



UNIVERSIDAD
MAYOR

para espíritus emprendedores

Facultad de Ciencias

**ESCUELA DE
BIOTECNOLOGÍA**

**Participación de la proteína STING en la acumulación de grasas y su potencial
como biomarcador en la detección temprana de la obesidad**

Catalina Javiera Guerra Ramírez

Proyecto de Tesis para optar al título de Biotecnóloga

Santiago – Chile

2022



**UNIVERSIDAD
MAYOR**

para espíritus emprendedores

Facultad de Ciencias
**ESCUELA DE
BIOTECNOLOGÍA**

**Participación de la proteína STING en la acumulación de grasas y su potencial
como biomarcador en la detección temprana de obesidad**

Catalina Javiera Guerra Ramírez

Proyecto de Tesis para optar al título de Biotecnóloga

Tutora: PhD. BQ. Paola Murgas Alcaíno

Co-tutor: PhD. T.M Cristian Cortez Plaza

Santiago – Chile

2022

El trabajo detrás de esta Tesis se lo dedico a mis ángeles guardianes, espero que estén orgullosos de la persona en la que me he convertido.

También, se lo dedico a la Catalina del pasado que veía muy lejano este momento.

Esto es por y para ti.

SOLO USO ACADÉMICO

AGRADECIMIENTOS

Quisiera expresar en primer lugar, mis más profundos agradecimientos a cada persona que contribuyó de manera directa o indirecta en este proceso por su aporte académico, técnico, logístico y de guía durante este proceso. A la Dra. Paola Murgas por recibirme en su laboratorio y entregarme herramientas para mi formación profesional a lo largo de este proceso. A cada miembro del Laboratorio de Inmunología Murgas por su apoyo. Al Dr. Cristian Cortez por su dedicado aporte a la discusión del trabajo y su mentoría en el proceso de escritura.

En una nota más personal, le doy las gracias a mi familia por su apoyo incondicional desde mi primer día como estudiante de Biotecnología, que aún sin entender del todo mi futura profesión no dejaron nunca de ser mis mejores y mayores motivadores. Gracias por creer en mí incluso cuando yo no lo hice. Sus gestos han significado mucho para mí, cada comida compartida, cada conversación y todos los momentos en que me brindaron sus consejos de vida. A mis padres y mi hermano, gracias. También quisiera agradecer de todo corazón a mi pareja Matias por ser parte de mi vida, por seguir apoyándome, cuidándome y amándome en cada paso que damos, y por tus apreciaciones científicas compartidas. A todos los amigos que han sido parte de mi vida les agradezco por sus palabras de ánimo a seguir adelante. Gracias a todos ustedes por su invaluable contribución moral en mi vida y el impacto de ello en mi forma de ser, es por todos los valores que me han entregado que hoy soy la persona que soy.

INFORMACIÓN DEL LABORATORIO Y/O CENTRO DE INVESTIGACIÓN

Este trabajo fue realizado bajo la tutela de la Dra. Paola Murgas quien dirige el Laboratorio de Inmunología en el Centro de Biología Integrativa (CIB), en co-tutoría con el Dr. Cristian Cortez Plaza quien dirige el Laboratorio de Interacciones patógeno-hospedero del Centro de Genómica y Bioinformática (CGB), ambos centros están ubicados en las dependencias de la Facultad de Ciencias de la Universidad Mayor.

En el CIB se trabaja desde un enfoque integrativo para entender el desarrollo de organizaciones complejas y funcionales en sistemas vivos tanto en salud como en enfermedad. Así mismo, se utiliza equipamiento de manera colaborativa para el desarrollo de diferentes aproximaciones experimentales y sus respectivos niveles de análisis, desde el comportamiento animal a técnicas ómicas basadas en sistemas celulares y modelos animales como moscas (*Drosophila*), peces (*Danio rerio*) y ratones (*Mus musculus*) (1).

El CGB es el primer centro de investigación de este tipo en Chile y se estableció en 2010 con el objetivo de abordar desafíos claves en ciencia, tecnología e innovación. Se trabaja de manera asociativa y sinérgica con organizaciones de investigación chilenas e internacionales integrando las últimas tecnologías disponibles con técnicas de alto rendimiento, utilizando la bioinformática e informática como herramienta principal en el diseño y análisis de los proyectos de investigación para generar investigación interdisciplinaria fundamental y aplicada de alto impacto, además de brindar servicios de consultoría en genómica y bioinformática a una amplia gama de instituciones públicas y privadas en Chile y en el extranjero (2).

La fuente de financiamiento para el desarrollo de esta tesis se obtuvo a partir del proyecto FONDECYT de Iniciación 11190258 adjudicado por el laboratorio de Inmunología.

ABREVIATURAS

ACC: Acetil-CoA carboxilasa	KO: <i>Knock Out</i>
ACL: ATP-citrato liasa	LDL: Lipoproteínas de baja densidad
AGL: Ácidos grasos libres	MGL: Lipasa de monoacilglicerol
AGPAT: Acilglicerol-3-fosfato aciltransferasa	mtADN: ADN mitocondrial
ATGL: Lipasa de triglicérido adiposo	NAFLD: Enfermedad del hígado graso no alcohólico
cGAMP: 2'3' GMP– AMP cíclico	NASH: Esteatohepatitis no alcohólica
cGAS: GMP-AMP sintasa cíclica	NFKB: Factor nuclear kappa B
CE: Colesterol esterificado	NKT: Linfocitos T asesinos naturales
CL: Colesterol libre	OMS: Organización Mundial de la Salud
CTT: Extremo C-terminal	PAMP: Patrón Molecular Asociado a Patógenos
DAG: Diacilglicerol(es)	PAP2: Fosfohidrolasa
DAMP: Patrón Molecular Asociado a Daño	PEPCK: Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa
DE: Expresión diferencial	QM: Quilomicrones
DGAT: Diacilglicerol aciltransferasa	QMR: Remanentes de quilomicrones
DNL: Lipogénesis <i>de novo</i>	RE: Retículo endoplasmático
dsADN: ADN de doble hebra	RER: Retículo endoplasmático rugoso
EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético	SAT: Tejido adiposo subcutáneo
ERGIC: Compartimiento intermediario Retículo endoplasmático-Golgi	SREBP2-SCAP: Proteína de unión al elemento regulador de esteroides (SBRE)- proteína activadora de la escisión de SREBP
FAS: Ácido graso sintasa	STING: Proteína estimuladora de Genes de Interferón
FEV: Fracción vascular estromal	STINGKO: <i>Knock Out</i> para Sting
FL: Fosfolípidos	TA: Tejido adiposo
GMCSF: Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos	TAG: Triacilglicerol(es)
GPAT: Glicerol-3-fosfato aciltransferasa	TBK1: Quinasa de unión a TANK 1
HDL: Lipoproteínas de alta densidad	TG: Triglicéridos
Hmgcr: 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa	Th2: Linfocito colaborador 2
Hmgcs: 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA sintasa 1	TNF- α : Factor de necrosis tumoral alfa
HSL: Lipasa sensible a hormonas	UCP-1: Proteína desacopladora 1
IDL: Lipoproteínas de densidad intermedia	VAT: Tejido adiposo visceral
IFN I: Interferón(es) tipo I	VLDL: Lipoproteínas de muy baja densidad
IFN β : Interferón beta	VLDLR: Remanentes de lipoproteínas de muy baja densidad
IKK: Inhibidor del factor nuclear kappa B	WT: <i>Wild Type</i>
IL: Interleuquina (1,4,5,6,10,11,13)	
IMC: Índice de masa corporal	
IRF3: Factor regulador de Interferón 3	

