



**Universitat de les
Illes Balears**

Facultad de Ciencias

Memoria del Trabajo de Fin de Grado

**Mejora de la eficacia de la terapia con ácido
retinoico en el tratamiento de la obesidad y sus
complicaciones**

Agustí Sabater Bibiloni

Grado de Bioquímica

Año académico 2012-13

DNI del alumno: 43223877T

Trabajo tutelado por Dr. Joan Ribot Riutort
Departamento de Biología Fundamental y Ciencias de la Salud

Se autoriza a la Universidad a incluir mi trabajo en el Repositorio Institucional para su consulta en acceso abierto y difusión en línea, con finalidades exclusivamente académicas y de investigación

Palabras clave del trabajo:

Vitamina A, esteatosis hepática, hepatocitos, metabolismo de ácidos grasos



Prefacio



Este documento engloba todas las tareas que he realizado durante el desarrollo del trabajo de fin de grado, así como los resultados obtenidos de las mismas. Así, he adquirido nuevas habilidades tanto experimentales en el laboratorio como teóricas haciendo búsqueda bibliográfica. El diseño experimental me permitió realizar un gran número de tareas, que abarcaron desde la preparación de cultivos celulares hasta la realización de reacciones de PCR en tiempo real, cuya metodología había estudiado o llevado a cabo previamente en el grado.

Quiero dar las gracias al doctor Joan Ribot Riutort, un modelo a seguir para mí, por confiarme su propuesta del Trabajo de Fin de Grado, por todas las correcciones pertinentes que hizo en esta memoria y por la gran ayuda que me proporcionó en la ardua tarea del análisis estadístico y representación gráfica de los datos. También quiero agradecerle todo el apoyo que me ha aportado durante toda la carrera y el haberme concedido su plaza de alumno colaborador en el Laboratorio de Biología Molecular Nutrición y Biotecnología (LBNB) durante estos años. Todo ello me ha facilitado adquirir experiencia en el laboratorio que no se aprende solamente en las prácticas hechas durante la carrera y que durante el trabajo experimental del Trabajo de Fin de Grado me ha sido de gran utilidad para hacer las actividades del laboratorio más fluidas.

También quiero dejar constancia de la infinita paciencia que ha tenido futuro doctor Petar Dianov Petrov por explicarme en detalle todos y cada uno de los experimentos que he hecho durante el desarrollo del trabajo científico/experimental y al que le quiero agradecer en especial sus sabias lecciones y grandes consejos y, en general, el haberme ayudado siempre dentro y fuera del laboratorio, lo que ha sido para mí una acción de valor incalculable.

Finalmente, decir que el Trabajo de Fin de Grado ha sido el primer proyecto de mi formación universitaria y que, en mi opinión, ha sido una experiencia magnífica en la cual he invertido un gran número de horas de trabajo que espero que hayan servido para cumplir las expectativas puestas en mi persona y las competencias que se me exigían.



Índice General



1. Introducción	6
1.1. Los retinoides y su metabolismo	7
1.2. El ácido retinoico y sus mecanismos de acción.....	8
1.3. El ácido retinoico y su papel en el control de la adiposidad corporal	10
1.4. El ácido retinoico y su papel en el metabolismo lipídico en el hígado	11
1.5. Efectos sinérgicos del ácido retinoico con otros compuestos.....	12
2. Objetivo/planteamiento experimental	13
2.1. Objetivos específicos.....	14
3. Búsqueda bibliográfica	14
3.1. Materiales y métodos	14
3.2. Resultados	15
3.3. Discusión.....	18
4. Trabajo experimental	20
4.1. Materiales y métodos.....	20
4.1.1. Cultivos celulares y tratamientos	20
4.1.2. Aislamiento de ADN, ARN y proteínas.....	20
4.1.3. Transcripción reversa y análisis con PCR en tiempo real.....	21
4.1.4. Ensayo de citotoxicidad	22
4.1.5. Análisis estadístico.....	22
4.2. Resultados.....	22
4.2.1. Efecto del tratamiento con ATRA sobre los niveles de expresión génica	22
4.2.2. Efecto del tratamiento con el compuesto sobre los niveles de expresión génica....	23
4.2.3. Grado de citotoxicidad por tratamiento.....	24
4.2.4. Efecto del tratamiento con ATRA + compuesto sobre los niveles de expresión génica	24
4.3. Discusión	26
5. Conclusión	27
6. Bibliografía	29



Tablas y Figuras



Tabla.1.	16
Figura 1.	8
Figura 2.	17
Figura 3.	23
Figura 4.	23
Figura 5.	24
Figura 6.	25
Figura 7.	25

Resumen

La obesidad representa en la actualidad uno de los principales problemas de salud para la sociedad del mundo desarrollado y que puede conducir a la formación de afecciones secundarias, como la formación de un hígado graso por acumulación de lípidos en este órgano.

Los retinoides son sustancias relacionadas estructuralmente con la vitamina A que pueden ser captadas a partir de la dieta consumiendo alimentos ricos en precursores de esta vitamina. El metabolito activo de la vitamina A, el ácido retinoico, modula procesos celulares y metabólicos que influyen en la adiposidad de los mamíferos, por lo que se ha visto que la terapia con ácido retinoico podría servir como tratamiento para la obesidad en modelos animales. Sin embargo, hay datos controvertidos porque el uso de altas dosis de ácido retinoico puede provocar un aumento de los triglicéridos circulantes, o la ganancia de peso como síntoma del síndrome del ácido retinoico. Asimismo, se ha visto en experimentos *in vitro* que el tratamiento con ácido retinoico induce la expresión de los genes que codifican para proteínas que favorecen la oxidación de ácidos grasos.

Por otro lado, existen compuestos, cuya procedencia y propiedades pueden ser muy distintas, que han demostrado tener efectos sinérgicos con el ácido retinoico y que su combinación puede reducir significativamente la dosis necesaria de este último para la terapia de distintas enfermedades. Así, uno de estos compuestos fue seleccionado para realizar un estudio sobre el co-tratamiento con ácido retinoico para analizar e interpretar el nivel de expresión génica para CPT1 y FASN en la línea celular de carcinoma hepático humano HepG2. Finalmente, los resultados obtenidos del estudio podrían indicar una nueva estrategia para desarrollar un tratamiento combinado para la obesidad y sus complicaciones asociadas que teóricamente produciría un menor grado de efectos secundarios causados por el ácido retinoico, debido a que se utilizaría una dosis 100 veces inferior.

1. Introducción

La regulación de las reservas de grasa corporal y, por tanto del peso corporal, en los mamíferos se logra a través de un sistema complejo constituido por los siguientes componentes: (i) el control de la alimentación, básicamente a través de la modulación del apetito; (ii) el control de la eficiencia energética y, en particular, de la termogénesis adaptativa, un proceso que permite la disipación de energía contenida en los alimentos en forma de calor, así que no se acumulan en forma de grasa; (iii) el control del desarrollo del tejido adiposo y el metabolismo; y (iv) el control de la distribución de los nutrientes entre los tejidos, lo que condiciona las posibilidades de crecimiento del tejido adiposo (revisado en ¹).

El sobrepeso y la obesidad se definen como una acumulación anormal o excesiva de grasa que puede ser perjudicial para la salud². Desde la década de los años 80 se ha triplicado la incidencia de la obesidad en los países desarrollados y emergentes debido a los cambios producidos en los hábitos alimentarios por la mejora del procesamiento y producción de los alimentos³. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que hay cerca de un billón y medio de adultos en todo el mundo con sobrepeso, de los cuales 200 y 300 millones de hombres y mujeres, respectivamente, son diagnosticados como obesos. Además, en el año 2010, la OMS también calculó que había alrededor de 40 millones de niños menores de cinco años con sobrepeso².

Por otro lado, se ha demostrado que la obesidad viene acompañada de otras patologías, como la diabetes de tipo 2, el cáncer, enfermedades cardiovasculares⁴ y la enfermedad del hígado graso no alcohólico (EHGNA)⁵. La EHGNA es una patología multifactorial que está caracterizada por desregulaciones metabólicas que incluyen la acumulación de lípidos en el hígado, conocida como esteatosis, la lipotoxicidad, y la resistencia a la insulina⁶. Por lo tanto, la liberación crónica de ácidos grasos por el tejido adiposo visceral está directamente relacionada con el daño hepatocelular, debido a una captación excesiva de lípidos por parte del hígado⁵.

Actualmente se sabe que los nutrientes modifican la expresión génica y la función de sus células diana y, de este modo, afectan a muchos procesos biológicos fundamentales⁷. Así, se forja una conexión entre la regulación de las reservas de grasa y el efecto que un nutriente pueda ejercer sobre éstas para reducir el peso corporal, y servir como un futuro tratamiento para el sobrepeso y la obesidad.

1.1. Los retinoides y su metabolismo

Los retinoides son una familia de sustancias naturales y sintéticas relacionadas estructuralmente con la vitamina A (retinol). La vitamina A es una molécula liposoluble que se puede unir a muchas proteínas para su transporte a través de fluidos hidrofílicos, como el plasma sanguíneo o el espacio intracelular. La vitamina A no puede ser sintetizada *de novo* en los seres humanos, para su obtención se debe producir a partir de precursores como el retinal o apocarotenoides. Otra forma para obtener la vitamina A es a partir de la dieta, consumiendo tejidos de procedencia animal o vegetal ricos en precursores de esta vitamina. En el ser humano, la vitamina A es necesaria para la visión, un buen funcionamiento del sistema inmune, la reproducción, y el crecimiento y desarrollo embrionarios^{8,9}.

En el intestino, los retinoides son convertidos a retinol y se unen a una proteína citoplasmática específica de unión a retinol (CRBP). Este retinol se procesa a ésteres de retinilo, que son exportados a la circulación sanguínea, donde son transportados al hígado. Una vez se han introducido los ésteres de retinilo en los hepatocitos son convertidos en retinol y unidos a una nueva proteína, la proteína de unión al retinol (RBP) para que pueda ser transportado a las células diana. Una vez en la circulación el retinol:RBP se une a la transtiretina (TTR) para evitar que sea eliminada por el riñón¹⁰. La concentración típica del retinol en la circulación es de $1-3\mu\text{M}$ ¹¹.

