son relevantes en cuanto a que estos datos sugieren que la acetilación puede condicionar la secreción de esta proteína. Si comparamos estas observaciones con los datos proteómicos, la forma TM, no acetilada, se asociaría al depósito SC de Ob-NG mientras que la forma silvestre, WT, a la forma acetilada de FABP4 identificada en el depósito SC de sujetos Ob-IR. Estos resultados están en concordancia con la bibliografía disponible, que muestra un aumento de FABP4 circulante en condiciones de obesidad y resistencia a insulina (Queipo-Ortuño et al., 2012; Furuhashi, 2019).

En relación al efecto de la acetilación sobre la síntesis y degradación de FABP4, nuestros datos indicaron diferencias entre ambas formas de FABP4, WT y TM. Así, no se detectaron cambios en la degradación de la forma WT de FABP4 tras un tratamiento con MG132 (inhibidor del proteasoma) con respecto a las condiciones control, lo que sugiere que, en condiciones normales, al menos parte de la proteína FABP4 sintetizada es liberada al exterior celular, sin que esto se vea afectado por la regulación de la vida



media de la proteína vía proteasoma. Sin embargo, cuando la proteína no está acetilada, esto funciona como señal para su degradación por el proteasoma, lo que produce además una disminución de la cantidad de proteína disponible para su secreción. Esto es relevante en tanto en que el grado de acetilación regularía finalmente el papel de FABP4 sobre otros tejidos (ie., su papel como adipoquina).

Del mismo modo, se analizó la localización celular de FABP4 ya que ello también determina las funciones de la proteína. Así, nuestro análisis de localización celular mostró que la forma TM se acumula una menor acumulación en el núcleo y, por tanto, una menor proporción núcleo/citosol, que la forma WT en condiciones basales. Así, la mayor presencia de FABP4-TM en citosol podría indicar una mayor actividad como transportador de ácidos grasos entre orgánulos, favoreciendo la lipogénesis (Furuhashi and Hotamisligil, 2008; Furuhashi, 2019). De hecho, durante la diferenciación, los adipocitos transfectados con la forma mutada mostraron un menor grado de diferenciación, con gotas más pequeñas que las células que expresaban la forma WT, lo que sugiere que la acetilación podría jugar un papel importante en el proceso de diferenciación adipocitaria. De hecho, se han descrito resultados similares en la misma línea celular, 3T3-L1, por Xu et al. (2013), quienes mostraron que se requiere la acetilación de varias proteínas, incluyendo FABP4, para una correcta adipogénesis. En nuestro caso, además observamos una menor expresión de factores de transcripción fundamentales en diferenciación en células que expresaban la forma FABP4-TM vs. FABP4-WT, cambios que podrían ser explicados, en parte, por la menor localización nuclear de la forma mutada.

Con el fin de profundizar en este efecto de la acetilación sobre la localización intracelular de la proteína, se realizó un estudio individual de los distintos residuos seleccionados, ya que se ha demostrado la importancia de la acetilación en los residuos de lisina para diversas funciones celulares, incluyendo la distribución subcelular de proteínas y, en especial, la translocación de proteínas al núcleo (Choudhary et al., 2014; Christie et al., 2016). En este sentido, FABP4 muestra una señal de importación al núcleo que, si bien no es identificable en su estructura primaria, sí puede diferenciarse en su estructura tridimensional. Esta señal incluye tres residuos aminoacídicos: K22, K32, R31

(Gillilan et al., 2007) Puesto que nuestra versión mutada de FABP4 (K22I, K32I, K59I), incluye dos de los tres residuos implicados en la señal de importación al núcleo (K22I, K32I), que modifica su susceptibilidad de acetilación y, por tanto, su capacidad de translocación al núcleo, nos propusimos analizar la localización de FABP4 usando formas individuales de los residuos mutados FABP4-M1 (K22I), FABP4-M2 (K32I) y FABP4-M3 (K59I). Los resultados mostraron que, de los 3 sitios estudiados, la posición K32 mostraba el mayor efecto sobre la localización de la proteína. Estos resultados confirman la importancia de la acetilación de dichos residuos para la localización de FABP4, que es fundamental para su función.

Sobre su papel en el citosol, la bibliografía previa indica que FABP4 está estrechamente relacionada con procesos de lipólisis/lipogénesis. Así en ratones *knockout* para FABP4 se observó un déficit en la entrada de ácidos grasos en el tejido adiposo, así como una menor eficacia de la lipólisis (Hotamisligil y Bernlohr, 2015). Además, FABP4 parece regular la lipogénesis, ya que la ausencia de FABP4 en adipocitos se traduce en un incremento de los niveles intracelulares de ácidos grasos, lo que podría explicar el aumento de peso corporal que experimentan los animales deficientes en FABP4 (Furuhashi et al., 2014). Sin embargo, en estos estudios no se tiene en cuenta la influencia de las MPTs en las funciones de FABP4. Por ello, se examinaron los efectos de la forma triple mutante de FABP4 sobre enzimas implicadas en lipogénesis y lipólisis: FAS y HSL, respectivamente.

Teniendo en cuenta el papel de PPAR $\gamma$  en la transcripción de FAS (Ma et al., 2018), la disminución de este factor de transcripción inducida por FABP4-TM podría explicar la efectos inhibitorios de la proteína mutante sobre el contenido de FAS. Aunque, como se ha comentado en la Sección de resultados, no pudimos determinar los niveles de FAS en nuestras muestras de tejido adiposo SC por motivos técnicos, estudios previos sobre dicho tejido han demostrado que la expresión de FAS está disminuida en individuos obesos vs. delgados (Fryk et al., 2021) y en Ob-NG y Ob-IR vs. delgados (Ortega et al., 2010). Por otro lado, los resultados con FABP4-TM indicaron que la desacetilación de FABP4 puede afectar la lipólisis mediante el aumento de la expresión de HSL, demostrando un papel adicional de la acetilación sobre la función de esta

proteína. Por otro lado, cuando analizamos HSL en tejido adiposo SC, observamos una tendencia a la disminución del contenido proteico en sujetos Ob-IR, los cuales presentaban una mayor acetilación y expresión de FABP4, con respecto a sujetos Ob-NG. De hecho, el ratio FABP4:HSL en el depósito graso SC fue significativamente mayor en individuos obesos con resistencia a insulina que en normoglucémicos.

Con el fin de poder profundizar en la importancia de la acetilación de FABP4 y su funcionamiento en el adipocito, se analizó su regulación mediante el uso de modelos *in vitro* esatbelcidos por el grupo y que mimetizan los diferentes insultos obesogénicos que ocurren en obesidad: sobrecarga lipídica (exposición a oleato o palmitato) o condiciones de hiperglucemia/hiperinsulinemia (exposición a altas concentraciones de glucosa e insulina) (Díaz-Ruiz et al., 2015; Guzmán-Ruiz et al., 2020).

En primer lugar, en condiciones basales, se encontró un menor ratio núcleo/citosol en la distribución de la forma TM vs. WT, lo que estuvo acompañado de un menor contenido de lípidos en los adipocitos transfectados con la forma mutada. Estos resultados, junto con la disminución observada en la expresión de los marcadores de diferenciación adipocitaria en células 3T3-L1 transfectadas con la forma FABP4 TM, indican que la falta de acetilación de esta proteína puede afectar a la diferenciación adipocitaria. Estos resultados pueden ser algo contradictorios si se considera que el tejido adiposo SC tiene una mayor capacidad adipogénica que el tejido adiposo OM y que dicha capacidad disminuye en ambos depósitos en condiciones de resistencia a insulina vs. NG (Sánchez-Ceinos et al., 2021). En este contexto, es posible que el efecto de la acetilación de FABP4 sea menos relevante en periodos tempranos de la diferenciación, en los que la cantidad de FABP4 es menor, afectando más este proceso a la actividad de los adipocitos maduros.

Centrándonos en los estudios realizados con ácidos grasos, pudimos observar que la acetilación de FABP4 no modificó el efecto de la sobrecarga lipídica inducida por oleato o palmitato, ya que en ambos casos se observó un aumento del contenido lipídico en células transfectadas con la forma mutada, como en el caso de la forma silvestre. Tampoco se observaron cambios entre la forma silvestre y la mutada en cuanto al perfil de localización en respuesta a la exposición con oleato o palmitato. Sí es interesante

resaltar que se observaron cambios de localización en la forma mutada entre los dos ácidos grasos, mostrando un mayor ratio núcleo/citosol de la forma mutada en presencia de palmitato. Estas variaciones podrían estar relacionadas con la diferente afinidad de FABP4 por cada uno de los ácidos grasos en estudio. Así, ensayos de afinidad con distintos ácidos grasos, han demostrado que FABP4 tiene una mayor afinidad por ácidos grasos insaturados como oleato respecto a la afinidad que muestra con ácidos grasos saturados como palmitato (Zimmerman et al., 2001; Furuhashi, 2019). Además, se han observado resultados similares en líneas celulares hepáticas donde se observó un incremento de la interacción PGC1 $\alpha$ -PPAR $\gamma$  en presencia de palmitato, activando rutas relacionadas con el metabolismo mitocondrial, glucídico y lipídico, mientras que en presencia de oleato no se observó ningún cambio en la expresión de PGC1 $\alpha$  y PPAR $\gamma$  (Maruyama et al., 2016). Incluso en otro estudio, se observó que la señalización de PPAR $\alpha$  y PPAR $\gamma$  fue inhibida en macrófagos tratados con oleato, incrementando los niveles de ciertos aminoácidos (glutamato, aspartato y alanina) y de triglicéridos, mientras que disminuía la cantidad de ácidos grasos libres en la célula (Ye et al., 2019).

Por el contrario, en condiciones hiperglucemia/hiperinsulinemia, la acetilación de FABP4 sí parece afectar a la acumulación de los lípidos. Concretamente, es importante analizar la distribución del tamaño de las gotas lipídicas, ya que el área ocupada por las gotas lipídicas es un indicativo de un mayor o menor grado de diferenciación adipocitaria. Así, cuanto más pequeñas son las gotas lipídicas, más favorecidos se encuentran los procesos de lipólisis, mientras que un incremento del tamaño de las mismas indica la activación de rutas lipogénicas en las células (Thiam y Beller, 2017; Yu y Li, 2017).

Por este motivo, también se analizó el tamaño de las gotas en los adipocitos transfectados con las diferentes formas de FABP4 y, en este caso, observamos que la forma mutada indujo la presencia de gotas de menor tamaño que la forma silvestre en condiciones de HGHI. Además, el ratio de distribución núcleo/citosol fue menor en células que expresaban la forma WT y eran expuestas a condiciones HGHI, mientras que dichas condiciones no afectaron la localización de la forma mutada. Estos resultados podrían estar relacionados, en el caso del WT, con un aumento de la lipogénesis *de novo*.

En estas condiciones, la glucosa, en exceso, serviría de sustrato para la síntesis de ácidos grasos y el glicerol necesario para su reesterificación (Ameer et al., 2014; Saponaro et al., 2015), en un proceso que estaría estimulado por la presencia adicional de un exceso de insulina. Se han encontrado resultados similares a los obtenidos en esta Tesis Doctoral en otros tipos celulares. Por ejemplo, trofoblastos expuestos a insulina exhibieron un incremento de la acumulación de lípidos y del contenido proteico de FABP4, efecto que fue parcialmente reducido al utilizar un inhibidor selectivo de FABP4, BMS309403 (Scifres et al., 2011). Por otro lado, también se ha observado un efecto estimulante de FABP4 sobre el metabolismo de los lípidos en cardiomiocitos y células renales, siendo reducido este efecto a través del uso de inhibidores de FABP4 (Rodríguez-Calvo et al., 2019).

En resumen, nuestros resultados describen, por primera vez, el perfil de proteínas acetiladas, el acetiloma, del tejido adiposo humano, indicando: (1) que una proporción considerable de las proteínas del tejido adiposo están acetiladas, poniendo en evidencia la importancia de esta PTM en el funcionamiento de dicho tejido; (2) la regulación por acetilación de proteínas puede subyacer en las diferencias entre los dos grandes depósitos de tejido adiposo, SC y OM, tanto en condiciones de normopeso como, sobre todo, en respuesta a la obesidad y la resistencia a insulina; y (3) la acción de FABP4, una proteína relevante en los adipocitos, por su función dual como chaperona intracelular de lípidos y como adipoquina, está regulada por su grado de acetilación, lo que puede tener consecuencias tanto en condiciones fisiológicas como patológicas.



A thick, hand-drawn style green border frames the page, starting from the top left and ending at the bottom right, leaving the central text area open.

# **CAPÍTULO 2**

**Efecto de la carbonilación de proteínas  
en la disfunción del tejido adiposo en  
obesidad y resistencia a insulina**





---

## **ANTECEDENTES**

---

La obesidad se caracteriza por la desregulación del tejido adiposo que predispone a los individuos al desarrollo de resistencia a insulina. A nivel molecular, la disfunción de los adipocitos se ha relacionado, en parte, con un aumento de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) desencadenado por el suministro excesivo de nutrientes que tiene lugar en obesidad promoviendo la aparición de estrés oxidativo (Vincent y Taylor, 2006; Curtis et al., 2012; Masschelin et al., 2020).

El exceso de algunas de estas especies reactivas de oxígeno provoca daño oxidativo en las células mediante su interacción con lípidos, dando lugar a peroxidación lipídica o uniéndose a residuos aminoacídicos de proteínas causando la carbonilación de proteínas (Catalán et al., 2018). Concretamente, la carbonilación de proteínas corresponde a una modificación postraducciona (MPT) no enzimática inducida por ROS que se desarrolla en condiciones de estrés oxidativo, por lo que se trata de un buen marcador de daño oxidativo del tejido adiposo en condiciones de obesidad. Esta MPT se genera por oxidación directa de las cadenas laterales de algunos residuos aminoacídicos, particularmente treonina (T), arginina (R), prolina (P) y lisina (K), transformándose en cetonas o derivados de aldehídos (Ghezzi y Bonetto, 2003). Estos cambios en las cadenas laterales son irreversibles provocando la disfunción de la proteína y, por tanto, su degradación (Catalán et al., 2018).

Hasta el momento, se han llevado a cabo estudios sobre el perfil de proteínas carboniladas en muestras de tejido adiposo procedentes de pacientes con diferentes IMC pero sin alteraciones en el patrón de sensibilidad a insulina. No obstante, un trabajo realizado en nuestro grupo en adipocitos humanos aislados (Díaz-Ruiz et al., 2015) y de otros grupos sobre grasa total (Xu et al., 2012) han permitido establecer que la resistencia a insulina lleva consigo un incremento global en los niveles de carbonilación de proteínas. Sin embargo, hasta la fecha, no se ha identificado el perfil de proteínas carboniladas ni existen estudios que determinen de forma cuantitativa las diferencias en el perfil de proteínas carboniladas en el tejido adiposo de individuos con obesidad con diferente de sensibilidad a insulina.

Por ello, a continuación se muestra un estudio proteómico comparativo de los depósitos SC y OM, en los grupos de pacientes analizados en la presente Tesis Doctoral, con el que se pretende conseguir los siguientes objetivos:

1. Identificar, describir y comparar –empleando la técnica 2DE– el perfil de proteínas carboniladas, o carboniloma, del tejido adiposo SC y OM en condiciones de obesidad y resistencia a insulina.
2. Analizar el impacto de la carbonilación de las proteínas identificadas en el desarrollo de resistencia a insulina asociada a la obesidad.
3. Evaluar el posible papel de la carbonilación de la transferrina en la alteración de la homeostasis del hierro y su papel en el metabolismo de los adipocitos.

---

## RESULTADOS

---

### 1. Características de los sujetos de estudio

Se reclutaron sujetos con obesidad mórbida procedentes de la Unidad de Lípidos y Aterosclerosis del Hospital Universitario Reina Sofía de Córdoba (cohorte 2). Como para la Cohorte 1, los pacientes de la Cohorte 2 se subclasificaron en: sujetos con obesidad normoglucémicos (Ob-NG) (Glucosa < 100 mg/dl y HbA1c < 5,7%); resistencia a insulina (Ob-IR) (Glucosa 100 - 126 mg/dl y HbA1c 5,7 – 6,4%) y o diabetes tipo 2 (Ob-T2D) (Glucosa > 126 mg/dl, HbA1c > 6,4%). Todos los parámetros antropométricos y clínicos asociados a los pacientes incluidos en este estudio se especifican en la **Tabla 11**.

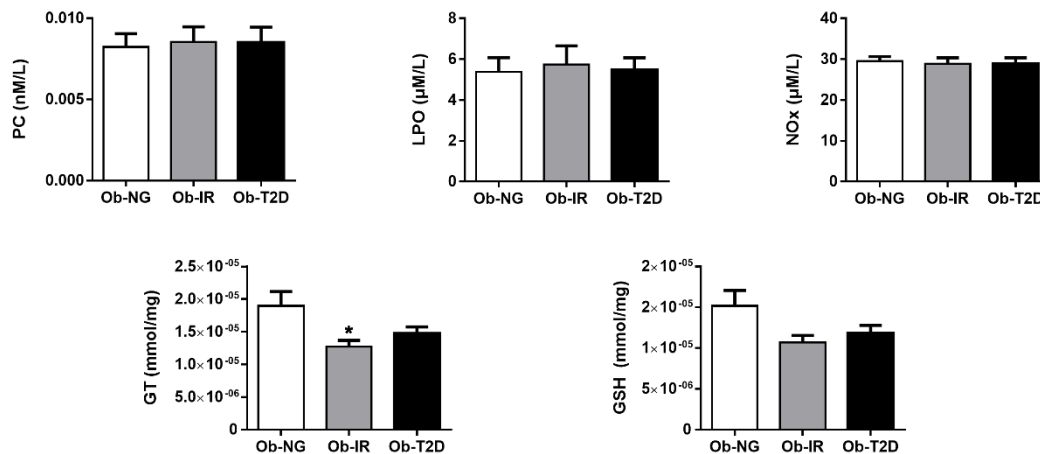
Así, se puede observar que las principales diferencias clínicas significativas entre grupos se refieren a la homeostasis glucémica, siendo significativamente diferentes los niveles de glucosa circulante y hemoglobina glicosilada, además de la insulina y el índice HOMA (**Tabla 11**). El resto de parámetros fue similar entre los grupos, salvo los niveles plasmáticos de triglicéridos, que fueron ligeramente superiores en los sujetos con obesidad y diabetes (**Tabla 11**).

**Tabla 11.** Características antropométricas y bioquímicas de los sujetos de este estudio.

	<b>Ob-NG (n=20)</b>	<b>Ob-IR (n=37)</b>	<b>Ob-T2D (n=16)</b>	<b>ANOVA</b>
<b>Sexo(hombre/mujer)</b>	8/12	11/26	8/8	
<b>Edad (años)</b>	34,50 ± 2,26	42,14 ± 1,68 <sup>a</sup>	44,69 ± 2,02 <sup>aa</sup>	<0,01
<b>Terapia hipolipemiente (n; %)</b>	2; 10	7; 19	4; 25	
<b>Terapia Antidiabética (n; %)</b>	2; 10	2; 5,4	8; 50	
<b>Terapia antihipertensiva (n; %)</b>	3; 15	18; 48,6	7; 43,8	
<b>Peso (kg)</b>	143,90 ± 6,5	148,60 ± 6,14	156,4 ± 6,26	ns
<b>IMC (kg/m<sup>2</sup>)</b>	52,38 ± 2,37	53,25 ± 1,80	54,53 ± 1,49	ns
<b>Circunferencia de la cintura (cm)</b>	136,6 ± 4,06	145,3 ± 3,85	149,0 ± 3,53	ns
<b>Glucosa (mg/dL)</b>	90,95 ± 2,00	107,9 ± 1,66 <sup>aaa</sup>	171,4 ± 9,92 <sup>aaa,bbb</sup>	<0,0001
<b>HbAc1 (mmol/mol)</b>	5,64 ± 0,12	6,24 ± 0,22 <sup>aa</sup>	9,17 ± 0,5 <sup>aaa,bbb</sup>	<0,0001
<b>HOMA-IR</b>	3,31 ± 0,37	5,49 ± 0,44 <sup>aa</sup>	8,44 ± 1,42 <sup>aaa</sup>	<0,001
<b>Insulina (mU/L)</b>	14,72 ± 1,5	21,06 ± 1,73	19,88 ± 2,56	ns
<b>Triglicéridos (mg/dL)</b>	121,1 ± 12,42	117 ± 7,91	195 ± 30,71 <sup>aa,bb</sup>	<0,001
<b>Colesterol (mg/dL)</b>	182 ± 10,68	201,1 ± 5,96	195,8 ± 9,5	ns
<b>HDL (mg/dL)</b>	40,47 ± 3,05	41,86 ± 1,5	35,5 ± 1,66	ns
<b>LDL (mg/dL)</b>	121,2 ± 8,47	136 ± 4,9	118,6 ± 7,99	ns
<b>Hemoglobina (g/dL)</b>	13,74 ± 0,38	13,31 ± 0,28	14,08 ± 0,47	ns
<b>Hematocrito (%)</b>	41,52 ± 0,94	39,47 ± 1,25	42,61 ± 1,11	ns
<b>Hierro (µg/dL)</b>	82,42 ± 6,28	68,35 ± 5,33	69,13 ± 7,74	ns
<b>Ferritina (ng/mL)</b>	83,59 ± 18,04	98,54 ± 15,09	149,9 ± 27,56	ns
<b>Transferrina (mg/dL)</b>	254 ± 12,39	279,6 ± 8,04	276,1 ± 10,07	ns

Los datos se representan como la media ± SEM. *p* value fue analizado utilizando el análisis de varianzas One-Way (ANOVA) y su correspondiente test post-hoc. <sup>a</sup>p<0,05, <sup>aa</sup>p<0,01, <sup>aaa</sup>p<0,001 vs. Ob-NG; <sup>bb</sup>p<0,01, <sup>bbb</sup>p<0,001 vs. Ob-IR; ns, no significativo. Ob-NG: obesos normoglucémicos; Ob-IR: obesos insulinoresistentes; Ob-T2D: obesos con diabetes tipo 2; BMI: índice de masa corporal; HOMA-IR: índice de resistencia a insulina; HDL: lipoproteína de alta densidad; LDL: lipoproteína de baja densidad.

También se midieron marcadores de estrés oxidativo en plasma y se observó una disminución de los niveles de glutatión total (GT) y glutatión reducido (GSH) en los sujetos con obesidad y resistencia a insulina, aunque solo fue significativa esa caída en el caso del GT (**Figura 49**).

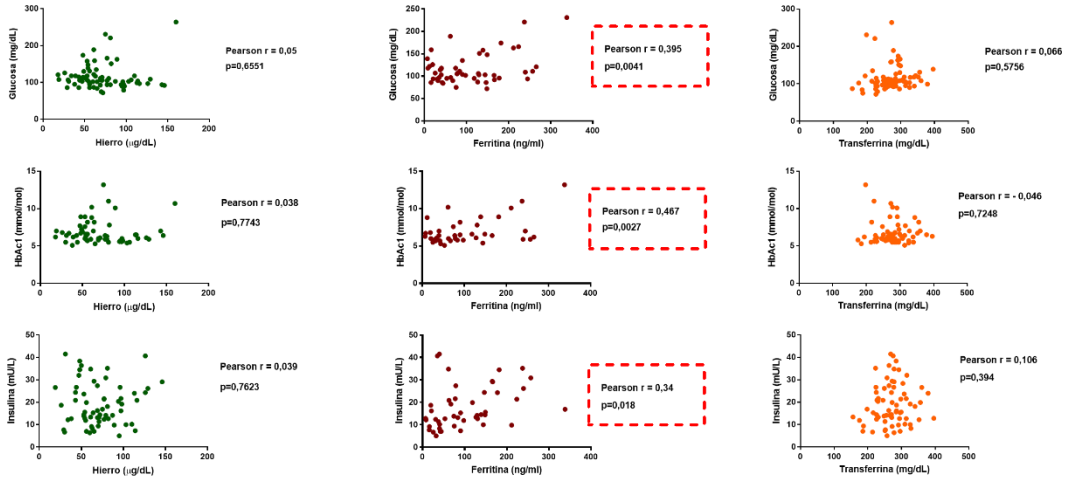


**Figura 49.** Análisis de marcadores plasmáticos de estrés oxidativo en los sujetos de estudio subclasificados en tres grupos en función de sus niveles de glucosa en ayunas y su valor de hemoglobina glicosilada: Ob-NG = pacientes con obesidad normoglucémicos. Ob-IR = pacientes con obesidad y resistencia a insulina. Ob-T2D = pacientes con obesidad y diabetes tipo 2; PC = grupos carbonilos en proteínas; LPO = productos de peroxidación lipídica; NOx = nitritos totales; GT = glutatión total; GSH = glutatión reducido. Los datos están representados como la media ± SEM. Las diferencias significativas están indicadas como \* $p < 0,05$  vs. Ob-NG.

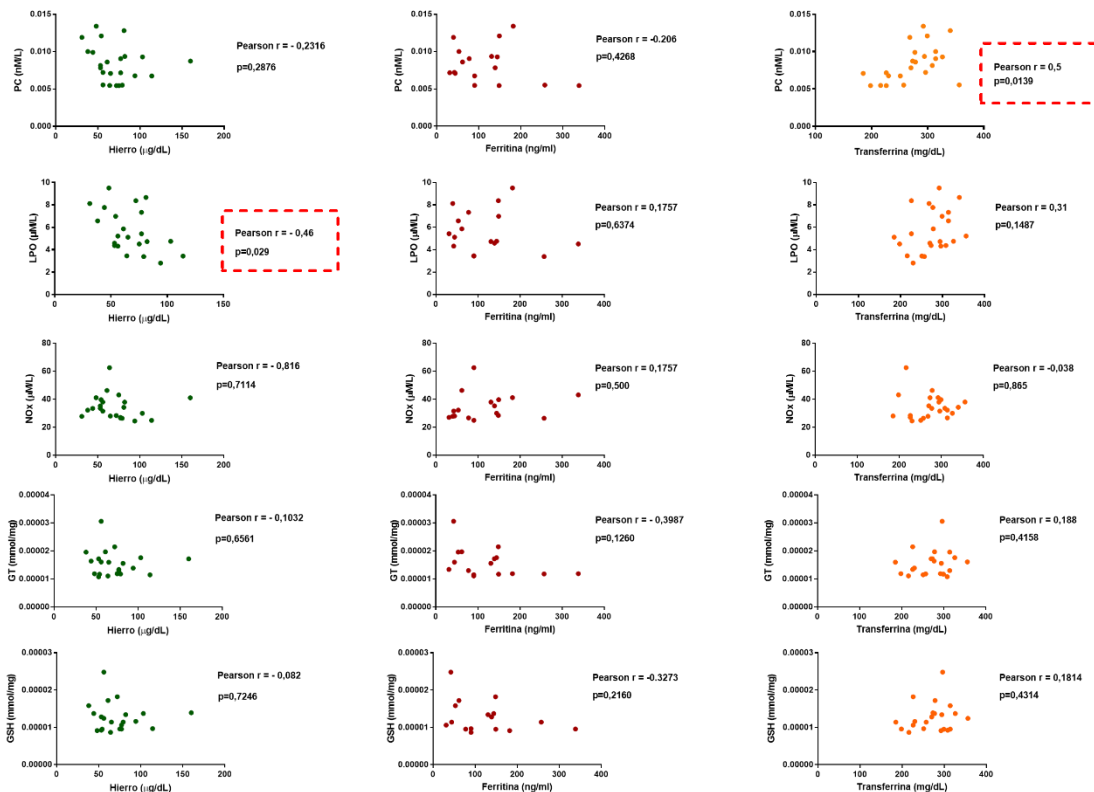
Adicionalmente y debido a la relación propuesta en bibliografía sobre la resistencia a insulina y alteraciones en el metabolismo del hierro, se analizó la homeostasis del hierro. Se observó una disminución en los niveles de hierro plasmático y un aumento de los niveles de ferritina y transferrina en sujetos Ob-IR y Ob-T2D, aunque estos cambios no alcanzaron diferencias significativas (**Tabla 11**). No obstante, análisis posteriores de correlación mostraron diferencias significativas con el metabolismo de la glucosa. Específicamente, la ferritina correlacionó positivamente con la glucosa ( $r = 0,39$ ;  $p = 0,0041$ ), con HbA1c ( $r = 0,46$ ;  $p = 0,0027$ ) y con los niveles de insulina ( $r = 0,34$ ;  $p = 0,018$ ) (**Figura 50**), lo que indica una asociación entre el hierro con el estado glucémico en obesidad y resistencia a insulina. Además, el hierro correlacionó negativamente con los productos de peroxidación lipídica ( $r = -0,46$ ;  $p = 0,029$ ) y la transferrina correlacionó positivamente con los grupos carbonilo en proteínas ( $r = 0,5$ ;  $p = 0,0139$ ) (**Figura 50**). Estas asociaciones sugieren que la desregulación del metabolismo del hierro también

podría relacionarse con el estrés oxidativo existente en condiciones de obesidad y resistencia a insulina.