i. ÍNDICE DE CONTENIDOS

1. INTRODUCCIÓN	14
1.1 Obesidad: un problema de salud pública a nivel mundial.....	14
1.2 Definición y clasificación de la obesidad.....	17
1.3 Aspectos celulares y moleculares de la obesidad.....	18
1.3.1 Fisiología de la obesidad y del metabolismo lipídico.....	19
1.3.2 Descripción, localización anatómica y función del tejido adiposo.....	22
1.3.3 Composición celular del tejido adiposo.....	23
1.3.4 Descripción y localización anatómica del hígado.....	25
1.3.5 Composición celular del hígado.....	27
1.3.6 Cambios que ocurren en el tejido adiposo y el hígado en la obesidad.....	28
1.3.7 Asociación entre obesidad e inmunidad, tratamientos y nuevas perspectivas.....	31
1.4 Vía de señalización de STING.....	32
1.4.1 Expresión de la vía de señalización de STING en tejidos y tipos celulares.....	32
1.4.2 Función canónica de la señalización de STING.....	32
1.4.3 Vía de señalización de STING en metabolismo y obesidad.....	35
1.5 Resumen de los antecedentes.....	36
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	37
3. MATERIAL Y MÉTODOS	38
3.1 Materiales.....	38
3.2 Ratones (<i>Mus musculus</i>) de experimentación.....	38
3.3 Análisis del peso corporal e ingesta de alimento.....	39
3.4 Ensayos de conducta sedentaria y fuerza animal.....	40
3.4.1 Prueba de Campo Abierto (<i>Open Field test</i>).....	40
3.4.2 Prueba de Suspensión en alambre (<i>Hanging test</i>).....	40
3.5 Histología de tejido hepático.....	40
3.6 Análisis del peso y tamaño de tejido adiposo abdominal.....	42
3.7 Medición de parámetros bioquímicos: glucosa, triglicéridos y colesterol sanguíneos.....	42
3.7.1 Medición de glucosa (hemogluco test).....	42
3.7.2 Medición de colesterol y triglicéridos sanguíneos.....	42
3.8 Construcción de redes de interacción <i>in silico</i>	43
3.9 Análisis de anotación funcional	43

3.10	Análisis in silico de la expresión diferencial de genes de la vía de señalización de STING.....	43
3.10.1	Obtención de datasets de experimentos de RNA-Seq.....	43
3.10.2	Análisis de datasets de RNA-Seq.....	44
3.11	Análisis estadístico y construcción de gráficos.....	45
4.	PRESENTACIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS	46
4.1	Diferencias de peso corporal entre ratones WT y STINGKO a diferentes edades.....	46
4.2	Seguimiento de peso corporal y consumo de alimento de ratones WT y STINGKO a diferentes edades.....	47
4.3	Open Field Test: distancias recorridas por ratones WT y STINGKO a diferentes edades.....	48
4.4	Hanging test: rendimiento y latencia a caer de ratones WT y STINGKO a diferentes edades.....	49
4.5	Análisis del peso y tamaño del tejido adiposo abdominal de ratones WT y STINGKO a diferentes edades.....	50
4.6	Histología de tejido hepático de ratones WT y STINGKO a diferentes edades.....	51
4.7	Medición de parámetros bioquímicos: glucosa, triglicéridos y colesterol sanguíneos.....	52
4.8	Interacciones predictivas entre STING y proteínas relacionadas con el metabolismo lipídico.....	54
4.9	Niveles de expresión de STING por tipos celulares del tejido adiposo.....	56
4.10	Análisis de expresión diferencial: tejido adiposo de ratones con obesidad inducida por dieta.....	56
4.11	Análisis de expresión diferencial: tejido adiposo de ratones envejecidos.....	57
4.12	Análisis de expresión diferencial: tejido hepático de ratones envejecidos.....	57
5.	DISCUSIÓN	61
6.	CONCLUSIONES	68
7.	IMPLICANCIAS, RECOMENDACIONES Y/O PROYECCIONES FUTURAS	69
8.	REFERENCIAS	72
9.	ANEXOS/MATERIAL SUPLEMENTARIO	85

ii. ÍNDICE DE TABLAS

1. Tabla 1. Listado de los materiales usados en la presente tesis.....	38
2. Tabla 2. Grupos experimentales de ratones WT y STINGKO.....	39
3. Tabla 3. Listado de los genes utilizados en análisis de redes de interacción, análisis de anotación funcional y la búsqueda de expresión diferencial.....	43

SOLO USO ACADÉMICO

iii. ÍNDICE DE FIGURAS

1. Figura 1. Proporción de adultos obesos a nivel mundial.....	15
2. Figura 2. Distribución del estado nutricional total de la población chilena y por sexo.....	15
3. Figura 3. Distribución del estado nutricional total de la población chilena por edades.....	16
4. Figura 4. Clasificación de sobrepeso y obesidad según los criterios de IMC.....	18
5. Figura 5. Representación esquemática de las vías lipolíticas y lipogénicas.....	21
6. Figura 6. Localización del tejido adiposo en las especies murino y humanos.....	23
7. Figura 7. Ilustración representativa de la estructura celular del tejido adiposo.....	25
8. Figura 8. Comparación esquemática de la anatomía macroscópica del hígado en ratón y humano..	26
9. Figura 9. Estructura macromolecular del hígado.....	27
10. Figura 10. Cambios inducidos por la obesidad en el tejido adiposo.....	29
11. Figura 11. Cambios inducidos por la obesidad en el hígado.....	30
12. Figura 12. Vía de detección de DNA citosólico con la activación río debajo de STING.....	34
13. Figura 13. Esquema de las pruebas de suspensión y de Campo Abierto.....	41
14. Figura 14. Esquema explicativo del análisis utilizado para la evaluación de la inclusión de grasa en tejido hepático.....	42
15. Figura 15. Flujo del trabajo computacional realizado para análisis de expresión diferencial de genes de datasets de experimentos de RNA-Seq.....	45
16. Figura 16. Los ratones WT presentaron menor peso corporal que los KO en todas las edades evaluadas.....	46
17. Figura 17. La diferencia de peso observada entre los ratones STINGKO y WT no está asociada a una mayor ingesta de alimento.....	47
18. Figura 18. Los ratones WT y STINGKO no presentaron diferencias en su capacidad de moverse indicando que estos últimos no tendrían conductas sedentarias.....	48
19. Figura 19. Los ratones WT demostraron mayor fuerza y menor fatiga que los STINGKO a todas las edades evaluadas.....	49
20. Figura 20. Los ratones WT exhibieron una menor área de tejido adiposo que los STINGKO.....	50
21. Figura 21. Los ratones STINGKO a diferencia de los WT acumulan grasa en el tejido hepático a edades adultas y envejecidas.....	51
22. Figura 22. Los ratones STINGKO presentaron un incremento en la concentración circulante de colesterol y triglicéridos durante todas las etapas de su vida.....	53