En la *figura 1* se puede observar el metabolismo de la vitamina A (retinol) hasta su conversión al ácido retinoico (AR). La RBP se une a un receptor de la membrana celular llamado STRA6, de manera que permite la inserción del retinol en la célula diana. La vitamina A circulante como parte de los quilomicrones remanentes (CMRE) también puede servir como recurso de vitamina A para la célula, que será convertido a retinol por la hidrolasa de ésteres de retinol (REH). El retinol puede tomar dos vías distintas: (i) unirse a la proteína celular de unión a retinol (CRBP) y ser esterificado por la lecitina:retinol acetiltransferasa (LRAT) a ésteres de retinol (ER) y almacenado; (ii) ser oxidado reversiblemente a retinaldehído (RAL) por las deshidrogenasas de retinol (RDH/ADH). A su vez, el RAL puede ser oxidado irreversiblemente por deshidrogenasas de retinaldehído (RALDH) a AR, que se podrá unir a proteínas celulares de unión al ácido retinoico (CRABPs) o podrá ser degradado a metabolitos oxidados por enzimas del citocromo P450. El AR:CRABP entra en el núcleo, donde se podrá unir a sus correspondientes receptores nucleares, unirse a sus secuencias diana de la célula, reclutar coactivadores e iniciar la transcripción del mRNA y la traducción a proteína^{8,10}.

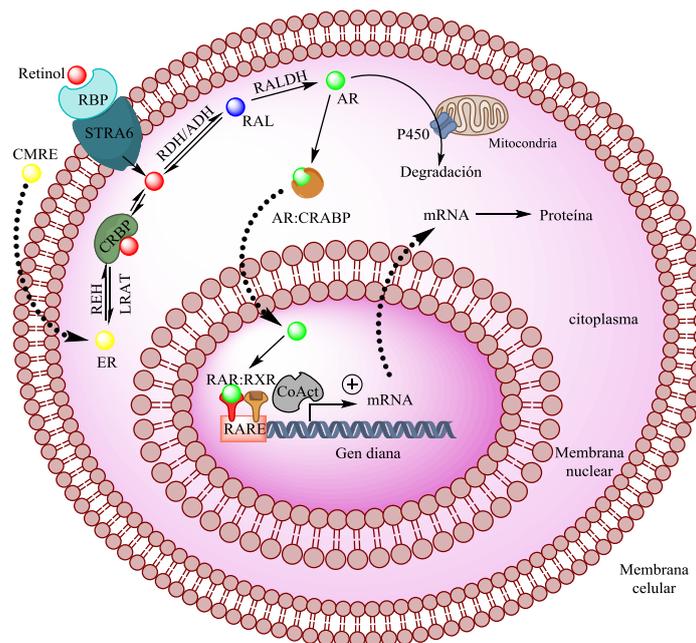


Figura 1. Metabolismo de la vitamina A (retinol) a ácido retinoico. Acrónimos del esquema: AR es el ácido retinoico; CMRE son los ésteres de retinol transportados por quilomicrones remanentes; CoAct es un coactivador de la transcripción; CRABP es la proteína celular de unión al ácido retinoico; CRBP es la proteína celular de unión al retinol; ER son ésteres de retinol; LRAT es la lecitina:retinol acetiltransferasa; P450 es el citocromo P450; RAL es el retinaldehído; RALDH es la deshidrogenasa de retinaldehído; RAR:RXR son los receptores del ácido retinoico en forma de heterodímero; RARE es el elemento a respuesta a ácido retinoico; RBP es la proteína de unión al retinol; RDH/ADH son las deshidrogenasas de retinol; REH es la hidrolasa de ésteres de retinol; STRA6 es el receptor que reconoce la proteína de unión al retinol. Adaptado de ^{8,10}.

1.2. El ácido retinoico y sus mecanismos de acción

El ácido retinoico es el metabolito biológicamente activo derivado de la vitamina A. El AR presenta distintas estructuras moleculares pero con la misma composición atómica, conocidas como isómeros. Dos ejemplos de isómeros son el *all-trans* RA (ATRA), que es el producto mayoritario de la oxidación de la vitamina A⁹, y el *9-cis* RA. Las concentraciones fisiológicas en humanos del ATRA rondan los 3-13nM¹¹, mientras que las del *9-cis* RA son mucho menores en comparación de las del ATRA. Además, la significancia de la isomerización entre el ATRA y el *9-cis* RA a nivel de organismo se desconoce totalmente¹¹. El mecanismo exacto con el que el AR actúa para regular los procesos metabólicos aún no se ha descifrado por completo. Pero se sabe que el ATRA y el *9-cis* RA pueden unirse y activar a dos tipos de receptores nucleares: los receptores del ácido retinoico (RARs), que pueden unir los dos tipos de isómeros, y los receptores X retinoides (RXRs), que unen específicamente el *9-cis* RA.

También se ha visto que el ATRA puede activar directamente los receptores activados de proliferación de los peroxisomas (PPAR β/δ) (revisado en ¹¹). La activación de los PPAR β/δ incrementa el catabolismo de lípidos en el músculo esquelético y el tejido adiposo blanco previniendo el desarrollo de la obesidad y mejorando la sensibilidad a la insulina en ratones obesos. También hay evidencia de que la supresión de la obesidad y la resistencia a la insulina por el ATRA en ratones está seguramente mediada por la activación tanto de los PPAR β/δ como de los RARs (revisado en ⁴). Tanto los RARs como los RXRs poseen hasta tres subtipos de receptor: α , β y γ . Los RARs y los RXRs pueden formar heterodímeros (RAR:RXR) y homodímeros (RXR:RXR) para regular la expresión mediante su unión a elementos de respuesta a AR (RAREs) localizados en el promotor del gen diana. Por lo tanto, la unión de los dímeros activados por ligando a los RAREs y el reclutamiento de otros cofactores (ver **Figura 1**), implicaría la interacción con componentes de la maquinaria de transcripción basal y la modificación de la condensación de la cromatina, resultando en cambios en la frecuencia del inicio de la transcripción⁴.

Los RXRs también pueden actuar como heterodímeros junto con una gran variedad de receptores nucleares. Algunos ejemplos son: los PPARs, que como se ha comentado son factores de transcripción de una superfamilia de receptores nucleares relacionados con el control del metabolismo lipídico¹²; los receptores nucleares de la hormona tiroidea (TR) o de la vitamina D (VDR), o los *liver X receptors* (LXR s), que están todos implicados en el control de la lipogénesis hepática; y los *farnesoid X receptors* (FXR s), que, entre otros efectos, inhiben la enzima limitante de la síntesis de ácidos biliares a partir del colesterol⁷. Algunos de estos heterodímeros de RXR (como TR:RXR, VDR:RXR y RAR:RXR) pueden ser activados por el ligando del otro receptor nuclear, pero no pueden ser activados únicamente por el 9-*cis* RA. En cambio, otros heterodímeros de RXR, como el PPAR:RXR, sí que pueden ser activados en presencia de cualquiera de los dos ligandos⁷.

El AR también puede ejercer su función a través de la modulación de la actividad de determinadas proteínas que juegan importantes papeles en el control del metabolismo lipídico y energético, como varios tipos de proteínas quinasa. Una de estas quinasas es la proteína quinasa activada por mitógeno p38, que se ha visto que tiene un papel inhibitorio de la lipogénesis hepática y que puede promover la β -oxidación de ácidos grasos mediante la activación de PPAR α , entre otros⁷.

Se ha documentado que en cultivos de células y en modelos animales el tratamiento con AR activa su propio metabolismo por parte de varios tipos de enzimas del citocromo P450, que se localiza en la mitocondria (ver *Figura 1*). Por ejemplo, se ha visto que en el hígado de ratas la expresión del mRNA del CYP26A1, que codifica para una de las enzimas del citocromo, está directamente relacionada con los niveles de AR y de vitamina A. Los productos que se generan a partir del metabolismo del AR en el citocromo P450 son cetonas, epóxidos, y productos hidroxilados. El metabolito más común, como resultado de la degradación del AR, es el 4-OH RA, aunque también hay otros que son menos frecuentes, como el 18-OH RA y el 3-OH RA. Se ha demostrado que algunos de estos metabolitos tienen función biológica, pero el AR es el único que regula el desarrollo. Como ya hemos comentado anteriormente, el ATRA puede isomerizarse a otros compuestos, como el 9-*cis* RA, debido a la exposición a la luz o por la actividad de la glutatión S-transferasa, esto produce la activación de otras enzimas del citocromo P450 que generarán nuevos metabolitos como resultado de la oxidación de los isómeros de ATRA. Todas las enzimas del CYP26 han demostrado también la capacidad para metabolizar AR, a pesar de tener diferentes patrones de expresión del mRNA y los mecanismos de regulación. Las CYP26 son las responsables para la metabolización del AR en varios tejidos, principalmente el hígado¹¹.

1.3. El ácido retinoico y su papel en el control de la adiposidad corporal

Se ha demostrado que el AR modula procesos celulares y metabólicos que influyen en la adiposidad de los mamíferos, incluyendo la adipogénesis, la lipogénesis, la termogénesis adaptativa, la lipólisis y la oxidación de ácidos grasos en los tejidos. Se ha visto que en roedores delgados y obesos el tratamiento con ATRA a diferentes dosis y rutas de administración mejora la sensibilidad a la insulina, reduce el peso y la adiposidad corporal, al incrementar la movilización de grasas y favorecer la oxidación de éstas en los tejidos. En estudios que se han alimentado animales con dietas bajas en vitamina A se ha visto que hay un aumento de la formación de tejido adiposo y acumulación de grasa en el músculo. En seres humanos, se ha observado que las personas con sobrepeso u obesidad presentan unos niveles plasmáticos de precursores de la vitamina A reducidos en comparación con los valores normales (revisado en ⁴).

Sin embargo, hay datos controvertidos respecto al tratamiento con AR tanto en roedores como en seres humanos, porque a pesar de que se reduce la cantidad de grasa corporal se ha examinado, tanto en estudios experimentales como clínicos, que hay un aumento de los triglicéridos circulantes en respuesta a altas dosis de retinoides. En otros estudios se ha

observado la ganancia de peso como uno de los síntomas del síndrome del ácido retinoico, que suele aparecer en aquellos pacientes con leucemia promielocítica aguda (APL) que están recibiendo terapia de ATRA (revisado en ⁴).

1.4. El ácido retinoico y su papel en el metabolismo lipídico en el hígado

El hígado es un órgano altamente relacionado con el almacenaje de retinoides y su metabolismo, así como el mantenimiento de la homeostasis del metabolismo lipídico. Se ha demostrado que el tratamiento con ATRA en experimentos con ratones provoca un aumento de la expresión en el hígado de los genes que codifican proteínas reguladoras y metabólicas que favorecen la oxidación de ácidos grasos (como PPAR α , RXR α y CPT1), mientras que redujo la expresión de genes hepáticos relacionados con la lipogénesis (como FASN). Además de estos cambios en la expresión génica, también se observó una disminución del contenido de triglicéridos en el hígado y de la concentración lipoproteínas de muy baja densidad (VLDLs) circulantes⁴.