### Correlaciones metabolismo hierro - glucosa



### Correlaciones metabolismo hierro - estrés oxidativo



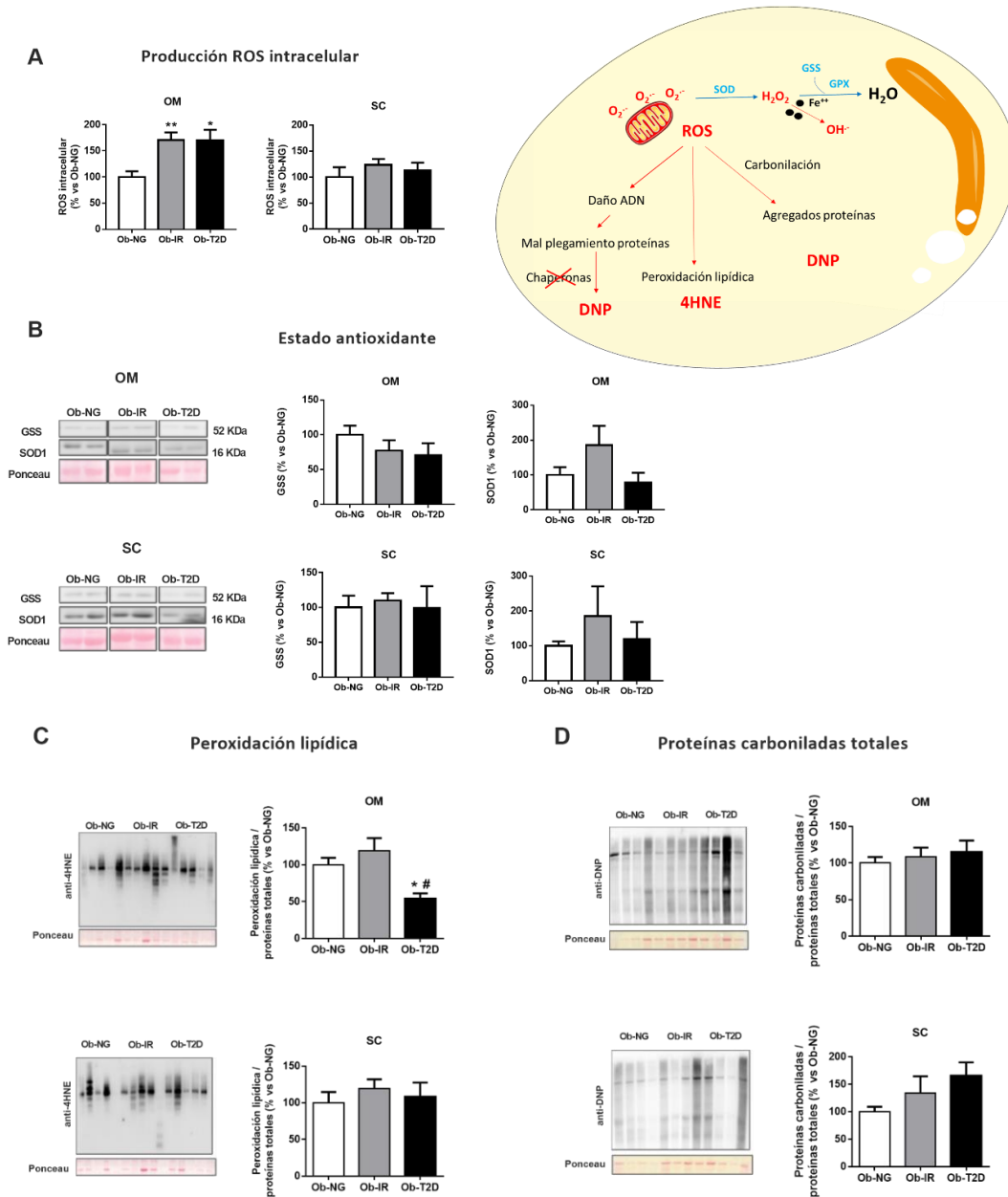
**Figura 50.** Análisis de correlaciones mediante el coeficiente de correlación de Pearson entre los parámetros plasmáticos asociados a la homeostasis del hierro y el metabolismo de la glucosa así como entre marcadores de estrés oxidativo y proteínas del metabolismo del hierro determinados en los sujetos de la cohorte 2. Los recuadros rojos indican aquellas correlaciones que muestran diferencias significativas entre los dos parámetros.

## **2. Estado redox del tejido adiposo en resistencia a la insulina asociada a la obesidad**

En primer lugar, se analizó el estado redox de tejido adiposo SC y OM en los diferentes grupos de sujetos de estudio mediante la medida de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) intracelulares. Se observó que el depósito OM mostró una mayor producción de ROS intracelulares en los sujetos Ob-IR y Ob-T2D vs. Ob-NG. Por el contrario, no se detectaron diferencias en el depósito SC (**Figura 51A**). A continuación, se determinaron los niveles de expresión de las enzimas antioxidantes glutatión sintetasa (GSS) y superóxido dismutasa (SOD1), que mostraron un perfil muy similar entre los grupos, sin que se detectaran diferencias significativas (**Figura 51B**).

Con el fin de profundizar en un posible daño celular derivado del aumento de producción de radicales libres, se determinó el grado de peroxidación lipídica mediante: (1) la medida de aductos de 4-hidroxinonenal (4-HNE) y (2) la medida del total de proteínas carboniladas a través de la sustitución de los grupos carbonilo (C=O) de las proteínas por el grupo DNP (dinitrofenilo). Los datos mostraron que, en el depósito OM, los sujetos Ob-T2D mostraron una disminución en el contenido de 4-HNE frente a Ob-NG y Ob-IR. Nuevamente, el depósito SC no mostró cambios en los niveles de 4-HNE (**Figura 51C**). En cuanto al contenido de proteínas carboniladas totales, no se detectaron diferencias significativas en la expresión de DNP en ambos depósitos (**Figura 51D**). Estos datos sugieren que, si bien se detecta una mayor producción de radicales libres en el depósito OM, no parece ser en cantidad suficiente como para generar un daño generalizado sobre las proteínas o los lípidos.

Capítulo 2: Efecto de la carbonilación de proteínas en la disfunción del tejido adiposo en obesidad y resistencia a insulina



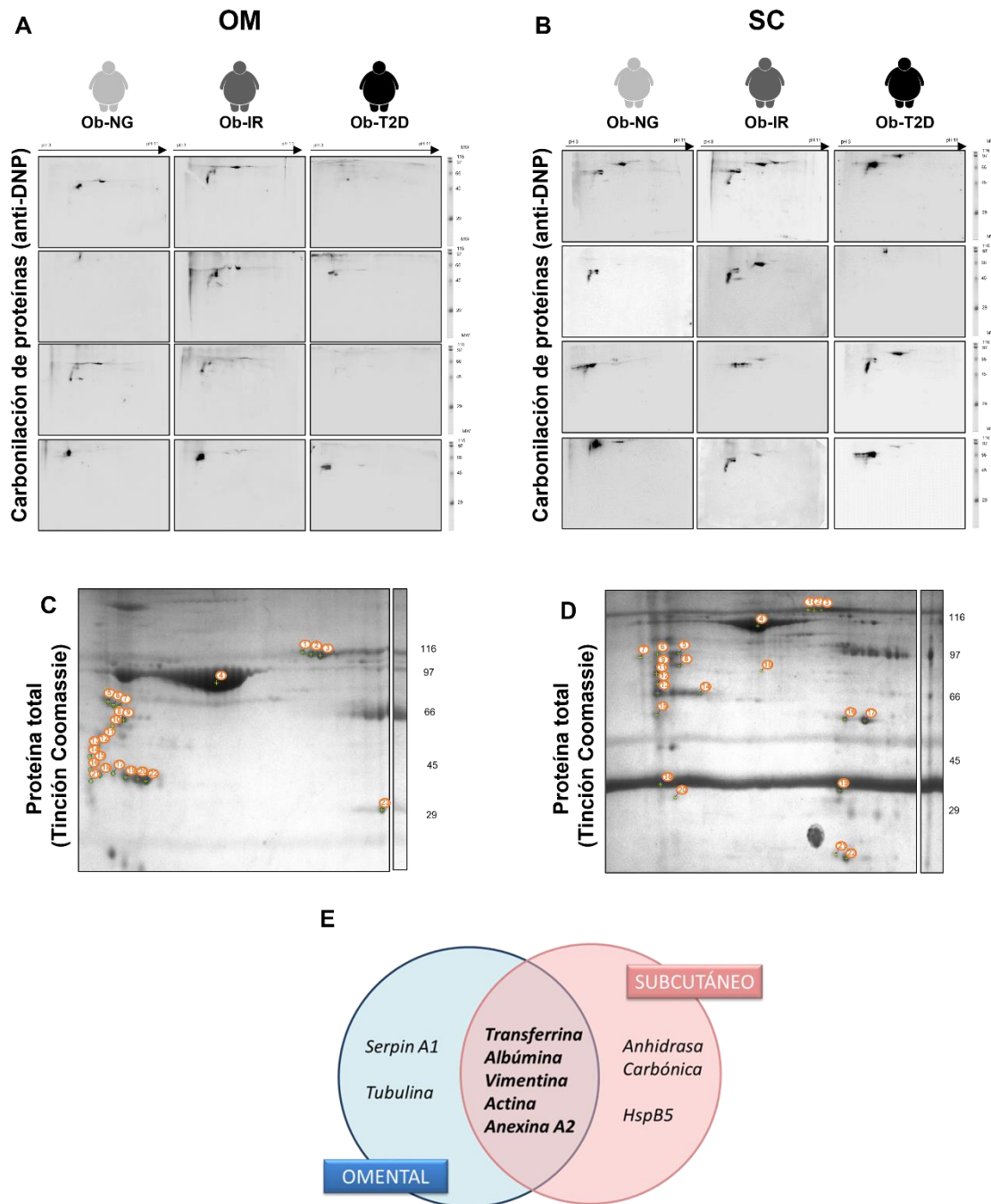
**Figura 51.** Estado redox del tejido adiposo en la resistencia a insulina asociada a la obesidad. **A.** Producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) intracelulares en muestras pareadas de tejido adiposo omental (OM) y subcutáneo (SC) de sujetos con obesidad normoglucémicos (Ob-NG), pacientes con obesidad y resistencia a insulina (Ob-IR) y pacientes con obesidad y diabetes tipo 2 (Ob-T2D) (panel izquierdo). Efectos de las ROS. Imagen derecha creada con elementos del repositorio SMART (Servier Medical Art). **B.** Bandas inmunorreactivas y análisis de los niveles de proteínas de las enzimas antioxidantes GSS y SOD1 en extractos proteicos de SC y OM de Ob-NG, Ob-IR y Ob-T2D. **C.** Bandas inmunorreactivas y análisis del grado de peroxidación lipídica en extractos proteicos de SC y OM de Ob-NG, Ob-IR y Ob-T2D. **D.** Bandas inmunorreactivas y análisis del total de proteínas carboniladas en extractos proteicos de SC y OM de Ob-NG, Ob-IR y Ob-T2D. En todos los casos, los datos están representados como la media  $\pm$  SEM (n = 10 individuos/grupo en producción ROS; n = 5 individuos/grupo WB). Las diferencias significativas están indicadas como \*p < 0,05 vs. Ob-NG; \*\*p < 0,01 vs. Ob-NG; #p < 0,05 vs. Ob-IR.



### 3. Identificación del carboniloma del tejido adiposo en condiciones de obesidad y resistencia a insulina

La carbonilación de proteínas es una modificación postraduccional de proteínas irreversible inducida por la producción de ROS. Así, teniendo en cuenta los datos previos obtenidos sobre las diferencias específicas de depósito en la producción de las ROS intracelulares, se analizó la huella de proteínas carboniladas (carboniloma) para identificar posibles cambios influenciados por el estrés oxidativo en la señalización de la insulina.

Para ello, se realizó un estudio proteómico basado en la identificación de proteínas carboniladas mediante separación por electroforesis bidimensional (2D-PAGE) e identificación de proteínas mediante inmunorreacción con anticuerpo anti-DNP. Así, se identificó el subconjunto de proteínas carboniladas del tejido adiposo OM (**Figura 52A**) y SC (**Figura 52B**) en sujetos con obesidad y diferentes grados de sensibilidad a insulina (Ob-NG, Ob-IR y Ob-T2D). Se detectaron un total de 23 *spots* en el depósito OM y 22 *spots* en el depósito SC (**Figura 52C y 52D**). El análisis proteómico posterior de esos *spots* identificó un total de 14 proteínas carboniladas expresadas en el tejido adiposo, 7 en el tejido adiposo OM y 7 en el depósito SC (**Tabla 12**). Entre ellas, 5 proteínas, incluidas la transferrina, la albúmina, la vimentina, la actina y la anexina A2, fueron comunes en ambos depósitos. También se detectaron dos proteínas específicas de cada depósito: la anhidrasa carbónica y la proteína de choque térmico  $\beta$ -5 (HspB5) en el depósito SC y, serpin A1 y tubulina en el depósito OM (**Figura 52E**).



**Figura 52.** Determinación del carboniloma del tejido adiposo en condiciones de obesidad y resistencia a insulina. Aproximación proteómica 2D-PAGE en tejido adiposo omental (A) y subcutáneo (B) en sujetos Ob-NG (obesidad y normoglucemia), Ob-IR (obesidad y resistencia a insulina) y Ob-T2D (obesidad y diabetes tipo 2). Tinción Coomassie para la visualización y posterior análisis de los spots identificados en la 2D-PAGE en OM (C) y SC (D). E. Diagrama de Venn de las proteínas carboniladas identificadas (comunes y específicas de cada depósito) en el depósito omental y subcutáneo de individuos Ob-NG, Ob-IR y Ob-T2D.

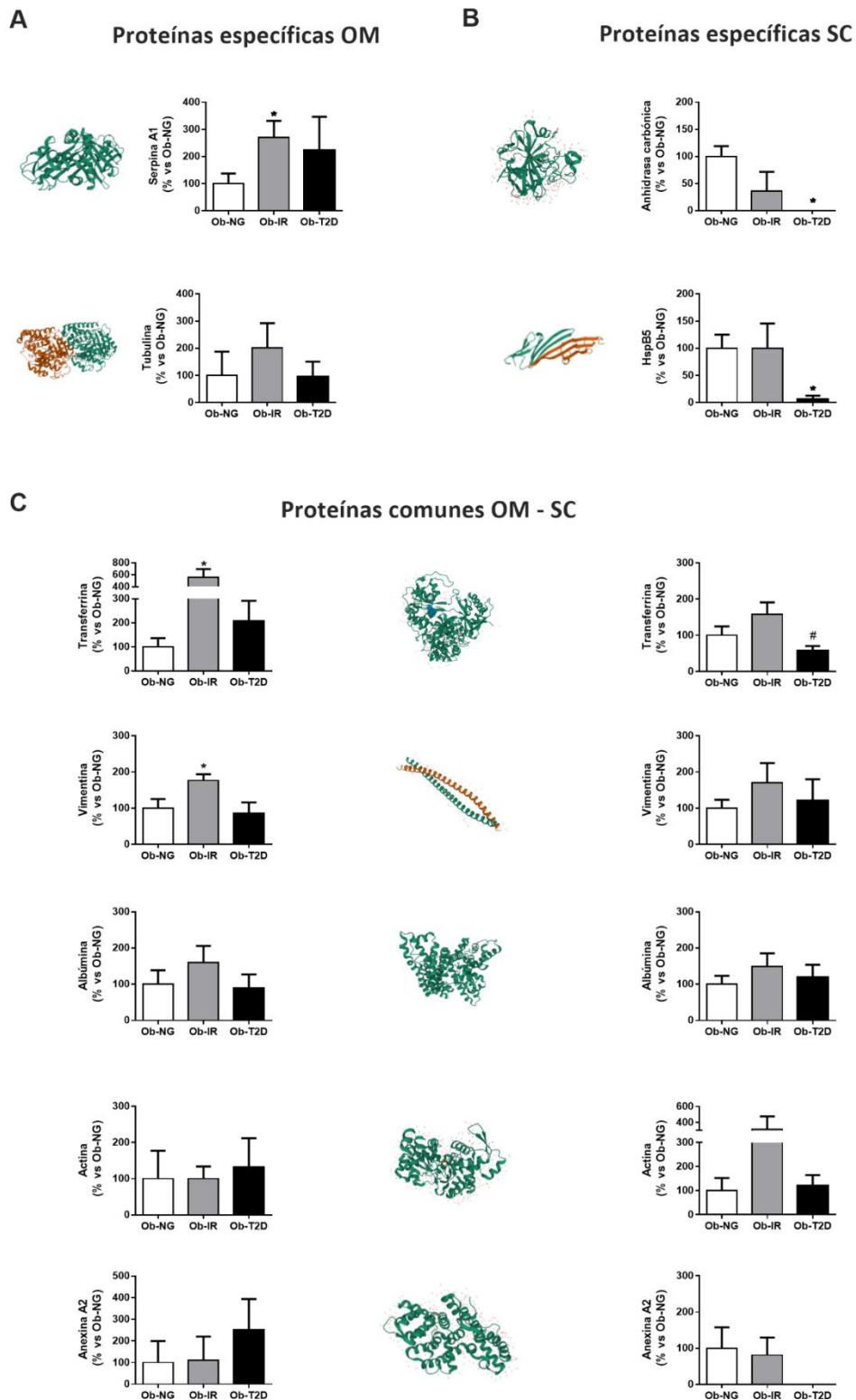
**Tabla 12.** Proteínas carboniladas identificadas por MALDI-TOF/TOF en el tejido adiposo humano.

Nº spot. <sup>a</sup>	Nombre proteína	Símbolo	Número acceso <sup>b</sup>	MW (KDa)/pI	%Cober. <sup>c</sup>	Pep. <sup>d</sup>	Punt. <sup>e</sup>
<b>Tejido Adiposo Omental (OM)</b>							
1	Transferrina	TRFE_HUMAN	P02787	79,3/6,81	24	19	222
2	Transferrina	TRFE_HUMAN	P02787	79,3/6,81	35	32	613
3	Transferrina	TRFE_HUMAN	P02787	79,3/6,81	39	35	695
4	Albúmina sérica	ALBU_HUMAN	P02768	71,3/5,92	54	38	760
5	Alpha-1-antitripsina	A1AT_HUMAN	P01009	46,9/5,37	43	19	297
6	Alpha-1-antitripsina	A1AT_HUMAN	P01009	46,9/5,37	25	14	106
7	Alpha-1-antitripsina	A1AT_HUMAN	P01009	46,9/5,37	43	19	252
8	Vimentina	VIME_HUMAN	P08670	53,7/5,05	61	32	512
9	Vimentina	VIME_HUMAN	P08670	53,7/5,05	54	30	548
10	Tubulina beta-4B	TBB4B_HUMAN	P68371	50,3/4,79	27	14	157
11	Alpha-1-antitripsina	A1AT_HUMAN	P01009	46,9/5,37	40	18	368
12	Vimentina	VIME_HUMAN	P08670	53,7/5,05	51	25	454
13	Vimentina	VIME_HUMAN	P08670	53,7/5,05	59	34	548
14	Vimentina	VIME_HUMAN	P08670	53,7/5,05	31	23	378
15	Vimentina	VIME_HUMAN	P08670	53,7/5,05	42	26	403
16	Vimentina	VIME_HUMAN	P08670	53,7/5,05	31	19	241
17	No detectado						
18	No detectado						
19	Actina, citoplasmática 1	ACTB_HUMAN	P60709	42,1/5,29	27	18	352
20	Actina, citoplasmática 1	ACTB_HUMAN	P60709	42,1/5,29	57	21	488
21	Vimentina	VIME_HUMAN	P08670	53,7/5,05	47	30	452
22	Actina, citoplasmática 1	ACTB_HUMAN	P60709	42,1/5,29	53	26	487
23	Anexina A2	ANXA2_HUMAN	P07355	38,8/7,57	52	22	430
<b>Tejido Adiposo Subcutáneo (SC)</b>							
1	Transferrina	TRFE_HUMAN	P02787	79,3/6,81	21	15	198
2	Transferrina	TRFE_HUMAN	P02787	79,3/6,81	27	21	259
3	No detectado						
4	Albúmina sérica	ALBU_HUMAN	P02768	71,3/5,92	58	40	686
5	Vimentina	VIME_HUMAN	P08670	53,7/5,05	56	30	510
6	Vimentina	VIME_HUMAN	P08670	53,7/5,05	28	14	147
7	Vimentina	VIME_HUMAN	P08670	53,7/5,05	17	9	43
8	Vimentina	VIME_HUMAN	P08670	53,7/5,05	42	22	432
9	Vimentina	VIME_HUMAN	P08670	53,7/5,05	23	11	123
10	No detectado						
11	No detectado						
12	No detectado						
13	Vimentina	VIME_HUMAN	P08670	53,7/5,05	29	15	188
14	Actina, citoplasmática 2	ACTG_HUMAN	P60709	42,1/5,29	46	15	379
15	No detectado						
16	No detectado						
17	Anexina A2	ANXA2_HUMAN	P07355	38,8/7,57	50	24	553
18	Actina, citoplasmática 2	ACTG_HUMAN	P60709	42,1/5,29	30	9	159
19	Anhidrasa carbónica 1	CAH1_HUMAN	P00915	28,9/6,59	57	15	401
20	No detectada						
21	Alpha-cristalina B	CRYAB_HUMAN	P02511	20,1/6,76	48	8	59
22	Alpha-cristalina B	CRYAB_HUMAN	P02511	20,1/6,76	57	14	237

<sup>a</sup> Número de *spot* correspondiente a la Figura 4C (OM) y 4D (SC). <sup>b</sup> Número de acceso para la base de datos del NCBI. MW = peso molecular. <sup>c</sup> Cobertura de todas las secuencias peptídicas coincidentes con la proteína identificada (%). <sup>d</sup> Pep. corresponde al número de péptidos identificados (Mascot). <sup>e</sup> Punt. se refiere a la puntuación del *spot*.

Posteriormente, se llevaron a cabo las cuantificaciones de los diferentes *spots* identificados correspondientes a la expresión de proteínas carboniladas. Así, en el depósito OM, la expresión de la proteína serpin A1 carbonilada, una proteasa inhibidora de serinas e implicada, por tanto, en el control de la respuesta a estrés del retículo endoplasmático (RE), fue significativamente mayor en los sujetos Ob-IR vs. Ob-NG (**Figura 53A**). Sin embargo, no se observaron diferencias con el grupo de pacientes Ob-T2D. Por el contrario, en el depósito SC, la expresión de la anhidrasa carbónica carbonilada se redujo significativamente en los individuos Ob-T2D en comparación con los Ob-NG (**Figura 53B**). Por último, entre las proteínas carboniladas comunes, solo la transferrina, proteína transportadora de hierro, y la vimentina, componente del citoesqueleto, mostraron diferencias significativas en su grado de carbonilación en Ob-IR vs. Ob-NG en el depósito OM (**Figura 53C**) mientras que, en grasa SC, solo la expresión de la transferrina carbonilada se redujo significativamente en Ob-T2D comparados con los sujetos Ob-IR. No se observaron diferencias significativas en la expresión de otras proteínas carboniladas comunes.

Estos resultados muestran diferencias en la expresión del perfil de proteínas carboniladas que podrían comprometer la respuesta al estrés del RE y la homeostasis del hierro en el tejido adiposo, siendo, además, el depósito OM más susceptible de mostrar cambios por carbonilación de proteínas que el depósito SC.



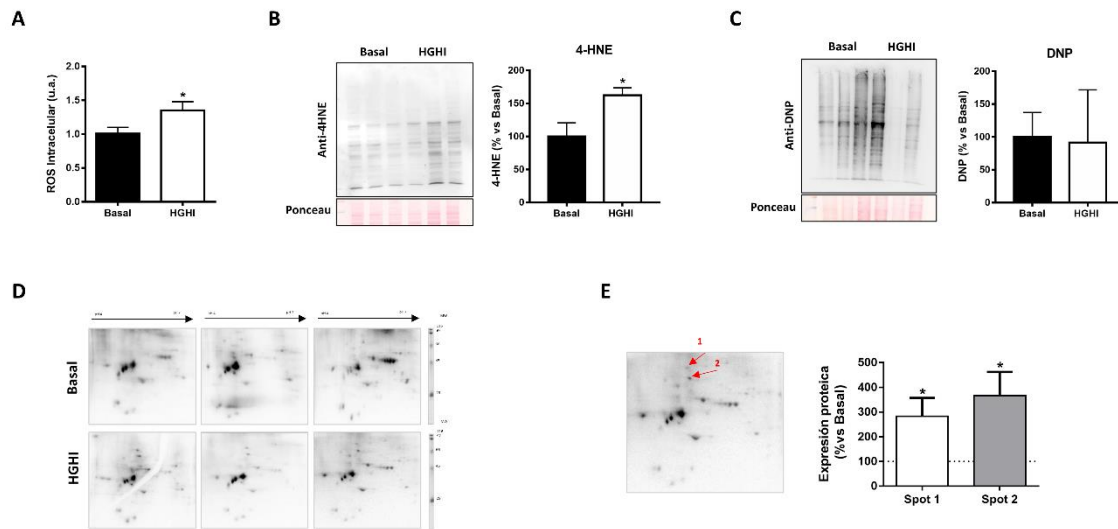
**Figura 53.** Cuantificación de los *spots* identificados correspondientes a proteínas carboniladas. Análisis de la expresión de las proteínas carboniladas específicas del depósito omental (OM) (A) y del subcutáneo (SC) (B) en individuos con obesidad y normoglucesmia (Ob-NG), pacientes con obesidad y resistencia a insulina (Ob-IR) y sujetos con obesidad y diabetes tipo 2 (Ob-T2D). C. Cuantificación de las proteínas carboniladas comunes en OM y SC en Ob-NG, Ob-IR y Ob-T2D. En todos los casos, los datos están representados como la media  $\pm$  SEM ( $n = 4$  individuos / grupo). Las diferencias significativas están indicadas como \* $p < 0,05$  vs. Ob-NG; # $p < 0,05$  vs. Ob-IR.

#### 4. El efecto de la hiperglucemia/hiperinsulinemia sobre el carboniloma del tejido adiposo

Para esclarecer la relación entre el mecanismo molecular relacionado con la resistencia a la insulina y el proceso de carbonilación en el tejido adiposo, se utilizó el modelo *in vitro* de resistencia a la insulina mediante la exposición a altas concentraciones de glucosa e insulina (HGHI) en adipocitos 3T3-L1. Inicialmente, se midieron los niveles intracelulares de ROS (**Figura 54A**) y se determinó el grado de peroxidación lipídica mediante la medida de los niveles de 4-HNE (**Figura 54B**), observándose un incremento significativo de ambos parámetros en los adipocitos expuestos a condiciones HGHI en comparación con las condiciones basales. Estos resultados sugieren un aumento del estrés oxidativo en los adipocitos provocado por la hiperglucemia/hiperinsulinemia. Por el contrario, no se observaron diferencias en los niveles totales de proteínas carboniladas (**Figura 54C**), lo que está de acuerdo con lo observado en las muestras de tejido adiposo humano.

Finalmente, se llevó a cabo una aproximación proteómica 2DE similar a la realizada en las muestras humanas para identificar posibles diferencias en la huella de proteínas carboniladas en los adipocitos 3T3-L1 expuestos a condiciones HGHI (**Figura 54D**). En este modelo, se observó un aumento significativo en 2 proteínas carboniladas entre las dos condiciones de estudio: HspA4, proteína chaperona implicada en la degradación de proteínas y VCP, componente del complejo ternario, involucrado en la degradación de proteínas a través del proteasoma (**Figura 54E; Tabla 13**).

Estos resultados mostraron que la exposición a condiciones de hiperglucemia/hiperinsulinemia en adipocitos 3T3-L1 promueve la carbonilación de proteínas relacionadas con el estrés del RE y la degradación de proteínas, datos similares a los encontrados en las muestras humanas, en las que también detectamos la carbonilación de la proteína HspB5, otra chaperona implicada en la degradación de proteínas a través del proteasoma. En conjunto, estos resultados evidencian un posible papel de la respuesta al estrés del RE y de la disfunción de la degradación de proteínas mediada por la carbonilación de proteínas en la resistencia a la insulina.



**Figura 54.** Estado redox y aproximación proteómica 2DE en adipocitos 3T3-L1 expuestos al modelo *in vitro* de alta glucosa y alta insulina (HGHI). **A.** Producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) intracelulares en adipocitos 3T3-L1 expuestos a condiciones basales (basal) o a altas concentraciones de glucosa (4,5 g/L) y de insulina (100 nM) durante 24 horas (HGHI). Los datos están representados como la media  $\pm$  SEM ( $n = 3$  repeticiones/condición). Las diferencias significativas están indicadas como  $*p < 0,05$  vs. basal. **B.** Bandas inmunorreactivas y análisis del grado de peroxidación lipídica en extractos proteicos de células 3T3-L1 en condiciones basales o de HGHI. Los datos están representados como la media  $\pm$  SEM ( $n = 3$  repeticiones/condición). Las diferencias significativas están indicadas como  $*p < 0,05$  vs. basal. **C.** Bandas inmunorreactivas y análisis del total de proteínas carboniladas extractos proteicos de células 3T3-L1 en condiciones basales o de HGHI. En todos los casos, los datos están representados como la media  $\pm$  SEM ( $n = 3$  repeticiones/condición). **D.** Aproximación proteómica 2DE en adipocitos 3T3-L1 expuestos a condiciones basales o a altas concentraciones de glucosa e insulina (HGHI). **E.** Tinción Coomassie y análisis de los 2 *spots* identificados con diferencias significativas entre las condiciones basales y HGHI. Los datos están representados como la media  $\pm$  SEM ( $n = 3$  repeticiones/condición). Las diferencias significativas están indicadas como  $*p < 0,05$  vs. basal.

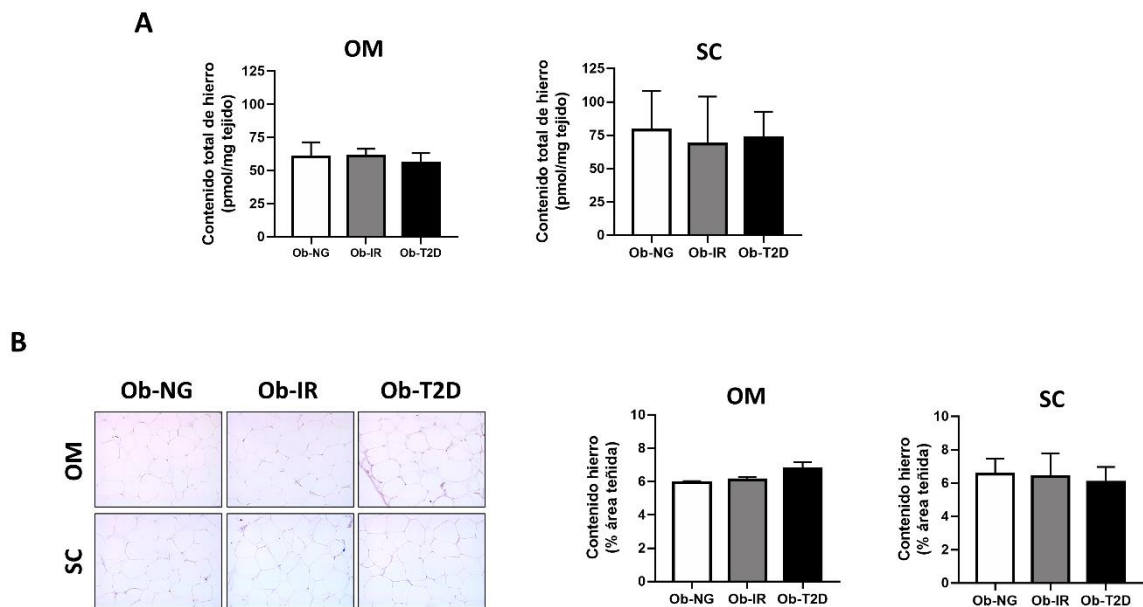
**Tabla 13.** Proteínas carboniladas identificadas por MALDI-TOF/TOF en el modelo *in vitro* HGHI.