23. Figura 23. Red de interacción de genes que codifican para las proteínas que participan en la vía de señalización de STING y en el metabolismo de los lípidos.....	55
24. Figura 24. El gen Tmem173 se expresa mayormente en células de la Fracción Estromal Vascular en comparación con adipocitos.....	56
25. Figura 25. El gen Tmem173 se encuentra menormente expresado tejido adiposo de ratones con obesidad inducida por dieta.....	58
26. Figura 26. El gen Tmem173 se encuentra menormente expresado en el tejido adiposo de ratones envejecidos.....	59
27. Figura 27. El gen Tmem173 tiene una expresión reducida en tejido hepático de ratones envejecidos.....	60
28. Figura 28. Modelo propuesto de las interacciones entre STING y las enzimas del metabolismo lipídico.....	67
29. Figura 29. Esquema del desarrollo de un futuro kit de detección de STING.....	71

SOLO USO ACADÉMICO

iv. RESUMEN

La obesidad es un problema sanitario del siglo XXI y que desde el año 1975 se ha triplicado en términos de prevalencia a nivel mundial, alcanzando proporciones pandémicas. La obesidad se caracteriza por una acumulación anormal de grasa en el tejido adiposo y hepático que se traduce como un aumento en el peso corporal, cambiando la dinámica celular y molecular del organismo, lo que puede llegar a perjudicar la salud.

La regulación metabólica y el sistema inmunológico preservan la homeostasis de un individuo a través de un vínculo integral de conversaciones dinámicas y coordinadas en los organismos animales. En este contexto, la vía de señalización de STING (*Stimulator of Interferon Genes*), se ha vinculado a esta regulación metabólica. STING es un mediador clave que desencadena respuestas inflamatorias contra el ADN de doble hebra citosólico potencialmente patogénico o propio, al inducir la secreción de interferones tipo I y citocinas proinflamatorias. Existen escasos reportes que indican que STING estaría participando en el metabolismo, sin embargo, no se han dilucidado los mecanismos a través de los cuales esto estaría sucediendo. Por lo tanto, se planteó como objetivo investigar la participación de la vía de STING en el metabolismo lipídico utilizando ratones C57BL6J (WT) y STINGKO a diferentes edades. Se analizó su peso y consumo de alimento junto con pruebas de comportamiento, así como también, parámetros bioquímicos tales como triglicéridos, colesterol y glucosa.

Los resultados evidenciaron un aumento significativo de peso corporal en ratones STINGKO en todas las edades analizadas, no obstante, no estuvo asociado a una mayor ingesta de alimento ni a la falta de actividad física, pero sí estuvo acompañado de una menor fuerza global y aumento de la fatiga en todas las edades medidas. Se comprobó una mayor acumulación de grasa en el hígado y tejido adiposo en ratones STINGKO, acompañados por niveles de colesterol y triglicéridos altos, en comparación con los WT en todas las edades evaluadas. No se observaron diferencias en los niveles de glucosa. En paralelo, fue posible encontrar potenciales relaciones entre STING y enzimas del metabolismo lipídico, y se determinó que la expresión de Tmem173 (STING) se regula a la baja (*down-regulated*) en condiciones de obesidad y a mayor edad. Así mismo, se determinó qué tipo celular aporta mayores niveles de STING en el tejido adiposo de ratón.

Por tanto, estos resultados sugieren que STING participa en la regulación del almacenamiento de las grasas. Y se propone un modelo en el cual STING estaría interactuando con complejos enzimáticos involucrados en la síntesis y transporte de lípidos.

v. SUMMARY

Obesity is a health problem of the 21st century, and since 1975 it has tripled in terms of prevalence worldwide, reaching pandemic proportions. It is characterized by an abnormal accumulation of fat in adipose and hepatic tissue that increases body weight, changing the cellular and molecular dynamics of the organism, which can be detrimental to health.

Metabolic regulation and the immune system preserve an individual's homeostasis through a comprehensive link of coordinated and dynamic crosstalk in animal organisms. In this context, the STING (Stimulator of Interferon Genes) signaling pathway has been linked to this metabolic regulation. STING is a key mediator that elicits inflammatory responses against self or potentially pathogenic cytosolic double-stranded DNA by inducing the secretion of Type I Interferons and pro-inflammatory cytokines. There are few reports that indicate that STING is participating in metabolism, however, the mechanisms through which this would be happening have not been elucidated. Therefore, we aimed to investigate the participation of the STING pathway in lipid metabolism using C57BL6J (WT) and STINGKO mice at different ages. Their weight and food intake were analyzed along with behavioral tests and biochemical parameters such as triglycerides, cholesterol, and glucose.

The results showed a significant increase in body weight in STINGKO mice at all ages analyzed; however, it was not associated with a higher food intake or lack of physical activity, but it was accompanied by an impaired overall strength and an increase in fatigue at all ages measured. In addition, a more significant accumulation of fat in the liver and adipose tissue was found in STINGKO mice, accompanied by high cholesterol and triglyceride levels, compared to WT at all ages. However, there were no differences in glucose levels. In parallel, it was possible to find potential relationships between STING and lipid metabolism enzymes. It was determined that *Tmem73* (STING) was downregulated in conditions of obesity and older age. Likewise, it was determined which cell type provides higher levels of STING in mouse adipose tissue.

Thus, these results suggest that STING participates in the regulation of fat storage. A model is proposed in which STING would be interacting with enzyme complexes involved in the synthesis and transport of lipids.