Por otro lado, se ha demostrado en estudios realizados con cultivos de la línea celular de carcinoma hepático humano HepG2, que el tratamiento con ATRA induce la expresión de genes lipogénicos, como el de FASN, debido a la activación de heterodímeros LXR:RXR^{17,18}. La ácido graso sintasa (FASN, derivado de sus siglas en inglés *fatty acid synthase*) en el hígado es la enzima encargada de la síntesis *de novo* de ácidos grasos para ser utilizados para almacenar energía, para la producción y reparación de membranas y para la secreción de triglicéridos en forma de lipoproteínas¹⁶. De hecho los autores^{17,18} sugieren que este hecho podría explicar el aumento de los triglicéridos circulantes observado en humanos tratados con altas dosis de retinoides.

Recientemente, en los estudios realizados por Amengual J. y sus compañeros se pudo demostrar, en un experimento *in vitro* realizado con la misma línea celular de carcinoma hepático humano HepG2, que el ATRA y el 9-*cis* RA activan el catabolismo de los ácidos grasos en los cultivos de estas células. Con respecto a la oxidación mitocondrial de ácidos grasos (FAO, derivado del inglés *fatty acid oxidation*) es necesario el sistema carnitina palmitoiltransferasa (CPT) para la translocación de ácidos grasos de cadena larga al interior de la matriz mitocondrial. Este sistema se localiza en la membrana mitocondrial y está compuesto por dos enzimas: la carnitina palmitoiltransferasa 1 (CPT1), situada en la membrana externa, y 2 (CPT2), ubicada en la membrana interna¹³. La CPT1 posee tres isoformas: la isoforma presente principalmente en el hígado (CPT1-L), la del músculo

esquelético y la del cerebro^{13,14}. Los genes que codifican para las CPT están sujetos a regulación dietética y hormonal en varios tejidos, incluyendo el hígado. La FAO en el hígado está regulada principalmente a nivel del aumento de la expresión del gen de la CPT1 en respuesta a diversos estímulos fisiológicos o patológicos, como el ayuno, la ingesta de grasas o la diabetes. La actividad de la CPT1 está controlada por las concentraciones de malonil-CoA, que varían según el estado nutricional. Durante el ayuno, los niveles de malonil-CoA disminuyen, por lo que la CPT1 estará desinhibida y la FAO se llevará a cabo, mientras que en condiciones postabsortivas no estará activa la FAO debido a que la CPT1 estará inactivada por la abundancia malonil-CoA¹³.

En concreto, Amengual J. y sus compañeros argumentaron que tanto el tratamiento con ATRA (1 μ M) como el del *9-cis* RA inducen la expresión del mRNA de CPT1-L y su correspondiente proteína, tanto por mecanismos implicados con RXR como por RAR. Los efectos similares en la expresión del mRNA de la CPT1-L con ambos isómeros se podrían explicar debido a la existencia de un sistema que poseen las HepG2 para convertir el ATRA en *9-cis* RA. Además, también pudieron demostrar que en las HepG2 el gen de la CPT1-L está regulado por el heterodímero PPAR α :RXR α por la presencia de un elemento a respuesta a PPAR en su promotor. Sin embargo, también existe la posibilidad de que haya ciertas vías independientes de PPAR en las que homodímeros de RXR puedan unirse a elementos en respuesta a PPAR y transactivar genes diana del PPAR α ¹⁵. Otro aspecto que hay que destacar es que se pudo observar un aumento de la expresión del mRNA de FASN en las células HepG2 tratadas con 1 μ M de ATRA¹⁵.

Resumiendo, el tratamiento con ATRA a una concentración de 1 μ M aumenta la expresión de CPT1-L, que permite una mayor oxidación de ácidos grasos en las células HepG2. Sin embargo, el tratamiento también induce la expresión de FASN por lo que podría quedar contrarrestada la eficacia de oxidación de ácidos grasos por parte de la CPT1-L. Esto explicaría que Amengual J. y sus compañeros no pudieron observar una disminución de los lípidos intracelulares como sí que se había reportado en experimentos *in vivo*¹².

1.5. Efectos sinérgicos del ácido retinoico con otros compuestos

Se ha visto en múltiples estudios realizados con cultivos celulares que el ATRA puede ejercer efectos sinérgicos junto con otros compuestos para obtener una respuesta celular. Así, al comparar los tratamientos en los que se utiliza una concentración alta de ATRA con los que se utiliza una menor concentración de ATRA en combinación con el otro compuesto se

observan unos efectos muy similares, o incluso mejores, en comparación con el tratamiento sólo con ATRA.

Un ejemplo de estos compuestos es el fenetil éster del ácido cafeico denominado con el acrónimo CAPE, derivado de su nombre en inglés *Caffeic acid phenethyl ester*. Se trata de un compuesto fenólico que se encuentra en el propóleo que compone las colmenas de la abeja, y tiene propiedades antioxidantes¹⁹, antiinflamatorias²⁰, antivíricas, antiproliferativas²¹ y proapoptóticas²².

En el año 2006, Suzuki, T. y sus colegas descubrieron que el CAPE es un ligando para los RARs, por lo que podría servir como fármaco para inhibir la proliferación del cáncer selectivamente y sin una gran toxicidad²³.

Se ha demostrado el potencial del CAPE para mejorar la eficacia de la terapia con ATRA en la diferenciación de la leucemia promielocítica aguda. Aunque el tratamiento únicamente con CAPE induce la diferenciación su eficacia es menor que la del ATRA. En cambio, la coadministración de CAPE (1µM) con una baja concentración de ATRA (1nM) podría ser una nueva terapia para la APL²⁴.

Recientemente se ha demostrado en un modelo experimental de obesidad que el CAPE reduce las señales inflamatorias, mejora la respuesta metabólica y activa los primeros pasos de la señalización de la insulina. Concretamente, se demostró en ratones alimentados con una dieta rica en grasas que el tratamiento con CAPE mejora la sensibilidad a la glucosa, reduce la gravedad de la esteatosis hepática, y que reduce la inducción de la vía inflamatoria del factor nuclear κB (NFκB)²⁵. En otro experimento se ha visto que el CAPE inhibe la producción de citoquinas proinflamatorias que son sintetizadas por los macrófagos que invaden el tejido adiposo en la obesidad y que además el CAPE suprime la expresión de señales inflamatorias emitidas por cultivos de adipocitos hipertrofiados²⁶.

2. Objetivo/planteamiento experimental

El objetivo general planteado para la consecución de las competencias específicas y transversales del Trabajo de Fin de Grado fue estudiar el estado actual de los conocimientos sobre los efectos sinérgicos entre nutrientes moduladores y el ácido retinoico sobre distintos procesos celulares y metabólicos e identificar potenciales compuestos que permitirán terapias combinadas con el ácido retinoico para el tratamiento de la obesidad y sus complicaciones.

2.1. Objetivos específicos

Se dividen en dos clases:

- Académico:
 - Elaborar una estrategia de búsqueda en las principales bases de datos de información científica para recopilar información sobre compuestos (preferentemente de la dieta) con potenciales efectos sinérgicos con el ácido retinoico.
 - Comprender, extraer y sintetizar información relevante a partir de los documentos científicos obtenidos de las principales bases de datos de información científica para la elaboración de una lista de compuestos (preferentemente de la dieta) con potenciales efectos sinérgicos con el ácido retinoico.
- Científico/experimental:
 - Diseñar y realizar un estudio sobre el co-tratamiento del ácido retinoico y el compuesto (preferentemente de la dieta) seleccionado de la lista anteriormente elaborada, en la línea celular de carcinoma hepático humano HepG2.
 - Analizar e interpretar el nivel de expresión génica para CPT1 y FASN en los distintos tratamientos para estudiar el efecto de los mismos sobre la capacidad de oxidar y de sintetizar ácidos grasos, respectivamente, en la línea celular de carcinoma hepático humano HepG2.

3. Búsqueda bibliográfica

3.1. Materiales y métodos

La base de datos utilizada para obtener artículos científicos ha sido *Pubmed* (disponible en: “<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>”), que es un recurso gratuito desarrollado y mantenido por el Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) en los EE.UU y en el que los editores de revistas pueden facilitar el acceso al texto completo de artículos científicos a través de las páginas web de las correspondientes revistas²⁷.

También se han realizado búsquedas de artículos a partir de *ScienceDirect* (disponible en: “<http://www.sciencedirect.com>”), que es una de las principales bases de datos científicas con más de 11 millones de artículos de revistas de texto completo²⁸.

Para aquellos artículos que no hay el texto completo gratuito se ha utilizado el Servicio de Biblioteca y Documentación de la Universidad de las Islas Baleares (UIB) a través de su página web (accesible en: “<http://biblioteca.uib.es>”) para poder acceder al artículo completo

de la revista. También se ha consultado la tesis doctoral del doctor J. Mercader, “Cambios funcionales del tejido adiposo asociados a la vitamina A” a través del Servicio de Biblioteca y Documentación del Edificio Mateu Orfila de la UIB.

La *figura 2* se ha creado personalmente a partir de ChemBiodraw[®] Ultra 13.0, que es una herramienta utilizada expresamente para dibujar esquemas en publicaciones de revistas de ciencias de la salud.

3.2. Resultados

En la siguiente tabla se clasifican según su estructura molecular o propiedades los compuestos que poseen efectos sinérgicos con el ATRA. También se indica el tipo de células utilizado para el cultivo y el tiempo de exposición al tratamiento y la concentración del compuesto y del ATRA, respectivamente. Finalmente, también están indicados el efecto y el mecanismo de cada uno de los tratamientos que combinan un determinado compuesto con el ATRA. Para facilitar la visualización y comprensión de los efectos o mecanismos de cada compuesto se ha utilizado un sistema de números y vocales, respectivamente, que se corresponden con los representados en la *figura 2*.