Nº <i>spot</i> . <sup>a</sup>	Nombre proteína	Símbolo	MW (KDa)/pI	%Cober. <sup>b</sup>	Pep. <sup>c</sup>	Punt. <sup>d</sup>
1	<i>Heat shock 70 KDa protein 4</i>	HspA4	94/5,37	12	8	151
2	<i>Transitional endoplasmic reticulum ATPase</i>	VCP	89/5,14	42	27	323

<sup>a</sup> Número de *spot* correspondiente a la Figura 53E. <sup>b</sup> Cobertura de todas las secuencias peptídicas coincidentes con la proteína identificada (%). MW = peso molecular. <sup>c</sup> Pep. corresponde al número de péptidos identificados (Mascot). <sup>d</sup> Punt. se refiere a la puntuación del *spot*.

## 5. Homeostasis del hierro en el tejido adiposo en la resistencia a la insulina asociada a la obesidad

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en los estudios de correlación plasmáticos, y los cambios observados en la carbonilación de la transferrina, el siguiente paso se centró en analizar la homeostasis del hierro en el tejido adiposo en condiciones de obesidad y resistencia a insulina. Así, inicialmente, se analizó el contenido de hierro en ambos depósitos grasos en los diferentes grupos de estudio. No se observaron diferencias en el contenido total de hierro (**Figura 55A**), ni en el contenido de hierro férrico (**Figura 55B**) entre los grupos, en ninguno de los depósitos.



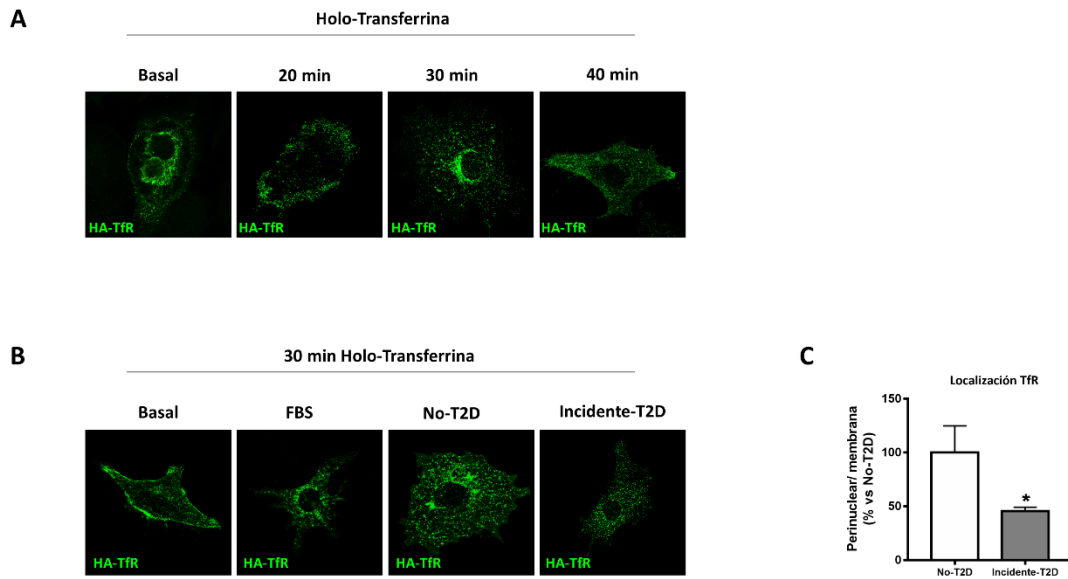
**Figura 55.** Análisis del metabolismo del hierro en el tejido adiposo humano en condiciones de obesidad y resistencia a insulina. **A.** Contenido de hierro total en el depósito omental (OM) y subcutáneo (SC) de sujetos con obesidad normoglucémicos (Ob-NG), pacientes con obesidad y resistencia a insulina (Ob-IR) y pacientes con obesidad y diabetes tipo 2 (Ob-T2D). Los datos están representados como la media  $\pm$  SEM (n = 5 individuos / grupo). **B.** Cortes histológicos del depósito OM y SC de individuos Ob-NG, Ob-IR y Ob-T2D teñidos con la tinción azul de Prusia de Perl (*Perl's Prussian Blue*) y análisis de los cortes. Los datos están representados como la media  $\pm$  SEM (n = 5 individuos / grupo).



Con el fin de analizar más específicamente el papel de la transferrina en adipocitos en condiciones de resistencia a insulina, se realizaron estudios de la translocación del receptor de transferrina (TfR). Para ello, se transfectaron células 3T3-L1 con la construcción HA-TfR (HA como etiqueta de la construcción) y se expusieron a sueros de pacientes incluidos en un estudio de intervención dietética (CORDIOPREV). Este estudio incluye a sujetos no diabéticos y sujetos que desarrollaron T2D (diabéticos incidentes) tras 60 meses de seguimiento del estudio. Posteriormente, las células se estimularon con holo-transferrina y se procedió al análisis de la translocación del TfR utilizando anticuerpo anti-HA.

En primer lugar, se analizó la localización del receptor de transferrina en respuesta a un estímulo de holo-transferrina. Concretamente, se evaluó el *time-course* del proceso de internalización del TfR en adipocitos 3T3-L1 transfectados con HA-TfR bajo un estímulo de holo-transferrina (20, 30 y 40 min). La **figura 56A** muestra la internalización del TfR desde la membrana plasmática al citosol a los 20 min de estímulo de holo-transferrina, concentrándose en la posición perinuclear a los 30 min y volviendo hacia la superficie celular tras 40 min, reduciendo la señal perinuclear.

A continuación, se evaluó la internalización del TfR en células 3T3-L1 transfectadas con la construcción HA-TfR y expuestas a sueros de pacientes con o sin incidencia de diabetes para emular las condiciones de resistencia a insulina. En este caso se observó que los adipocitos expuestos a condiciones de incidencia de diabetes, mostraron una menor señal del TfR en la región perinuclear que la condición estimulada con suero de individuos que no desarrollaron diabetes, o con FBS –como control basal– (**Figura 56B y 56C**).



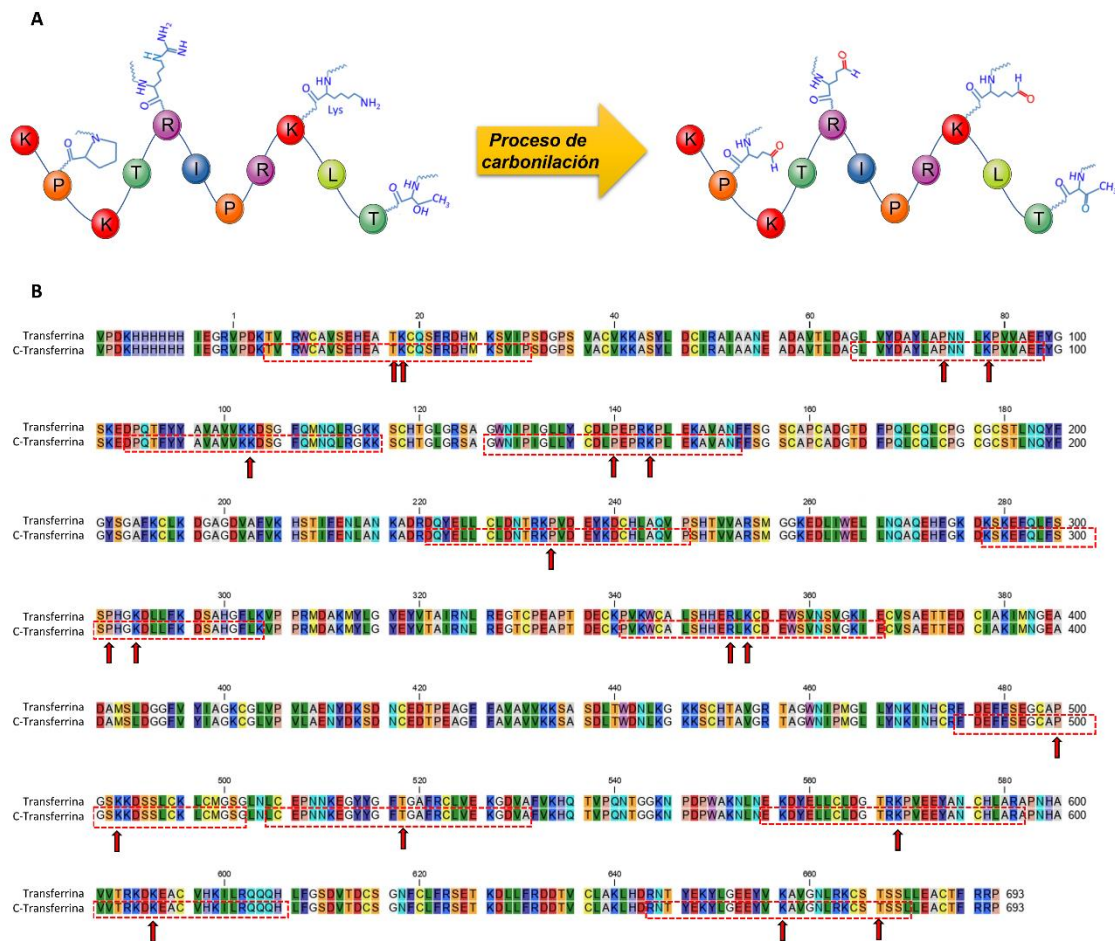
**Figura 56.** Estudio de la internalización del receptor de transferrina en condiciones de resistencia a insulina. **A.** Imágenes de microscopía confocal representativas del *time course* del proceso de internalización del receptor de transferrina, TfR, en adipocitos 3T3-L1 transfectados con HA-TfR bajo un estímulo de holo-transferrina (20, 30 y 40 min) en condiciones basales. **B.** Imágenes confocales representativas de la internalización del TfR en células 3T3-L1 transfectadas con la construcción HA-TfR y expuestas a sueros de pacientes no diabéticos (No-T2D) y sueros de pacientes que han desarrollado diabetes tipo 2 (Incidente-T2D) y posterior estímulo de 30 min con holo-transferrina **C.** Cuantificación de la localización perinuclear/membrana de HA-TfR en células 3T3-L1 expuestas a sueros de pacientes No-T2D e Incidentes-T2D mediante análisis de las imágenes confocales. Los datos están representados como la media  $\pm$  SEM (8-10 imágenes confocales/condición). Las diferencias significativas están indicadas como \* $p < 0,05$  vs. No-T2D.

Aunque ambas condiciones indujeron una internalización del TfR, correspondiente a la captación de hierro, los pacientes con diabetes incidente mostraron diferencias subcelulares en la localización del TfR relacionadas, principalmente, con el tiempo de respuesta/recuperación del proceso de internalización del TfR. Esto podría estar relacionado con la respuesta insulínica defectuosa inicial observada en sujetos con T2D incidente, ya que se ha observado que parte del transporte de glucosa al interior de las células está mediado por internalización del receptor de transferrina.

## 6. Estudios de interacción entre receptor de transferrina-transferrina-hierro

Para caracterizar el posible efecto de la carbonilación de la transferrina en la homeostasis del hierro, se estudió la interacción entre el receptor de transferrina (TfR) y transferrina (Tf) mediante *docking* molecular *in silico* empleando el modelado molecular del complejo receptor de transferrina 1 y transferrina con hierro conjugado en el lóbulo N (código PDB: 3S9L). Tanto el receptor como la proteína son dímeros de proteínas formados por dos cadenas iguales por lo que, para facilitar el estudio de interacción entre ambos, se han eliminado las cadenas iguales (cadena B para el TfR y cadena D para la transferrina).

Para localizar las posibles posiciones carboniladas de la transferrina se llevó a cabo un estudio *in silico* utilizando el servidor iCarPS así como una búsqueda bibliográfica de las posibles posiciones de carbonilación de la proteína. En la **figura 57A** se muestran los aminoácidos susceptibles de carbonilarse: prolina (P), arginina (R), lisina (K) y treonina (T) y los cambios que sufren sus cadenas laterales tras sufrir el proceso de carbonilación. Posteriormente, una vez identificados los aminoácidos susceptibles de carbonilación en la Tf, se alinearon las secuencias de la transferrina y la transferrina carbonilada (C-Transferrina). En la **Figura 57B** se indican las regiones susceptibles de carbonilaciones (líneas rojas) y con flechas rojas, los aminoácidos específicos carbonilados predichos (prolina, lisina, arginina o treonina) englobados dentro de estas regiones.

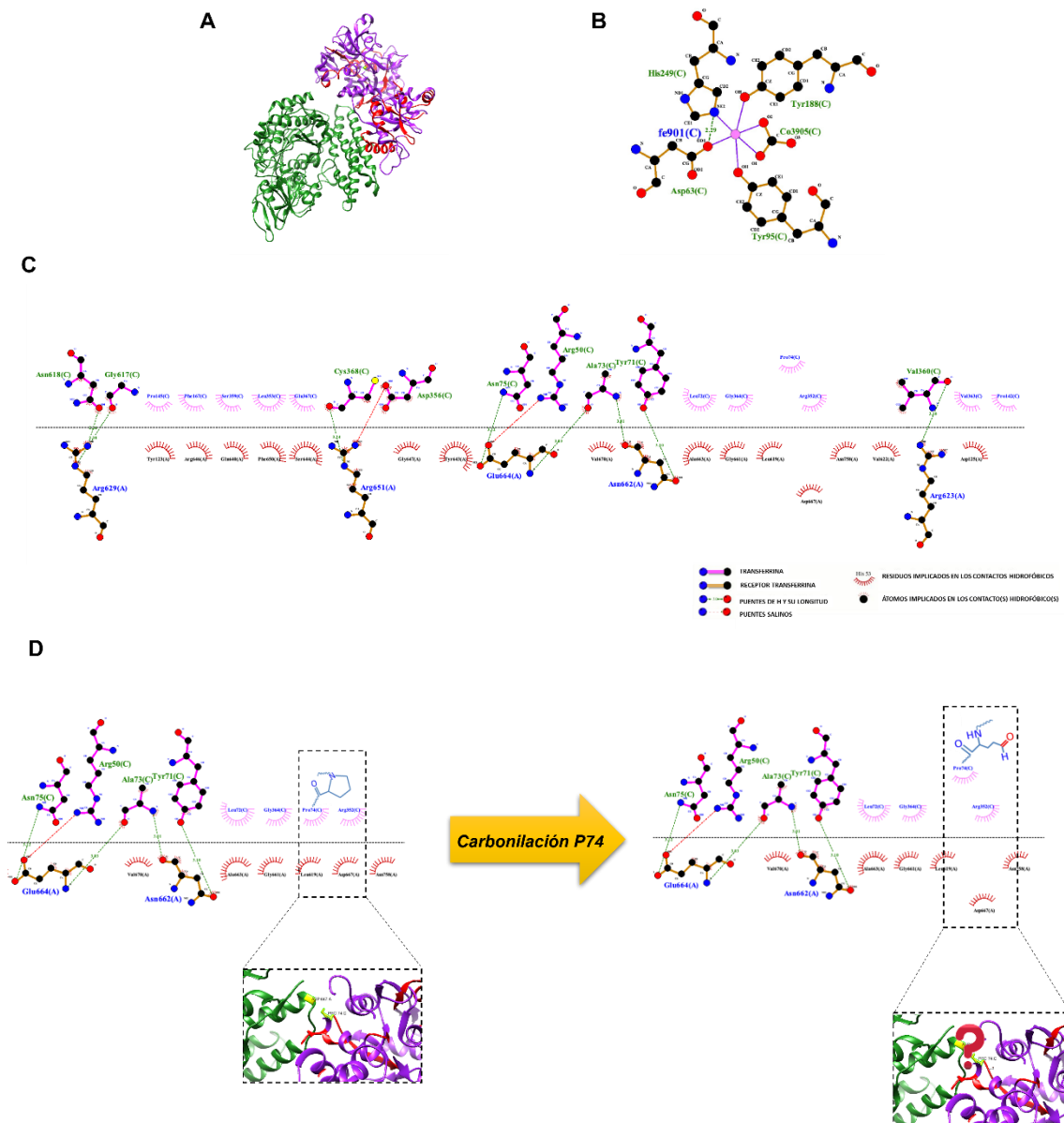


**Figura 57.** Estudio de los aminoácidos susceptibles de carbonilación en la transferrina. **A.** Esquema de los aminoácidos (prolina-P, arginina-R, lisina-K y treonina-T) sensibles de sufrir carbonilación y los cambios que se producen en sus cadenas laterales tras esta modificación postraduccional. **B.** Alineamiento de la secuencia de la transferrina y la transferrina carbonilada (C-Transferrina). Las regiones susceptibles de carbonilarse están marcadas en rojo y la flecha roja señala el aminoácido que se carbonila en la C-Transferrina.

Tras el estudio de las posiciones de carbonilación en la estructura primaria de la proteína, a continuación se identificaron las regiones de susceptibles de carbonilaciones en la estructura 3D del complejo para conocer la influencia de esas carbonilaciones en la interacción entre el hierro, Tf y TfR (**Figura 58A**). Tras ello, se llevó a cabo el estudio *in silico* utilizando el servidor Ligplot+ (<https://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/software/LigPlus/>) de estas interacciones. La **figura 58B** muestra los aminoácidos implicados en la interacción entre el hierro y Tf. Así, 5 aminoácidos de la transferrina están implicados en la unión de la proteína con el hierro (H249, D63, Y95 e Y188). Sin embargo, los análisis previos no pronosticaron péptidos carbonilados en las regiones de

unión entre Tf-Fe, lo que parece indicar que la carbonilación de transferrina no afecta a su interacción con el hierro.

Por otro lado, la interacción entre la transferrina y su receptor implica a varios aminoácidos de ambas proteínas. En concreto, 7 aminoácidos específicos de la transferrina establecen puentes de hidrógeno con TfR (N618, G617, C368, N75, A73, Y71 y V360), 2 de ellos generan puentes salinos entre Tf-TfR (D356 y R50) y múltiples aminoácidos están implicados en las interacciones hidrofóbicas entre ambas proteínas (**Figura 58C**). En concreto, 3 de los aminoácidos que generan puentes de hidrógeno (V360, A73 y N75) están incluidos en las regiones carboniladas predichas y, la prolina 74 (P74), aminoácido carbonilado identificado en la Tf en nuestros estudios *in silico*, está implicada en las interacciones hidrofóbicas entre la transferrina y su receptor (**Figura 58D**). Por tanto, la carbonilación de esta región podría comprometer la interacción de la transferrina con su receptor mediante cambios en la interacción hidrofóbica, hecho que podría explicar, en parte, la internalización alterada del receptor de transferrina observada en los adipocitos en respuesta a la exposición de los sueros de individuos con T2D incidente.



**Figura 58.** Estudio *in silico* del efecto de la carbonilación de la transferrina en sus interacciones con el hierro y su receptor. **A.** Complejo receptor de transferrina 1 (verde) y transferrina (morada) con hierro conjugado en el lóbulo N (código PDB: 3S9L). En rojo se indican las regiones susceptibles de carbonilación en la transferrina. **B.** Estudio de interacción entre la transferrina, Tf, y el hierro utilizando Ligplot+ (<https://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/software/LigPlus/>). **C.** Estudio de interacción entre la transferrina, Tf, y su receptor, TfR, utilizando Ligplot+. **D.** Ampliación de la región susceptible de carbonilación de la transferrina. En todos los análisis de interacciones con Ligplot+, las estructuras de las proteínas se muestran en representación de bola y palo, con los enlaces de la Tf coloreados en rosa y los enlaces del TfR en marrón. Los puentes de hidrógeno se muestran como líneas de puntos verdes, los puentes salinos se indican como líneas rojas, los arcos radiales representan residuos involucrados en contactos hidrofóbicos y los átomos con líneas cortas corresponden a átomos implicados en contactos hidrofóbicos.

---

## DISCUSIÓN

---

El estrés oxidativo se puede definir como el desequilibrio entre la producción de especies reactivas de oxígeno intracelulares (ROS) y la capacidad antioxidante de las células (Matés et al., 2008). La carbonilación se considera el principal sello distintivo del daño oxidativo en los tejidos. Esta modificación postraducciona l no enzimática irreversible conduce a disfunciones de las proteínas y a la degradación de las mismas, afectando a múltiples vías de señalización celular (Catalán et al., 2018). Dada la implicación de la carbonilación en la función podría ser interesante detectar las vías que promueven el desarrollo de esta modificación postraducciona l así como identificar las proteínas que se modifiquen mediante carbonilación y las consecuencias de su disfunción en el tejido adiposo en condiciones de obesidad y resistencia a insulina.

Por ello, en primer lugar, analizamos marcadores plasmáticos de estrés oxidativo clásicos (PC, peroxidación lipídica, GT ó GSH) en sujetos con obesidad y diferente grado de sensibilidad a insulina (Ob-NG, Ob-IR y Ob-T2D). Sin embargo, no se observaron diferencias entre los grupos de estudio. De hecho, de los marcadores plasmáticos, solo se observaron diferencias significativas entre los tres grupos en los parámetros asociados a la homeostasis de la glucosa, que justifican la correcta clasificación de los grupos de estudio en función a los criterios de la ADA. No obstante, los estudios de correlaciones evidenciaron una correlación positiva entre la glucosa y la ferritina circulantes, indicando que la homeostasis del hierro podría jugar un posible papel en el desarrollo de resistencia a insulina en estos sujetos. Estos resultados están en concordancia con datos previos de otros grupos que demuestran que la sobrecarga de hierro está asociada con la obesidad y la resistencia a la insulina y la diabetes (Guglielmi et al., 2015; Fernández-Real et al., 2016; Zhou et al., 2019; Feng et al., 2020) aunque aún se desconoce el mecanismo molecular implicado.

Por otro lado, la internalización del hierro en las células ocurre gracias a que el hierro circulante en el plasma se une a la transferrina, proteína transportadora de hierro, y ésta interacciona con su receptor expuesto en la membrana plasmática de las células. Este proceso está regulado por la insulina, que es capaz de estimular la captación de

hierro por parte de las células, pero esta interacción es modulada por el estrés oxidativo (Fernández-Real y Manco, 2014). De hecho, el estudio de correlación de los parámetros plasmáticos mostró que los niveles de hierro correlacionaron con el grado de peroxidación lipídica mientras que la transferrina correlacionó con los niveles de grupos carbonilos de proteínas medidos en plasma. Por tanto, estos resultados destacan una relación entre la homeostasis del hierro y el daño oxidativo del tejido adiposo en la resistencia a la insulina asociada a la obesidad.

Para conocer el nivel de estrés oxidativo del propio tejido adiposo de nuestros pacientes, evaluamos parámetros de estrés oxidativo en el tejido adiposo OM y SC de nuestros sujetos de estudio. Los datos obtenidos en el depósito OM mostraron un aumento en la producción de ROS, aunque no se detectaron cambios en la expresión de enzimas antioxidantes entre los pacientes Ob-IR y Ob-T2D. Este incremento podría inducir un alto riesgo de carbonilación de proteínas en estos pacientes. De hecho, el grado de peroxidación lipídica y el total de proteínas carboniladas fueron ligeramente superiores en Ob-IR, lo que sugiere una situación de daño oxidativo en el depósito OM. Por el contrario, el depósito SC no mostró diferencias en la producción de ROS, aunque también hubo un pequeño incremento en la peroxidación lipídica y la carbonilación total de proteínas. Los datos previos descritos sobre el estado de estrés oxidativo del tejido adiposo son similares a los obtenidos en este estudio, mostrando que el depósito OM es más sensible a la disfunción del estrés oxidativo que el SC (Jankovic et al., 2014). Además, esto concuerda con estudios previos en los que se detectaron marcadores de estrés oxidativo y ROS en preadipocitos del depósito OM en comparación con los preadipocitos SC (Sriram et al., 2019). Dado que la diferenciación de los adipocitos implica cambios en la abundancia, morfología y organización de las mitocondrias, el aumento del estrés oxidativo por una presencia excesiva de ROS interrumpe la adipogénesis e inhibe la expansión “saludable” del tejido adiposo (Fernando et al., 2020).

Para poder dilucidar e identificar posibles marcadores implicados en la disfunción del metabolismo de la glucosa y su asociación con el estrés oxidativo, se describió, por primera vez, el carboniloma del tejido adiposo. Observamos que las



principales proteínas carboniladas identificadas están relacionadas con el estrés del retículo endoplasmático (RE), la reorganización del citoesqueleto y el metabolismo. Se han descrito previamente proteínas carboniladas similares a las identificadas en este estudio, específicamente, proteínas metabólicas y estructurales, en tejido adiposo omental tras un incremento de peso corporal (Frohnert y Bernlohr, 2013). Sin embargo, aún no se han descrito cambios en el perfil de proteínas carboniladas asociados a la resistencia a insulina, independientemente del peso corporal.

En concreto, los cambios más significativos se detectaron en el depósito OM, donde se observó un incremento de la expresión de serpin 1, vimentina y transferrina carboniladas en sujetos Ob-IR vs. Ob-NG. Un estudio reciente describió que serpin A1 (también llamada A1AT) es esencial para prevenir el estrés del RE y actúa como supresor endógeno de la inflamación del tejido adiposo (Ando et al., 2021). De hecho, la eliminación de A1AT en adipocitos omentales primarios humanos aumentó factores proinflamatorios como IL-6, IL1 $\beta$  o TNF $\alpha$  (Ando et al., 2021). Así, el aumento de la carbonilación de la proteína serpin A1 en nuestro estudio, podría asociarse con la disfunción y degradación de la proteína, disminuyendo los niveles de serpin A1 funcional y aumentando la respuesta proinflamatoria del depósito OM. En este sentido, está bien establecido que el tejido adiposo OM contribuye de manera fundamental al estado de inflamación crónica de bajo grado que acompaña a la obesidad, lo que se ha asociado a la mayor infiltración de este depósito por células inmunes (Khan et al., 2020).

Por otro lado, la vimentina es un filamento intermedio que juega un papel clave en el posicionamiento de los orgánulos dentro del citoplasma y regula numerosos procesos celulares (Wilhelmsson et al., 2019). En el tejido adiposo, la vimentina participa en la lipólisis a través de la interacción directa con la lipasa sensible a hormonas (HSL) (Shen et al., 2010) y también está implicada en la translocación del transportador de glucosa tipo 4 (GLUT4) en adipocitos 3T3-L1 (Hirata et al., 2011). Más recientemente, Kim et al. (2021) describieron que la deficiencia de vimentina previene la obesidad y la resistencia a la insulina en ratones alimentados con HFD. Estos animales mostraron menos ganancia de peso, menos adiposidad y mejoraron la tolerancia a la glucosa, reduciendo la glucosa plasmática (Kim et al., 2021). En nuestro estudio, el aumento de

la expresión de vimentina carbonilada podría ser un efecto compensatorio para mejorar la tolerancia a glucosa en sujetos con obesidad y resistencia a insulina.

Finalmente, la transferrina es una proteína de unión a metales abundante en suero. El hierro circulante ( $\text{Fe}^{3+}$ ) se encuentra unido a la transferrina y es transportado hasta los distintos tejidos. Centrándonos en el tejido adiposo, la eliminación de la transferrina en adipocitos SGBS disminuyó los niveles de hierro intracelular y redujo la captación máxima de glucosa estimulada por insulina, lo que condujo a una disminución de la expresión de GLUT4 y de la fosforilación de AKT, una enzima fundamental en la señalización de la insulina (McClain et al., 2018). Por tanto, un aumento de transferrina carbonilada en el tejido adiposo podría promover un estado de resistencia a insulina en los adipocitos, que, atendiendo a nuestros resultados, sería más evidente en el depósito OM de sujetos Ob-IR.

Por el contrario, en el depósito SC, solo los sujetos Ob-T2D evidenciaron una reducción significativa de proteínas carboniladas: la anhidrasa carbónica, Hspb5 y la transferrina. La anhidrasa carbónica III (CA III) es la proteína más abundante del tejido adiposo y su cantidad disminuye con la obesidad, lo que podría estar en consonancia con el grado de carbonilación mayor de esta proteína que observamos también en nuestro estudio. Se ha observado que la inhibición de la CA III en el tejido adiposo provoca una disminución de la secreción de leptina estimulada por insulina (Alver et al., 2004). La leptina regula múltiples procesos metabólicos implicados en el desarrollo de enfermedades metabólicas en el tejido adiposo, siendo el depósito SC la principal fuente de esta hormona (Picó et al., 2022).

Por otro lado, Hspb5 (también llamada  $\alpha$ B-cristalina) es un miembro de la familia de las HSPB independientes de ATP, proteínas que se cree que están implicadas en el plegamiento de proteínas en cooperación con la maquinaria HSP70 dependiente de ATP y/o promueven la degradación de proteínas mediante el proteasoma (Husseini et al., 2015). La carbonilación de esta proteína podría relacionarse con la desregulación del proteasoma que ocurre en condiciones de obesidad y resistencia a insulina.

En conjunto, estos resultados proteómicos evidencian diferencias específicas de depósito en el carboniloma del tejido adiposo y proporcionan nuevos conocimientos sobre la participación del tejido adiposo OM en el desarrollo de resistencia a insulina asociada a la obesidad.