1. INTRODUCCIÓN

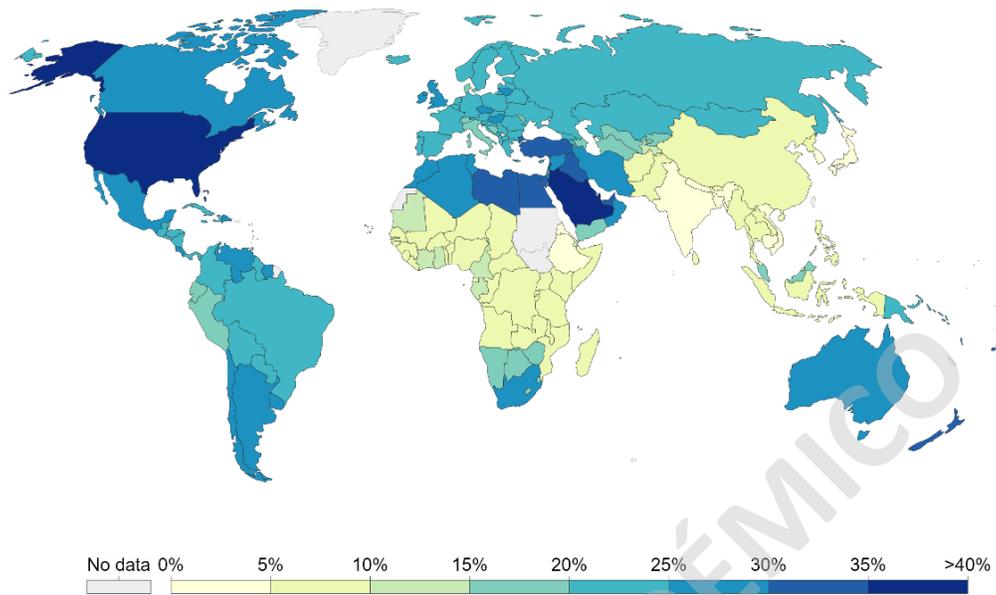
1.1 La obesidad: un problema de salud pública a nivel mundial

La obesidad es uno de los problemas sanitarios más importantes del siglo XXI; entre los años 1975 y 2016 la prevalencia de esta enfermedad casi se triplicó alcanzando proporciones pandémicas (3–5). Esta condición médica es definida por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como una acumulación anormal o excesiva de grasa provocando un aumento en el peso corporal, reflejado en un índice de masa corporal (IMC) $>30 \text{ kg/m}^2$ (ver definición más adelante), que puede ser perjudicial para la salud (3,6–9). Esto último debido a que la obesidad genera propensión a padecer otras comorbilidades como la diabetes de tipo II, resistencia a la insulina, enfermedad de hígado graso no alcohólico, hiperlipidemia, hipertensión, arterosclerosis, enfermedades cardiovasculares y ciertos tipos de cáncer entre otras (5,8–10).

Esta enfermedad afecta principalmente a adultos. Durante el año 2016 se documentó que el 39% o (1900 millones) de personas adultas de 18 o más años tenían sobrepeso y que el 13% o (600 millones) de adultos eran obesos (3,11). Sin embargo, la OMS también ha reportado cifras alarmantes acerca de la obesidad infanto-juvenil, ya que, la prevalencia de esta enfermedad en niños y adolescentes (5-19 años) ha aumentado drásticamente. Durante el año 1975 se reportó que sólo un 4% de los niños y adolescentes eran obesos y ya para el año 2016 esta cifra aumentó a un poco más del 18% (3). Durante el 2016 el 6% de las niñas y el 8% de los niños eran obesos (más de 124 millones de niños y adolescentes). Originalmente la prevalencia de esta enfermedad era predominante en los países de mayor ingreso económico, sin embargo, en la actualidad la obesidad ha pasado a ser un problema que abarca a todos los países del mundo, sin distinguir los niveles de ingresos (Figura 1) (4,5,12).

En Chile, durante el año 2012, se estimó que existían aproximadamente 4 millones de personas obesas en el país, ubicándose en la primera posición del ranking de obesidad en Latinoamérica. En nuestro país, se demostró que la obesidad representa la sexta causa de muerte a nivel nacional y la segunda causa de años de vida perdidos por muerte o por discapacidad prematura (13–16). Según la Encuesta Nacional de Salud realizada entre los años 2016 y 2017 se reportó que en Chile hay una mayor prevalencia de la obesidad en mujeres (33,7%) que hombres (28,6%) (Figura 2). Se determinó que casi el 40% de los encuestados tenían sobrepeso y cerca del 31% padecía de obesidad (Figura 2). El sobrepeso se mantuvo cerca del 40% del total de encuestados, mientras que la obesidad se mantuvo alrededor del 35% del total de encuestados, a partir de los 30 años en adelante (Figura 3)(17).

Proporción de adultos obesos a nivel mundial (2016)



Source: WHO, Global Health Observatory

OurWorldInData.org/obesity • CC BY

Figura 1. Proporción de adultos obesos a nivel mundial. En amarillo y verde claro aparecen los países con índices de obesidad entre 0 y 15%. En verde agua, celeste y azul claro están los países con índices entre 15 y 30%, dejando en azul oscuro a los países con porcentajes de obesidad mayores a 30 y 40. La prevalencia de esta enfermedad tiende a ser mayor a 30% en Europa, América del Norte, Oceanía y algunos países de Latinoamérica. La prevalencia de la obesidad es alrededor de 20 y 25% en países de Latinoamérica y el norte de Asia. Mientras que en el sur de Asia y África subsahariana hay proporciones de entre 0 y 10%, como en India (3,9%). Modificado de Ritchie H, Roser M. Causas de muerte: nuestro mundo en datos (2018).

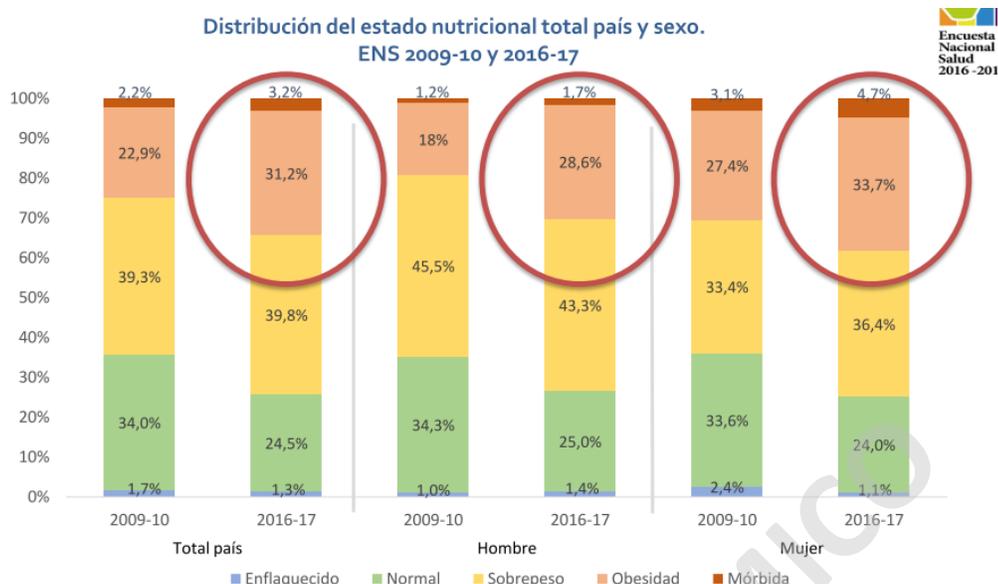


Figura 2. Distribución del estado nutricional total de la población chilena y por sexo. Porcentajes de estado nutricional de acuerdo con los valores establecidos de IMC para la población encuestada, según total país (hombres y mujeres) y sexo. En azul se observan los porcentajes de enflaquecidos, en verde normal, en amarillo sobrepeso, naranja obesidad y rojo obesidad mórbida. En Chile, casi el 40% tenían sobrepeso y cerca del 31% tenían obesidad. Además, hay una mayor prevalencia de la obesidad en mujeres (33,7%) que en hombres (28,6%). Extraído de Subsecretaría de Salud Pública. Encuesta nacional de salud 2016-2017 Primeros resultados (2017).