<i>Clasificación</i>	<i>Compuesto</i>	<i>Línea celular, Tiempo</i>	<i>Concentración (compuesto y ATRA)</i>	<i>Efectos</i>	<i>Mecanismos</i>	<i>Referencias</i>
Vitaminas	Ácido ascórbico	MCF-7, 72h	1mM y 100nM	1, 2 y 3	-	29
	α -TS	CML, 12h	50mM y 10 μ M	1 y 3	-	30
	1 α ,25D	NB4, 96h CD4 ⁺ *	10nM y 1 μ M -	2	A	31,32
Péptidos del Sistema inmunológico	IFN- α	HL-60*	-	2, 3 y 5	-	35
	TNF	NB4*	10mM y 10mM	2	-	36
		U937*	10mM y 10mM			
Compuestos polifenólicos	CAPE	HL-60, 96h	1 μ M y 1nM	1 y 2	A	24
	Ácido carnósico	HL-60, 96h	2,5 μ M y 1nM	1 y 2	A	38,39
	Curcumina	U937, 48h	5 μ M y 1 μ M	1, 2 y 3	-	40-42
		HL-60* NB4*	1 μ M y 10nM 20 μ M*			
	Genisteina	A549*	40 μ M y 50 μ M	1, 3 y 5	-	43

Otros medicamentos	UDCA	HSC*	50µM y 1µM	5	B	44
		LX-2*	50µM y 1µM			
	8-MOP	Tca8113*	-	1 y 3	-	45
		Ca9-22*	-			
	MK-886	HL-60*	-	2	-	37
	Simvastatina	NB4, 72h	15µM y 0,5µM	1, 2, 3 y 5	-	46
TO-901317	CD4 ⁺ , 48h	1µM y 1mM	4	A y C	33	
Rosiglitazona	U266*	10mM*	1 y 2	-	34	
	RPMI-8226*	10mM*				

Tabla.1. Clasificación de los compuestos que poseen efectos sinérgicos con el ácido retinoico según su estructura o propiedades. Se explica el tipo de compuesto, la línea celular, el tiempo de tratamiento, la concentración utilizada en el tratamiento, los efectos y mecanismos de cada compuesto. Abreviaturas compuestos: 1α,25D es el 1α,25-dihidroxitamina D3; 8-MOP es el 8-metoxipsoraleno α-TS es el α-tocoferol succinato; CAPE es el Caffeic Acid Phenethyl Ester; IFN-α es el Interferón α; MK-886 es el inhibidor de la lipoxigenasa: 1-[(4-clorofenil)metil]-3-[(1,1-dimetiletil)tio]-α,α-dimetil-5-(1-metiletil)-1H-indol-2-ácido propanoico; TNF es el Tumor Necrosis Factor; TO-901317 es el agonista LXR: N-(2,2,2-trifluoro-etil)-N-[4-(2,2,2-trifluoro-1-hidroxi-1-trifluorometil-etil)-fenil]-benzenosulfonamida; UDCA es el ácido ursodesoxicólico. Líneas celulares: A549 es una línea celular obtenida a partir de un adenocarcinoma; Ca9-22 es una línea celular de encía; CD4⁺ es una línea de células T; CML es una línea celular obtenida de un paciente con leucemia; HL-60 es una línea celular obtenida de un paciente con leucemia; HSC y LX-2 son dos líneas celulares de origen hepático; MCF-7 es una línea celular de pecho; NB4 es una línea celular obtenida de un paciente con leucemia; Tca8113 es una línea celular de lengua; U266 y RPMI-8226 son líneas celulares obtenidas a partir de un mieloma; U937 es una línea celular obtenida a partir de un linfoma. *Anotaciones: en las líneas celulares que no se especifica el tiempo de tratamiento, o no hay la concentración del ATRA o de ambos compuestos es debido a que únicamente se ha podido consultar el “abstract” del artículo, ya que tenía acceso restringido, o debido a que el artículo estaba en un idioma distinto al inglés. Aquellos compuestos que no poseen un mecanismo en la tabla es debido a que aún se desconoce cómo actúan exactamente.

En la **figura 2** se puede ver el mecanismo de transducción de señal y los efectos sobre la función celular que se ha demostrado que produce la combinación del ATRA con algunos de los compuestos de la **tabla 1** en experimentos *in vitro* hechos con los distintos cultivos celulares. El ATRA difunde a través de la membrana celular debido a que es una molécula lipofílica. Una vez la molécula de ATRA está localizada en el citoplasma de la célula se podrá unir a proteína transportadoras, como la *cellular retinoic acid-binding protein II* (CRABP-II). Se ha demostrado que el ATRA en el interior celular puede isomerizarse en 9-cis RA, de manera que también podrá unirse a otros receptores, y activar otros dímeros de RXR no

representados. Los receptores nucleares, que pueden localizarse tanto en el citoplasma como en el núcleo, se han representado en el citoplasma en la **figura 2**. Se pueden ver representados los heterodímeros RAR:RXR, FXR:RXR y LXR:RXR, que son los que se ha demostrado que son activados por la combinación del ATRA con otro compuesto. Una vez se han activado los heterodímeros, estos pueden transportarse hacia el núcleo de la célula dónde podrán unirse a los elementos de respuesta a hormonas (HRE) y activar la expresión del mRNA. Este mRNA podrá ser transcrito a proteína en el citoplasma, y ésta podrá mediar una serie de respuestas al estímulo producido por el tratamiento con ATRA y el otro compuesto.

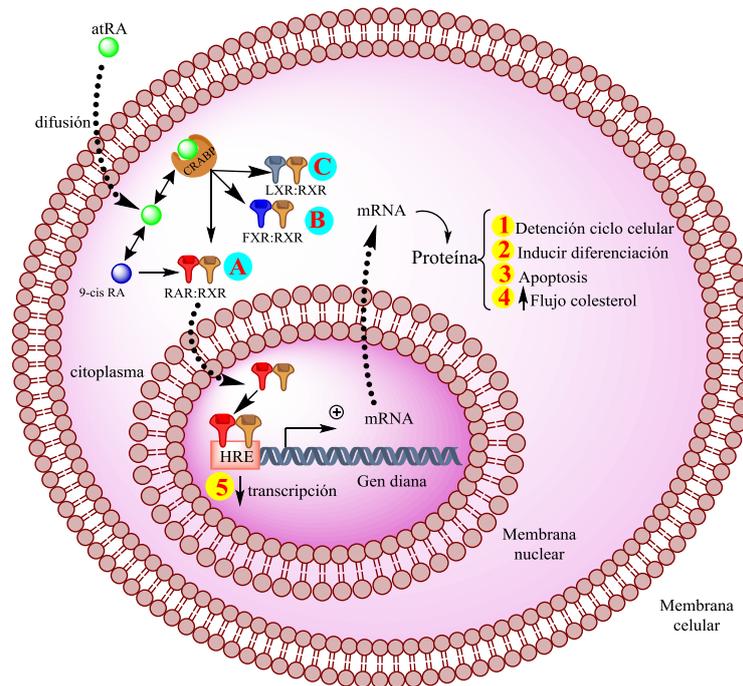


Figura 2. Efectos y mecanismos de la combinación del ATRA con otros compuestos. Acrónimos del esquema: 9-cis RA es el 9-cis retinoic acid; ATRA es el all-trans retinoic acid; CRABP es la proteína celular de unión al ácido retinoico; FXR:RXR es el heterodímero compuesto por el farnesoid X receptor y el retinoid X receptor; HRE es el hormone response element; LXR:RXR es el heterodímero compuesto por liver X receptor y el retinoid X receptor; RAR:RXR es el heterodímero compuesto por el retinoic acid receptor y el retinoid X receptor. Para simplificar solamente se ha señalado el transporte al núcleo del RAR:RXR en lugar de los tres heterodímeros representados. Adaptado a partir de los datos de: ^{24,29-35,37-40,42-46}.

3.3. Discusión

Las moléculas con efectos sinérgicos con el ATRA que se han encontrado tras la búsqueda son de muy diversas procedencias, por ejemplo el CAPE se encuentra en una gran variedad de plantas y es un componente de las colmenas de abejas²⁴, el ácido carnósico es un polifenol proveniente del romero³⁸, el UDCA es una clase de ácido biliar⁴⁴, el ácido ascórbico es la vitamina C que no puede ser sintetizada en humanos y debe ser obtenida a través de la dieta²⁹, la rosiglitazona es un medicamento que actúa a través de la unión a los PPAR³⁴, la genistéina es una isoflavona de soja⁴³, etc. Los más interesantes desde el punto de vista experimental son los que pertenecen al grupo de los compuestos polifenólicos, debido a las bajas concentraciones de ATRA que requieren en los tratamientos combinados.

El CAPE con ATRA puede ejercer su función a través de la activación de homodímeros RXR:RXR y heterodímeros RAR α :RXR²⁴. Otros compuestos combinados con el ATRA que también se ha demostrado que actúan en la vía de señalización por el AR mediante el heterodímero RAR:RXR son el 1 α ,25D³¹, el TO-901317³³ y el ácido carnósico³⁸. El TO-901317 también puede unirse a los LXR permitiendo la formación del heterodímero LXR:RXR³³. Se ha demostrado que el UDCA puede activar los FXR para formar el heterodímero FXR:RXR⁴⁴. Aunque no se haya demostrado en los cultivos, es posible que la rosiglitazona también participe en la activación de los heterodímeros PPAR:RXR.

Tal y como se puede ver en la **figura 2** la traducción de proteínas a consecuencia del efecto sinérgico entre ambos compuestos conduce a distintos tipos de respuesta según el tipo de célula. Así, podemos distinguir los siguientes efectos:

- (1) *Un aumento de las proteínas que detienen el ciclo celular en la fase G0/G1.* Como por ejemplo, en la combinación del ácido ascórbico con el ATRA que promueve el bloqueo de la proliferación, así como la activación de la expresión de enzimas antioxidantes y de proteínas relacionadas con la regulación del ciclo celular y la reparación del ADN.
- (2) *La expresión de proteínas y receptores nucleares que inducen la diferenciación celular.* Por ejemplo el tratamiento con 1 α ,25-dihidroxitamina D3 (1 α ,25D) hace que las células expresen espontáneamente niveles basales de RAR, RXR y VDR. O en el tratamiento con el MK-886, un inhibidor de la lipoxigenasa, se vio que la modulación del metabolismo de la lipoxigenasa podría modular los efectos del ATRA en la diferenciación de las células mieloides.

- (3) *La expresión de proteínas que conducen a la apoptosis.* Como el tratamiento con la simvastatina o la genisteína, que inhiben la proliferación de las células y promueven su apoptosis. O en el tratamiento con el α -tocoferol succinato (α -TS), que es un análogo de la vitamina E, en el que se demostró que el tratamiento combinado induce la apoptosis en las células por el aumento de la peroxidación lipídica, y la reducción de la expresión de C-myc y glutatión.
- (4) En el caso de las células CD4⁺ que hay un *aumento del flujo de colesterol* porque el tratamiento combinado de atRA con el TO-901317, un agonista de LXR, actúa sinérgicamente para mejorar la expresión del *ATP binding cassette transporter A1* (ABCA1), que se encarga del flujo de colesterol en los macrófagos, células neuronales y del intestino.
- (5) *La inhibición de la expresión de un determinado mRNA y la consecuente disminución de los niveles de la correspondiente proteína.* Por ejemplo, en el tratamiento con ácido ursodesoxicólico (UDCA) la reducción del mRNA del CYP7A1 disminuye la síntesis de ácido biliar, lo que explica la reducción de las sales biliares y serviría como nuevo tratamiento para los enfermos con colestasis crónica. Otro ejemplo es la inhibición de la expresión del mRNA del CYP26 en el tratamiento con IFN- α , lo que reduce el metabolismo del ATRA y permite que se mantenga más tiempo activo. O la genisteína que inhibe la expresión del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) tanto a nivel de mRNA como de proteína, lo que mejora los efectos anticancerígenos del ATRA.