Previamente, ya se había descrito que el proceso de inflamación aumenta la carbonilación de proteínas en adipocitos (Demozay et al., 2008), por lo que en este estudio caracterizamos, por primera vez, ya habíamos descrito el efecto de la hiperglucemia/hiperinsulinemia sobre la inducción de resistencia a insulina, por lo que nos planteamos analizar su efecto en la carbonilación de proteínas en adipocitos 3T3-L1. Nuestros resultados en el modelo de HGHI *in vitro* mostraron un incremento en la carbonilación de HspA4, chaperona implicada en la degradación de proteínas y VCP, involucrado en la actividad del proteasoma, con respecto a las condiciones basales. Estos resultados describen una relación entre la oxidación de proteínas y el plegamiento incorrecto de proteínas que hemos descrito previamente que ocurre en adipocitos de individuos obesos resistentes a la insulina (Díaz-Ruiz et al., 2015). De hecho, previamente en el grupo describimos la relevancia de la disfunción del proteasoma en la resistencia a la insulina asociada a la obesidad en adipocitos aislados (Díaz-Ruiz et al., 2015). Así, los datos proteómicos obtenidos en el modelo *in vitro* confirman los resultados obtenidos en el modelo humano y destacan el importante papel de la degradación de proteínas, que estaría condicionada por la existencia de estrés oxidativo, en la asociación del tejido adiposo omental y la resistencia a la insulina asociada a la obesidad.

En respuesta a insulina, se produce la translocación del transportador de glucosa, GLUT4, desde los compartimentos intracelulares hasta la membrana plasmática, proceso promovido por la insulina a través de la vía PI3K/AKT (Olivares-Reyes y Arellano-Plancarte, 2008). Además, esta hormona también provoca una estimulación rápida y sustancial de la captación de hierro por parte de las células, redistribuyendo los receptores de transferrina desde su compartimento intracelular hacia la superficie celular, estando esta interacción modulada por el estrés oxidativo (Fernández-Real y Manco, 2014). En las células de mamíferos, los receptores internalizados, como el

receptor de transferrina (TfR), pasan secuencialmente a través de endosomas tempranos y, posteriormente, a endosomas de reciclaje perinuclear antes de regresar a la membrana plasmática (Sheff et al., 2002). En concreto, en la endocitosis mediada por clatrina, el receptor de transferrina, TfR, y GLUT4 se encuentran dentro de las mismas vesículas de reciclaje. GLUT4 se separa de los receptores de transferrina en un compartimento especializado perinuclear de almacenamiento reticular de GLUT4 (GSVs).

Por tanto, debido a la relación entre el metabolismo glucídico y del hierro, a continuación, analizamos la homeostasis del hierro en el tejido adiposo de nuestros sujetos de estudio. No se detectaron diferencias significativas en el contenido de hierro total entre los grupos, lo que podría sugerir que la resistencia a insulina observada no está asociada con el aumento del contenido de hierro intracelular en el tejido adiposo. Sin embargo, nuestros estudios sobre la internalización del receptor de transferrina evidenciaron una disminución en la localización perinuclear del receptor de transferrina en adipocitos expuestos a sueros de sujetos incidentes con T2D en comparación con sujetos sin diabetes tipo 2. Estos resultados concuerdan con la asociación entre la aparición de diabetes tipo 2 y la desregulación de la homeostasis del hierro (Miranda y Lawson, 2018; Guzmán-Ruiz et al., 2020).

Los cambios observados en la localización del receptor de transferrina podrían asociarse a una alteración en su unión con la transferrina. Nuestros resultados mostraron un patrón de carbonilación diferencial de la transferrina entre los sujetos Ob-NG vs. Ob-IR y Ob-T2D en los depósitos SC y OM, encontrando un aumento significativo de la transferrina carbonilada en pacientes Ob-IR vs. Ob-NG en el depósito OM. La transferrina es una glicoproteína bilobulada (lóbulos N y C) de ~80 kDa que se une al hierro plasmático y lo transfiere a las células a través de su interacción con el receptor de transferrina. A su vez, el receptor de transferrina (TfR) es una proteína transmembrana dimérica, con un pequeño dominio citoplasmático, una región transmembrana de un solo paso y un gran dominio extracelular (Lawrence et al., 1999; Cheng et al., 2004). Se ha descrito que el receptor de transferrina interacciona con los dos lóbulos de la transferrina. Sin embargo, la interacción entre el lóbulo N y el receptor

de transferrina resulta más complejo y de mayor relevancia (Cheng et al., 2004), por ello estudiamos la implicación de la carbonilación en este lóbulo. Así, estudios *in silico* revelaron regiones carboniladas específicas (incluyendo aminoácidos carbonilados) en la estructura primaria de la proteína y, en concreto, en el lóbulo N de la transferrina. Para conocer si estas carbonilaciones podrían comprometer la funcionalidad de la transferrina (su unión con hierro o con su receptor), se llevaron a cabo estudios de *docking* molecular *in silico*. Para ello, utilizamos un complejo receptor de transferrina 1, transferrina y hierro conjugado a la transferrina (PDB:3S9L), generando una estructura 3D que nos permitió analizar la influencia de la carbonilación de la transferrina en la interacción con su receptor o con el hierro y, por tanto, el posible efecto de esta modificación postraduccional irreversible sobre la homeostasis del hierro. Nuestros resultados mostraron que 3 aminoácidos (V360, A73 y N75) de la transferrina que generan puentes de hidrógeno con su receptor están incluidos en regiones carboniladas predichas, y la prolina 74 (P74), aminoácido carbonilado identificado en la transferrina nuestros estudios *in silico*, está implicada en las interacciones hidrofóbicas entre la transferrina y su receptor. Se ha demostrado que las MPTs pueden ejercer su función a través de la modulación de las interacciones proteína-proteína (Li et al., 2013; Zheng et al., 2018). Además de las MPTs, las funciones de las proteínas también están reguladas por las interacciones proteína-proteína no covalentes, como las interacciones hidrofóbicas. Muchas MPTs modulan las afinidades de unión entre proteínas al cambiar las propiedades electrostáticas o estructurales de los sitios de unión involucrados, por lo que las MPTs y las interacciones proteína-proteína están altamente relacionadas (Duan y Walther, 2015; Zheng et al., 2018). Según los datos de la base de datos dbPTM de MPTs de proteínas, más del 60 % de los sitios susceptibles de MPTs están relacionados con los dominios funcionales de proteínas, lo que sugiere un papel regulador central de las mismas en la modulación de las interacciones proteicas y, por tanto, de su función (Duan y Walther, 2015). En el contexto de nuestro estudio, la carbonilación de la región identificada podría comprometer la interacción de la transferrina con su receptor mediante cambios en la interacción hidrofóbica, hecho que podría explicar, en parte, la internalización anómala del receptor de transferrina observada en respuesta al ambiente extracelular de los sujetos con T2D incidente.

En definitiva, nuestros datos proteómicos revelaron diferencias claras en el carboniloma del tejido adiposo en condiciones de resistencia a insulina asociada a la obesidad, lo que destaca la importancia del estado redox y de la proteostasis en las comorbilidades asociadas a la obesidad. Además, nuestro estudio reveló un incremento significativo de la expresión de transferrina carbonilada en sujetos Ob-IR en el depósito OM, que podría estar relacionado con la resistencia a la insulina en los adipocitos de estos pacientes. Sin embargo, serán necesarios datos adicionales relacionados con la transferrina carbonilada, tanto humana como en modelos *in vitro* de adipocitos, para desentrañar su contribución en la disfunción del tejido adiposo relacionada con condiciones de resistencia a la insulina. Lamentablemente, la escasez de herramientas moleculares que permitan analizar proteínas carboniladas, y más especialmente en el caso de la transferrina, la no disponibilidad de anticuerpos específicos de determinación de los residuos carbonilados suponen una limitación para establecer la relevancia precisa de este proceso que, según nuestros estudios, tendría una repercusión patogénica.

Finalmente, y más allá de lo observado en cuanto al tráfico intracelular de transferrina y su receptor, hay que destacar que, como se indicaba anteriormente, la carbonilación es un proceso irreversible. Esto supone que, finalmente, las proteínas carboniladas deben ser eliminadas porque, como las proteínas mal plegadas que se acumulan también en los adipocitos en condiciones de obesidad y resistencia a insulina (Díaz-Ruiz et al., 2015), su acumulación es tóxica y compromete la viabilidad celular. Este proceso, en el que intervienen el proteasoma y/o la autofagia y vía lisosomal (König et al., 2017), conduciría a una reducción de la cantidad de receptor de transferrina disponible. En este sentido, mencionamos anteriormente la relación inversa existente entre los niveles de receptor de transferrina y la sensibilidad a insulina en adipocitos (McClain et al., 2018). La no disponibilidad de transferrina suficiente, como sugerirían nuestros estudios de aumento de la carbonilación, repercutiría en la disponibilidad de hierro para los adipocitos, con el consecuente efecto sobre los procesos que regula este ion, tal como demuestran otros estudios: transporte de glucosa, actividad mitocondrial y señalización vía Wnt/adipogénesis (McClain et al., 2018).

En conjunto, nuestros resultados muestran que el estrés oxidativo inducido en el tejido adiposo por la obesidad, especialmente en el depósito más asociado al riesgo metabólico, tejido adiposo OM, provoca cambios irreversibles en proteínas implicadas en procesos tan relevantes como el estrés del retículo endoplasmático, la degradación de proteínas y, en particular, en el metabolismo del hierro. En estas circunstancias, se podría pensar en el uso de que compuestos que puedan eliminar los grupos carbonilo (*carbonyl quenching*), para la prevención/tratamiento de enfermedades asociadas a esta MPT, como sugieren estudios preclínicos de otros autores para enfermedades asociadas a la obesidad como diabetes y el síndrome metabólico (Suzuki et al., 2010). Nuestro estudio apoya la idea del uso de esta vía de eliminación de carbonilos en proteínas específicas para abordar las repercusiones patogénicas de la obesidad.





A thick, hand-drawn style green border frames the page, starting from the top left and ending at the bottom right.

# CAPÍTULO 3

Estudio comparativo del uso de *quantum-dots* semiconductores (SQDs) y *quantum-dots* de carbono (CQDs) en modelos celulares *in vitro*



---

## ANTECEDENTES

---

Actualmente, el tratamiento de la obesidad se basa fundamentalmente en cambios en el estilo de vida o la cirugía, a lo que se añade el tratamiento farmacológico, que actualmente está incrementado por la aparición de nuevos compuestos anti-obesidad (Müller et al., 2022). No obstante, se necesitan enfoques novedosos y mejorados para el tratamiento de la obesidad; así, en el capítulo anterior sugeríamos el uso de quelantes de grupos carbonilo o se podría considerar la nanoterapia para reemplazar a proteínas dañadas, como FABP4 o la transferrina. En este sentido, en el campo de la obesidad, como en otras patologías prevalentes, se están empezando a considerar las terapias basadas en la nanotecnología (Sibuyi et al., 2019). En todos los casos, el objetivo es buscar sistemas más eficaces que la terapia convencional, para lo que hay que asegurarse de que los nanosistemas tengan una alta tolerabilidad, efectos secundarios reducidos y una mayor eficacia (Sibuyi et al., 2019).

En las últimas décadas, los nanomateriales de alta luminiscencia han logrado un auge especial en las aplicaciones de la nanomedicina debido a su bajo coste, su fácil preparación, su alta reactividad y sus excelentes propiedades fotoluminiscentes. Dentro de los nanomateriales, los *quantum dots* (QDs) –en especial, las *semiconductor quantum dots* (SQDs)– han sido ampliamente estudiadas. En concreto, el número de aplicaciones publicadas con SQDs ha experimentado un incremento considerable, especialmente en biología y en la clínica (Cayuela et al., 2016). En particular, se ha demostrado su potencial en análisis FRET (técnica de transferencia de energía de resonancia fluorescente), administración de fármacos, bioimágenes *in vivo* y seguimiento celular (Jamieson et al., 2007; Rosenthal et al., 2011). Sin embargo, su uso está limitado debido a su potencial toxicidad asociada con la liberación de metales pesados, por lo que los estudios futuros están enfocados en la identificación de nuevas nanopartículas fluorescentes alternativas. En esta línea, la nueva generación de *quantum dots* corresponden a nanomateriales verdes que permiten el desarrollo de estas múltiples aplicaciones en nanomedicina. Así, las *carbon-based quantum dots* (CQDs) de grafito, descubiertas en 2004 durante la purificación de nanotubos de carbono (Xu et al., 2004) han sido unas excelentes candidatas para su aplicación en biodetección y bioimagen.

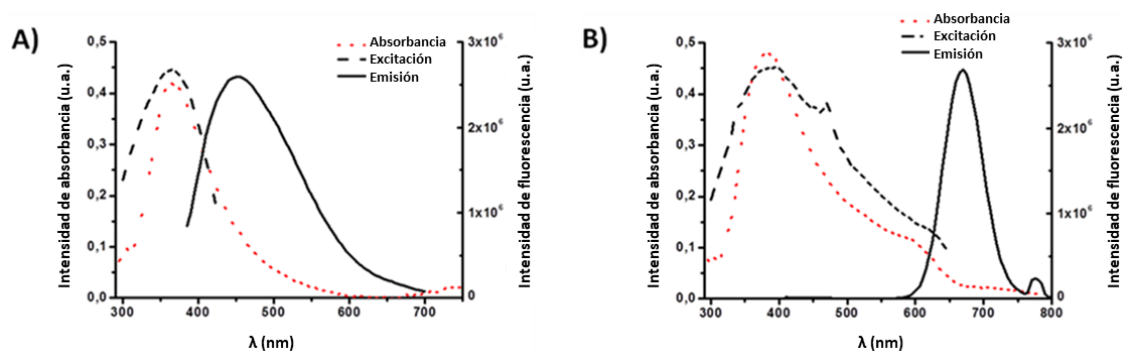
Si bien es cierto que estas dos familias de *quantum dots* fluorescentes han sido ampliamente estudiadas de manera individual para múltiples aplicaciones en el campo de la biomedicina (Wang y Hu, 2014; Xu et al., 2014; Fernando et al., 2015; Kargbo et al., 2015; Cayuela et al., 2016; Liu et al., 2016; Molaei, 2019; Panwar et al., 2019; Tian y Yin, 2019), hasta el momento, no se han realizado estudios comparativos de estas dos nanopartículas para determinar su comportamiento en un mismo tipo celular y bajo las mismas condiciones y que además nos permitan seleccionar a las mejores candidatas para su aplicación en el estudio de la disfunción del tejido adiposo en condiciones de obesidad y resistencia a insulina. Por ello, a continuación, se muestra un análisis comparativo con el que se pretende alcanzar los siguientes objetivos:

1. Examinar y comparar la viabilidad celular de los preadipocitos (línea celular 3T3-L1) expuestos a SQDs y CQDs con el mismo tamaño (3 nm) e idéntica superficie (grupos carboxilos) bajo las mismas condiciones.
2. Determinar y comparar la influencia del medio extracelular en la internalización de las SQDs y CQDs.
3. Analizar y comparar la internalización de CQDs y SQDs para su posible aplicación en el estudio de la disfunción del tejido adiposo en condiciones de obesidad y resistencia a insulina.

## RESULTADOS

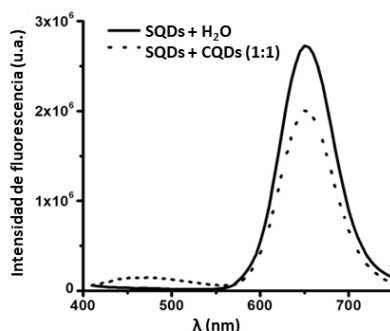
### 1. Selección y caracterización óptica de las CQDs y SQDs

En primer lugar, se evaluaron las condiciones de solubilidad así como los espectros de excitación y emisión para los dos tipos de *quantum dots*: SQDs y CQDs. Se demostró que, tanto las CQDs como las SQDs, fueron solubles en agua y exhibieron un comportamiento de emisión estable durante una larga irradiación, sin ninguna precipitación notable a temperatura ambiente. Además, se establecieron los rangos de excitación y emisión para cada una, siendo el máximo de  $\lambda_{\text{excitación}}$  de 365 nm para las CQDs y 390 nm para las SQDs y el máximo de  $\lambda_{\text{emisión}}$  de 450 nm y 650 nm para las CQDs y SQDs, respectivamente (**Figura 59**).



**Figura 59.** Curvas de absorción y emisión en sus máximos de  $\lambda_{\text{excitación}}$  de las **(A)** CQDs y **(B)** SQDs. [Nanodots] = 200 mg/L; los anchos de rendija para la fluorescencia de emisión y excitación se establecieron en 3 y 8 nm, respectivamente.

Por otro lado, para explorar la capacidad donadora de electrones de ambas *nanodots*, se mezclaron CQDs y SQDs a concentraciones equimolares. La curva de fotoluminiscencia de las SQDs en presencia de las CQDs se redujo significativamente en su intensidad de fluorescencia cuando se excitaron a 390 nm (**Figura 60**), indicando que ha ocurrido una transferencia de electrones entre ambas *nanodots*. Esto es debido a que, a pesar de ser *quantum dots* con el mismo tamaño, 3 nm, y las mismas condiciones superficiales, grupos carboxilos en la superficie, sus núcleos están formados por átomos distintos, CdTe en las SQDs, mientras que las CQDs presentan átomos biocompatibles (C y O), característica que le confiere diferencias en sus propiedades.



**Figura 60.** Quenching en la fluorescencia de las SQDs en presencia de las CQDs en un ratio 1:1 a  $\lambda_{\text{excitación}} = 390 \text{ nm}$ . [Nanodots] = 200 mg/L; ancho de rendija = 3 nm.

## 2. Evaluación de la toxicidad de las CQDs y las SQDs

Con el fin de evaluar el grado de toxicidad de las CQDs y SQDs, se analizó su efecto sobre preadipocitos (línea celular 3T3-L1). Del mismo modo, se establecieron diferentes condiciones de estudio (ayuno y exceso de nutrientes) con el fin de analizar la toxicidad asociada al estado metabólico de este tipo celular.

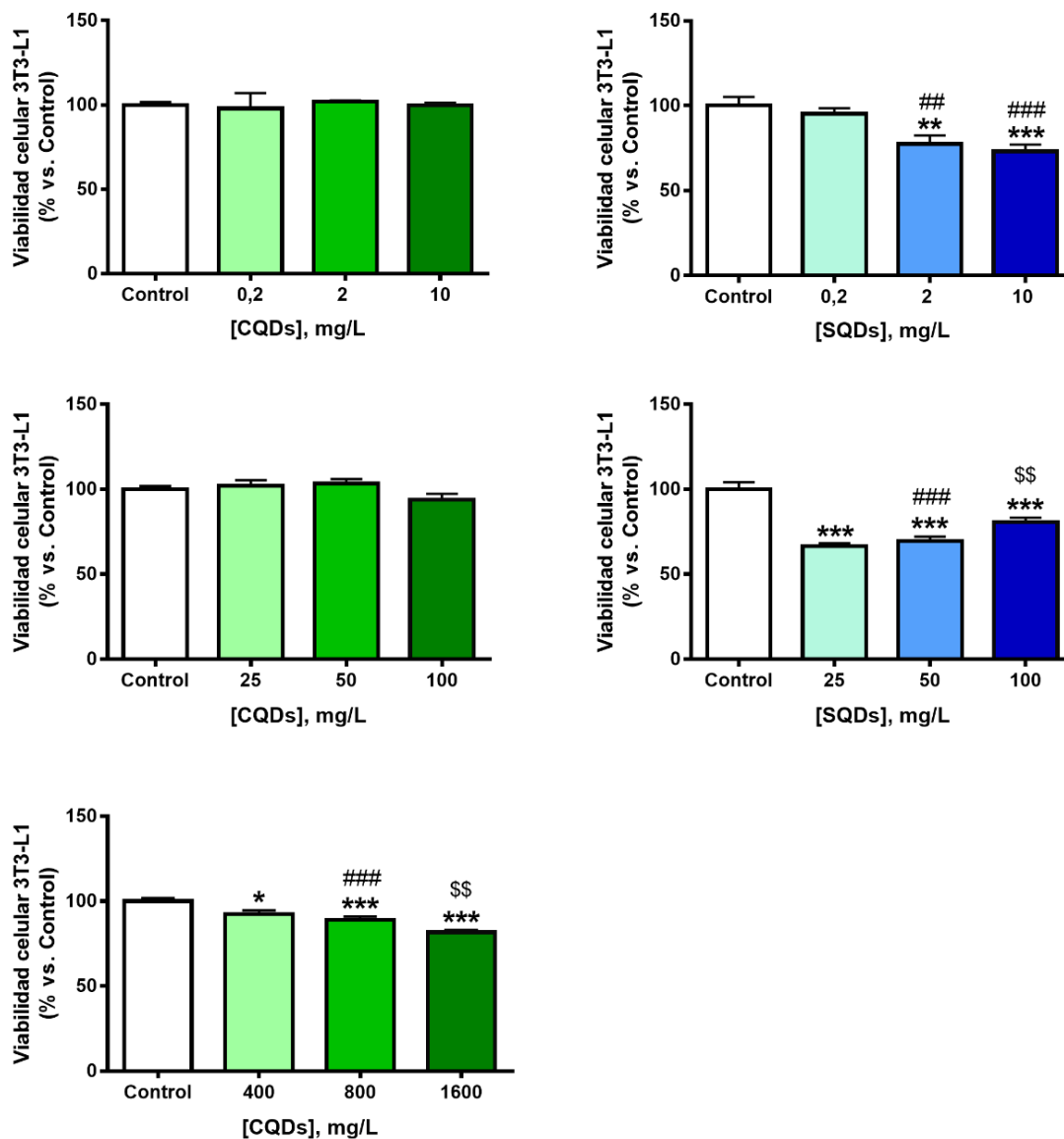
### 2.1. Toxicidad de las CQDs y SQDs en la línea celular 3T3-L1

#### Condición 1: Ausencia de suero en el medio de cultivo

##### a) Ensayo de viabilidad celular

El tratamiento de los adipocitos 3T3-L1 con CQDs en condiciones de privación de suero mostró una disminución de la viabilidad celular con concentraciones superiores a 400 mg/L de CQDs, siendo significativamente diferente de manera dosis-dependiente: 18,6% para 400 mg/L; 21,1% para 800 mg/L y 28,4% para 1600 mg/L tras 24 h de exposición (**Figura 61**).

Por otro lado, el tratamiento de 24 h con las SQDs indujo muerte celular con concentraciones muy bajas (2 mg/L), manteniendo dicha toxicidad con concentraciones mayores: 22,4% para 2 mg/L, 26,8% para 10 mg/L, 33,6% para 25 mg/L, 30,4% para 50 mg/L y 19,4% para 100 mg/L tras 24 h de exposición (**Figura 61**).

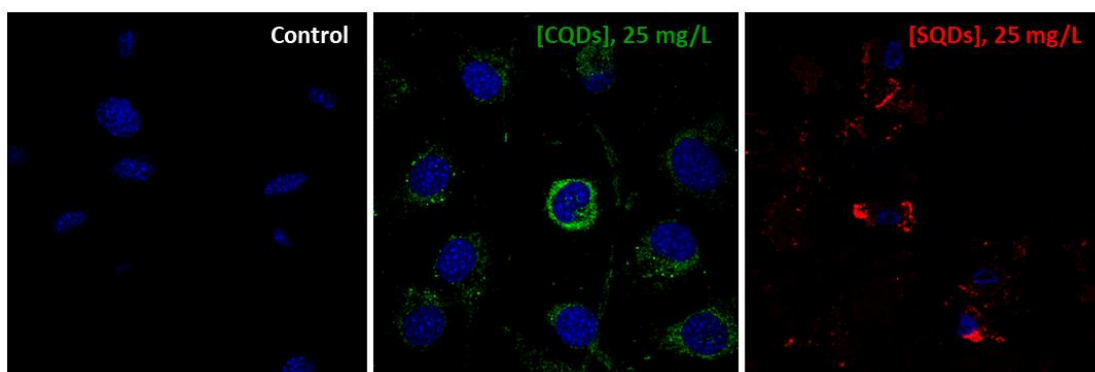


**Figura 61.** Ensayo de viabilidad celular en células 3T3-L1 cultivadas en ausencia de suero y expuestas a CQDs y SQDs en concentraciones crecientes de 0,2-1600 mg/L durante 24 h. El control corresponde a células 3T3-L1 cultivadas en DMEM en ausencia de suero durante 24 h. La viabilidad celular está representada como la media  $\pm$  SEM. Las diferencias significativas están indicadas como la media  $\pm$  SEM. Las diferencias significativas están indicadas como \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  vs. Control; ##  $p < 0,01$ , ###  $p < 0,001$  vs. 0,2, 25, o 400 mg/L, respectivamente ; \$\$  $p < 0,01$  vs. 50 o 800 mg/L, respectivamente.

## b) Ensayo de imagen

Con el fin de analizar la captación de estas nanopartículas por los preadipocitos, se llevaron a cabo estudios de imagen mediante microscopía confocal en células 3T3-L1 expuestas a 25 mg/L de CQDs o SQDs, dosis a la que se observó mayor muerte celular.

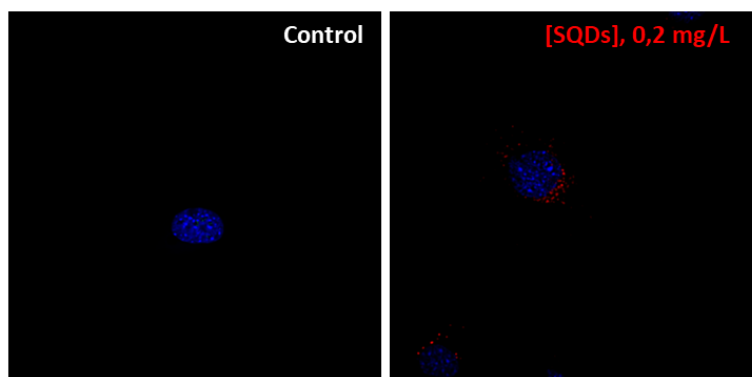
Las imágenes muestran cómo ambos tipos de QDs fueron incorporados por las células pero que las respuestas celulares fueron diferentes (**Figura 62**). En concordancia con los resultados obtenidos en el ensayo de viabilidad celular, las SQDs indujeron cambios morfológicos indicativos de muerte celular en las células como daño en la membrana celular o la descondensación del ADN. Por el contrario, en el caso de las CQDs, se observó una mayor incorporación de las nanopartículas sin alteraciones en la morfología de los preadipocitos (**Figura 62**).



**Figura 62.** Imágenes de microscopía confocal obtenidas de células 3T3-L1 expuestas a 25 mg/L de CQDs o SQDs en ausencia de suero durante 24 h. El control corresponde a células 3T3-L1 cultivadas en DMEM en ausencia de suero durante 24 h. El núcleo aparece teñido en azul (DAPI), las CQDs están marcadas en verde y las SQDs en rojo.

Con el fin de analizar si los cambios en la morfología celular se asociaban a la toxicidad celular, se analizó la respuesta de los preadipocitos a la dosis más baja de SQDs testada (0,2 mg/L), que no fue tóxica para las células. Las imágenes mostraron cómo los preadipocitos mantenían una morfología normal y exhibieron fluorescencia punteada como indicativo de la captación celular de las SQDs (**Figura 63**).

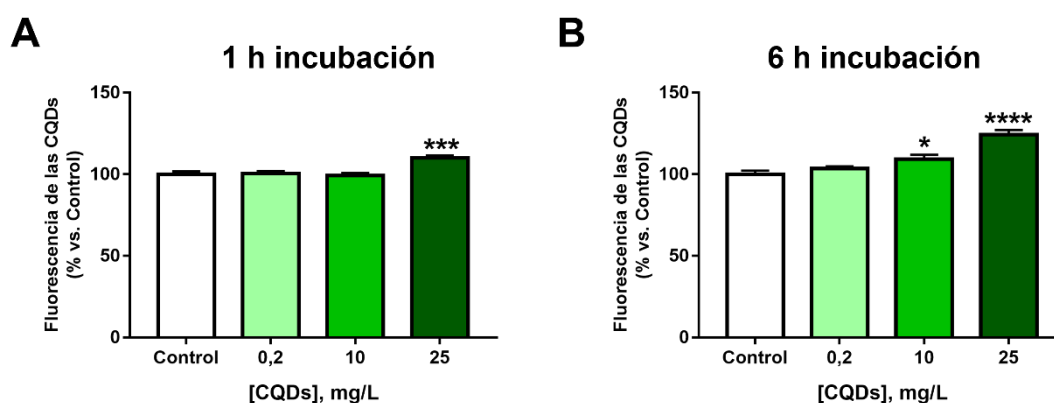




**Figura 63.** Imágenes de microscopía confocal obtenidas de células 3T3-L1 expuestas a 0,2 mg/L de SQDs en ausencia de suero durante 24 h. El control corresponde a células 3T3-L1 cultivadas en DMEM en ausencia de suero durante 24 h. El núcleo aparece teñido en azul (DAPI) y las SQDs están marcadas en rojo.

### c) Ensayo de captación celular

Además de los estudios de microscopía celular, se evaluó la incorporación de las nanopartículas al interior celular por espectrofotometría. Como se muestra en la **Figura 64**, las células 3T3-L1 mostraron captación de CQDs a dosis altas (25 mg/L) tras 1 h de incubación. Las dosis inferiores (10 mg/L) necesitaron un mayor tiempo de incubación (6 h). Las concentraciones más bajas de CQDs (0,2 mg/L) no mostraron un incremento en los niveles de fluorescencia intracelular (**Figura 64**).



**Figura 64.** Emisión de fluorescencia en cultivos celulares 3T3-L1 expuestos durante (A) 1 h o (B) 6 h a concentraciones crecientes de CQDs (0,2, 10 y 25 mg/L) en deprivación de suero. El control corresponde a células 3T3-L1 cultivadas en DMEM en ausencia de nanopartículas.  $\lambda_{\text{excitación}} = 365$  nm y  $\lambda_{\text{emisión}} = 450$  nm. La fluorescencia de las CQDs en el interior de las células está representada como la media  $\pm$  SEM. Las diferencias significativas están indicadas como \*  $p < 0,05$ , \*\*\*\*  $p < 0,001$  vs. Control.