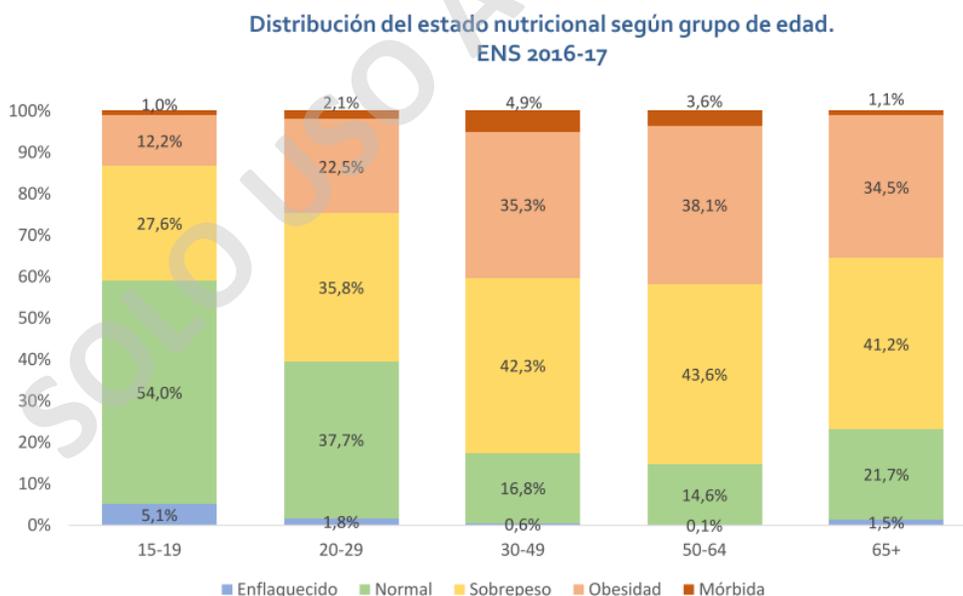


Figura 3. Distribución del estado nutricional total de la población chilena por edades. Porcentajes de estado nutricional de acuerdo con los valores establecidos de IMC para la población encuestada, según total país y edades. En azul se observan los porcentajes de enflaquecidos, en verde normal, en amarillo sobrepeso, naranja obesidad y rojo obesidad mórbida. En todos los rangos etarios se puede observar un porcentaje de sobrepeso y obesidad, es a partir de los 30 años que los porcentajes de sobrepeso se mantienen cerca del 40% total mientras que la obesidad se mantiene alrededor del 35%. Extraído de Subsecretaría de Salud Pública. Encuesta nacional de salud 2016-2017 Primeros resultados (2017)(17).

Como se ha comentado, la obesidad aumenta la probabilidad de generar comorbilidades, donde algunas de ellas, corresponden a las patologías principales causantes de muerte en el mundo (10,12). Durante el año 2017 se estimó que el 8% (4,7 millones de personas) de las muertes a nivel mundial, se generaron como resultado de esta patología, representando un aumento de 4,5% desde 1990 (12). Dicho en otras palabras, las muertes generadas por obesidad son cuatro veces más que el número de muertos en accidentes de tránsito y cerca de cinco veces más que el número de muertos por VIH/SIDA en 2017 (12). Es así que, la mayor parte de la población mundial vive en países donde el sobrepeso y la obesidad mata a más personas que el bajo peso o desnutrición (3). En Chile esta tendencia es similar, ya que, se estima que 1 de cada 11 muertes es atribuible al sobrepeso y la obesidad, falleciendo 1 persona cada una hora por esta enfermedad (17,18).

En síntesis, la obesidad es una de las causas de muerte prematura principal en el mundo y en nuestro país. Además, es una enfermedad que trae consigo pérdidas económicas sustanciales, estimadas en 147 mil millones de dólares en Estados Unidos durante el 2008 (10), considerando costos médicos de prevención, diagnóstico y tratamiento. La obesidad entonces corresponde a un alto y profundo impacto en la morbilidad, mortalidad y costos de atención médica asistencial convirtiéndola en una carga de salud pública (4,10,12,19)

1.2 Definición y clasificación de la obesidad

La literatura ha descrito la obesidad en términos generales como una acumulación anormal o excesiva de grasa. Sin embargo, actualmente se ha expandido aquella definición considerándola como un padecimiento sistémico, multiorgánico e inflamatorio crónico, de etiología multifactorial, y que se traduce como un exceso de grasa corporal manifestándose diferencialmente en cada persona y grupo social, pudiendo ser perjudicial para la salud (3,9,19,20). Esta patología se genera principalmente por un desequilibrio entre la energía ingerida como alimento y la gastada metabólicamente, es decir, una acumulación anormal o excesiva de energía ingerida en forma de grasa en el tejido adiposo (TA) e hígado, lo cual, está determinado por una combinación de factores fisiológicos, psicológicos, metabólicos, genéticos, socioeconómicos, culturales y emocionales (7,21).

Tal definición considera una perspectiva más clínica que anatómica, aunque sin dejar de tener en cuenta los indicadores antropométricos de riesgo. Uno de estos indicadores es el Índice de Masa Corporal (IMC), que funciona como un indicativo simple de la relación entre el peso y la talla en adultos (3,6) (Figura 4). El IMC se calcula dividiendo el peso de una persona en kilos por el cuadrado de su talla en metros ($IMC = \text{peso [kg]} / \text{altura [m]}^2$).

Según los procedimientos de diagnóstico estandarizados en adultos, el paciente cumple un perfil de sobrepeso si el IMC es $>25-29 \text{ kg/m}^2$ y con un perfil de obesidad si el IMC es $>30 \text{ kg/m}^2$. Un IMC superior a este valor implica una nueva clasificación, por nivel de obesidad (1-3) u otras denominaciones como obesidad severa, obesidad mórbida y súper obesidad (Figura 4). En pacientes menores a 5 años, el sobrepeso se considera como el peso para la estatura superior a 2 desviaciones estándar (DS) por encima de la mediana (Me) de los patrones de crecimiento infantil de la OMS; y la obesidad es el peso para la estatura superior a 3 DS por encima de la Me de los patrones de la OMS (3) (Figura 4). En pacientes entre 5 y 19 años el sobrepeso es el IMC para la edad superior a 1 DS por encima de la Me de referencia de crecimiento de la OMS; y la obesidad es superior a 2 DS por encima de la mediana de referencia de crecimiento de la OMS (3) (Figura 4). Para adultos mayores a 65 años no hay criterios universales, sin embargo, dado que en este grupo etario existe una reducción de la talla corporal, se han implementado distintos indicadores para definir sobrepeso y obesidad con rango de normalidad mayor que lo que ocurre en otras edades. En nuestro país, el Ministerio de Salud ha establecido un criterio de IMC normal $23,0-27,9 \text{ kg/m}^2$, por lo que cualquier valor sobre eso es clasificado como perfil de obesidad (13).