En resumen, los estudios realizados hasta el momento demuestran que existe sinergismo entre el ATRA y otros compuestos. Los efectos que se producen a consecuencia del tratamiento combinado podrían ser útiles para tratar determinadas enfermedades. Así, surge la cuestión de si el CAPE o algún otro compuesto, cuya procedencia sea principalmente de la dieta, puede mejorar la eficacia de la terapia con ATRA en el tratamiento de la obesidad y sus complicaciones metabólicas asociadas. La ventaja que podría suponer la combinación del ATRA con otro compuesto frente al tratamiento únicamente con ATRA consistiría en que se requeriría una menor cantidad efectiva del metabolito derivado de la vitamina A. De esta manera, podría haber un menor impacto de los efectos secundarios causados por el ATRA después del tratamiento, a la vez que se podrían obtener los mismos o incluso mejores resultados en comparación con la terapia sólo con ATRA.

4. Trabajo experimental

4.1. Materiales y métodos

4.1.1. Cultivos celulares y tratamientos

Los hepatocitos de la línea celular de carcinoma hepático humano HepG2 obtenidos del ATCC (*American Type Culture Collection; LGC Deselaers SL, Barcelona, Spain*) fueron cultivados en *Dulbecco's minimum essential medium* (DMEM) y complementados con un 10% de *fetal bovine serum* (FBS), antibióticos (50IU penicilina/mL y 50mg estreptomina/mL), 200mM de L-glutamina y 100mM de piruvato de sodio a una temperatura de 37°C, en una atmósfera humidificada con un 5% de CO₂. Para el correcto crecimiento de las células fue necesario utilizar placas tratadas para facilitar la adherencia de las células (*tissue culture treated*). Para poder hacer los tratamientos, las células (80×10^4 células/cm²) se cultivaron en 4 placas de 12 pocillos de 3,8 cm² y fueron incubadas hasta alcanzar el 80% de la confluencia. Alcanzada esta confluencia se procedió a iniciar los tratamientos de 24h de duración en las cuatro placas de doce pocillos, tratadas independientemente. A cada placa se prepararon un total de 11 tratamientos en los que se aplicaban distintas concentraciones de ácido retinoico (10nM y 1000nM) y/o de uno de los *compuestos* mencionados en la **tabla 1** de la sección anterior. Cada uno de los tratamientos fue disuelto en dimetil sulfóxido (DMSO). Se añadió 10µL de vehículo con DMSO a los pocillos con células control y a los pocillos con células tratadas únicamente con ATRA para igualar el efecto citotóxico del DMSO en todos los tratamientos. La concentración final de DMSO no excedió el 0,1-0,2% en todos los tratamientos y los controles.

4.1.2. Aislamiento de ADN, ARN y proteínas

Se recogió el medio de cultivo sobrenadante de cada uno de los tratamientos para ser utilizado posteriormente en el análisis de la citotoxicidad. Seguidamente se procedió a la recolección de las células y al aislamiento en paralelo del ADN, ARN y proteínas mediante el kit NucleoSpin® TriPrep (*Macherey-Nagel GmbH & Co. KG*) siguiendo las instrucciones del manual. El ADN fue diluido en 100µL de *buffer DNA Elute*, mientras que el ARN fue diluido en 60µL de agua libre de RNAsas. La proteína se diluyó en 100µL de *Protein Solving Buffer Agent TCEP (PSB-TCEP)* y se congeló a -80°C. El ADN y ARN aislados fueron cuantificados utilizando el NanoDrop ND-1000 (*NadroDrop Technologies Inc., Wilmington, DE*). Debido a que el ratio 260/230 fue inferior a 2 en algunas muestras, se procedió a la precipitación del

ADN y ARN en etanol al 70% y el ADN fue congelado a -80°C . Respecto al ARN se purificó y se resuspendió en $35\mu\text{L}$ de agua libre de RNAsas. Posteriormente, el ARN fue diluido con agua libre de RNAsas para que cada muestra alcanzara una concentración de $50\text{ng}/\mu\text{L}$. La integridad del ARN fue confirmada con una electroforesis en un gel de agarosa al 1%. El gel fue preparado con 1g de *Agarosa DI Baja EEO* (casa comercial *Conda*), 100mL de tampón TBE 0,5X y $10\mu\text{L}$ de *SYBR[®] Safe Gel Stain*. Al gel se cargaron $5\mu\text{L}$ de *DNA Marker* de 100pb y $10\mu\text{L}$ de las muestras de ARN diluidas mezclados con $2\mu\text{L}$ de *Loading Buffer* x6. El gel se dejó correr a 80V durante 30 minutos.

4.1.3. Transcripción reversa y análisis con PCR en tiempo real

A partir de un volumen de $4\mu\text{L}$ del ARN diluido se preparó una reacción de transcripción reversa para cada experimento en un Termociclador 2720 (*Applied Biosystems*). Se calentó cada muestra durante 10 minutos a 65°C para desnaturalizar el ARN. Para iniciar la reacción de transcripción reversa se preparó y añadió a cada muestra de ARN desnaturalizado una *mix* que estaba compuesta por: $1,25\mu\text{L}$ de *M-MuLV Reverse Transcriptase Reaction Buffer* a 10X, $1,25\mu\text{L}$ de cloruro de magnesio (MgCl_2) 25mM, $2\mu\text{L}$ de desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs) 2.5mM, $0,5\mu\text{L}$ de *random hexamers* 50 μM , $0,5\mu\text{L}$ de inhibidor de RNAsas 20U/ μL , $0,5\mu\text{L}$ de transcriptasa reversa 50U/ μL y $1,5\mu\text{L}$ de agua libre de RNAsas.

Se utilizó en el StepOnePlusTM Real-Time PCR System (*Applied Biosystems*) para hacer una reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR) para cada experimento con el cDNA obtenido de la transcripción reversa. El cDNA del primer y segundo experimento fue diluido con el fin de obtener una concentración final de $1\text{ng}/\mu\text{L}$. Se prepararon 3 *mix* distintas para medir los niveles de expresión del mRNA de CPT1-L (isoforma hepática), de FASN y de Rplp0, este último como control interno. Las secuencias de los *primers* utilizados son: para CPT1-L 5'-GATTTTGCTGTCGGTCTTGG-3' y 5'-CTCTTGCTGCCTGAATGTGA-3'; para FASN 5'-GAGGAAGGAGGGTGTGTTT-3' y 5'-CGGGGATAGAGGTGCTGA-3'; para Rplp0 5'-ACAACCCAGCTCTGGAGAAA-3' y 5'-TGCCCCTGGAGATTTTAGTG-3'. Cada *mix* estaba formada por los siguientes componentes: $5\mu\text{L}$ de *Power SYBR[®] Green PCR Master Mix* 1X, $0,25\mu\text{L}$ para el *primer forward* y otros $0,25\mu\text{L}$ para el *reverse* y $2,5\mu\text{L}$ de agua libre de RNAsas. El volumen final de la reacción para cada muestra era de $10\mu\text{L}$ ($2\mu\text{L}$ de cDNA y $8\mu\text{L}$ de *mix*). Para comprobar que se había amplificado el fragmento deseado se preparó un gel de agarosa al 4% con 4g de Agarosa MS-8 (casa comercial *Conda*) y 100mL de tampón TBE 0,5X. Al gel se cargaron $5\mu\text{L}$ de *DNA Marker* de 100pb y $10\mu\text{L}$ de

las muestras de la reacción de qPCR mezclados con 2µL de *Loading Buffer* x6. El gel se dejó correr a 80V durante 30 minutos. La expresión relativa de cada mRNA fue calculada conforme M. W. Pfaffl (2001)⁴⁷, utilizando Rplp0 como gen de normalización.

4.1.4. Ensayo de citotoxicidad

Se analizó el potencial citotóxico de sustancias solubles en el medio de cultivo reservado durante la recogida de las células después de los tratamientos a través del *Cytotoxicity Detection Kit^{PLUS}* (LDH) siguiendo las instrucciones del manual. Se utilizó un lector de ELISA para medir la absorbancia de las muestras a 492nm y con una longitud de onda de referencia igual o superior a 610nm.

4.1.5. Análisis estadístico

Las diferencias entre los grupos han sido valoradas mediante el análisis ANOVA y el contraste entre las medias ha sido valorado por comparación mediante DMS y t-test *post hoc*. Para realizar el análisis se ha utilizado el programa *IBM SPSS Statistics*.

4.2. Resultados

4.2.1. Efecto del tratamiento con ATRA sobre los niveles de expresión génica

En el tratamiento con ATRA a la concentración de 1000nM se observó un aumento de la expresión del mRNA de CPT1-L y FASN en comparación con las células control (DMSO). Con respecto al tratamiento de 10nM de ATRA no se observaron diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo control en ninguno de los dos mRNA (*Figuras 3A y B*).

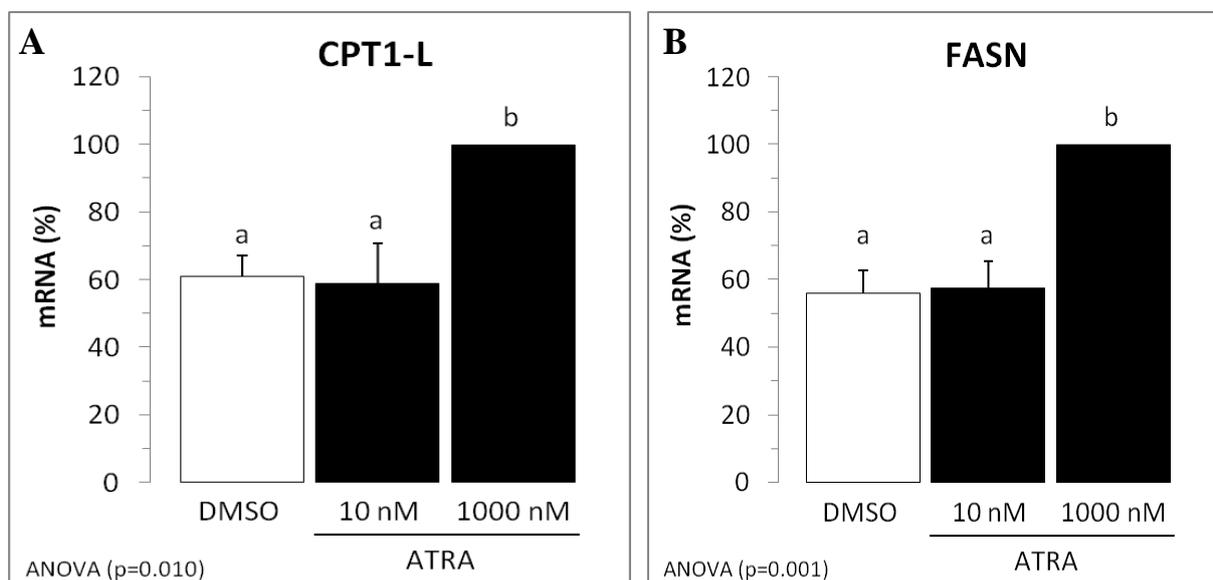


Figura 3. Niveles de expresión del mRNA de CPT1-L (A) y de FASN (B) en el tratamiento con ATRA en células HepG2. El vehículo fue el DMSO. La expresión del mRNA de CPT1-L y FASN fue normalizada a la expresión del mRNA del Rplp0. Los datos se representaron en relación al valor medio de las células que recibieron tratamiento con ATRA a 1000nM, que fue fijado a 100%, y se representan gráficamente como las medias \pm SEM de cuatro placas de doce pocillos, tratadas independientemente. Los valores con una distinta letra son significativamente diferentes ($p < 0.05$: DMS post hoc).