En particular, la incorporación de las nanopartículas en el interior de las células no solo depende de la concentración, sino también del tiempo de exposición a las *nanodots*. Así, a tiempos cortos de incubación (1 h), solo dosis altas de CQDs (25 mg/L) provocaron un incremento significativo de la señal de fluorescencia celular.

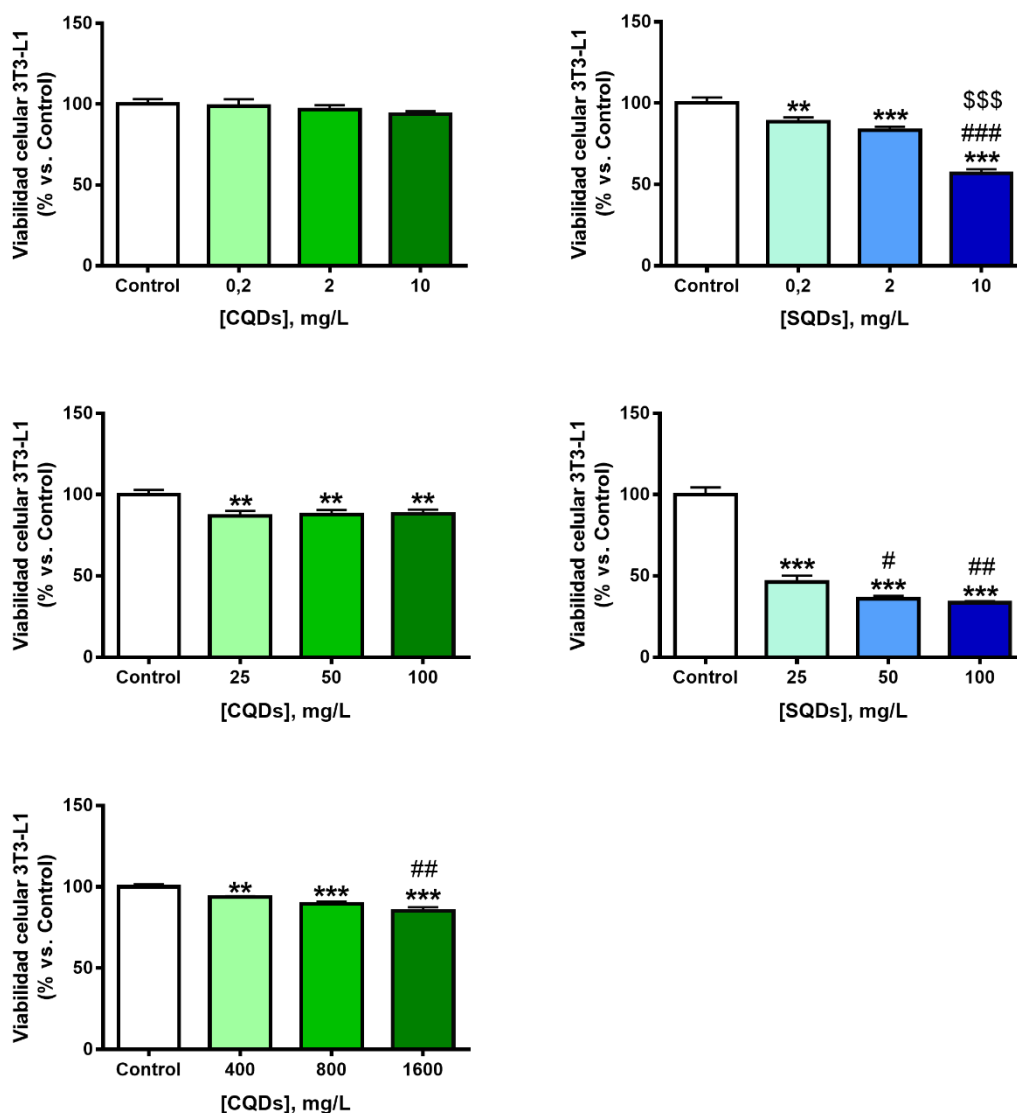
Con respecto a las SQDs, la acumulación de estas nanopartículas se pudo observar mediante microscopía confocal, encontrándose QDs en los restos celulares (**Figura 62**), lo que generaría mediciones aberrantes de los niveles de fluorescencia intracelular mediante espectrofotometría.

#### Condición 2: Presencia de suero en el medio de cultivo

##### a) Ensayo de viabilidad celular

Tras la administración de CQDs a células 3T3-L1 durante 24 h en presencia de suero, se observó que, a dosis intermedias (25 mg/L), la viabilidad celular de las 3T3-L1 disminuyó ligeramente (13,2%), aunque ya de forma significativa (**Figura 65**). Sin embargo, incluso a concentraciones altas de CQDs (1600 mg/L), la viabilidad celular se mantuvo sobre el 85% (**Figura 65**).

En el caso de las SQDs, la toxicidad inducida por las SQDs en presencia de suero fue significativa (13,2%) incluso con la dosis más baja testada (0,2 mg/L). La viabilidad celular fue aumentando de manera dosis-dependiente con la presencia de suero en el medio de cultivo. Así, todas las dosis de SQDs examinadas disminuyeron la viabilidad celular de las 3T3-L1 de forma significativa y las reducciones de este parámetro fueron mayores en presencia de suero (**Figura 65**) que en ausencia de FBS (**Figura 65**). En concreto, cuando se administró la dosis de 100 mg/L de SQDs en ausencia de suero, se redujo la viabilidad celular en un 19,4% (**Figura 61**) en comparación con la reducción del 66,5% que se observó a esta misma dosis de SQDs en cultivos expuestos a suero.

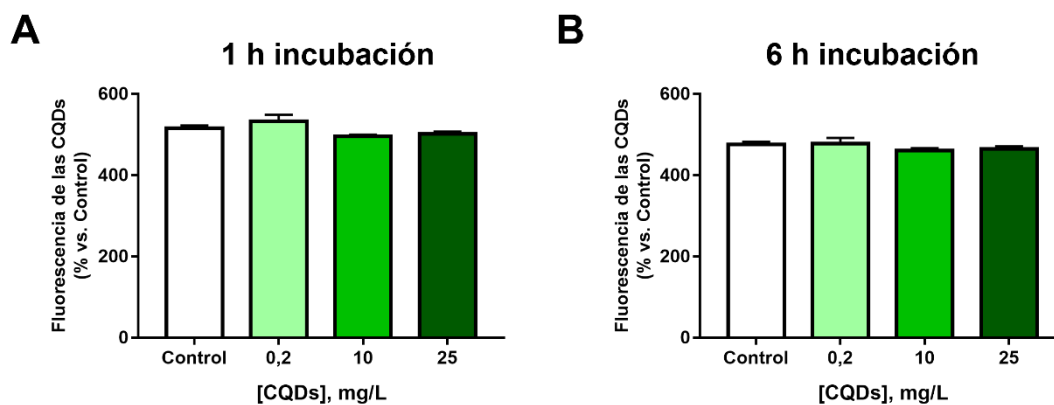


**Figura 65.** Ensayo de viabilidad celular en células 3T3-L1 cultivadas en presencia del 10% de FBS y expuestas a CQDs y SQDs en concentraciones crecientes de 0,2-1600 mg/L durante 24 h. El control corresponde a células 3T3-L1 cultivadas en DMEM en presencia de suero durante 24 h. La viabilidad celular está representada como la media  $\pm$  SEM. Las diferencias significativas están indicadas como \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  vs. Control; ##  $p < 0,01$ , ###  $p < 0,001$  vs. 0,2, 25, o 400 mg/L, respectivamente ; \$\$\$  $p < 0,001$  vs. 0,2 mg/L.

#### b) Ensayo de captación celular

La presencia de suero en el medio de cultivo también alteró el tiempo de exposición necesario para la incorporación de las CQDs en las células 3T3-L1. De acuerdo con los resultados obtenidos por espectrofotometría, no se observaron cambios en el contenido intracelular de las nanopartículas en las células 3T3-L1 después de una exposición de CQDs a dosis comprendidas entre 0,2 y 25 mg/L a tiempos cortos –1 o 6 h–

(Figuras 66). La acumulación aberrante de las SQDs en células muertas cultivadas en presencia de FBS impidió medir el contenido de fluorescencia intracelular en células 3T3-L1 expuestas a estas nanopartículas.

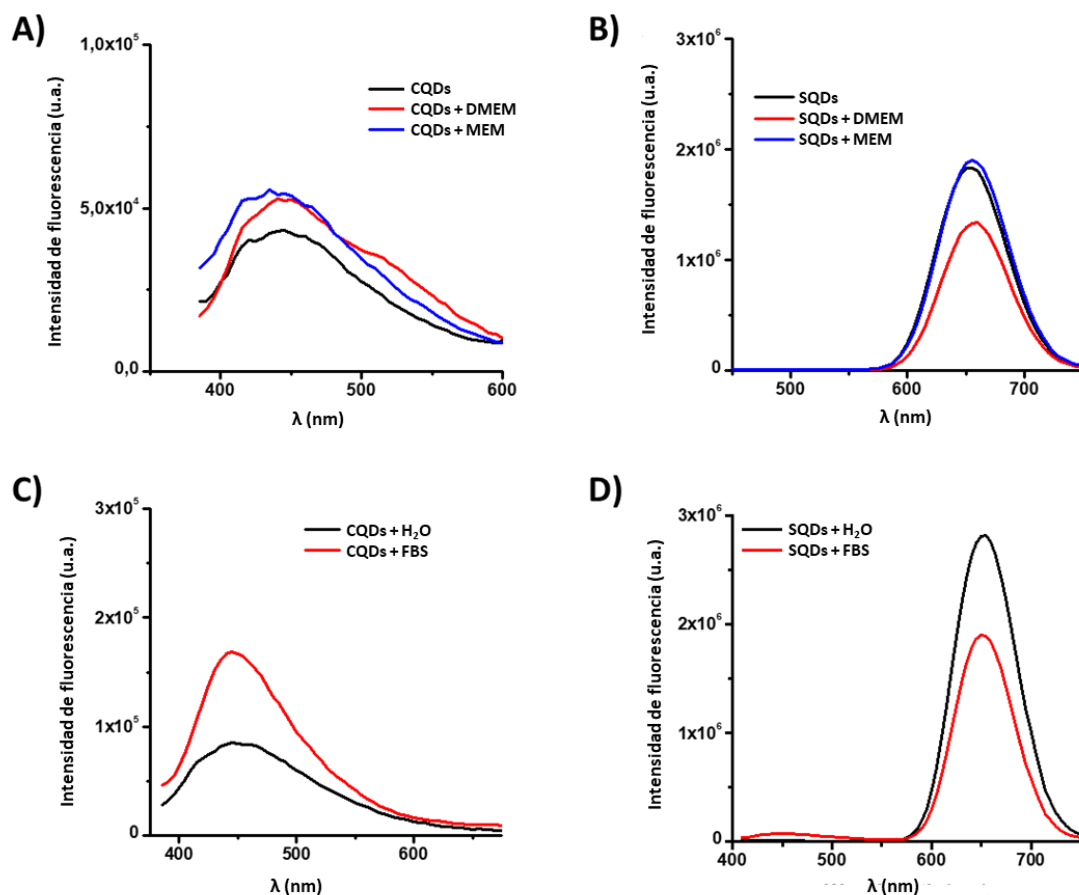


**Figura 66.** Emisión de fluorescencia en cultivos celulares 3T3-L1 expuestos durante (A) 1 h y (B) 6 h a concentraciones crecientes de CQDs (0,2, 10 y 25 mg/L) en presencia de suero. El control corresponde a células 3T3-L1 cultivadas en DMEM en presencia de suero durante 6 h.  $\lambda_{\text{excitación}} = 365 \text{ nm}$  y  $\lambda_{\text{emisión}} = 450 \text{ nm}$ . La fluorescencia de las CQDs en el interior de las células está representada como la media  $\pm$  SEM.

Estos datos sugieren que, en presencia de suero, la incorporación de las CQDs se ve afectada posiblemente por su interacción con las proteínas presentes en el suero provocando un cambio en la superficie de la nanopartícula modificando la identidad sintética de la misma.

## 2.2. Estudios de interacción extracelular de las CQDs y SQDs. Influencia del medio de cultivo en el comportamiento de las *nanodots*

A continuación, a partir de las diferencias observadas en presencia y ausencia de suero, se evaluó la posible interacción entre los componentes del medio de extracelular y las QDs a través de la monitorización de la señal de fluorescencia de las CQDs y las SQDs en presencia de DMEM (medio de cultivo específico de las células 3T3-L1), o FBS (suero común para los dos tipos celulares). También se testó el efecto de MEM, que se usa habitualmente como medio de cultivo específico de otros tipos celulares relacionados con el metabolismo, como las células HepG2.



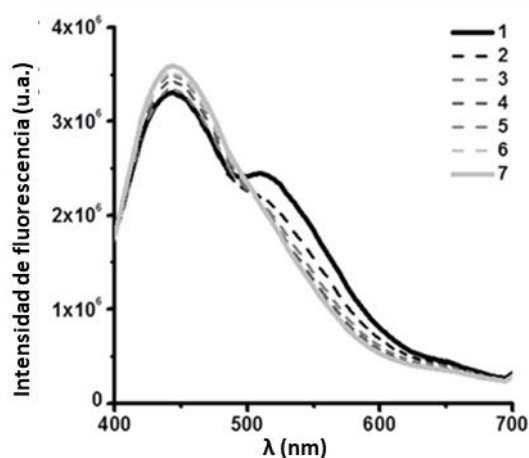
**Figura 67.** Influencia del medio de cultivo en la fluorescencia de emisión de las CQDs y las SQDs. Efecto del DMEM, MEM en la intensidad de fluorescencia de las **(A)** CQDs y **(B)** SQDs. Efecto del FBS en la intensidad de fluorescencia de las **(C)** CQDs y **(D)** SQDs. [Nanodots] = 50 mg/L, anchos de rendija = 3 nm.

Como se muestra en la **Figura 67**, la intensidad de la fluorescencia de emisión de las CQDs aumentó cuando estas nanopartículas se mezclaron con DMEM, MEM (**Figura 67A**) o FBS MEM (**Figura 67C**), lo que indica que tiene lugar una reacción de transferencia de electrones entre las CQDs y estos componentes extracelulares.

En relación a las SQDs, se observó *quenching* en la fluorescencia de emisión cuando estas *nanodots* fueron mezcladas con DMEM (**Figura 67B**), o FBS (**Figura 67D**), pero no con MEM (**Figura 67B**).

Además, estudiamos el comportamiento de las CQDs en respuesta a la combinación de DMEM y FBS, componentes del medio de cultivo de las células 3T3-L1. Como se muestra en la **Figura 68**, se observó un hombro en la banda de emisión

característica de las CQDs, aunque este hombro desapareció después de una irradiación continua durante casi 7 min.



**Figura 68.** Estudio de la intensidad de fluorescencia de las CQDs expuestas a DMEM + 10% FBS. Las líneas representan las medidas de fluorescencias a diferentes tiempos (1 – 7 min). [CQDs] = 50 mg/L, ancho de rendija = 3 nm.

Este estudio muestra una adecuada aproximación experimental para comparar los efectos de toxicidad de nanopartículas en distintos tipos celulares incluyendo el estudio del efecto de los medios extracelulares. En la **Tabla 14** se muestra un resumen de los principales resultados obtenidos y se comparan con un estudio previo llevado a cabo en el grupo con el uso de otras nanopartículas (nanotubos de grafeno).

**Tabla 14.** Comparativa de los principales resultados toxicológicos obtenidos vs. bibliografía.

	<b>CQDs (0,2 – 100 mg/L)</b>	<b>SQDs (0,2-100 mg/L)</b>	<b>SWCNTs-PEG (2,6-13 mg/L)</b>
$\lambda_{\text{excitación}}/\lambda_{\text{emisión}}$ (nm)	365/450	390/650	-
<b>Localización celular en preadipocitos</b>	Intracelular, ausencia de muerte celular	Intracelular, descondensación del ADN, daño en la membrana celular	-
<b>% Viabilidad celular en preadipocitos (línea celular 3T3-L1) (Ausencia FBS)</b>	94-100 %	66-95 %	85-95 %
<b>% Viabilidad celular en preadipocitos (línea celular 3T3-L1) (+ 10% FBS)</b>	87-99 %	33-89 %	95-100 %
<b>Interacción con DMEM (medio de cultivo 3T3-L1)</b>	Aumento de la intensidad de fluorescencia de emisión	<i>Quenching</i> en la fluorescencia de emisión	-
<b>Interacción con FBS (suero para cultivo 3T3-L1)</b>	Aumento de la intensidad de fluorescencia de emisión	<i>Quenching</i> en la fluorescencia de emisión	-
<b>Referencias</b>	(Navarro-Ruiz et al., 2020)		(Caballero-Díaz et al., 2014)

---

## DISCUSIÓN

---

Las dificultades metodológicas que presenta el estudio de posibles biomarcadores y su regulación por MPTs, lleva a la necesidad de buscar nuevas estrategias metodológicas tales como el uso de los *quantum dots*, que podrían ser una herramienta útil en el campo de la biomedicina. En concreto, ya hay *quantum dots* conjugadas con proteínas comerciales (Qdot™ Streptavidin Sampler Kit, por ejemplo) para aplicaciones como *Western blots*, citometría de flujo, adquisición de imágenes por microscopía confocal e incluso en flujos de trabajo de purificación para lograr el fraccionamiento deseado ([www.thermofisher.com](http://www.thermofisher.com)).

Además, recientemente, un estudio ha analizado los efectos de la encapsulación de la dibenzazepina –inhibidor de la señalización de Notch– en nanopartículas fluorescentes para destacar el posible papel terapéutico de la señalización de Notch en el tratamiento de la obesidad. Tras la administración del inhibidor encapsulado en nanopartículas fluorescentes, se observó una mejora en la internalización celular del inhibidor provocando una inhibición sostenida de Notch reduciendo la expansión del tejido adiposo subcutáneo en cerdos. Estos resultados mostraron cómo la señalización de Notch juega un papel esencial en la regulación de la plasticidad del tejido adiposo en animales grandes (Huang et al., 2020).

Por tanto, los *nanodots* fluorescentes proporcionan una base sólida para el desarrollo de nanoagentes en sistemas biológicos de detección e imagen. Entre las dos grandes familias de *nanodots* fluorescentes, CQDs y SQDs, hay un abanico de posibilidades para el diseño y la ingeniería de sus propiedades ópticas en función de la amplia variedad de superficies y tamaños funcionales y, en el caso de las SQDs, las distintas opciones de núcleo de las que pueden estar formadas.

Sin embargo, hay que considerar múltiples variables a la hora de seleccionar a la mejor candidata como herramienta nanotecnológica, siendo necesaria la evaluación de la estabilidad, citotoxicidad y biocompatibilidad de las nanopartículas en nuestro sistema biológico de aplicación.



Para comparar las SQDs y CQDs es necesario que presenten el mismo tamaño y las mismas cargas superficiales. En este caso, las CQDs presentaban un tamaño de 3 nm, y grupos carboxilos en su superficie mostrando una excelente solubilidad en agua, además, sus propiedades fluorescentes son modulables con valores de pH, lo que les permite ser aptas para aplicaciones biológicas (Cayuela et al., 2013; Sciortino et al., 2017). En consecuencia, se seleccionaron SQDs hidrofílicas con un núcleo formado por CdTe, grupos carboxilos en su superficie y el mismo tamaño que las CQDs, aunque con diferente  $\lambda$  emisión que las CQDs.

Entender los orígenes de la fotoluminiscencia en los diversos nanomateriales fotoluminiscentes es necesario para entender su mecanismo de fluorescencia; sin embargo, es aún un aspecto poco estudiado (Cayuela et al., 2016) y los mecanismos de fluorescencia de emisión de las CQDs aún están en debate (Sciortino et al., 2017), estando propuestos varios mecanismos de fluorescencia para estas QDs (Cayuela et al., 2016).

En este estudio se evaluaron las características y el grado de toxicidad de SQDs y CQDs con el mismo tamaño e idénticos grupos de superficie sobre preadipocitos (línea celular 3T3-L1). Nuestros resultados indican que, aunque ambos tipos de nanopartículas podrían ser aptas para su uso en aplicaciones biológicas y/o biomédicas, difieren notablemente en su interacción con las células, en su capacidad de internalización y en su grado de toxicidad celular.

Un estudio previo realizado en nuestro grupo de investigación demostró que la toxicidad de las nanopartículas –en concreto, de las SWCNTs-PEG– aumentó en células 3T3-L1 cultivadas en condiciones de privación de suero (Caballero-Díaz et al., 2014). Estos resultados contrastaron con los obtenidos en este estudio para las CQDs, a pesar de que ambas, CQDs y SWCNTs-PEG, son nanopartículas de carbono (Caballero-Díaz et al., 2014; Cayuela et al., 2016). Para ser más específicos, se necesitaron altas dosis de CQDs (400 mg/L, 800 mg/L o 1600 mg/L) para disminuir la viabilidad celular de las 3T3-L1 en ausencia de suero, en comparación con las SWCNTs-PEG (2,6 mg/L y 13 mg/L) (Caballero-Díaz et al., 2014). Estos resultados podrían revelar la importancia de la

morfología de las nanopartículas (esférica en las CQDs vs. cilíndrica en las SWCNTs-PEG) como parámetro a tener en cuenta a la hora de la elección del nanodispositivo.

Las características sintéticas de las *nanodots* experimentan cambios cuando los nanomateriales se encuentran en un ambiente extracelular, adquiriendo una identidad biológica que no puede atribuirse únicamente a su identidad sintética (Walkey y Chan, 2012). Así, se ha demostrado que la presencia de suero en el medio de cultivo altera el tamaño y el potencial zeta de las nanopartículas (Ehrenberg et al., 2009). Un estudio en la línea celular A549 (células epiteliales de pulmón), demostró que nanopartículas de sílice se internalizaron en condiciones de ausencia de suero, incluso con mayor eficacia que en un medio con suero, mediante la adhesión de las nanopartículas a la membrana celular (Lesniak et al., 2012). Por ello, el estudio de la interacción de las nanopartículas con el medio extracelular es de gran interés. En esta línea, nuestros estudios previos de microscopía con las SWCNTs-PEG (Caballero-Díaz et al., 2014) y los realizados en este estudio con las CQDs demostraron que ambos tipos de nanopartículas pueden ser internalizadas por las células 3T3-L1 en ausencia de suero, apoyando la idea de que la captación de las nanopartículas no es dependiente de la presencia de proteínas séricas en el medio de cultivo, cualquiera que sea el tipo de célula y/o de nanopartícula. De hecho, ambos tipos de nanopartículas, CQDs y SWCNTs-PEG indujeron toxicidad celular en ausencia de suero pero con diferente eficacia, siendo este último más tóxico cuando se administraba a células 3T3-L1 en concentraciones que oscilaban entre 2 y 10 mg/L (Caballero-Díaz et al., 2014). Estas diferencias podrían estar relacionadas con las propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas ya que está establecido que la forma, el tamaño, las cargas en la superficie de la nanopartícula y la composición de su núcleo afectan a la interacción de estas con las células (Behzadi et al., 2017).

También cabe señalar que las CQDs y las SWCNTs-PEG se comportaron de manera diferente cuando se añadieron en medios de cultivo que contenían suero. Así, en presencia de suero, la administración de CQDs disminuyeron la viabilidad celular de las 3T3-L1 a dosis más bajas que los datos observados en situación de privación de suero, mientras que ocurrió lo contrario tras la administración de las SWCNTs-PEG en células 3T3-L1 (Caballero-Díaz et al., 2014). Estos resultados apoyan la idea de que las

propiedades de las nanopartículas son esenciales para definir su asociación con las proteínas séricas, las cuales, a su vez, tienen un impacto en las respuestas biológicas celulares. No obstante, también es plausible que el comportamiento diferencial de las SWCNTs-PEG frente a las CQDs se deba, al menos en parte, por su cubierta de polietilenglicol debido a que se ha demostrado que este polímero interactúa con los componentes del suero, como la albúmina, y que dicha interacción modifica su estabilidad (Bekale et al., 2015). Está establecido que no solo la superficie sino también el núcleo de la nanopartícula es un factor determinante de la toxicidad de la misma (Tsoi et al., 2013).

Por otro lado, se ha demostrado consistentemente que el núcleo de las SQDs (CdTe) es extremadamente tóxico y genera daño en el ADN, estrés oxidativo por generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y muerte celular (Jamieson et al., 2007; Madani et al., 2013; Tsoi et al., 2013; Grabowska-Jadach et al., 2018; Papaioannou et al., 2018). De acuerdo con estas observaciones, nuestro estudio comparativo realizado en 3T3-L1 ha demostrado que las SQDs presentan una mayor toxicidad que las CQDs, tanto en términos del nivel de dosis umbral como del grado de muerte celular. Además, la toxicidad de las SQDs aumentó significativamente en presencia de suero. Esto también se observó, aunque en menor medida, para las CQDs, hecho que podría explicarse debido a una mayor internalización de las QDs en presencia de proteínas séricas en el medio de cultivo.

Al analizar específicamente la interacción de las SQDs y CQDs con los distintos componentes extracelulares, se observó que los factores microambientales podrían modificar la identidad sintética de las CQDs y SQDs, proporcionando una nueva identidad biológica, distinta a la original, que influye en la respuesta de las células a estas QDs. Así, nuestro estudio comparativo del efecto de distintos componentes del medio de cultivo (DMEM, MEM y FBS) en las propiedades de fluorescencia de las CQDs y SQDs sugirieron que, a pesar de compartir superficies idénticas, las SQDs pueden actuar como donantes de electrones y volverse más positivos cuando se exponen a DMEM y FBS, mientras que las CQDs se comportarían como elementos electronegativos en estas condiciones.

Independientemente del campo de aplicación biológico o biomédico de las nanopartículas, es importante evaluar las respuestas de las células diana al tipo específico de partículas que se pretende emplear. Sin embargo, hay pocos estudios comparativos que aborden si los diferentes tipos de células pueden exhibir respuestas distintas a un determinado tipo de nanopartícula (Bradburne et al., 2013; Song et al., 2013; McNamara y Tofail, 2017; Grabowska-Jadach et al., 2018). Un metaanálisis sobre la toxicidad celular de QDs demostró que células epiteliales y preadipocitos, de origen humano o murino, representan los tipos celulares más comunes empleados en estudios de nanotoxicidad (Oh et al., 2016). Por el contrario, los estudios toxicológicos de nanopartículas en hepatocitos son muy limitados [3% según el metaanálisis de Oh et al. (2016)] aunque estas células, que constituyen casi el 80% del volumen del hígado, son células clave para regular procesos tan importantes como el metabolismo, la desintoxicación o la activación de la inmunidad innata, y son actores importantes en las patologías hepáticas, como la esteatosis hepática o el cáncer (Schroeder y McNiven, 2014; Zhou et al., 2015).

En un estudio paralelo realizado con células HepG2, observamos que, en comparación con los resultados obtenidos en preadipocitos 3T3-L1, se necesitaron altas dosis de CQDs (400 mg/L) para desencadenar toxicidad en hepatocitos HepG2 (Navarro-Ruiz et al., 2020). Estos resultados se refieren a células cultivadas en presencia de suero, porque la viabilidad celular de las HepG2 se vio comprometida dramáticamente cuando fueron privadas de suero, mientras que estas condiciones no alteraron significativamente la viabilidad de las células 3T3-L1. Sin embargo, las células HepG2 fueron tan sensibles como las células 3T3-L1 a la toxicidad inducida por las SQDs, al menos en las concentraciones más bajas probadas, aunque parecen a altas concentraciones de las SQDs en comparación con los preadipocitos (Navarro-Ruiz et al., 2020). Además de las diferencias en cuanto a la dependencia del suero y los requisitos de cultivo (DMEM para las células 3T3-L1 y MEM para las células HepG2), parece probable que la internalización de las QDs, el seguimiento intracelular y el metabolismo de las mismas ocurran de manera diferente en cada tipo celular. De acuerdo con esta idea, se ha demostrado que, aunque tanto los preadipocitos como las células hepáticas internalizan nanopartículas de oro a través de endocitosis mediada por clatrina, ambos

tipos celulares muestran respuestas diferentes a inhibidores de endocitosis dirigidos a partes distintivas de esta vía (Ng et al., 2015).

Por lo tanto, las CQDs podrían ser una buena herramienta para la caracterización y posible aplicación biomédica de proteínas de interés en condiciones de obesidad y resistencia a insulina, como FABP4 o transferrina, las cuales son reguladas funcionalmente por modificaciones postraduccionales. En concreto, ya hay un estudio donde se ha conjugado el anticuerpo del receptor de transferrina o la propia transferrina con nanopartículas cilíndricas observando diferentes efectos en la nanotoxicidad en diferentes líneas celulares tumorales señalando la necesidad de conocer los posibles efectos de las nanopartículas conjugadas con fin quimioterapéutico en las células no diana (Wang et al., 2010). Por ello, con el fin de encontrar el mejor diseño de herramienta nanotecnológica de aplicación en el estudio de la disfunción del tejido adiposo en condiciones de obesidad y resistencia a insulina es necesario continuar optimizando los sistemas nanotecnológicos e investigando para dilucidar los mecanismos precisos que subyacen a la captación celular, distribución intracelular y el destino de las nanopartículas.

En resumen, los resultados obtenidos en este último capítulo de la Tesis abren una vía posible dirigido a tratar el tejido adiposo disfuncional en obesidad, basada en el uso de nanoherramientas. Nuestros estudios muestran la biocompatibilidad de las CQDs en particular y la importancia del microambiente sobre las propias características las nanopartículas, que pueden modificar su eficacia.