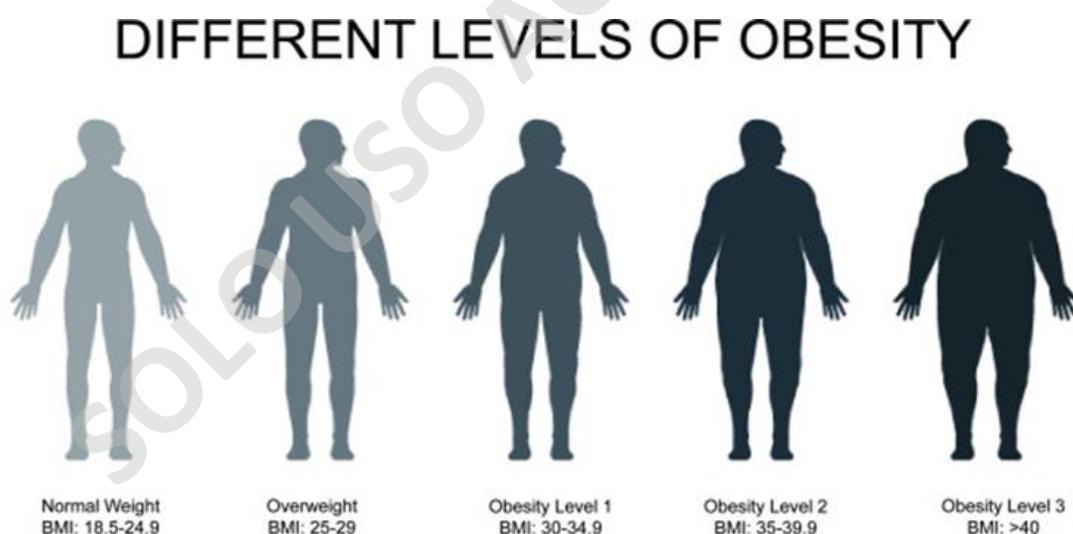


Figura 4. Clasificación de sobrepeso y obesidad según los criterios de IMC. Los procedimientos de diagnóstico estandarizados permiten clasificar a un paciente con los diferentes rangos de IMC definidos para sobrepeso y obesidad en edades infanto-juveniles, adultas y envejecidas. Es así como un paciente adulto con un IMC $>25-29 \text{ kg/m}^2$ es considerado con sobrepeso y si el IMC es $>30 \text{ kg/m}^2$ es considerado obeso. Esta clasificación es la más citada al referirse a pacientes obesos, ya que, dentro de este rango caen la mayoría de los pacientes diagnosticados con obesidad (3,6,13,22). Extraído de M. Higuera-Hernández y cols. Lucha contra la obesidad: intervenciones no farmacológicas (2018)(6).

1.3 Aspectos celulares y moleculares de la obesidad

El peso corporal y la obesidad están determinados por la interacción de factores genéticos, ambientales y psicosociales que actúan a través de varios mediadores fisiológicos en la ingesta de alimentos y el gasto energético, que afectan el almacenamiento de grasas (23). Esta interacción sucede bajo una regulación integral de los sistemas nervioso y endocrino, donde participan diferentes neuropéptidos, hormonas intestinales, entre otros, que mantienen la homeostasis del organismo al regular el metabolismo (24,25). Sin embargo, hay que considerar algunos factores que interfieren en esta regulación. Como es el caso del sedentarismo (tiempo destinado a estar sentado) y las conductas sedentarias, que han surgido como un factor de riesgo importante en el desarrollo de la obesidad y otras comorbilidades que acompañan a esta enfermedad (26)(27). Otro de los factores a considerar es la disfunción muscular global, la cual se ha reportado durante la última década estar íntimamente asociada con la obesidad en humanos y en modelos animales sometidos a dietas altas en grasa (28).

1.3.1 Fisiología de la obesidad y del metabolismo lipídico

El metabolismo se define ampliamente como la suma de reacciones químicas que tienen lugar dentro de cada célula de un organismo vivo y que proporcionan energía para procesos de síntesis de materia orgánica (29,30). Estas reacciones están mediadas por diversas enzimas con funciones especializadas en anabolismo (síntesis) y catabolismo (degradación), dispuestas en una secuencia definida a las que se conoce como vías metabólicas que convierten un precursor o compuesto de partida (sustrato), en un producto final particular y de esta forma mantienen el balance (30). Las vías metabólicas se encargan de la síntesis y degradación de carbohidratos, lípidos, proteínas, aminoácidos y vitaminas (30). Dicho esto, el metabolismo lipídico es aquel que mantiene un equilibrio dinámico entre los procesos de **lipogénesis** (formación de lípidos) y **lipólisis** (degradación de lípidos) (Figura 5). Ambos procesos ocurren principalmente en los órganos metabólicos como son el tejido adiposo e hígado, que desempeñan un papel activo en el equilibrio energético y son regulados por la nutrición y factores neuroendocrinos (19,31–33).

Los lípidos, son compuestos orgánicos que incluyen grasas, aceites, hormonas y ciertos componentes de las membranas celulares que se agrupan entre sí, dado que no interactúan con el agua (34). Se sintetizan dentro de las células (endógenos) o derivan de las grasas de la dieta (exógenos) (35). Son esenciales como sustratos para la producción de energía y síntesis de la mayoría de los lípidos, incluidos los lípidos de membrana y aquellos involucrados en la señalización celular (54).

Los principales lípidos del organismo son los triglicéridos (TG), el colesterol libre (CL), el colesterol esterificado (CE) y los fosfolípidos (FL) (55,56). El colesterol y los FL son constituyentes esenciales de todas las membranas celulares, y son necesarios para mantener la funcionalidad y supervivencia de las células. Además, el colesterol es precursor de hormonas esteroideas suprarrenales, testiculares y ováricas, así como de los ácidos biliares (56). Por otra parte, los FL forman parte de las lipoproteínas y las hacen más solubles. Los TG constituyen la reserva energética más importante del organismo, fundamental en periodos de ayuno para asegurar la supervivencia y es almacenada en el tejido adiposo (56). Al ser insolubles en agua, los lípidos se unen a apolipoproteínas para formar complejos lipoproteicos y así poder distribuirse por la circulación. Esto representa un medio de transporte y reservorio para los lípidos que no circulan unidos a la albúmina como CL, CE, TG y FL (55,56,59).