4.2.2. Efecto del tratamiento con el compuesto sobre los niveles de expresión génica

En el tratamiento con el compuesto seleccionado se observa una tendencia a aumentar los niveles del mRNA para la CPT1-L, aunque únicamente se observaron diferencias estadísticamente significativas en el tratamiento con una concentración intermedia en comparación con las células control (**Figura 4A**). Con respecto al nivel de expresión del mRNA de FASN no se observaron diferencias estadísticamente significativas en las diferentes concentraciones del tratamiento con el compuesto en comparación con las células control (**Figura 4B**).

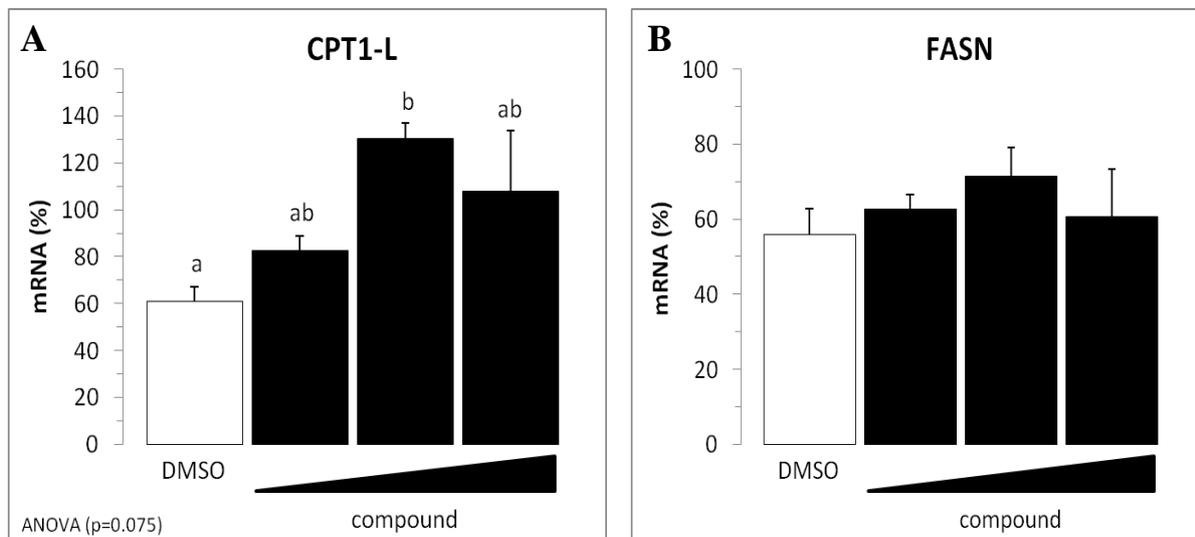


Figura 4. Niveles de expresión del mRNA de CPT1-L (A) y de FASN (B) en el tratamiento con el compuesto en células HepG2. El vehículo fue el DMSO. La expresión del mRNA de CPT1-L y FASN fue normalizada a la expresión del mRNA del Rplp0. Los datos se representaron en relación al valor medio de las células que recibieron tratamiento con ATRA a 1000nM, que fue fijado a 100%, y se representan gráficamente como las medias \pm SEM de cuatro placas de doce pocillos, tratadas independientemente. Los valores con una distinta letra son significativamente diferentes ($p < 0.05$: DMS post hoc).

4.2.3. Grado de citotoxicidad por tratamiento

La lactato deshidrogenasa (LDH) es una enzima citoplasmática que está presente en todas las células. Cuando la membrana plasmática está dañada la LDH es liberada al medio de cultivo. Así, a partir del medio de cultivo sobrenadante que se reservó durante la recolección de las células después de los tratamientos se pudo cuantificar con un método colorimétrico la actividad de la LDH.

En las *figuras 5A y B* están representados en porcentaje los valores de citotoxicidad obtenidos para cada tratamiento con ATRA y el *compuesto*. Los porcentajes de citotoxicidad fueron relativamente bajos en los tratamientos con ATRA y el *compuesto*. Únicamente se observaron diferencias estadísticamente significativas en el tratamiento con la mayor concentración del *compuesto*.

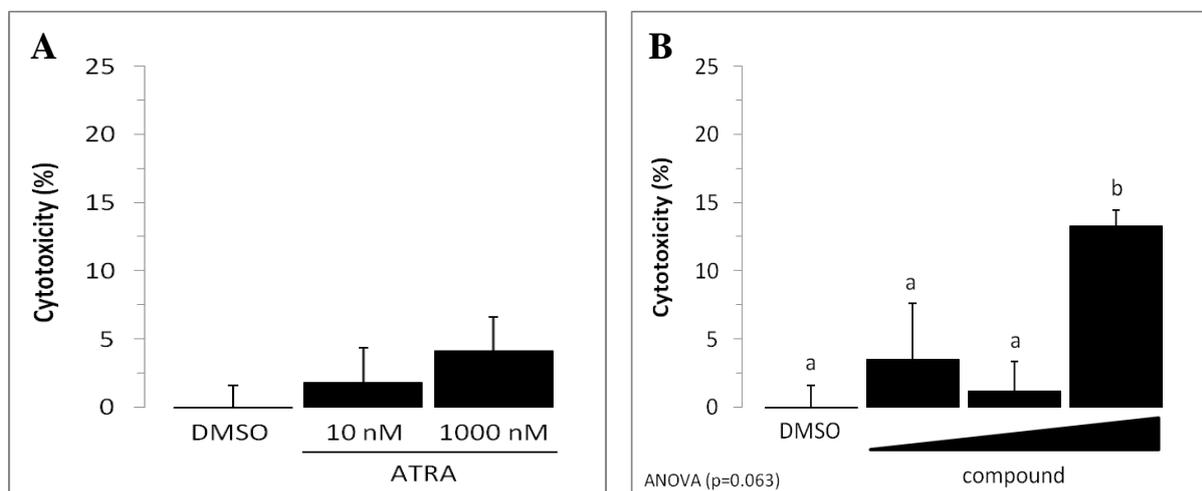


Figura 5. Efecto de los tratamientos a distintas concentraciones de ATRA (A) y del *compuesto* (B) sobre la citotoxicidad en células HepG2. Los datos se representaron en relación al valor medio de las células que recibieron tratamiento con DMSO y fueron expuestas durante 15 minutos adicionales al lisis buffer del kit (ver materiales y métodos) para garantizar la rotura de todas las células del pocillo, que fue fijado a 100%, y se representan gráficamente como las medias \pm SEM de dos placas de doce pocillos, tratadas independientemente.

4.2.4. Efecto del tratamiento con ATRA + *compuesto* sobre los niveles de expresión génica

El tratamiento combinado del *compuesto* (a la dosis más baja) y del ATRA (a la dosis 10 nM) en células HepG2 induce los niveles de expresión del mRNA de CPT1-L al mismo nivel que la inducción observada en el tratamiento con ATRA 1000 nM (*Figuras 6A y 7A*). Dicho efecto potenciador del co-tratamiento con el *compuesto* se pierde a la dosis más alta de

ATRA. En relación a los niveles de expresión del mRNA de FASN se observa que el co-tratamiento con el *compuesto* (a la dosis más baja) disminuye en un 30-40% los niveles de expresión del mRNA de FASN, disminución que se hace significativa a la dosis más alta de ATRA (*Figuras 6B y 7B*).

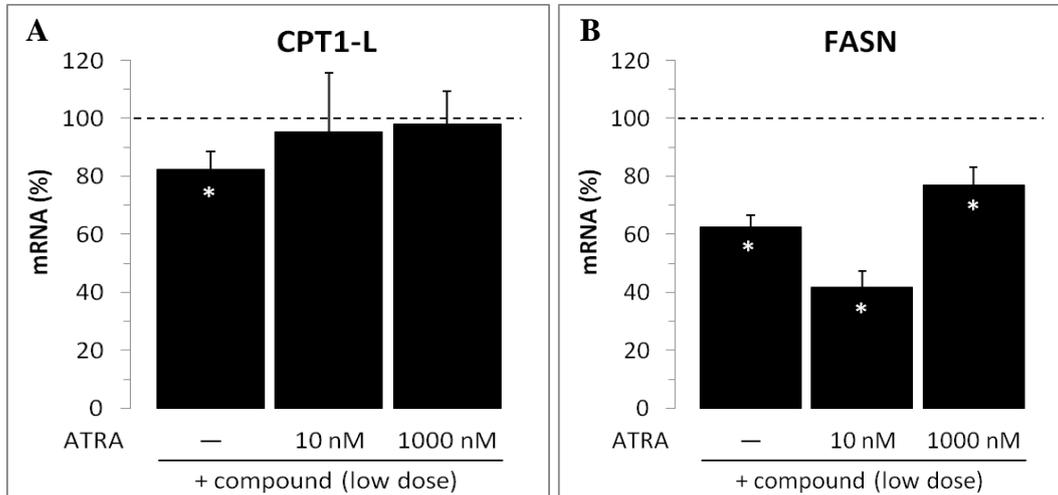


Figura 6. Niveles de expresión del mRNA de CPT1-L (A) y de FASN (B) en el tratamiento combinado del compuesto (a la dosis más baja) y del ATRA (a diferentes concentraciones) en células HepG2. El vehículo fue el DMSO. La expresión del mRNA de CPT1-L y FASN fue normalizada a la expresión del mRNA del Rplp0. Los datos se representaron en relación al valor medio de las células que recibieron tratamiento con ATRA a 1000nM, que fue fijado a 100% (y que se indica en la figura por la línea punteada), y se representan gráficamente como las medias \pm SEM de cuatro placas de doce pocillos, tratadas independientemente. *, tratamiento indicado respecto al tratamiento con ATRA a 1000 nM ($p < 0.05$; t-test).