# **CONCLUSIONES**





Los resultados presentados en esta Tesis Doctoral constituyen una novedosa y valiosa información sobre el papel de las modificaciones postraduccionales en la aparición y desarrollo de enfermedades metabólicas como la resistencia a insulina (IR) y la diabetes tipo 2 (T2D) asociadas a la obesidad, concluyendo que:

1. Los cambios observados en el patrón de acetilación de múltiples proteínas relacionadas con procesos metabólicos en relación al IMC y el desarrollo de resistencia a insulina evidenciaron el posible papel de la acetilación en la disfunción de los adipocitos asociada a la obesidad y enfermedades metabólicas asociadas.
2. La acetilación de FABP4 podría desempeñar un papel clave en la adipogénesis y en el control del metabolismo lipídico en condiciones de obesidad y resistencia a insulina, apoyando la idea de esta adipoquina como una diana terapéutica prometedora en estas condiciones patológicas.
3. La carbonilación de proteínas en el tejido adiposo es depósito-dependiente y puede contribuir al desarrollo de los procesos celulares patogénicos relacionados con la proteostasis que ocurren en los adipocitos en obesidad.
4. La carbonilación de la transferrina que ocurre en el tejido adiposo en obesidad podría alterar su interacción con su receptor y, con ello, contribuir a la alteración del metabolismo del hierro. Este proceso podría desencadenarse de manera previa a la aparición de diabetes tipo 2.
5. Las CQDs podrían representar herramientas moleculares valiosas tanto para estudios básicos de internalización de proteínas como para su uso en el tratamiento de la disfunción celular de los adipocitos en condiciones de obesidad y resistencia a insulina.





# **BIBLIOGRAFÍA**



(2022). Introduction: Standards of Medical Care in Diabetes—2022. *Diabetes Care* 45, S1–S2. <https://doi.org/10.2337/dc22-SINT>.

Ahmad, B., Serpell, C.J., Fong, I.L., and Wong, E.H. (2020). Molecular Mechanisms of Adipogenesis: The Anti-adipogenic Role of AMP-Activated Protein Kinase. *Frontiers in Molecular Biosciences* 7. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2020.00076>.

Aleksandrova, K., Egea Rodrigues, C., Floegel, A., and Ahrens, W. (2020). Omics Biomarkers in Obesity: Novel Etiological Insights and Targets for Precision Prevention. *Curr Obes Rep* 9, 219–230. <https://doi.org/10.1007/s13679-020-00393-y>.

Alver, A., Keha, E.E., Uçar, F., and Ovali, E. (2004). The effect of carbonic anhydrase inhibition on leptin secretion by rat adipose tissue. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* 19, 181–184. <https://doi.org/10.1080/14756360310001650228>.

Ameer, F., Scanduzzi, L., Hasnain, S., Kalbacher, H., and Zaidi, N. (2014). De novo lipogenesis in health and disease. *Metabolism: Clinical and Experimental* 63, 895–902. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2014.04.003>.

Anbalagan, M., Huderson, B., Murphy, L., and Rowan, B.G. (2012). Post-translational modifications of nuclear receptors and human disease. *Nucl Recept Signal* 10. <https://doi.org/10.1621/nrs.10001>.

Ando, Y., Kuroda, A., Kusama, K., Matsutani, T., Matsuda, A., and Tamura, K. (2021). Impact of serine protease inhibitor alpha1-antitrypsin on expression of endoplasmic reticulum stress-induced proinflammatory factors in adipocytes. *Biochemistry and Biophysics Reports* 26. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2021.100967>.

Antonescu, C.N., Foti, M., Sauvonnnet, N., and Klip, A. (2009). Ready, set, internalize: Mechanisms and regulation of GLUT4 endocytosis. *Bioscience Reports* 29, 1–11. <https://doi.org/10.1042/BSR20080105>.

Arias de la Rosa, I., Escudero-Contreras, A., Rodríguez-Cuenca, S., Ruiz-Ponce, M., Jiménez-Gómez, Y., Ruiz-Limón, P., Pérez-Sánchez, C., Ábalos-Aguilera, M.C., Cecchi, I., Ortega, R., et al. (2018). Defective glucose and lipid metabolism in rheumatoid arthritis is determined by chronic inflammation in metabolic tissues. *Journal of Internal Medicine* 284, 61–77. <https://doi.org/10.1111/joim.12743>.

Barceló-Batllo, S., Kalko, S.G., Esteban, Y., Moreno, S., Carmona, M.C., and Gomis, R. (2008). Integration of DIGE and bioinformatics analyses reveals a role of the antiobesity agent tungstate in redox and energy homeostasis pathways in brown adipose tissue. *Molecular and Cellular Proteomics* 7, 378–393. <https://doi.org/10.1074/mcp.M700198-MCP200>.

Behzadi, S., Serpooshan, V., Tao, W., Hamaly, M.A., Alkawareek, M.Y., Dreaden, E.C., Brown, D., Alkilany, A.M., Farokhzad, O.C., and Mahmoudi, M. (2017). Cellular uptake of nanoparticles: Journey inside the cell. *Chemical Society Reviews* 46, 4218–4244. <https://doi.org/10.1039/c6cs00636a>.

Bekale, L., Agudelo, D., and Tajmir-Riahi, H.A. (2015). The role of polymer size and hydrophobic end-group in PEG-protein interaction. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 130, 141–148. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.03.045>.

Belligoli, A., Compagnin, C., Sanna, M., Favaretto, F., Fabris, R., Busetto, L., Foletto, M., Dal Prà, C., Serra, R., Prevedello, L., et al. (2019). Characterization of subcutaneous and omental adipose

tissue in patients with obesity and with different degrees of glucose impairment. *Sci Rep* 9, 11333. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-47719-y>.

Beltrao, P., Bork, P., Krogan, N.J., and van Noort, V. (2013). Evolution and functional cross-talk of protein post-translational modifications. *Molecular Systems Biology* 9. <https://doi.org/10.1002/msb.201304521>.

Blas-Garcia, A., Baldoví, H.G., Polo, M., Victor, V.M., Garcia, H., and Herance, J.R. (2016). Toxicological properties of two fluorescent carbon quantum dots with onion ring morphology and their usefulness as bioimaging agents. *RSC Advances* 6, 30611–30622. <https://doi.org/10.1039/C5RA27662D>.

Blüher, M. (2013). Adipose tissue dysfunction contributes to obesity related metabolic diseases. *Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism* 27, 163–177. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2013.02.005>.

Blüher, M. (2019). Obesity: global epidemiology and pathogenesis. *Nature Reviews Endocrinology* 15, 288–298. <https://doi.org/10.1038/s41574-019-0176-8>.

Blüher, S., and Schwarz, P. (2014). Metabolically healthy obesity from childhood to adulthood - Does weight status alone matter? *Metabolism: Clinical and Experimental* 63, 1084–1092. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2014.06.009>.

Bódis, K., and Roden, M. (2018). Energy metabolism of white adipose tissue and insulin resistance in humans. *European Journal of Clinical Investigation* 48. <https://doi.org/10.1111/eci.13017>.

Booth, A., Magnuson, A., Fouts, J., and Foster, M.T. (2016). Adipose tissue: An endocrine organ playing a role in metabolic regulation. *Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation* 26, 25–42. <https://doi.org/10.1515/hmbci-2015-0073>.

Bourgeois, C., Gorwood, J., Barrail-Tran, A., Lagathu, C., Capeau, J., Desjardins, D., le Grand, R., Damouche, A., Béréziat, V., and Lambotte, O. (2019). Specific Biological Features of Adipose Tissue, and Their Impact on HIV Persistence. *Frontiers in Microbiology* 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02837>.

Bradburne, C.E., Delehanty, J.B., Boeneman Gemmill, K., Mei, B.C., Mattoussi, H., Susumu, K., Blanco-Canosa, J.B., Dawson, P.E., and Medintz, I.L. (2013). Cytotoxicity of quantum dots used for in vitro cellular labeling: Role of QD surface ligand, delivery modality, cell type, and direct comparison to organic fluorophores. *Bioconjugate Chemistry* 24, 1570–1583. <https://doi.org/10.1021/bc4001917>.

Bradford, M.M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding.

Bray, G.A., Heisel, W.E., Afshin, A., Jensen, M.D., Dietz, W.H., Long, M., Kushner, R.F., Daniels, S.R., Wadden, T.A., Tsai, A.G., et al. (2018). The science of obesity management: An endocrine society scientific statement. *Endocrine Reviews* 39, 79–132. <https://doi.org/10.1210/er.2017-00253>.

Brewer, P.D., Habtemichael, E.N., Romenskaia, I., Mastick, C.C., and Coster, A.C.F. (2016). Glut4 is sorted from a Rab10 GTPase-independent constitutive recycling pathway into a highly insulinresponsive Rab10 GTPase-dependent sequestration pathway after adipocyte

differentiation. *Journal of Biological Chemistry* 291, 773–789. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.694919>.

Bruce, K.D., and Hanson, M.A. (2010). The developmental origins, mechanisms, and implications of metabolic syndrome. In *Journal of Nutrition*, pp. 648–652.

Caballero-Díaz, E., Guzmán-Ruiz, R., Malagón, M.M., Simonet, B.M., and Valcárcel, M. (2014). Effects of the interaction of single-walled carbon nanotubes with 4-nonylphenol on their in vitro toxicity. *Journal of Hazardous Materials* 275, 107–115. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.04.055>.

Cannon, B., and Nedergaard, J. (2004). Brown Adipose Tissue: Function and Physiological Significance. *Physiological Reviews* 84, 277–359. <https://doi.org/10.1152/physrev.00015.2003>.

Carvalho, E., Kotani, K., Peroni, O.D., and Kahn, B.B. (2005). Adipose-specific overexpression of GLUT4 reverses insulin resistance and diabetes in mice lacking GLUT4 selectively in muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 289, 551–561. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00116.2005.-Adipose>.

Catalán, V., Frühbeck, G., and Gómez-Ambrosi, J. (2018). Inflammatory and oxidative stress markers in skeletal muscle of obese subjects. In *Obesity: Oxidative Stress and Dietary Antioxidants*, (Elsevier), pp. 163–189.

Cayuela, A., Laura Soriano, M., and Valcárcel, M. (2013). Strong luminescence of Carbon Dots induced by acetone passivation: Efficient sensor for a rapid analysis of two different pollutants. *Analytica Chimica Acta* 804, 246–251. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2013.10.031>.

Cayuela, A., Soriano, M.L., Carrillo-Carrión, C., and Valcárcel, M. (2016). Semiconductor and carbon-based fluorescent nanodots: The need for consistency. *Chemical Communications* 52, 1311–1326. <https://doi.org/10.1039/c5cc07754k>.

Cheng, K., and Lim, L.Y. (2004). Insulin-loaded calcium pectinate nanoparticles: Effects of pectin molecular weight and formulation pH. *Drug Development and Industrial Pharmacy* 30, 359–367. <https://doi.org/10.1081/DDC-120030930>.

Cheng, Y., Zak, O., Aisen, P., Harrison, S.C., and Walz, T. (2004). Structure of the Human Transferrin Receptor-Transferrin Complex. *Cell* 116, 565-576.

Chooi, Y.C., Ding, C., and Magkos, F. (2019). The epidemiology of obesity. *Metabolism: Clinical and Experimental* 92, 6–10. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2018.09.005>.

Choudhary, C., Kumar, C., Gnad, F., Nielsen, M.L., Rehman, M., Walther, T.C., Olsen, J. v., and Mann, M. (2009). Lysine acetylation targets protein complexes and co-regulates major cellular functions. *Science* (1979) 325, 834–840. <https://doi.org/10.1126/science.1175371>.

Choudhary, C., Weinert, B.T., Nishida, Y., Verdin, E., and Mann, M. (2014). The growing landscape of lysine acetylation links metabolism and cell signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 15, 536–550. <https://doi.org/10.1038/nrm3841>.

Christie, M., Chang, C.W., Róna, G., Smith, K.M., Stewart, A.G., Takeda, A.A.S., Fontes, M.R.M., Stewart, M., Vértessy, B.G., Forwood, J.K., et al. (2016). Structural Biology and Regulation of Protein Import into the Nucleus. *Journal of Molecular Biology* 428, 2060–2090. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2015.10.023>.

- Cinti, S. (2012). The adipose organ at a glance. *DMM Disease Models and Mechanisms* 5, 588–594. <https://doi.org/10.1242/dmm.009662>.
- Cinti, S. (2018). Pink Adipocytes. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 29, 651–666. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2018.05.007>.
- Cisa-Wieczorek, S., and Hernández-Alvarez, M.I. (2020). Deregulation of Lipid Homeostasis: A Fa(c)t in the Development of Metabolic Diseases. *Cells* 9. <https://doi.org/10.3390/cells9122605>.
- Collins, J.M., Neville, M.J., Pinnick, K.E., Hodson, L., Ruyter, B., van Dijk, T.H., Reijngoud, D.J., Fielding, M.D., and Frayn, K.N. (2011). De novo lipogenesis in the differentiating human adipocyte can provide all fatty acids necessary for maturation. *Journal of Lipid Research* 52, 1683–1692. <https://doi.org/10.1194/jlr.M012195>.
- Cotillard, A., Poitou, C., Torcivia, A., Bouillot, J.L., Dietrich, A., Klötting, N., Grégoire, C., Lolmede, K., Blüher, M., and Clément, K. (2014). Adipocyte size threshold matters: Link with risk of type 2 diabetes and improved insulin resistance after gastric bypass. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 99. <https://doi.org/10.1210/jc.2014-1074>.
- Crewe, C., An, Y.A., and Scherer, P.E. (2017). The ominous triad of adipose tissue dysfunction: Inflammation, fibrosis, and impaired angiogenesis. *Journal of Clinical Investigation* 127, 74–82. <https://doi.org/10.1172/JCI88883>.
- Curtis, J.M., Hahn, W.S., Long, E.K., Burrill, J.S., Arriaga, E.A., and Bernlohr, D.A. (2012). Protein carbonylation and metabolic control systems. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 23, 399–406. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2012.05.008>.
- Czech, M.P. (2017). Insulin action and resistance in obesity and type 2 diabetes. *Nature Medicine* 23, 804–814. <https://doi.org/10.1038/nm.4350>.
- Czech, M.P. (2020). Mechanisms of insulin resistance related to white, beige, and brown adipocytes. *Molecular Metabolism* 34, 27–42. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2019.12.014>.
- Czech, M.P., Tencerova, M., Pedersen, D.J., and Aouadi, M. (2013). Insulin signalling mechanisms for triacylglycerol storage. *Diabetologia* 56, 949–964. <https://doi.org/10.1007/s00125-013-2869-1>.
- Dankel, S.N., Fadnes, D.J., Stavrum, A.K., Stansberg, C., Holdhus, R., Hoang, T., Veum, V.L., Christensen, B.J., Våge, V., Sagen, J. v., et al. (2010). Switch from stress response to homeobox transcription factors in adipose tissue after profound fat loss. *PLoS ONE* 5. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011033>.
- Datta, R., Podolsky, M.J., and Atabai, K. (2018). Fat fibrosis: friend or foe? *JCI Insight* 3. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.122289>.
- de Lorenzo, A., Gratteri, S., Gualtieri, P., Cammarano, A., Bertucci, P., and di Renzo, L. (2019). Why primary obesity is a disease? *Journal of Translational Medicine* 17. <https://doi.org/10.1186/s12967-019-1919-y>.
- Delgado-Lista, J.-D.J.F. et al. (2022). Long-term secondary prevention of cardiovascular disease with a Mediterranean diet and a low-fat diet (CORDIOPREV): a randomised controlled trial. *The Lancet* 399, 1876–1885.



- Demozay, D., Mas, J.C., Rocchi, S., and van Obberghen, E. (2008). FALDH reverses the deleterious action of oxidative stress induced by lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal on insulin signaling in 3T3-L1 adipocytes. *Diabetes* 57, 1216–1226. <https://doi.org/10.2337/db07-0389>.
- Denis, G. v., and Obin, M.S. (2013). “Metabolically healthy obesity”: Origins and implications. *Molecular Aspects of Medicine* 34, 59–70. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2012.10.004>.
- Díaz-Ruiz, A., Guzmán-Ruiz, R., Moreno, N.R., García-Rios, A., Delgado-Casado, N., Membrives, A., Túnez, I., el Bekay, R., Fernández-Real, J.M., Tovar, S., et al. (2015). Proteasome Dysfunction Associated to Oxidative Stress and Proteotoxicity in Adipocytes Compromises Insulin Sensitivity in Human Obesity. *Antioxidants and Redox Signaling* 23, 597–612. <https://doi.org/10.1089/ars.2014.5939>.
- Diz, A.P., Truebano, M., and Skibinski, D.O.F. (2009). The consequences of sample pooling in proteomics: An empirical study. *Electrophoresis* 30, 2967–2975. <https://doi.org/10.1002/elps.200900210>.
- Dodson, M. v., Du, M., Wang, S., Bergen, W.G., Fernyhough-Culver, M., Basu, U., Poulos, S.P., and Hausman, G.J. (2014). Adipose depots differ in cellularity, adipokines produced, gene expression, and cell systems. *Adipocyte* 3, 236–241. <https://doi.org/10.4161/adip.28321>.
- Dongiovanni, P., Ruscica, M., Rametta, R., Recalcati, S., Steffani, L., Gatti, S., Girelli, D., Cairo, G., Magni, P., Fargion, S., et al. (2013). Dietary iron overload induces visceral adipose tissue insulin resistance. *American Journal of Pathology* 182, 2254–2263. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2013.02.019>.
- Drazic, A., Myklebust, L.M., Ree, R., and Arnesen, T. (2016). The world of protein acetylation. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics* 1864, 1372–1401. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2016.06.007>.
- Duan, G., and Walther, D. (2015). The Roles of Post-translational Modifications in the Context of Protein Interaction Networks. *PLoS Computational Biology* 11. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1004049>.
- Ducharme, N.A., and Bickel, P.E. (2008). Minireview: Lipid droplets in lipogenesis and lipolysis. *Endocrinology* 149, 942–949. <https://doi.org/10.1210/en.2007-1713>.
- Ehrenberg, M.S., Friedman, A.E., Finkelstein, J.N., Oberdörster, G., and McGrath, J.L. (2009). The influence of protein adsorption on nanoparticle association with cultured endothelial cells. *Biomaterials* 30, 603–610. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.09.050>.
- Ejarque, M., Ceperuelo-Mallafré, V., Serena, C., Maymo-Masip, E., Duran, X., Díaz-Ramos, A., Millan-Scheiding, M., Núñez-Álvarez, Y., Núñez-Roa, C., Gama, P., et al. (2019). Adipose tissue mitochondrial dysfunction in human obesity is linked to a specific DNA methylation signature in adipose-derived stem cells. *International Journal of Obesity* 43, 1256–1268. <https://doi.org/10.1038/s41366-018-0219-6>.
- Ekimov, A.I., and Onushchenko, A.A. (1982). Quantum size effect in the optical-spectra of semiconductor micro-crystals. *Sov. Phys. Semiconduct.* 16, 775–778.
- el Husseny, M.W.A., Mamdouh, M., Shaban, S., Ibrahim Abushouk, A., Zaki, M.M.M., Ahmed, O.M., and Abdel-Daim, M.M. (2017). Adipokines: Potential Therapeutic Targets for Vascular Dysfunction in Type II Diabetes Mellitus and Obesity. *Journal of Diabetes Research* 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/8095926>.

- Esteve Ràfols, M. (2014). Adipose tissue: Cell heterogeneity and functional diversity. *Endocrinología y Nutrición* (English Edition) 61, 100–112. <https://doi.org/10.1016/j.endoen.2014.02.001>.
- Feng, Y., Feng, Q., Lv, Y., Song, X., Qu, H., and Chen, Y. (2020). The relationship between iron metabolism, stress hormones, and insulin resistance in gestational diabetes mellitus. *Nutrition and Diabetes* 10. <https://doi.org/10.1038/s41387-020-0122-9>.
- Fernández-Real, J.M., and Manco, M. (2014). Effects of iron overload on chronic metabolic diseases. *The Lancet Diabetes and Endocrinology* 2, 513–526. [https://doi.org/10.1016/S2213-8587\(13\)70174-8](https://doi.org/10.1016/S2213-8587(13)70174-8).
- Fernández-Real, J.M., Blasco, G., Puig, J., Moreno, M., Xifra, G., Sánchez-Gonzalez, J., Maria Alustiza, J., Pedraza, S., Ricart, W., and Moreno-Navarrete, J.M. (2016). Adipose tissue R2\* signal is increased in subjects with obesity: A preliminary MRI study. *Obesity* 24, 352–358. <https://doi.org/10.1002/oby.21347>.
- Fernández-Vega, A., Chicano-Gálvez, E., Prentice, B.M., Anderson, D., Priego-Capote, F., López-Bascón, M.A., Calderón-Santiago, M., Avendaño, M.S., Guzmán-Ruiz, R., Tena-Sempere, M., et al. (2020). Optimization of a MALDI-Imaging protocol for studying adipose tissue-associated disorders. *Talanta* 219. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.121184>.
- Fernando, K.A.S., Sahu, S., Liu, Y., Lewis, W.K., Guliants, E.A., Jafariyan, A., Wang, P., Bunker, C.E., and Sun, Y.P. (2015). Carbon quantum dots and applications in photocatalytic energy conversion. *ACS Applied Materials and Interfaces* 7, 8363–8376. <https://doi.org/10.1021/acsami.5b00448>.
- Fernando, R., Wardelmann, K., Deubel, S., Kehm, R., Jung, T., Mariotti, M., Vasilaki, A., Gladyshev, V.N., Kleinriders, A., Grune, T., et al. (2020). Low steady-state oxidative stress inhibits adipogenesis by altering mitochondrial dynamics and decreasing cellular respiration. *Redox Biology* 32. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2020.101507>.
- Ferrero, R., Rainer, P., and Deplancke, B. (2020). Toward a Consensus View of Mammalian Adipocyte Stem and Progenitor Cell Heterogeneity. *Trends in Cell Biology* 30, 937–950. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2020.09.007>.
- Frohnert, B.I., and Bernlohr, D.A. (2013). Protein carbonylation, mitochondrial dysfunction, and insulin resistance. *Advances in Nutrition* 4, 157–163. <https://doi.org/10.3945/an.112.003319>.
- Frohnert, B.I., Sinaiko, A.R., Serrot, F.J., Foncea, R.E., Moran, A., Ikramuddin, S., Choudry, U., and Bernlohr, D.A. (2011). Increased adipose protein carbonylation in human obesity. *Obesity* 19, 1735–1741. <https://doi.org/10.1038/oby.2011.115>.
- Fryk, E., Olausson, J., Mossberg, K., Strindberg, L., Schmelz, M., Brogren, H., Gan, L.M., Piazza, S., Provenzani, A., Becattini, B., et al. (2021). Hyperinsulinemia and insulin resistance in the obese may develop as part of a homeostatic response to elevated free fatty acids: A mechanistic case-control and a population-based cohort study. *EBioMedicine* 65. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2021.103264>.
- Fukushima, A., and Lopaschuk, G.D. (2016). Acetylation control of cardiac fatty acid  $\beta$ -oxidation and energy metabolism in obesity, diabetes, and heart failure. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease* 1862, 2211–2220. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2016.07.020>.
- Furuhashi, M. (2019). Fatty acid-binding protein 4 in cardiovascular and metabolic diseases. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis* 26, 216–232. <https://doi.org/10.5551/JAT.48710>.

- Furuhashi, M., and Hotamisligil, G.S. (2008). Fatty acid-binding proteins: Role in metabolic diseases and potential as drug targets. *Nature Reviews Drug Discovery* 7, 489–503. <https://doi.org/10.1038/nrd2589>.
- Furuhashi, M., Saitoh, S., Shimamoto, K., and Miura, T. (2014). Fatty acid-binding protein 4 (FABP4): Pathophysiological insights and potent clinical biomarker of metabolic and cardiovascular diseases. *Clinical Medicine Insights: Cardiology* 2014, 23–33. <https://doi.org/10.4137/CMC.S17067>.
- Ghaben, A.L., and Scherer, P.E. (2019). Adipogenesis and metabolic health. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 20, 242–258. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0093-z>.
- Ghezzi, P., and Bonetto, V. (2003). Redox proteomics: Identification of oxidatively modified proteins. In *Proteomics*, pp. 1145–1153.
- Gillilan, R.E., Ayers, S.D., and Noy, N. (2007). Structural Basis for Activation of Fatty Acid Binding Protein 4. *J Mol Biol* 372, 1246–1260.
- Giordano, A., Smorlesi, A., Frontini, A., Barbatelli, G., and Cint, S. (2014). White, brown and pink adipocytes: The extraordinary plasticity of the adipose organ. *European Journal of Endocrinology* 170. <https://doi.org/10.1530/EJE-13-0945>.
- Görg, A., Weiss, W., and Dunn, M.J. (2004). Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics* 4, 3665–3685. <https://doi.org/10.1002/pmic.200401031>.
- Grabowska-Jadach, I., Zuchowska, A., Olesik, M., Drozd, M., Pietrzak, M., Malinowska, E., and Brzozka, Z. (2018). Cytotoxicity studies of selected cadmium-based quantum dots on 2D: Vs. 3D cell cultures. *New Journal of Chemistry* 42, 12787–12795. <https://doi.org/10.1039/c8nj01986j>.
- Gregor, M.F., and Hotamisligil, G.S. (2007). Adipocyte stress: The endoplasmic reticulum and metabolic disease. *Journal of Lipid Research* 48, 1905–1914. <https://doi.org/10.1194/jlr.R700007-JLR200>.
- Grimsrud, P.A., Picklo, M.J., Griffin, T.J., and Bernlohr, D.A. (2007). Carbonylation of adipose proteins in obesity and insulin resistance: Identification of adipocyte fatty acid-binding protein as a cellular target of 4-hydroxynonenal. *Molecular and Cellular Proteomics* 6, 624–637. <https://doi.org/10.1074/mcp.M600120-MCP200>.
- Guglielmi, V., D'Adamo, M., Bellia, A., Ciotto, R.T., Federici, M., Lauro, D., and Sbraccia, P. (2015). Iron status in obesity: An independent association with metabolic parameters and effect of weight loss. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases* 25, 541–547. <https://doi.org/10.1016/j.numecd.2015.02.012>.
- Guilherme, A., Virbasius, J. v., Puri, V., and Czech, M.P. (2008). Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 9, 367–377. <https://doi.org/10.1038/nrm2391>.
- Gupta, R.K. (2014). Adipocytes. *Current Biology* 24, R988–R993. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.09.003>.
- Guzmán-Ruiz, R., Tercero-Alcázar, C., Rabanal-Ruiz, Y., Díaz-Ruiz, A., el Bekay, R., Rangel-Zuñiga, O.A., Navarro-Ruiz, M.C., Molero, L., Membrives, A., Ruiz-Rabelo, J.F., et al. (2020a). Adipose tissue depot-specific intracellular and extracellular cues contributing to insulin resistance in obese individuals. *FASEB Journal* 34, 7520–7539. <https://doi.org/10.1096/fj.201902703R>.

- Gygi, S.P., Corthals, G.L., Zhang, Y., Rochon, Y., and Aebersold, R. (2000). Evaluation of two-dimensional gel electrophoresis-based proteome analysis technology. *PNAS* 97, 9390–9395.
- Han, D., Yu, Z., Lai, J., and Yang, C. (2022). Post-translational modification: a strategic response to high temperature in plants. *ABIOTECH* 3, 49–64. <https://doi.org/10.1007/s42994-021-00067-w>.
- Havrdova, M., Hola, K., Skopalik, J., Tomankova, K., Petr, M., Cepe, K., Polakova, K., Tucek, J., Bourlinos, A.B., and Zboril, R. (2016). Toxicity of carbon dots-Effect of surface functionalization on the cell viability, reactive oxygen species generation and cell cycle. *Carbon N Y* 99, 238–248. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2015.12.027>.
- Heberle, H., Meirelles, V.G., da Silva, F.R., Telles, G.P., and Minghim, R. (2015). InteractiVenn: A web-based tool for the analysis of sets through Venn diagrams. *BMC Bioinformatics* 16. <https://doi.org/10.1186/s12859-015-0611-3>.
- Heinonen, S., Jokinen, R., Rissanen, A., and Pietiläinen, K.H. (2020). White adipose tissue mitochondrial metabolism in health and in obesity. *Obesity Reviews* 21. <https://doi.org/10.1111/obr.12958>.
- Henegar, C., Tordjman, J., Achard, V., Lacasa, D., Cremer, I., Guerre-Millo, M., Poitou, C., Basdevant, A., Stich, V., Viguerie, N., et al. (2008). Adipose tissue transcriptomic signature highlights the pathological relevance of extracellular matrix in human obesity. *Genome Biology* 9. <https://doi.org/10.1186/gb-2008-9-1-r14>.
- Hennrich, M.L., and Gavin, A.-C. (2015). Quantitative mass spectrometry of posttranslational modifications: Keys to confidence. *Sci. Signal.* 8, re5.
- Hepler, C., and Gupta, R.K. (2017). The expanding problem of adipose depot remodeling and postnatal adipocyte progenitor recruitment. *Molecular and Cellular Endocrinology* 445, 95–108. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2016.10.011>.
- Hirata, Y., Hosaka, T., Iwata, T., Le, C.T.K., Jambaldorj, B., Teshigawara, K., Harada, N., Sakaue, H., Sakai, T., Yoshimoto, K., et al. (2011). Vimentin binds IRAP and is involved in GLUT4 vesicle trafficking. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 405, 96–101. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.12.134>.
- Hotamisligil, G.S., and Bernlohr, D.A. (2015). Metabolic functions of FABPs - Mechanisms and therapeutic implications. *Nature Reviews Endocrinology* 11, 592–605. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2015.122>.
- Hotamisligil, G.S., Murray, D.L., Choy, L.N., and Spiegelman, B.M. (1994). Tumor necrosis factor  $\alpha$  inhibits signaling from the insulin receptor (cyt  $\alpha$ 2 is not insulin-dependent diabetes mellitus/glucose transport/tyrosine receptor).
- Hou, B., Zhao, Y., He, P., Xu, C., Ma, P., Lam, S.M., Li, B., Gil, V., Shui, G., Qiang, G., et al. (2020). Targeted lipidomics and transcriptomics profiling reveal the heterogeneity of visceral and subcutaneous white adipose tissue. *Life Sciences* 245. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.117352>.
- Hruby, A., and Hu, F.B. (2015). The Epidemiology of Obesity: A Big Picture. *Pharmacoeconomics* 33, 673–689. <https://doi.org/10.1007/s40273-014-0243-x>.