Se denomina **lipogénesis** a la síntesis *de novo* (DNL) de triglicéridos, a partir de glicerol y ácidos grasos. Es un proceso estrictamente regulado que ocurre principalmente en el tejido adiposo, pero también en el hígado, los músculos, el corazón y el páncreas (36). Se da lugar a una serie de reacciones tales como la colesterogénesis y la cetogénesis, mediante las cuales el acetil-CoA, producto intermediario del metabolismo de la glucosa, se convierte en ácidos grasos. (Figura 5). Una comunicación continua entre los tejidos oxidativos y los órganos periféricos, en particular el tejido adiposo, mantiene y controla la homeostasis energética. Por otra parte, la **lipólisis** es una vía catabólica que ocurre principalmente en el tejido adiposo promoviendo la movilización de combustible metabólico desde este a los tejidos periféricos en respuesta a las demandas de energía (36). A través de este proceso, se lleva a cabo la hidrólisis de los TG en ácidos grasos (AG) y glicerol (Figura 5); los ácidos grasos que provienen de los triacilglicéridos (TAG) almacenados en el tejido adiposo o de la circulación, entran a las células y son degradados por β -oxidación hasta Acetil-CoA en las mitocondrias de los tejidos para ser utilizados por el resto del organismo como combustible mayoritariamente en el músculo. Posteriormente, se pueden generar cuerpos cetónicos desde el acetil-CoA (30,36,37).

Así pues, la alteración del metabolismo lipídico da paso a la manifestación de la obesidad, en el que la acumulación excesiva de lípidos puede provocar lipotoxicidad, disfunción celular y alteración de las vías metabólicas, ya sea, en el TA o en órganos periféricos como el hígado, corazón, páncreas y músculo (36). Esta patología se asocia con cambios que se describen como síndrome metabólico, y que ocurren para acomodarse al suministro excesivo de nutrientes (7,38,39). Este síndrome es caracterizado por obesidad abdominal, niveles reducidos de colesterol del tipo HDL, niveles elevados de TG, hipertensión y resistencia a la insulina (13,40).

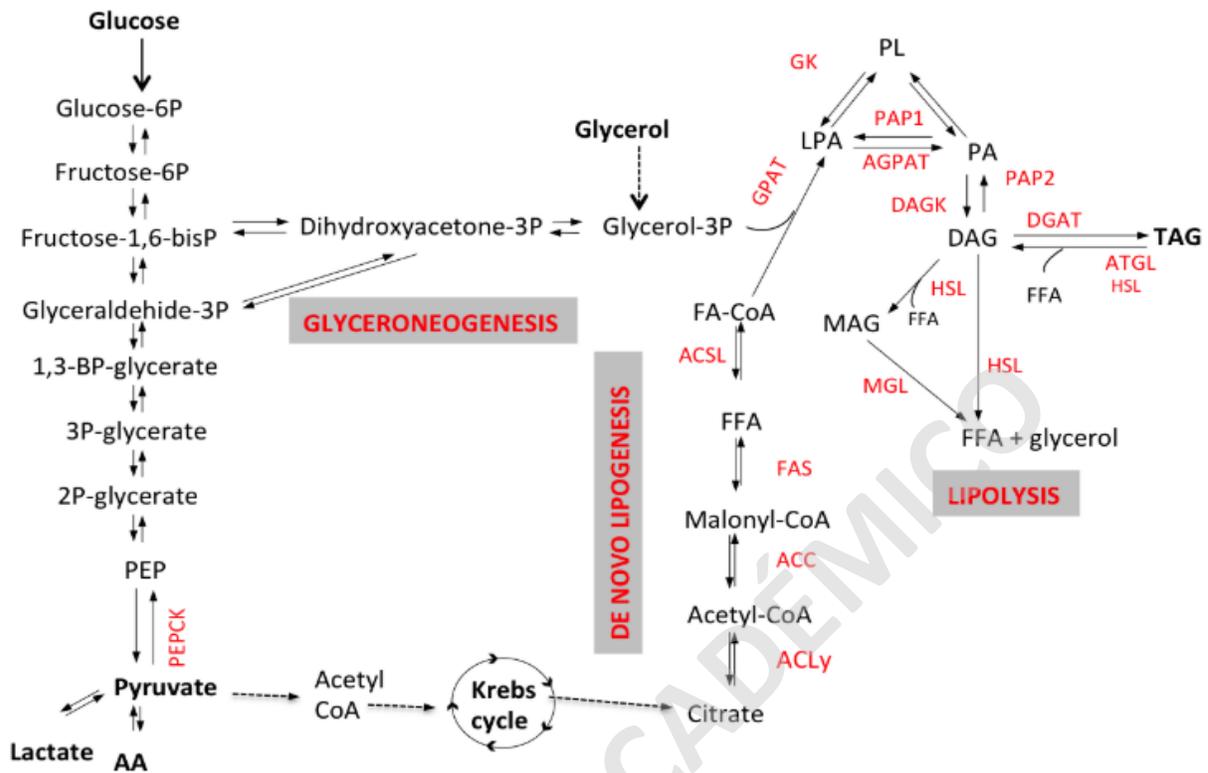


Figura 5. Representación esquemática de las vías lipolíticas y lipogénicas. La síntesis de triacilglicerol (TAG) requiere la activación de ácidos grasos libres (AGL) en Acil-CoA por la enzima Acil-CoA sintetasa. AGL-CoA y G3P se transforman en ácido fosfatídico (PA) mediante acilación por la glicerol-3-fosfato aciltransferasa (GPAT) y la AcilCoA acilglicerol-3-fosfato aciltransferasa (AGPAT). Luego de una desfosforilación por Fosfohidrolasa (PAP2), se forman diacilgliceroles (DAG). La diacilglicerol aciltransferasa (DGAT) cataliza la conversión de DAG en TAG. En el adipocito, la G3P puede provenir de la glucólisis o sustratos sin carbohidratos a través de la enzima fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK), en la gliceroneogénesis. En el hígado, la G3P también se puede sintetizar a partir de glicerol plasmático. La DNL de AG se produce en el citoplasma celular donde el ácido cítrico se convierte en acetil-CoA mediante ATP-citrato liasa (ACL) y posteriormente en malonil-CoA por acetil-CoA carboxilasa (ACC). DNL ocurre principalmente en el hígado, aunque también puede ocurrir en el tejido adiposo con tasas bajas. Este proceso requiere las enzimas ACL, ACC y el complejo multienzimático de ácidos grasos sintasa (FAS). La G3P se puede sintetizar directamente a partir de sustratos que no contienen carbohidratos, como piruvato, lactato o aminoácidos en oxalacetato, que se convierte en G3P directamente a partir del fenol piruvato (PEP), por la PEPCK o mediante la síntesis de dihidroxiacetona (DHA). El catabolismo de TAG involucra varias lipasas, lipasa de triglicérido adiposo (ATGL), lipasa sensible a hormonas (HSL) y lipasa de monoacilglicerol (MGL) y produce la liberación de tres ácidos grasos libres (FFA) y una molécula de glicerol. Extraído de Chiara Saponaro y cols. El sutil equilibrio entre la lipólisis y la lipogénesis: un punto crítico en la homeostasis metabólica (2015)(36).