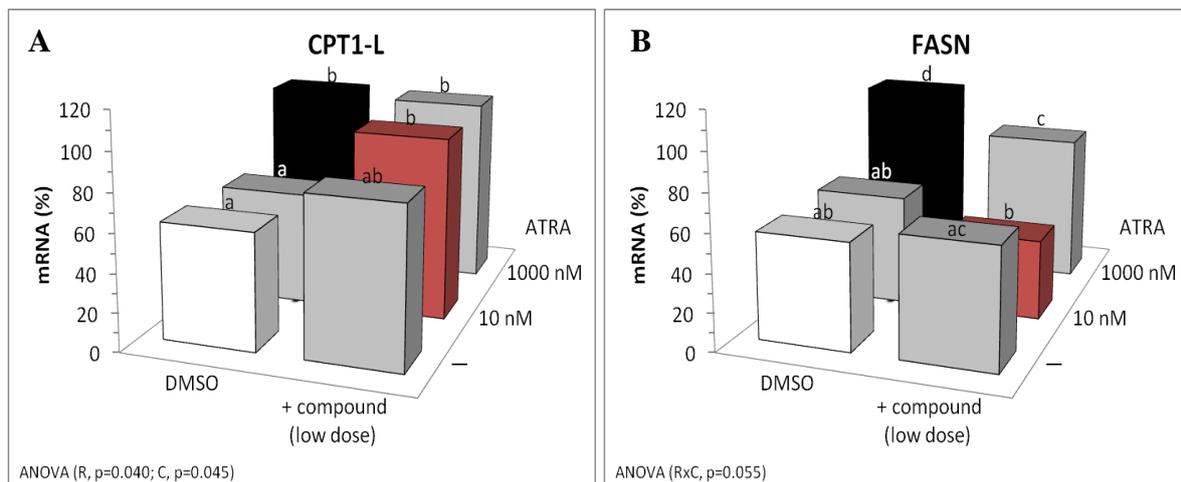


Figura 7. Niveles de expresión del mRNA de CPT1-L (A) y de FASN (B) en el tratamiento de ATRA (a diferentes concentraciones) combinado o no con el compuesto (a la dosis más baja) en células HepG2. El vehículo fue el DMSO. La expresión del mRNA de CPT1-L y FASN fue normalizada a la expresión del mRNA del Rplp0. Los datos se representaron en relación al valor medio de las células que recibieron tratamiento con ATRA a 1000nM, que fue fijado a 100%, y se representan gráficamente como las medias \pm SEM de cuatro placas de doce pocillos, tratadas independientemente. Los valores con una distinta letra son significativamente diferentes ($p < 0.05$; DMS post hoc).

4.3. Discusión

De los distintos tratamientos que se han preparado con las células HepG2 se ha podido comprobar que en el tratamiento con ATRA a una dosis de 1000nM induce la expresión del mRNA de CPT1-L y FASN, lo que se corresponde con los resultados obtenidos en los experimentos realizados por Amengual J. y sus compañeros¹⁵.

Los tratamientos con diferentes concentraciones del *compuesto* no mostraron diferencias con respecto a la expresión del mRNA de FASN en comparación con las células control. Por otro lado, se observó un aumento de la tendencia a expresar el mRNA de CPT1-L en comparación con las células control pero sólo se observaron diferencias estadísticamente significativas en el tratamiento a concentración intermedia. Así, en el caso del tratamiento con mayor concentración del *compuesto* se puede observar un mayor error que puede ser explicado según los resultados obtenidos en el análisis de citotoxicidad (*figura 5*) y en los cálculos de la concentración de ADN total por tratamiento (datos no mostrados). En el análisis cuantitativo de la actividad de LDH se pudo comprobar que para la mayor concentración del *compuesto* había aproximadamente un 13% de citotoxicidad, lo que se correspondería con los resultados de los experimentos realizados por Costa S. y sus compañeros. En sus estudios determinaron la viabilidad de las células HepG2 cuando se sometían a un tratamiento de 24h a la misma concentración del *compuesto*, que tenía un valor cercano al 90%⁴⁸. De esta manera, la mayor variabilidad entre las muestras para este tratamiento, por la cual no hay diferencias significativas, podría ser explicada debido al grado de citotoxicidad causado por la alta concentración del *compuesto*.

Debido a que los resultados no mostraron diferencias significativas entre el tratamiento con ATRA a 1000nM y los tratamientos en que se combinaron las concentraciones de 10nM y 1000nM de ATRA con la concentración más baja del *compuesto* no se pudo confirmar la hipótesis inicial de encontrar efectos sinérgicos para aumentar la expresión del mRNA de CPT1-L. Sin embargo, sí que se pudo aumentar la expresión del mRNA de CPT1-L en el tratamiento de ATRA 10nM y el *compuesto* al ser comparado con el tratamiento sólo con ATRA 10nM. Con respecto a la expresión del mRNA de FASN sí que se observaron diferencias entre los tratamientos combinados y el tratamiento con ATRA a 1000nM, permitiendo una disminución de la expresión del mRNA en los tratamientos combinados.

En resumen, el tratamiento combinado con 10nM de ATRA y la concentración más baja del *compuesto* no posee una citotoxicidad muy elevada y, además, podría suponer una mayor eficacia para la oxidación de ácidos grasos en comparación al tratamiento con ATRA a

1000nM. En concreto, la ventaja del tratamiento combinado se fundamentaría en la expresión del mRNA de CPT1 a unos niveles muy similares a los del tratamiento con ATRA a una concentración 100 veces superior y en la disminución del mRNA de FASN en el tratamiento combinado en comparación con la expresión del FASN en el tratamiento con ATRA 1000nM.

5. Conclusión

La obesidad representa en la actualidad uno de los principales problemas de salud para la sociedad del mundo desarrollado, llegando a haber aproximadamente un billón de enfermos en todo el mundo. La obesidad puede conducir a la formación de enfermedades secundarias, como la formación de un hígado graso por acumulación de lípidos en este órgano. Debido a que existe una conexión a nivel genético entre la regulación de las reservas de grasa y los nutrientes, se han realizado un gran número de estudios para ver el efecto de algunos nutrientes para reducir el peso corporal.

Los retinoides son sustancias relacionadas estructuralmente con la vitamina A (retinol) que pueden ser captadas a partir de la dieta consumiendo alimentos ricos en precursores de esta vitamina. Los precursores son convertidos a la vitamina A una vez están en los hepatocitos. Cuando la vitamina A alcanza su célula diana se podrá iniciar en ésta el metabolismo de la vitamina hasta la formación del ácido retinoico, que es su metabolito biológicamente activo. El ácido retinoico modula procesos celulares y metabólicos que influyen en la adiposidad de los mamíferos, por lo que se ha visto que el tratamiento con ATRA mejora la sensibilidad a la insulina y reduce el peso y adiposidad corporales en modelos animales. Sin embargo, hay datos controvertidos porque el uso de altas dosis provoca un aumento de los triglicéridos circulantes, tanto en humanos como en roedores, o la ganancia de peso como síntoma del síndrome del ácido retinoico, que tiene una incidencia del 27% en los pacientes con leucemia promielocítica aguda (APL) que reciben un tratamiento únicamente sólo con ATRA.

Asimismo, se ha visto tanto en experimentos *in vitro* como *in vivo* que el tratamiento con ATRA induce la expresión de los genes que codifican para proteínas que favorecen la oxidación de ácidos grasos. No obstante, los resultados no coinciden en su totalidad, ya que por ejemplo en experimentos realizados con células HepG2 tratadas con ATRA se observó un aumento de la expresión de la FASN, a diferencia de experimentos *in vivo* donde disminuía.

Por otro lado, como se ha visto a lo largo de este trabajo existen compuestos, cuya procedencia y propiedades pueden ser muy distintas, que han demostrado que su combinación

con el ATRA puede reducir significativamente la dosis necesaria de ATRA para la terapia de distintas enfermedades, como la APL o la esteatosis hepática.

Así, de los compuestos para los que se ha declarado algún tipo de efecto sinérgico con el ATRA se seleccionó uno para ver si se podía inducir un aumento de la síntesis del mRNA de la CPT1 en cultivos de la línea celular HepG2, lo que podría propiciar hipotéticamente la estimulación de la oxidación de ácidos grasos. En los resultados obtenidos en el tratamiento combinado con ATRA 10nM y una dosis baja del *compuesto* se pudo observar que la expresión del mRNA de la CPT1 era similar al tratamiento con ATRA 1000nM, mientras que el mRNA de FASN disminuía significativamente en el tratamiento combinado en comparación con el tratamiento con ATRA 1000nM. Esto podría suponer dos ventajas: por un lado, se reduciría la dosis necesaria de ATRA para obtener un aumento de la expresión del mRNA de CPT1, con lo cual podría haber un menor impacto de los efectos secundarios causados por el ATRA; por otro lado, tanto el aumento de la expresión del mRNA de la CPT1 como la disminución del mRNA de FASN que se produce en el tratamiento combinado se podría traducir a mayor predisposición a la oxidación de ácidos grasos en las células HepG2 en comparación con el tratamiento con ATRA 1000nM. De esta manera, supuestamente podría haber una disminución del contenido lipídico intracelular en el tratamiento combinado.

En conclusión, debido a que la obesidad implica toda una serie de desregulaciones metabólicas, como la acumulación desmesurada de lípidos en el hígado, estos resultados podrían indicar una nueva estrategia para desarrollar una terapia combinada para tratar la obesidad y sus complicaciones asociadas y que teóricamente produciría un menor grado de efectos secundarios causados por el ATRA, debido a que se utilizaría una dosis 100 veces inferior en comparación con la cantidad utilizada en estudios previos.