- Huang, D., Narayanan, N., Cano-Vega, M.A., Jia, Z., Ajuwon, K.M., Kuang, S., and Deng, M. (2020). Nanoparticle-Mediated Inhibition of Notch Signaling Promotes Mitochondrial Biogenesis and Reduces Subcutaneous Adipose Tissue Expansion in Pigs. *IScience* 23. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2020.101167>.
- Hui, H.X., and Feng, T. (2018). Adipose Tissue as an Endocrine Organ. In *Adipose Tissue*, (InTech).
- Hurtado Del Pozo, C., Calvo, R.M., Vesperinas-García, G., Gómez-Ambrosi, J., Frühbeck, G., Rubio, M.A., and Obregon, M.J. (2011). Expression profile in omental and subcutaneous adipose tissue from lean and obese subjects. Repression of lipolytic and lipogenic genes. *Obesity Surgery* 21, 633–643. <https://doi.org/10.1007/s11695-010-0246-4>.
- Hussein, R.M., Benjamin, I.J., and Kampinga, H.H. (2015). Rescue of  $\alpha$ B crystallin (HSPB5) mutants associated protein aggregation by co-expression of HSPB5 partners. *PLoS ONE* 10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0126761>.
- Inagaki, T., Sakai, J., and Kajimura, S. (2016). Transcriptional and epigenetic control of brown and beige adipose cell fate and function. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 17, 480–495. <https://doi.org/10.1038/nrm.2016.62>.
- Irazusta, V., Moreno-Cermeño, A., Ros, J., and Tamarit, J. (2008). Estrategias proteómicas para el análisis de grupos carbonilo como marcadores de daño oxidativo en proteínas. *PROTEOMICA*.
- Iyer, A., Fairlie, D.P., and Brown, L. (2012). Lysine acetylation in obesity, diabetes and metabolic disease. *Immunology and Cell Biology* 90, 39–46. <https://doi.org/10.1038/icb.2011.99>.
- Jamieson, T., Bakhshi, R., Petrova, D., Pocock, R., Imani, M., and Seifalian, A.M. (2007). Biological applications of quantum dots. *Biomaterials* 28, 4717–4732. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.07.014>.
- Jankovic, A., Korac, A., Srdic-Galic, B., Buzadzic, B., Otasevic, V., Stancic, A., Vucetic, M., Markelic, M., Velickovic, K., Golic, I., et al. (2014). Differences in the redox status of human visceral and subcutaneous adipose tissues - Relationships to obesity and metabolic risk. *Metabolism: Clinical and Experimental* 63, 661–671. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2014.01.009>.
- Jastreboff, A.M., Kotz, C.M., Kahan, S., Kelly, A.S., and Heymsfield, S.B. (2019). Obesity as a Disease: The Obesity Society 2018 Position Statement. *Obesity* 27, 7–9. <https://doi.org/10.1002/oby.22378>.
- Jenkins-Kruchten, A.E., Bennaars-Eiden, A., Ross, J.R., Shen, W.J., Kraemer, F.B., and Bernlohr, D.A. (2003). Fatty acid-binding protein-hormone-sensitive lipase interaction: Fatty acid dependence on binding. *Journal of Biological Chemistry* 278, 47636–47643. <https://doi.org/10.1074/jbc.M307680200>.
- Jia, Q., Morgan-Bathke, M.E., and Jensen, M.D. (2020). Adipose tissue macrophage burden, systemic inflammation and insulin resistance. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 319, E254-E264.
- Jung, Y.K., Shin, E., and Kim, B.S. (2015). Cell Nucleus-Targeting Zwitterionic Carbon Dots. *Scientific Reports* 5. <https://doi.org/10.1038/srep18807>.
- Kahn, C.R., Wang, G., and Lee, K.Y. (2019). Altered adipose tissue and adipocyte function in the pathogenesis of metabolic syndrome. *Journal of Clinical Investigation* 129, 3990–4000. <https://doi.org/10.1172/JCI129187>.

- Kalluri, R. (2016). The biology and function of fibroblasts in cancer. *Nature Reviews Cancer* 16, 582–598. <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.73>.
- Kamath, K.S., Vasavada, M.S., and Srivastava, S. (2011). Proteomic databases and tools to decipher post-translational modifications. *Journal of Proteomics* 75, 127–144. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2011.09.014>.
- Karastergiou, K., and Fried, S.K. (2013). Multiple adipose depots increase cardiovascular risk via local and systemic effects topical collection on clinical trials and their interpretations. *Current Atherosclerosis Reports* 15. <https://doi.org/10.1007/s11883-013-0361-5>.
- Kargbo, O., Jin, Y., and Ding, S.-N. (2015). Recent Advances in Luminescent Carbon Dots. *Current Analytical Chemistry* 11, 4–21.
- Ke, M., Shen, H., Wang, L., Luo, S., Lin, L., Yang, J., and Tian, R. (2016). Identification, quantification, and site localization of protein posttranslational modifications via mass spectrometry-based proteomics. In *Advances in Experimental Medicine and Biology*, (Springer New York LLC), pp. 345–382.
- Kelley, L.A., Mezulis, S., Yates, C.M., Wass, M.N., and Sternberg, M.J.E. (2015). The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nature Protocols* 10, 845–858. <https://doi.org/10.1038/nprot.2015.053>.
- Khan, S., Chan, Y.T., Revelo, X.S., and Winer, D.A. (2020). The Immune Landscape of Visceral Adipose Tissue During Obesity and Aging. *Frontiers in Endocrinology* 11. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00267>.
- Kim, E.Y., Kim, W.K., Kang, H.J., Kim, J.H., Chung, S.J., Seo, Y.S., Park, S.G., Lee, S.C., and Bae, K.H. (2012). Acetylation of malate dehydrogenase 1 promotes adipogenic differentiation via activating its enzymatic activity. *Journal of Lipid Research* 53, 1864–1876. <https://doi.org/10.1194/jlr.M026567>.
- Kim, S.Y., Kim, I., Cho, W., Oh, G.T., and Park, Y.M. (2021). Vimentin deficiency prevents high-fat diet-induced obesity and insulin resistance in mice. *Diabetes and Metabolism Journal* 45, 97–108. <https://doi.org/10.4093/DMJ.2019.0198>.
- Klimčáková, E., Roussel, B., Márquez-Quiñones, A., Kováčová, Z., Kováčiková, M., Combes, M., Šiklová-Vítková, M., Hejnová, J., Šrámková, P., Bouloumié, A., et al. (2011). Worsening of obesity and metabolic status yields similar molecular adaptations in human subcutaneous and visceral adipose tissue: Decreased metabolism and increased immune response. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 96. <https://doi.org/10.1210/jc.2010-1575>.
- Klip, A., McGraw, T.E., and James, D.E. (2019). Thirty sweet years of GLUT4. *Journal of Biological Chemistry* 294, 11369–11381. <https://doi.org/10.1074/jbc.REV119.008351>.
- Klip, A., Sun, Y., Chiu, T.T., and Foley, K.P. (2014). Signal transduction meets vesicle traffic: The software and hardware of GLUT4 translocation. *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 306. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00069.2014>.
- Kojta, I., Chacińska, M., and Błachnio-Zabielska, A. (2020). Obesity, bioactive lipids, and adipose tissue inflammation in insulin resistance. *Nutrients* 12. <https://doi.org/10.3390/nu12051305>.
- König, J., Jung, T., and Grune, T. (2017). Protein Carbonylation in Aging and Senescence. *Protein Carbonylation: Principles, Analysis, and Biological Implications*, First Edition.

- Konigorski, S., Janke, J., Drogan, D., Bergmann, M.M., Hierholzer, J., Kaaks, R., Boeing, H., and Pischon, T. (2019). Prediction of circulating adipokine levels based on body fat compartments and adipose tissue gene expression. *Obesity Facts* 12, 590–605. <https://doi.org/10.1159/000502117>.
- Koster, A., Murphy, R.A., Eiriksdottir, G., Aspelund, T., Sigurdsson, S., Lang, T.F., Gudnason, V., Launer, L.J., and Harris, T.B. (2015). Fat distribution and mortality: The AGES-Reykjavik study. *Obesity* 23, 893–897. <https://doi.org/10.1002/oby.21028>.
- Krycer, J.R., Yugi, K., Hirayama, A., Fazakerley, D.J., Quek, L.E., Scalzo, R., Ohno, S., Hodson, M.P., Ikeda, S., Shoji, F., et al. (2017). Dynamic Metabolomics Reveals that Insulin Primes the Adipocyte for Glucose Metabolism. *Cell Reports* 21, 3536–3547. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.11.085>.
- Kwok, K.H.M., Lam, K.S.L., and Xu, A. (2016). Heterogeneity of white adipose tissue: Molecular basis and clinical implications. *Experimental and Molecular Medicine* 48. <https://doi.org/10.1038/emm.2016.5>.
- Lafontan, M. (2014). Adipose tissue and adipocyte dysregulation. *Diabetes and Metabolism* 40, 16–28. <https://doi.org/10.1016/j.diabet.2013.08.002>.
- Lafontan, M., and Langin, D. (2009). Lipolysis and lipid mobilization in human adipose tissue. *Progress in Lipid Research* 48, 275–297. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2009.05.001>.
- Lagarde, D., Jeanson, Y., Barreau, C., Moro, C., Peyriga, L., Cahoreau, E., Guissard, C., Arnaud, E., Galinier, A., Bouzier-Sore, A.K., et al. (2021). Lactate fluxes mediated by the monocarboxylate transporter-1 are key determinants of the metabolic activity of beige adipocytes. *Journal of Biological Chemistry* 296. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA120.016303>.
- Lago, M.E.L., Cerqueira, M.T., Pirraco, R.P., Reis, R.L., and Marques, A.P. (2018). Skin in vitro models to study dermal white adipose tissue role in skin healing. In *Skin Tissue Models*, (Elsevier Inc.), pp. 327–352.
- Laskowski, R.A., and Swindells, M.B. (2011). LigPlot+: Multiple ligand-protein interaction diagrams for drug discovery. *Journal of Chemical Information and Modeling* 51, 2778–2786. <https://doi.org/10.1021/ci200227u>.
- Lawrence, C.M., Ray, S., Babyonyshev, M., Galluser, R., Borhani, D.W., and Harrison, S.C. (1999). Crystal Structure of the Ectodomain of Human Transferrin Receptor. *Science* (1979) 286.
- Lee, J., Ko, Y.U., Chung, Y., Yun, N., Kim, M., Kim, K., and Oh, Y.J. (2018). The acetylation of cyclin-dependent kinase 5 at lysine 33 regulates kinase activity and neurite length in hippocampal neurons. *Scientific Reports* 8. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-31785-9>.
- Lee, M.W., Lee, M., and Oh, K.J. (2019). Adipose tissue-derived signatures for obesity and type 2 diabetes: Adipokines, batokines and microRNAs. *Journal of Clinical Medicine* 8. <https://doi.org/10.3390/jcm8060854>.
- Lefterova, M.I., and Lazar, M.A. (2009). New developments in adipogenesis. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 20, 107–114. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2008.11.005>.
- Lenz, M., Arts, I.C.W., Peeters, R.L.M., de Kok, T.M., and Ertaylan, G. (2020). Adipose tissue in health and disease through the lens of its building blocks. *Scientific Reports* 10. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-67177-1>.

- Lesniak, A., Fenaroli, F., Monopoli, M.P., Åberg, C., Dawson, K.A., and Salvati, A. (2012). Effects of the presence or absence of a protein corona on silica nanoparticle uptake and impact on cells. *ACS Nano* 6, 5845–5857. <https://doi.org/10.1021/nn300223w>.
- Lessard, J., Laforest, S., Pelletier, M., Leboeuf, M., Blackburn, L., and Tchernof, A. (2014). Low abdominal subcutaneous preadipocyte adipogenesis is associated with visceral obesity, visceral adipocyte hypertrophy, and a dysmetabolic state. *Adipocyte* 3, 197–205. <https://doi.org/10.4161/adip.29385>.
- Letexier, D., Pinteur, C., Large, V., Fréring, V., and Beylot, M. (2003). Comparison of the expression and activity of the lipogenic pathway in human and rat adipose tissue. *Journal of Lipid Research* 44, 2127–2134. <https://doi.org/10.1194/jlr.M300235-JLR200>.
- Leung, M.Y.M., Carlsson, N.P., Colditz, G.A., and Chang, S.H. (2017). The Burden of Obesity on Diabetes in the United States: Medical Expenditure Panel Survey, 2008 to 2012. *Value in Health* 20, 77–84. <https://doi.org/10.1016/j.jval.2016.08.735>.
- Li, X., Foley, E.A., Kawashima, S.A., Molloy, K.R., Li, Y., Chait, B.T., and Kapoor, T.M. (2013). Examining post-translational modification-mediated protein-protein interactions using a chemical proteomics approach. *Protein Science* 22, 287–295. <https://doi.org/10.1002/pro.2210>.
- Li, Y., Yun, K., and Mu, R. (2020). A review on the biology and properties of adipose tissue macrophages involved in adipose tissue physiological and pathophysiological processes. *Lipids in Health and Disease* 19. <https://doi.org/10.1186/s12944-020-01342-3>.
- Liu, J., Lau, S.K., Varma, V.A., Kairdolf, B.A., and Nie, S. (2010). Multiplexed detection and characterization of rare tumor cells in Hodgkin's lymphoma with multicolor quantum dots. *Analytical Chemistry* 82, 6237–6243. <https://doi.org/10.1021/ac101065b>.
- Liu, R., and Nikolajczyk, B.S. (2019). Tissue immune cells fuel obesity-associated inflammation in adipose tissue and beyond. *Frontiers in Immunology* 10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01587>.
- Liu, W., Li, C., Ren, Y., Sun, X., Pan, W., Li, Y., Wang, J., and Wang, W. (2016). Carbon dots: Surface engineering and applications. *Journal of Materials Chemistry B* 4, 5772–5788. <https://doi.org/10.1039/c6tb00976j>.
- Liu, Y., Steiniger, S.C.J., Kim, Y.S., Kaufmann, G.F., Felding-Habermann, B., and Janda, K.D. (2007). Mechanistic studies of a peptidic GRP78 ligand for cancer cell-specific drug delivery. *Molecular Pharmaceutics* 4, 435–447. <https://doi.org/10.1021/mp060122j>.
- Liu, Z., Lv, Y., Zhao, N., Guan, G., and Wang, J. (2015). Protein kinase R-like ER kinase and its role in endoplasmic reticulum stress-decided cell fate. *Cell Death and Disease* 6. <https://doi.org/10.1038/cddis.2015.183>.
- Lombard-Banek, C., Reddy, S., Moody, S.A., and Nemes, P. (2016). Label-free Quantification of Proteins in Single Embryonic Cells with Neural Fate in the Cleavage-Stage Frog (*Xenopus laevis*) Embryo using CE-ESI-HRMS. *Molecular and Cellular Proteomics*.
- Longo, M., Zatterale, F., Naderi, J., Parrillo, L., Formisano, P., Raciti, G.A., Beguinot, F., and Miele, C. (2019). Adipose tissue dysfunction as determinant of obesity-associated metabolic complications. *International Journal of Molecular Sciences* 20. <https://doi.org/10.3390/ijms20092358>.



- López-Bascón, M.A., Calderón-Santiago, M., Sánchez-Ceinos, J., Fernández-Vega, A., Guzmán-Ruiz, R., López-Miranda, J., Malagon, M.M., and Priego-Capote, F. (2018). Influence of sample preparation on lipidomics analysis of polar lipids in adipose tissue. *Talanta* 177, 86–93. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.09.017>.
- López-Otín, C., and Kroemer, G. (2021). Hallmarks of Health. *Cell* 184, 33–63. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.11.034>.
- López-Otín, C., Blasco, M.A., Partridge, L., Serrano, M., and Kroemer, G. (2013). The hallmarks of aging. *Cell* 153, 1194. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.05.039>.
- López-Villar, E., Martos-Moreno, G., Chowen, J.A., Okada, S., Kopchick, J.J., and Argente, J. (2015). A proteomic approach to obesity and type 2 diabetes. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 19, 1455–1470. <https://doi.org/10.1111/jcmm.12600>.
- Lundby, A., Lage, K., Weinert, B.T., Bekker-Jensen, D.B., Secher, A., Skovgaard, T., Kelstrup, C.D., Dmytriyev, A., Choudhary, C., Lundby, C., et al. (2012). Proteomic Analysis of Lysine Acetylation Sites in Rat Tissues Reveals Organ Specificity and Subcellular Patterns. *Cell Reports* 2, 419–431. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2012.07.006>.
- Lynch, I., and Dawson, K.A. (2008). Protein-nanoparticle interactions. *Nanotoday* 3, 1-2.
- Lynes, M.D., and Tseng, Y.H. (2018). Deciphering adipose tissue heterogeneity. *Ann N Y Acad Sci* 1411, 5–20. <https://doi.org/10.1111/nyas.13398>.
- Ma, X., Wang, D., Zhao, W., and Xu, L. (2018). Deciphering the roles of PPAR $\gamma$  in adipocytes via dynamic change of transcription complex. *Frontiers in Endocrinology* 9. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00473>.
- Madani, S.Y., Shabani, F., Dwek, M. v., and Seifalian, A.M. (2013). Conjugation of quantum dots on carbon nanotubes for medical diagnosis and treatment. *International Journal of Nanomedicine* 8, 941–950. <https://doi.org/10.2147/IJN.S36416>.
- Maeda, K., Cao, H., Kono, K., Gorgun, C.Z., Furuhashi, M., Uysal, K.T., Cao, Q., Atsumi, G., Malone, H., Krishnan, B., et al. (2005). Adipocyte/macrophage fatty acid binding proteins control integrated metabolic responses in obesity and diabetes. *Cell Metabolism* 1, 107–119. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2004.12.008>.
- Makowski, L., and Hotamisligil, G.S. (2005). The role of fatty acid binding proteins in metabolic syndrome and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol.* 16, 543-548.
- Małodobra-Mazur, M., Cierzniak, A., Pawełka, D., Kaliszewski, K., Rudnicki, J., and Dobosz, T. (2020). Metabolic differences between subcutaneous and visceral adipocytes differentiated with an excess of saturated and monounsaturated fatty acids. *Genes (Basel)* 11, 1–16. <https://doi.org/10.3390/genes11091092>.
- Mariman, E.C.M., and Wang, P. (2010). Adipocyte extracellular matrix composition, dynamics and role in obesity. *Cellular and Molecular Life Sciences* 67, 1277–1292. <https://doi.org/10.1007/s00018-010-0263-4>.
- Maruyama, H., Kiyono, S., Kondo, T., Sekimoto, T., and Yokosuka, O. (2016). Palmitate-induced regulation of PPAR $\gamma$  via PGC1 $\alpha$ : A mechanism for lipid accumulation in the liver in nonalcoholic fatty liver disease. *International Journal of Medical Sciences* 13, 169–178. <https://doi.org/10.7150/ijms.13581>.

- Masschelin, P.M., Cox, A.R., Chernis, N., and Hartig, S.M. (2020). The Impact of Oxidative Stress on Adipose Tissue Energy Balance. *Frontiers in Physiology* 10. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.01638>.
- Matés, J.M., Segura, J.A., Alonso, F.J., and Márquez, J. (2008). Intracellular redox status and oxidative stress: Implications for cell proliferation, apoptosis, and carcinogenesis. *Archives of Toxicology* 82, 273–299. <https://doi.org/10.1007/s00204-008-0304-z>.
- Maury, E., and Brichard, S.M. (2010). Adipokine dysregulation, adipose tissue inflammation and metabolic syndrome. *Molecular and Cellular Endocrinology* 314, 1–16. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2009.07.031>.
- Maynard-Smith, L.A., Chen, L.C., Banaszynski, L.A., Ooi, A.G.L., and Wandless, T.J. (2007). A directed approach for engineering conditional protein stability using biologically silent small molecules. *Journal of Biological Chemistry* 282, 24866–24872. <https://doi.org/10.1074/jbc.M703902200>.
- McClain, D.A., Sharma, N.K., Jain, S., Harrison, A., Salaye, L.N., Comeau, M.E., Langefeld, C.D., Lorenzo, F.R., and Das, S.K. (2018). Adipose tissue transferrin and insulin resistance. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 103, 4197–4208. <https://doi.org/10.1210/jc.2018-00770>.
- McLaughlin, T., Craig, C., Liu, L.F., Perelman, D., Allister, C., Spielman, D., and Cushman, S.W. (2016). Adipose cell size and regional fat deposition as predictors of metabolic response to overfeeding in insulin-resistant and insulin-sensitive humans. *Diabetes* 65, 1245–1254. <https://doi.org/10.2337/db15-1213>.
- McNamara, K., and Tofail, S.A.M. (2017). Nanoparticles in biomedical applications. *Advances in Physics: X* 2, 54–88. <https://doi.org/10.1080/23746149.2016.1254570>.
- Mi, H., Muruganujan, A., Casagrande, J.T., and Thomas, P.D. (2013). Large-scale gene function analysis with the panther classification system. *Nature Protocols* 8, 1551–1566. <https://doi.org/10.1038/nprot.2013.092>.
- Mintziori, G., Nigdelis, M.P., Mathew, H., Mousiolis, A., Goulis, D.G., and Mantzoros, C.S. (2020). The effect of excess body fat on female and male reproduction. *Metabolism: Clinical and Experimental* 107. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2020.154193>.
- Miranda, M., and Lawson, H. (2018). Ironing out the Details: Untangling Dietary Iron and Genetic Background in Diabetes. *Nutrients* 10, 1437. <https://doi.org/10.3390/nu10101437>.
- Mittal, B. (2019). Subcutaneous adipose tissue & visceral adipose tissue. *Indian Journal of Medical Research* 149, 571–573. [https://doi.org/10.4103/ijmr.IJMR\\_1910\\_18](https://doi.org/10.4103/ijmr.IJMR_1910_18).
- Mohan, S., R, P.R.M., Brown, L., Ayyappan, P., and G, R.K. (2019). Endoplasmic reticulum stress: A master regulator of metabolic syndrome. *European Journal of Pharmacology* 860. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2019.172553>.
- Molaei, M.J. (2019). A review on nanostructured carbon quantum dots and their applications in biotechnology, sensors, and chemiluminescence. *Talanta* 196, 456–478. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.12.042>.
- Moreno-Castellanos, N., Guzmán-Ruiz, R., Cano, D.A., Madrazo-Atutxa, A., Peinado, J.R., Pereira-Cunill, J.L., García-Luna, P.P., Morales-Conde, S., Socas-Macias, M., Vázquez-Martínez, R., et al.

(2016). The Effects of Bariatric Surgery-Induced Weight Loss on Adipose Tissue in Morbidly Obese Women Depends on the Initial Metabolic Status. *Obesity Surgery* 26, 1757–1767. <https://doi.org/10.1007/s11695-015-1995-x>.

Moreno-Navarrete, J.M., Ortega, F., Rodríguez, A., Latorre, J., Becerril, S., Sabater-Masdeu, M., Ricart, W., Frühbeck, G., and Fernández-Real, J.M. (2017). HMOX1 as a marker of iron excess-induced adipose tissue dysfunction, affecting glucose uptake and respiratory capacity in human adipocytes. *Diabetologia* 60, 915–926. <https://doi.org/10.1007/s00125-017-4228-0>.

Moro, C., Galitzky, J., Sengenès, C., Crampes, F., Lafontan, M., and Berlan, M. (2004). Functional and Pharmacological Characterization of the Natriuretic Peptide-Dependent Lipolytic Pathway in Human Fat Cells. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 308, 984–992. <https://doi.org/10.1124/jpet.103.060913>.

Moseti, D., Regassa, A., and Kim, W.K. (2016). Molecular regulation of adipogenesis and potential anti-adipogenic bioactive molecules. *International Journal of Molecular Sciences* 17. <https://doi.org/10.3390/ijms17010124>.

Mueller, E. (2014). Understanding the variegation of fat: Novel regulators of adipocyte differentiation and fat tissue biology. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease* 1842, 352–357. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2013.05.031>.

Müller, T.D., Blüher, M., Tschöp, M.H., and DiMarchi, R.D. (2022). Anti-obesity drug discovery: advances and challenges. *Nature Reviews Drug Discovery* 21, 201–223. <https://doi.org/10.1038/s41573-021-00337-8>.

Navarro-Ruiz, M.C., Cayuela, A., Soriano, M.L., Guzmán-Ruiz, R., Malagón, M.M., and Valcárcel, M. (2020). A systematic comparative study of the toxicity of semiconductor and graphitic carbon-based quantum dots using in vitro cell models. *Applied Sciences (Switzerland)* 10, 1–16. <https://doi.org/10.3390/app10248845>.

Ng, C.T., Tang, F.M.A., Li, J.J., Ong, C., Yung, L.L.Y., and Bay, B.H. (2015). Clathrin-mediated endocytosis of gold nanoparticles in vitro. *Anatomical Record* 298, 418–427. <https://doi.org/10.1002/ar.23051>.

Niu, G., Li, J., Wang, H., Ren, Y., and Bai, J. (2016). Associations of A-FABP with Anthropometric and Metabolic Indices and Inflammatory Cytokines in Obese Patients with Newly Diagnosed Type 2 Diabetes. *BioMed Research International* 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/9382092>.

Novelle, M.G., Vázquez, M.J., Peinado, J.R., Martinello, K.D., López, M., Luckman, S.M., Tena-Sempere, M., Malagón, M.M., Nogueiras, R., and Diéguez, C. (2017). Sequential Exposure to Obesogenic Factors in Female Rats: From Physiological Changes to Lipid Metabolism in Liver and Mesenteric Adipose Tissue. *Scientific Reports* 7. <https://doi.org/10.1038/srep46194>.

O'Neill, S., Bohl, M., Gregersen, S., Hermansen, K., and O'Driscoll, L. (2016). Blood-Based Biomarkers for Metabolic Syndrome. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 27, 363–374. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2016.03.012>.

Ockner, R.K., Manning, J.A., Poppenhausen, R.B., and Ho, W.K.L. (1972). A binding Protein for Fatty Acids in Cytosol of Intestinal Mucosa, Liver, Myocardium, and Other Tissues. *Science*.

Oh, E., Liu, R., Nel, A., Gemill, K.B., Bilal, M., Cohen, Y., and Medintz, I.L. (2016). Meta-analysis of cellular toxicity for cadmium-containing quantum dots. *Nature Nanotechnology* 11, 479–486. <https://doi.org/10.1038/nnano.2015.338>.

- Olivares-Reyes, A.J., and Arellano-Plancarte, A. (2008). Bases Moleculares de las acciones de la insulina. *REB* 27, 9–18.
- Ortega, F.J., Mayas, D., Moreno-Navarrete, J.M., Catalán, V., Gómez-Ambrosi, J., Esteve, E., Rodríguez-Hermosa, J.I., Ruiz, B., Ricart, W., Peral, B., et al. (2010). The gene expression of the main lipogenic enzymes is downregulated in visceral adipose tissue of obese subjects. *Obesity* 18, 13–20. <https://doi.org/10.1038/oby.2009.202>.
- Ose, J., Holowatyj, A.N., Nattenmüller, J., Gigic, B., Lin, T., Himbert, C., Habermann, N., Achaintre, D., Scalbert, A., Keski-Rahkonen, P., et al. (2020). Metabolomics profiling of visceral and abdominal subcutaneous adipose tissue in colorectal cancer patients: results from the ColoCare study. *Cancer Causes and Control* 31, 723–735. <https://doi.org/10.1007/s10552-020-01312-1>.
- Oussaada, S.M., van Galen, K.A., Cooman, M.I., Kleinendorst, L., Hazebroek, E.J., van Haelst, M.M., ter Horst, K.W., and Serlie, M.J. (2019). The pathogenesis of obesity. *Metabolism: Clinical and Experimental* 92, 26–36. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2018.12.012>.
- Ozaki, K., Awazu, M., Tamiya, M., Iwasaki, Y., Harada, A., Kugisaki, S., Tanimura, S., and Kohno, M. (2016). Targeting the ERK signaling pathway as a potential treatment for insulin resistance and type 2 diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 310, 643–651. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00445.2015>.-Extracellular.
- Pachón-Peña, G., Serena, C., Ejarque, M., Petriz, J., Duran, X., Oliva-Olivera, W., Simó, R., Tinahones, F.J., Fernández-Veledo, S., and Vendrell, J. (2016). Obesity Determines the Immunophenotypic Profile and Functional Characteristics of Human Mesenchymal Stem Cells From Adipose Tissue. *Stem Cells Translational Medicine* 5, 464–475. <https://doi.org/10.5966/sctm.2015-0161>.
- Palumbo, P., Lombardi, F., Siragusa, G., Cifone, M.G., Cinque, B., and Giuliani, M. (2018). Methods of isolation, characterization and expansion of human adipose-derived stem cells (ASCs): An overview. *International Journal of Molecular Sciences* 19. <https://doi.org/10.3390/ijms19071897>.
- Panwar, N., Soehartono, A.M., Chan, K.K., Zeng, S., Xu, G., Qu, J., Coquet, P., Yong, K.T., and Chen, X. (2019). Nanocarbons for Biology and Medicine: Sensing, Imaging, and Drug Delivery. *Chemical Reviews* 119, 9559–9656. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.9b00099>.
- Papaoannou, N., Marinovic, A., Yoshizawa, N., Goode, A.E., Fay, M., Khlobystov, A., Titirici, M.M., and Sapelkin, A. (2018). Structure and solvents effects on the optical properties of sugar-derived carbon nanodots. *Scientific Reports* 8. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-25012-8>.
- Parrettini, S., Cavallo, M., Gaggia, F., Calafiore, R., and Luca, G. (2020). Adipokines: A Rainbow of Proteins with Metabolic and Endocrine Functions. *Protein & Peptide Letters* 27, 1204–1230. <https://doi.org/10.2174/0929866527666200505214555>.
- Peinado, J.R., Díaz-Ruiz, A., Frühbeck, G., and Malagon, M.M. (2014). Mitochondria in metabolic disease: Getting clues from proteomic studies. *Proteomics* 14, 452–466. <https://doi.org/10.1002/pmic.201300376>.
- Peinado, J.R., Pardo, M., de la Rosa, O., and Malagón, M.M. (2012). Proteomic characterization of adipose tissue constituents, a necessary step for understanding adipose tissue complexity. *Proteomics* 12, 607–620. <https://doi.org/10.1002/pmic.201100355>.

- Peinado, J.R., Quirós, P.M., Pulido, M.R., Mariño, G., Martínez-Chantar, M.L., Vázquez-Martínez, R., Freije, J.M.P., López-Otín, C., and Malagón, M.M. (2011). Proteomic profiling of adipose tissue from *Zmpste24*<sup>-/-</sup> mice, a model of lipodystrophy and premature aging, reveals major changes in mitochondrial function and vimentin processing. *Molecular and Cellular Proteomics* 10. <https://doi.org/10.1074/mcp.M111.008094>.
- Pellegrinelli, V., Carobbio, S., and Vidal-Puig, A. (2016). Adipose tissue plasticity: how fat depots respond differently to pathophysiological cues. *Diabetologia* 59, 1075–1088. <https://doi.org/10.1007/s00125-016-3933-4>.
- Pérez-Pérez, R., García-Santos, E., Ortega-Delgado, F.J., López, J.A., Camafeita, E., Ricart, W., Fernández-Real, J.M., and Peral, B. (2012). Attenuated metabolism is a hallmark of obesity as revealed by comparative proteomic analysis of human omental adipose tissue. *Journal of Proteomics* 75, 783–795. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2011.09.016>.
- Petersen, M.C., and Shulman, G.I. (2018). Mechanisms of Insulin Action and Insulin Resistance. *Physiol Rev* 98, 2133–2223. <https://doi.org/10.1152/physrev>.
- Picó, C., Palou, M., Pomar, C.A., Rodríguez, A.M., and Palou, A. (2022). Leptin as a key regulator of the adipose organ. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders* 23, 13–30. <https://doi.org/10.1007/s11154-021-09687-5>.
- Piperi, C., Adamopoulos, C., Dalagiorgou, G., Diamanti-Kandarakis, E., and Papavassiliou, A.G. (2012). Crosstalk between advanced glycation and endoplasmic reticulum stress: Emerging therapeutic targeting for metabolic diseases. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 97, 2231–2242. <https://doi.org/10.1210/jc.2011-3408>.
- Pischon, T., Hu, F.B., Girman, C.J., Rifai, N., Manson, J.A.E., Rexrode, K.M., and Rimm, E.B. (2011). Plasma total and high molecular weight adiponectin levels and risk of coronary heart disease in women. *Atherosclerosis* 219, 322–329. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2011.07.011>.
- Podadera-Herreros, A., Alcalá-Díaz, J.F., Gutiérrez-Mariscal, F.M., Jiménez-Torres, J., Cruz-Ares, S. de la, Arenas-de Larriva, A.P., Cardelo, M.P., Torres-Peña, J.D., Luque, R.M., Ordoñas, J.M., et al. (2022). Long-term consumption of a mediterranean diet or a low-fat diet on kidney function in coronary heart disease patients: The CORDIOPREV randomized controlled trial. *Clinical Nutrition* 41, 552–559. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2021.12.041>.
- Prentice, K.J., Saksi, J., and Hotamisligil, G.S. (2019). Adipokine FABP4 integrates energy stores and counterregulatory metabolic responses. *Journal of Lipid Research* 60, 734–740. <https://doi.org/10.1194/jlr.S091793>.
- Primeau, V., Coderre, L., Karelis, A.D., Brochu, M., Lavoie, M.E., Messier, V., Sladek, R., and Rabasa-Lhoret, R. (2011). Characterizing the profile of obese patients who are metabolically healthy. *International Journal of Obesity* 35, 971–981. <https://doi.org/10.1038/ijo.2010.216>.
- Pulido, M.R., Díaz-Ruiz, A., Jiménez-Gómez, Y., García-Navarro, S., Gracia-Navarro, F., Tinahones, F., López-Miranda, J., Frühbeck, G., Vázquez-Martínez, R., and Malagón, M.M. (2011). Rab18 dynamics in adipocytes in relation to lipogenesis, lipolysis and obesity. *PLoS ONE* 6. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022931>.
- Qian, X., Li, X., Cai, Q., Zhang, C., Yu, Q., Jiang, Y., Lee, J.H., Hawke, D., Wang, Y., Xia, Y., et al. (2017). Phosphoglycerate Kinase 1 Phosphorylates Beclin1 to Induce Autophagy. *Molecular Cell* 65, 917–931.e6. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.01.027>.

- Queipo-Ortuño, M.I., Escoté, X., Ceperuelo-Mallafré, V., Garrido-Sanchez, L., Miranda, M., Clemente-Postigo, M., Pérez-Pérez, R., Peral, B., Cardona, F., Fernández-Real, J.M., et al. (2012). FABP4 Dynamics in Obesity: Discrepancies in Adipose Tissue and Liver Expression Regarding Circulating Plasma Levels. *PLoS ONE* 7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048605>.
- Qureshi, K., Abrams, G.A., and Com, W.W. (2007). Metabolic liver disease of obesity and role of adipose tissue in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol* 13, 3540–3553.
- Ramazi, S., and Zahiri, J. (2021). Post-translational modifications in proteins: Resources, tools and prediction methods. *Database* 2021. <https://doi.org/10.1093/database/baab012>.
- Ray, S.C., Saha, A., Jana, N.R., and Sarkar, R. (2009). Fluorescent carbon nanoparticles: Synthesis, characterization, and bioimaging application. *Journal of Physical Chemistry C* 113, 18546–18551. <https://doi.org/10.1021/jp905912n>.
- Reddy, P., Lent-Schochet, D., Ramakrishnan, N., McLaughlin, M., and Jialal, I. (2019). Metabolic syndrome is an inflammatory disorder: A conspiracy between adipose tissue and phagocytes. *Clinica Chimica Acta* 496, 35–44. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2019.06.019>.
- Reilly, S.M., and Saltiel, A.R. (2017). Adapting to obesity with adipose tissue inflammation. *Nature Reviews Endocrinology* 13, 633–643. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2017.90>.
- Reyes, J., and Mariman, E. (2013). Application of proteomics technology in adipocyte biology. *Molecular BioSystems* 9, 1076–1091. <https://doi.org/10.1039/c3mb25596d>.
- Rodríguez-Calvo, R., Girona, J., Rodríguez, M., Samino, S., Barroso, E., de Gonzalo-Calvo, D., Guaita-Esteruelas, S., Heras, M., van der Meer, R.W., Lamb, H.J., et al. (2019). Fatty acid binding protein 4 (FABP4) as a potential biomarker reflecting myocardial lipid storage in type 2 diabetes. *Metabolism: Clinical and Experimental* 96, 12–21. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2019.04.007>.
- Rosenthal, S.J., Chang, J.C., Kovtun, O., McBride, J.R., and Tomlinson, I.D. (2011). Biocompatible quantum dots for biological applications. *Chemistry and Biology* 18, 10–24. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2010.11.013>.
- Sahay, G., Alakhova, D.Y., and Kabanov, A. v. (2010). Endocytosis of nanomedicines. *Journal of Controlled Release* 145, 182–195. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2010.01.036>.
- Saito, M., Yoneshiro, T., and Matsushita, M. (2016). Activation and recruitment of brown adipose tissue by cold exposure and food ingredients in humans. *Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism* 30, 537–547. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2016.08.003>.
- Salvador-Morales, C., Flahaut, E., Sim, E., Sloan, J., Green, M.L.H., and Sim, R.B. (2006). Complement activation and protein adsorption by carbon nanotubes. *Molecular Immunology* 43, 193–201. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2005.02.006>.
- Sánchez-Ceinos, J., Rangel-Zuñiga, O.A., Clemente-Postigo, M., Podadera-Herreros, A., Camargo, A., Alcalá-Díaz, J.F., Guzmán-Ruiz, R., López-Miranda, J., and Malagón, M.M. (2021). miR-223-3p as a potential biomarker and player for adipose tissue dysfunction preceding type 2 diabetes onset. *Molecular Therapy - Nucleic Acids* 23, 1035–1052. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2021.01.014>.

- Saponaro, C., Gaggini, M., Carli, F., and Gastaldelli, A. (2015). The subtle balance between lipolysis and lipogenesis: A critical point in metabolic homeostasis. *Nutrients* 7, 9453–9474. <https://doi.org/10.3390/nu7115475>.
- Scheja, L., and Heeren, J. (2019). The endocrine function of adipose tissues in health and cardiometabolic disease. *Nature Reviews Endocrinology* 15, 507–524. <https://doi.org/10.1038/s41574-019-0230-6>.
- Scherer PE. Nature medicine metabolic syndrome ePoster adipose tissue sponsored by Takeda global research & development center, inc. [http://www.nature.com/nm/eposter/eposter\\_full](http://www.nature.com/nm/eposter/eposter_full). Updated October 5, 2012.
- Schleinitz, D., Krause, K., Wohland, T., Gebhardt, C., Linder, N., Stumvoll, M., Blüher, M., Bechmann, I., Kovacs, P., Gericke, M., et al. (2020). Identification of distinct transcriptome signatures of human adipose tissue from fifteen depots. *European Journal of Human Genetics* 28, 1714–1725. <https://doi.org/10.1038/s41431-020-0681-1>.
- Schroeder, B., and McNiven, M.A. (2014). Importance of endocytic pathways in liver function and disease. *Compr Physiol* 4, 1403–1417. <https://doi.org/10.1002/cphy.c140001>.
- Schwer, B., Eckersdorff, M., Li, Y., Silva, J.C., Fermin, D., Kurtev, M. v., Giallourakis, C., Comb, M.J., Alt, F.W., and Lombard, D.B. (2009). Calorie restriction alters mitochondrial protein acetylation. *Aging Cell* 8, 604–606. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2009.00503.x>.
- Scifres, C.M., Chen, B., Nelson, D.M., and Sadovsky, Y. (2011). Fatty acid binding protein 4 regulates intracellular lipid accumulation in human trophoblasts. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 96. <https://doi.org/10.1210/jc.2010-2084>.
- Sciortino, A., Cayuela, A., Soriano, M.L., Gelardi, F.M., Cannas, M., Valcárcel, M., and Messina, F. (2017). Different natures of surface electronic transitions of carbon nanoparticles. *Physical Chemistry Chemical Physics* 19, 22670–22677. <https://doi.org/10.1039/c7cp04548d>.
- Scott, J.D., and Pawson, T. (2009). Cell signaling in space and time: Where proteins come together and when they're apart. *Science* (1979) 326, 1220–1224. <https://doi.org/10.1126/science.1175668>.
- Sebo, Z.L., and Rodeheffer, M.S. (2019). Assembling the adipose organ: Adipocyte lineage segregation and adipogenesis in vivo. *Development (Cambridge)* 146. <https://doi.org/10.1242/dev.172098>.
- Serena, C., Keiran, N., Ceperuelo-Mallafre, V., Ejarque, M., Fradera, R., Roche, K., Nuñez-Roa, C., Vendrell, J., and Fernández-Veledo, S. (2016). Obesity and Type 2 Diabetes Alters the Immune Properties of Human Adipose Derived Stem Cells. *Stem Cells* 34, 2559–2573. <https://doi.org/10.1002/stem.2429>.
- Sheff, D., Pelletier, L., O'Connell, C.B., Warren, G., and Mellman, I. (2002). Transferrin receptor recycling in the absence of perinuclear recycling endosomes. *Journal of Cell Biology* 156, 797–804. <https://doi.org/10.1083/jcb.20111048>.
- Shen, W.J., Patel, S., Eriksson, J.E., and Kraemer, F.B. (2010). Vimentin is a functional partner of hormone sensitive lipase and facilitates lipolysis. *Journal of Proteome Research* 9, 1786–1794. <https://doi.org/10.1021/pr900909t>.

- Sibuyi, N.R.S., Moabelo, K.L., Meyer, M., Onani, M.O., Dube, A., and Madiehe, A.M. (2019). Nanotechnology advances towards development of targeted-treatment for obesity. *Journal of Nanobiotechnology* 17. <https://doi.org/10.1186/s12951-019-0554-3>.
- Siebert, A., Goren, I., Pfeilschifter, J., and Frank, S. (2016). Anti-inflammatory effects of rosiglitazone in obesity-impaired wound healing depend on adipocyte differentiation. *PLoS ONE* 11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0168562>.
- Sies, H., Berndt, C., and Jones, D.P. (2017). Oxidative Stress. *Annu. Rev. Biochem* 86, 25–34. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem>.
- Singh, N., Parihar, R., Saini, G., Mohan, S., Sharma, N., and Razaq, M. (2013). Prevalence of metabolic syndrome in adolescents aged 10-18 years in Jammu, J and K. *Indian Journal of Endocrinology and Metabolism* 17, 133. <https://doi.org/10.4103/2230-8210.107849>.
- Solinas, G., Borén, J., and Dulloo, A.G. (2015). De novo lipogenesis in metabolic homeostasis: More friend than foe? *Molecular Metabolism* 4, 367–377. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2015.03.004>.
- Song, Y., Feng, D., Shi, W., Li, X., and Ma, H. (2013). Parallel comparative studies on the toxic effects of unmodified CdTe quantum dots, gold nanoparticles, and carbon nanodots on live cells as well as green gram sprouts. *Talanta* 116, 237–244. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2013.05.022>.
- Song, Z., Xiaoli, A.M., and Yang, F. (2018). Regulation and metabolic significance of De Novo lipogenesis in adipose tissues. *Nutrients* 10. <https://doi.org/10.3390/nu10101383>.
- Spange, S., Wagner, T., Heinzl, T., and Krämer, O.H. (2009). Acetylation of non-histone proteins modulates cellular signalling at multiple levels. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 41, 185–198. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2008.08.027>.
- Spencer, M., Unal, R., Zhu, B., Rasouli, N., McGehee, R.E., Peterson, C.A., and Kern, P.A. (2011). Adipose tissue extracellular matrix and vascular abnormalities in obesity and insulin resistance. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 96. <https://doi.org/10.1210/jc.2011-1567>.
- Srinivasan, C., Lee, J., Papadimitrakopoulos, F., Silbart, L.K., Zhao, M., and Burgess, D.J. (2006). Labeling and Intracellular Tracking of Functionally Active Plasmid DNA with Semiconductor Quantum Dots. *Molecular Therapy* 14, 192–201. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2006.03.010>.
- Sriram, S., Yuan, C., Chakraborty, S., Tay, W., Park, M., Shabbir, A., Toh, S.A., Han, W., and Sugii, S. (2019). Oxidative stress mediates depot-specific functional differences of human adipose-derived stem cells. *Stem Cell Research and Therapy* 10. <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1240-y>.
- Stenkula, K.G., and Erlanson-Albertsson, C. (2018). Adipose cell size: importance in health and disease. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 315, 284–295. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00257.2017>.
- Stöckli, J., Fazakerley, D.J., and James, D.E. (2011). GLUT4 exocytosis. *Journal of Cell Science* 124, 4147–4159. <https://doi.org/10.1242/jcs.097063>.
- Stone, T.W., McPherson, M., and Gail Darlington, L. (2018). Obesity and Cancer: Existing and New Hypotheses for a Causal Connection. *EBioMedicine* 30, 14–28. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2018.02.022>.



- Sun, K., Kusminski, C.M., and Scherer, P.E. (2011). Adipose tissue remodeling and obesity. *Journal of Clinical Investigation* 121, 2094–2101. <https://doi.org/10.1172/JCI45887>.
- Sun, M., and Zhang, X. (2021). Epigenetic regulation of N6-methyladenosine modifications in obesity. *Journal of Diabetes Investigation* 12, 1306–1315. <https://doi.org/10.1111/jdi.13571>.
- Suzuki, Y.J., Carini, M., and Butterfield, D.A. (2010). Protein Carbonylation. *Antioxidants & Redox Signaling* 12, 323–325. <https://doi.org/10.1089/ars.2009.2887>.
- Świdarska, E., Strycharz, J., Wróblewski, A., Szemraj, J., Drzewoski, J., and Śliwińska, A. (2020). Role of PI3K/AKT Pathway in Insulin-Mediated Glucose Uptake. In *Blood Glucose Levels*, (IntechOpen).
- Tanaka, M., Itoh, M., Ogawa, Y., and Suganami, T. (2018). Molecular mechanism of obesity-induced ‘metabolic’ tissue remodeling. *Journal of Diabetes Investigation* 9, 256–261. <https://doi.org/10.1111/jdi.12769>.
- Tchkonia, T., Karagiannides, I., Armour Forse, R., and Kirkland, J.L. (2001). Different fat depots are distinct mini-organs. *Endocrinology and Diabetes* 8, 227–234.
- Tchkonia, T., Thomou, T., Zhu, Y., Karagiannides, I., Pothoulakis, C., Jensen, M.D., and Kirkland, J.L. (2013). Mechanisms and metabolic implications of regional differences among fat depots. *Cell Metabolism* 17, 644–656. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.03.008>.
- Technical Publications, L. (2017). *Proteome Discoverer User Guide Software Version 2.2*.
- Thiam, A.R., and Beller, M. (2017). The why, when and how of lipid droplet diversity. *Journal of Cell Science* 130, 315–324. <https://doi.org/10.1242/jcs.192021>.
- Tian, X.T., and Yin, X.B. (2019). Carbon Dots, Unconventional Preparation Strategies, and Applications Beyond Photoluminescence. *Small* 15. <https://doi.org/10.1002/smll.201901803>.
- Tsoi, K.M., Dai, Q., Alman, B.A., and Chan, W.C.W. (2013). Are quantum dots toxic? Exploring the discrepancy between cell culture and animal studies. *Accounts of Chemical Research* 46, 662–671. <https://doi.org/10.1021/ar300040z>.
- Unamuno, X., Gómez-Ambrosi, J., Rodríguez, A., Becerril, S., Frühbeck, G., and Catalán, V. (2018). Adipokine dysregulation and adipose tissue inflammation in human obesity. *European Journal of Clinical Investigation* 48. <https://doi.org/10.1111/eci.12997>.
- Vázquez-Martínez, R., Cruz-García, D., Duran-Prado, M., Peinado, J.R., Castaño, J.P., and Malagon, M.M. (2007). Rab18 inhibits secretory activity in neuroendocrine cells by interacting with secretory Granules. *Traffic* 8, 867–882. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2007.00570.x>.
- Vázquez-Vela, M.E.F., Torres, N., and Tovar, A.R. (2008). White Adipose Tissue as Endocrine Organ and Its Role in Obesity. *Archives of Medical Research* 39, 715–728. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2008.09.005>.
- Venkat, S., Chen, H., McGuire, P., Stahman, A., Gan, Q., and Fan, C. (2019). Characterizing lysine acetylation of Escherichia coli type II citrate synthase. *FEBS Journal* 286, 2799–2808. <https://doi.org/10.1111/febs.14845>.
- Verdin, E., and Ott, M. (2015). 50 years of protein acetylation: From gene regulation to epigenetics, metabolism and beyond. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 16, 258–264. <https://doi.org/10.1038/nrm3931>.

- Vijay, J., Gauthier, M.F., Biswell, R.L., Louiselle, D.A., Johnston, J.J., Cheung, W.A., Belden, B., Pramatarova, A., Biertho, L., Gibson, M., et al. (2020). Single-cell analysis of human adipose tissue identifies depot- and disease-specific cell types. *Nature Metabolism* 2, 97–109. <https://doi.org/10.1038/s42255-019-0152-6>.
- Villeneuve, J., Bassaganyas, L., Lepreux, S., Chiritoiu, M., Costet, P., Ripoche, J., Malhotra, V., and Schekman, R. (2018). Unconventional secretion of FABP4 by endosomes and secretory lysosomes. *Journal of Cell Biology* 217, 649–665. <https://doi.org/10.1083/jcb.201705047>.
- Vincent, H.K., and Taylor, A.G. (2006). Biomarkers and potential mechanisms of obesity-induced oxidant stress in humans. *International Journal of Obesity* 30, 400–418. <https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0803177>.
- Virtue, S., and Vidal-Puig, A. (2010). Adipose tissue expandability, lipotoxicity and the Metabolic Syndrome - An allostatic perspective. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1801, 338–349. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2009.12.006>.
- Vishvanath, L., and Gupta, R.K. (2019). Contribution of adipogenesis to healthy adipose tissue expansion in obesity. *Journal of Clinical Investigation* 129, 4022–4031. <https://doi.org/10.1172/JCI129191>.
- Wajchenberg, B.L., Giannella-Neto, D., da Silva, M.E.R., and Santos, R.F. (2002). Depot-Specific Hormonal Characteristics of Subcutaneous and Visceral Adipose Tissue and their Relation to the Metabolic Syndrome. *Horm Metab Res* 34, 616–621.
- Walkey, C.D., and Chan, W.C.W. (2012). Understanding and controlling the interaction of nanomaterials with proteins in a physiological environment. *Chemical Society Reviews* 41, 2780–2799. <https://doi.org/10.1039/c1cs15233e>.
- Wang, J., Tian, S., Petros, R.A., Napier, M.E., and Desimone, J.M. (2010). The complex role of multivalency in nanoparticles targeting the transferrin receptor for cancer therapies. *J Am Chem Soc* 132, 11306–11313. <https://doi.org/10.1021/ja1043177>.
- Wang, K., Gao, Z., Gao, G., Wo, Y., Wang, Y., Shen, G., and Cui, D. (2013). Systematic safety evaluation on photoluminescent carbon dots. *Nanoscale Research Letters* 8, 1–9. <https://doi.org/10.1186/1556-276X-8-122>.
- Wang, S., Jiang, B., Zhang, T., Liu, L., Wang, Y., Wang, Y., Chen, X., Lin, H., Zhou, L., Xia, Y., et al. (2015). Insulin and mTOR Pathway Regulate HDAC3-Mediated Deacetylation and Activation of PGK1. *PLoS Biology* 13. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002243>.
- Wang, Y., and Hu, A. (2014). Carbon quantum dots: Synthesis, properties and applications. *Journal of Materials Chemistry C* 2, 6921–6939. <https://doi.org/10.1039/c4tc00988f>.
- Wilhelmsson, U., Stillemark-Billton, P., Borén, J., and Pekny, M. (2019). Vimentin is required for normal accumulation of body fat. *Biological Chemistry* 400, 1157–1162. <https://doi.org/10.1515/hsz-2019-0170>.
- Wondmkun, Y.T. (2020). Obesity, insulin resistance, and type 2 diabetes: Associations and therapeutic implications. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy* 13, 3611–3616. <https://doi.org/10.2147/DMSO.S275898>.

- Woodsmith, J., and Stelzl, U. (2014). Studying post-translational modifications with protein interaction networks. *Current Opinion in Structural Biology* 24, 34–44. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2013.11.009>.
- Wu, L.E., Samocha-Bonet, D., Whitworth, P.T., Fazakerley, D.J., Turner, N., Biden, T.J., James, D.E., and Cantley, J. (2014). Identification of fatty acid binding protein 4 as an adipokine that regulates insulin secretion during obesity. *Molecular Metabolism* 3, 465–473. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2014.02.005>.
- Wu, X., Liu, H., Liu, J., Haley, K.N., Treadway, J.A., Larson, J.P., Ge, N., Peale, F., and Bruchez, M.P. (2003). Immunofluorescent labeling of cancer marker Her2 and other cellular targets with semiconductor quantum dots. *Nature Biotechnology* 21, 41–46. <https://doi.org/10.1038/nbt764>.
- Wu, Y.F., Wu, H.C., Kuan, C.H., Lin, C.J., Wang, L.W., Chang, C.W., and Wang, T.W. (2016). Multi-functionalized carbon dots as theranostic nanoagent for gene delivery in lung cancer therapy. *Scientific Reports* 6. <https://doi.org/10.1038/srep21170>.
- Xijin Ge, S., and Jung, D. ShinyGO: a graphical enrichment tool for animals and plants. <https://doi.org/10.1101/315150>.
- Xu, X., Ray, R., Gu, Y., Ploehn, H.J., Gearheart, L., Raker, K., and Scrivens, W.A. (2004). Electrophoretic analysis and purification of fluorescent single-walled carbon nanotube fragments. *J Am Chem Soc* 126, 12736–12737. <https://doi.org/10.1021/ja040082h>.
- Xu, X.J., Gauthier, M.S., Hess, D.T., Apovian, C.M., Cacicedo, J.M., Gokce, N., Farb, M., Valentine, R.J., and Ruderman, N.B. (2012). Insulin sensitive and resistant obesity in humans: AMPK activity, oxidative stress, and depot-specific changes in gene expression in adipose tissue. *Journal of Lipid Research* 53, 792–801. <https://doi.org/10.1194/jlr.P022905>.
- Xu, X.J., Pories, W.J., Dohm, L.G., and Ruderman, N.B. (2013). What distinguishes adipose tissue of severely obese humans who are insulin sensitive and resistant? *Current Opinion in Lipidology* 24, 49–56. <https://doi.org/10.1097/MOL.0b013e32835b465b>.
- Xu, Y., Jia, X.H., Yin, X.B., He, X.W., and Zhang, Y.K. (2014). Carbon quantum dot stabilized gadolinium nanoprobe prepared via a one-pot hydrothermal approach for magnetic resonance and fluorescence dual-modality bioimaging. *Analytical Chemistry* 86, 12122–12129. <https://doi.org/10.1021/ac503002c>.
- Xu, Z., Ande, S.R., and Mishra, S. (2013). Temporal analysis of protein lysine acetylation during adipocyte differentiation. *Adipocyte* 2, 33–40. <https://doi.org/10.4161/adip.21916>.
- Yan, J., Hou, S., Yu, Y., Qiao, Y., Xiao, T., Mei, Y., Zhang, Z., Wang, B., Huang, C.C., Lin, C.H., et al. (2018). The effect of surface charge on the cytotoxicity and uptake of carbon quantum dots in human umbilical cord derived mesenchymal stem cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 171, 241–249. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.07.034>.
- Yan, Y., Zhang, D., Zhou, P., Li, B., and Huang, S.Y. (2017). HDOCK: A web server for protein-protein and protein-DNA/RNA docking based on a hybrid strategy. *Nucleic Acids Research* 45, W365–W373. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx407>.
- Ye, G., Gao, H., Wang, Z., Lin, Y., Liao, X., Zhang, H., Chi, Y., Zhu, H., and Dong, S. (2019). PPAR $\alpha$  and PPAR $\gamma$  activation attenuates total free fatty acid and triglyceride accumulation in

- macrophages via the inhibition of Fatp1 expression. *Cell Death and Disease* 10. <https://doi.org/10.1038/s41419-018-1135-3>.
- Yu, J., and Li, P. (2017). The size matters: regulation of lipid storage by lipid droplet dynamics. *Science China Life Sciences* 60, 46–56. <https://doi.org/10.1007/s11427-016-0322-x>.
- Zhang, T., Wang, S., Lin, Y., Xu, W., Ye, D., Xiong, Y., Zhao, S., and Guan, K.L. (2012). Acetylation negatively regulates glycogen phosphorylase by recruiting protein phosphatase 1. *Cell Metabolism* 15, 75–87. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.12.005>.
- Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L., and Friedman, J.M. (1994). Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372.
- Zhang, Y., Zheng, Y., Fu, Y., and Wang, C. (2019a). Identification of biomarkers, pathways and potential therapeutic agents for white adipocyte insulin resistance using bioinformatics analysis. *Adipocyte* 8, 318–329. <https://doi.org/10.1080/21623945.2019.1649578>.
- Zhang, Y., Zhou, F., Bai, M., Liu, Y., Zhang, L., Zhu, Q., Bi, Y., Ning, G., Zhou, L., and Wang, X. (2019). The pivotal role of protein acetylation in linking glucose and fatty acid metabolism to  $\beta$ -cell function. *Cell Death and Disease* 10. <https://doi.org/10.1038/s41419-019-1349-z>.
- Zhao, Q., Zhang, Z., Li, J., Xu, F., Zhang, B., Liu, M., Liu, Y., Chen, H., Yang, J., and Zhang, J. (2020). Lysine Acetylome Study of Human Hepatocellular Carcinoma Tissues for Biomarkers and Therapeutic Targets Discovery. *Frontiers in Genetics* 11. <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.572663>.
- Zheng, Y., Gilgenast, M.J., Hauc, S., and Chatterjee, A. (2018). Capturing Post-Translational Modification-Triggered Protein-Protein Interactions Using Dual Noncanonical Amino Acid Mutagenesis. *ACS Chemical Biology* 13, 1137–1141. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.8b00021>.
- Zhong, H., and Yin, H. (2015). Role of lipid peroxidation derived 4-hydroxynonenal (4-HNE) in cancer: Focusing on mitochondria. *Redox Biology* 4, 193–199. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2014.12.011>.
- Zhou, Y., Wu, W., Xu, Z., Liu, Y., Chang, H., Yu, P., Zhang, X., Yang, Y., Liu, K., and Chang, Y. (2019). Iron regulatory protein 2 deficiency may correlate with insulin resistance. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 510, 191–197. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.01.022>.
- Zhou, Z., Xu, M.-J., and Gao, B. (2016). Hepatocytes: a key cell type for innate immunity. *Cellular & Molecular Immunology* 13, 301–315. <https://doi.org/10.1038/cmi.2015.97>
- Zhu, Q., and Scherer, P.E. (2018). Immunologic and endocrine functions of adipose tissue: implications for kidney disease. *Nature Reviews Nephrology* 14, 105–120. <https://doi.org/10.1038/nrneph.2017.157>.
- Zimmerman, A.W., van Moerkerk, H.T.B., Veerkamp, J.H., and Zimmerman, A.W. (2001). Ligand specificity and conformational stability of human fatty acid-binding proteins. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 33, 865-876.
- Zuk, P. (2013). Adipose-Derived Stem Cells in Tissue Regeneration: A Review. *ISRN Stem Cells* 2013, 1–35. <https://doi.org/10.1155/2013/713959>.