6. Bibliografía

1. Palou, A.; Serra, F.; Bonet, M. L.; Pico, C. Obesity: molecular bases of a multifactorial problem. *Eur. J. Nutr.* 2000, 39, 127-144.
2. OMS: Obesidad y sobrepeso, mayo de 2012. Consultada en marzo de 2013. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/es/index.html>.
3. WHO: The World Health Report 2002 – Reducing Risks, Promoting Healthy Life, 2009; Consultada en marzo de 2013. Disponible en: <http://www.who.int/whr/2002/en/>.
4. Bonet, M. L.; Ribot, J.; Palou, A. Lipid metabolism in mammalian tissues and its control by retinoic acid. *Biochim. Biophys. Acta* 2012, 1821, 177-189.
5. Wree, A.; Kahraman, A.; Gerken, G.; Canbay, A. Obesity affects the liver - the link between adipocytes and hepatocytes. *Digestion* 2011, 83, 124-133.
6. Naik, A.; Belic, A.; Zanger, U. M.; Rozman, D. Molecular Interactions between NAFLD and Xenobiotic Metabolism. *Front. Genet.* 2013, 4, 2.
7. Bonet, M. L.; Ribot, J.; Felipe, F.; Palou, A. Vitamin A and the regulation of fat reserves. *Cellular and molecular life sciences: CMLS.* 2003, 60, 1311-21.
8. Clagett-Dame, M.; Knutson, D. Vitamin A in reproduction and development. *Nutrients* 2011, 3, 385-428.
9. Blomhoff, R.; Blomhoff, H. K. Overview of retinoid metabolism and function. *J. Neurobiol.* 2006, 66, 606-630.
10. Theodosiou, M.; Laudet, V.; Schubert, M. From carrot to clinic: an overview of the retinoic acid signaling pathway. *Cell Mol. Life Sci.* 2010, 67, 1423-1445.
11. Thatcher, J. E.; Isoherranen, N. The role of CYP26 enzymes in retinoic acid clearance. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* 2009, 5, 875-886.
12. Amengual, J.; Ribot, J.; Bonet, M. L.; Palou, A. Retinoic acid treatment enhances lipid oxidation and inhibits lipid biosynthesis capacities in the liver of mice. *Cell. Physiol. Biochem.* 2010, 25, 657-666.
13. Bonnefont, J. P.; Djouadi, F.; Prip-Buus, C.; Gobin, S.; Munnich, A.; Bastin, J. Carnitine palmitoyltransferases 1 and 2: biochemical, molecular and medical aspects. *Mol. Aspects Med.* 2004, 25, 495-520.
14. Zammit, V. A. Carnitine palmitoyltransferase 1: central to cell function. *IUBMB Life* 2008, 60, 347-354.
15. Amengual, J.; Petrov, P.; Bonet, M. L.; Ribot, J.; Palou, A. Induction of carnitine palmitoyl transferase 1 and fatty acid oxidation by retinoic acid in HepG2 cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2012, 44, 2019-2027.
16. Jensen-Urstad, A. P.; Semenkovich, C. F. Fatty acid synthase and liver triglyceride metabolism: housekeeper or messenger? *Biochim Biophys Acta.* 2012, 1821, 747-753.
17. Roder, K.; Schweizer, M. Retinoic acid-mediated transcription and maturation of SREBP-1c regulates fatty acid synthase via cis-elements responsible for nutritional regulation. *Biochem. Soc. Trans.* 2007, 35, 1211-1214.
18. Roder, K.; Zhang, L.; Schweizer, M. SREBP-1c mediates the retinoid-dependent increase in fatty acid synthase promoter activity in HepG2. *FEBS Lett.* 2007, 581, 2715-2720.
19. Chen, H.; Tran, J. T.; Anderson, R. E.; Mandal, M. N. Caffeic acid phenethyl ester protects 661W cells from H₂O₂-mediated cell death and enhances electroretinography response in dim-reared albino rats. *Mol. Vis.* 2012, 18, 1325-1338.
20. Korish, A. A.; Arafa, M. M. Propolis derivatives inhibit the systemic inflammatory response and protect hepatic and neuronal cells in acute septic shock. *Braz. J. Infect. Dis.* 2011, 15, 332-338.

21. Carrasco-Legleu, C. E.; Sánchez-Pérez, Y.; Márquez-Rosado, L.; Fattel-Fazenda, S.; Arce-Popoca, E.; Hernández-García, S.; Villa-Treviño, S. A single dose of caffeic acid phenethyl ester prevents initiation in a medium-term rat hepatocarcinogenesis model. *World journal of gastroenterology: WJG* 2006, *12*, 6779-85.
22. Onori, P.; DeMorrow, S.; Gaudio, E.; Franchitto, A.; Mancinelli, R.; Venter, J.; Kopriva, S.; Ueno, Y.; Alvaro, D.; Savage, J.; Alpini, G.; Francis, H. Caffeic acid phenethyl ester decreases cholangiocarcinoma growth by inhibition of NF-kappaB and induction of apoptosis. *Int. J. Cancer* 2009, *125*, 565-576.
23. Suzuki, T.; Nishimaki-Mogami, T.; Kawai, H.; Kobayashi, T.; Shinozaki, Y.; Sato, Y.; Hashimoto, T.; Asakawa, Y.; Inoue, K.; Ohno, Y.; Hayakawa, T.; Kawanishi, T. Screening of novel nuclear receptor agonists by a convenient reporter gene assay system using green fluorescent protein derivatives. *Phytomedicine* 2006, *13*, 401-411.
24. Kuo, H. C.; Kuo, W. H.; Lee, Y. J.; Wang, C. J.; Tseng, T. H. Enhancement of caffeic acid phenethyl ester on all-trans retinoic acid-induced differentiation in human leukemia HL-60 cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2006, *216*, 80-88.
25. Bezerra, R. M.; Veiga, L. F.; Caetano, A. C.; Rosalen, P. L.; Amaral, M. E.; Palanch, A. C.; de Alencar, S. M. Caffeic acid phenethyl ester reduces the activation of the nuclear factor kappaB pathway by high-fat diet-induced obesity in mice. *Meta* 2012, *61*, 11, 16-06-14.
26. Juman, S.; Yasui, N.; Ikeda, K.; Ueda, A.; Sakanaka, M.; Negishi, H.; Miki, T. Caffeic acid phenethyl ester suppresses the production of pro-inflammatory cytokines in hypertrophic adipocytes through lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *Biol. Pharm. Bull.* 2012, *35*, 1941-1946.
27. Página web con información sobre *Pubmed*. Consultado en abril de 2013. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK3827/#pubmedhelp.FAQs>.
28. Página web con información de *ScienceDirect*. Consultado en abril de 2013. Disponible en: <http://www.info.sciverse.com/sciencedirect/about>.
29. Kim, K. N.; Pie, J. E.; Park, J. H.; Park, Y. H.; Kim, H. W.; Kim, M. K. Retinoic acid and ascorbic acid act synergistically in inhibiting human breast cancer cell proliferation. *J. Nutr. Biochem.* 2006, *17*, 454-462.
30. Khanduja, K. L.; Kumar, S.; Varma, N.; Varma, S. C.; Avti, P. K.; Pathak, C. M. Enhancement in alpha-tocopherol succinate-induced apoptosis by all-trans-retinoic acid in primary leukemic cells: role of antioxidant defense, Bax and c-myc. *Mol. Cell. Biochem.* 2008, *319*, 133-139.
31. Bastie, J. N.; Balitrand, N.; Guillemot, I.; Chomienne, C.; Delva, L. Cooperative action of 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 and retinoic acid in NB4 acute promyelocytic leukemia cell differentiation is transcriptionally controlled. *Exp. Cell Res.* 2005, *310*, 319-330.
32. Ikeda, U.; Wakita, D.; Ohkuri, T.; Chamoto, K.; Kitamura, H.; Iwakura, Y.; Nishimura, T. 1alpha,25-Dihydroxyvitamin D3 and all-trans retinoic acid synergistically inhibit the differentiation and expansion of Th17 cells. *Immunol. Lett.* 2010, *134*, 7-16.
33. Jiang, H.; Badralmaa, Y.; Yang, J.; Lempicki, R.; Hazen, A.; Natarajan, V. Retinoic acid and liver X receptor agonist synergistically inhibit HIV infection in CD4⁺ T cells by up-regulating ABCA1-mediated cholesterol efflux. *Lipids Health. Dis.* 2012, *11*, 69.
34. Huang, H. W.; Chen, G. H.; Chang, H. R.; Chow, H. C.; Leung, A. Y.; Liang, R.; Wu, D. P. Differentiating effect of PPARgamma ligand rosiglitazone and all trans-retinoic acid on myeloma cells and its possible mechanism. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi* 2009, *31*, 885-889.
35. Liu, C. H. Study on the synergic effect of all-trans retinoic acid combined with IFN-alpha on the proliferation and differentiation of HL-60 cells. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi* 2005, *21*, 637-42.

36. Witcher, M.; Ross, D. T.; Rousseau, C.; Deluca, L.; Miller, W. H., Jr Synergy between all-trans retinoic acid and tumor necrosis factor pathways in acute leukemia cells. *Blood* 2003, *102*, 237-245.
37. Hofmanova, J.; Kozubik, A.; Dusek, L.; Pachernik, J. Inhibitors of lipoxygenase metabolism exert synergistic effects with retinoic acid on differentiation of human leukemia HL-60 cells. *Eur. J. Pharmacol.* 1998, *350*, 273-284.
38. Danilenko, M.; Wang, X.; Studzinski, G. P. Carnosic acid and promotion of monocytic differentiation of HL60-G cells initiated by other agents. *J. Natl. Cancer Inst.* 2001, *93*, 1224-1233.
39. Steiner, M.; Priel, I.; Giat, J.; Levy, J.; Sharoni, Y.; Danilenko, M. Carnosic acid inhibits proliferation and augments differentiation of human leukemic cells induced by 1,25-dihydroxyvitamin D3 and retinoic acid. *Nutr. Cancer* 2001, *41*, 135-144.
40. Liu, Y.; Chang, R. L.; Cui, X. X.; Newmark, H. L.; Conney, A. H. Synergistic effects of curcumin on all-trans retinoic acid- and 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3-induced differentiation in human promyelocytic leukemia HL-60 cells. *Oncol. Res.* 1997, *9*, 19-29.
41. Kikuchi, H.; Kuribayashi, F.; Kiwaki, N.; Nakayama, T. Curcumin dramatically enhances retinoic acid-induced superoxide generating activity via accumulation of p47-phox and p67-phox proteins in U937 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2010, *395*, 61-65.
42. Zhang, Z. L.; Kong, Y. Y.; Wan, L. G. Apoptosis of retinoic acid resistant NB4-R1 cells induced with curcumin and its mechanism. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi* 2010, *18*, 340-343.
43. Zhou, R. J.; Yang, X. Q.; Wang, D.; Zhou, Q.; Xia, L.; Li, M. X.; Zeng, L. L.; Wang, G.; Yang, Z. Z. Anti-tumor effects of all-trans retinoic acid are enhanced by genistein. *Cell Biochem. Biophys.* 2012, *62*, 177-184.
44. He, H.; Mennone, A.; Boyer, J. L.; Cai, S. Y. Combination of retinoic acid and ursodeoxycholic acid attenuates liver injury in bile duct-ligated rats and human hepatic cells. *Hepatology* 2011, *53*, 548-557.
45. Yan, X.; Wu, J.; Chen, J. Inhibitory effects of 8-methoxypsoralen combining with all trans retinoic acid on oral squamous cancer cell lines. *Hua. Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi* 1998, *16*, 117-119.
46. Jiang, T. X.; Gu, W. Y.; Qiu, G. Q.; Chen, Z. X.; Wang, Z. L.; Wu, H. Q.; Hua, X. Y.; He, B.; Wu, W.; Xie, X. B.; Cao, X. S. Effects of simvastatin plus all-trans retinoic acid on WT1/hDMP1 gene expression profiles of human promyelocytic leukemia cell line NB4. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2011, *91*, 1856-1860.
47. Pfaffl, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RTPCR. *Nucleic Acids Research* 2001, *29*, 9, e45.
48. Costa, S.; Utan, A.; Speroni, E.; Cervellati, R.; Piva, G.; Prandini, A.; Guerra, M. C. Carnosic acid from rosemary extracts: a potential chemoprotective agent against aflatoxin B1. An in vitro study. *Journal of applied toxicology* 2007, *27*, 152-159.