1.3.2 Descripción, localización anatómica y función del tejido adiposo

El tejido adiposo (TA) es un tipo de tejido conectivo especializado cuya función principal es la reserva de energía, la protección mecánica-física de los órganos y la secreción de ciertos péptidos y hormonas con acción endocrina, paracrina y autocrina (40–43). Dentro de este grupo de sustancias se tiene a la leptina y adiponectina, citocinas secretadas por los adipocitos, que son células especializadas en almacenar grasa, que regulan el peso corporal mediando la regulación del apetito. Estas células también liberan moléculas con funciones inmune como el Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- α), Interleuquina 1 y 6 (IL-1, IL-6), entre otras (43). El TA representa entre un 20-28% de la masa corporal de las personas sanas, dependiendo del sexo y del balance energético, pero puede llegar a representar hasta un 80% de la masa corporal de personas con obesidad (44).

Especies como los ratones y los seres humanos almacenan grasa en diferentes depósitos de TA dependiendo de la edad, sexo y estado nutricional (41,42). El TA se puede clasificar en tres tipos diferentes. El tejido 1) adiposo blanco es abundante, y los depósitos donde se localiza, son de manera subcutánea (SAT), alrededor de las vísceras (VAT), dentro de la región abdominal (VAT omental, mesentérico, epididimal) y alrededor de los ojos (45) (Figura 6). Es un tejido especializado en almacenar lípidos en forma de TG y liberar ácidos grasos libres (FFA), colesterol, fosfolípidos y otros, dependiendo de la dieta y de los requerimientos energéticos del organismo (44,46,47). El tejido 2) adiposo pardo o marrón (BAT) se localiza en depósitos interescapulares, supraclavicular y en la zona del cuello principalmente (45) (Figura 6). Su principal función es la termogénesis, proceso que regula la temperatura corporal de los recién nacidos y animales hibernantes en respuesta al frío. La principal proteína que participa en este proceso es la desacopladora UCP-1 o termogenina, localizada exclusivamente en la membrana interna de las mitocondrias del tejido adiposo marrón. Esta proteína transporta protones hacia el interior de la mitocondria y actúa desacoplando la síntesis de ATP del transporte electrónico, de esta manera se libera calor para generar un aumento de la temperatura de los tejidos cercanos, para prevenir la hipotermia y la acumulación de grasas (42,47). El último tipo de tejido adiposo 3) es el beige, que se localiza en la nuca, axilas y la región interescapular, sin embargo, una pequeña porción se encuentra en la grasa visceral (44,46,47) (Figura 6). El tejido adiposo beige es parecido al TA marrón, al estar involucrado también en la termogénesis, sin embargo, este proceso se activa en este tejido únicamente bajo estímulos asociados a la temperatura y no al gasto energético o utilización de las grasas almacenadas (44,47).

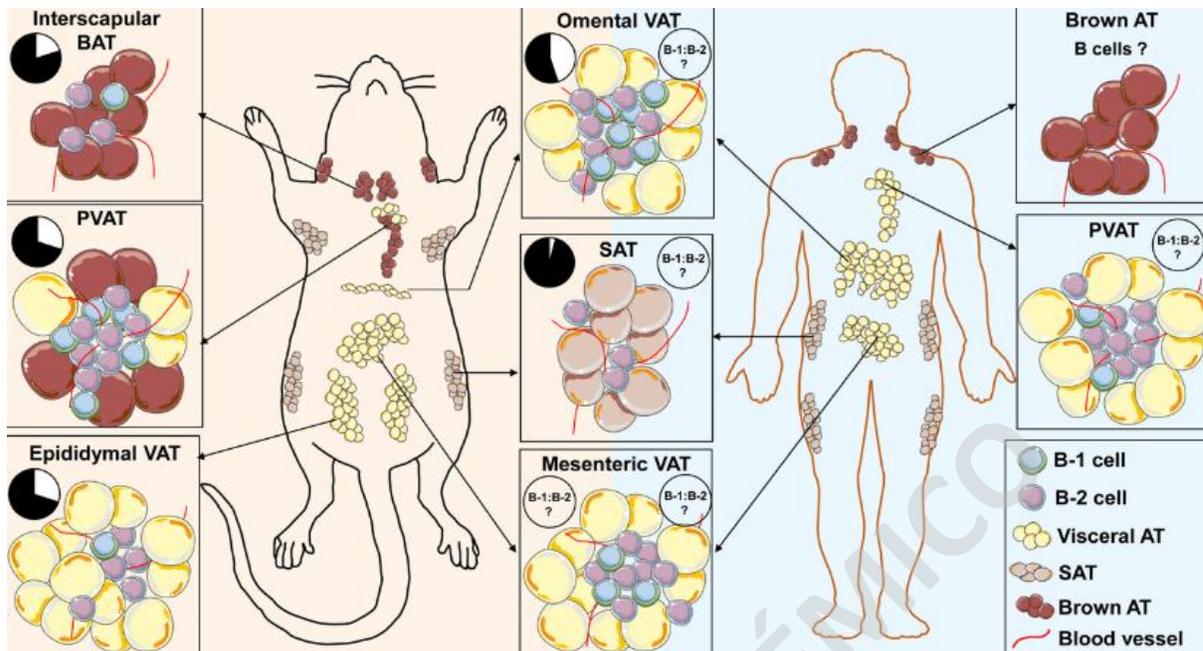


Figura 6. Localización del tejido adiposo en las especies murino y humanos: Tanto los ratones (izquierda) como los seres humanos (derecha) almacenan grasa en los distintos depósitos de grasa. El VAT omental y mesentérico, también el SAT comparten el mismo lugar anatómico en ambos organismos. En ratones, hay un VAT epididimal prominente, pero ausente en los humanos, también hay más adipocitos marrones en el tejido adiposo perivascular (PVAT) murino que en el humano y potencialmente menos células B-1 en omental y PVAT en humanos. En cuanto al tejido adiposo Interscapular, se compone de adipocitos marrones tanto en humano como en ratón. El tejido adiposo subcutáneo se compone principalmente por adipocitos blancos, pero también posee adipocitos beige. Los gráficos circulares representan la abundancia relativa de células B-1 (blancas) y células B-2 (negras) como porcentajes de células B totales en condición homeostática en ratones y humanos. Extraído de Prasad Srikakulapu y Coleen A. McNamara. Cruce de tejido adiposo y células vasculares e inmunes: implicaciones para la obesidad y las enfermedades vasculares (2020) (45).

1.3.3 Composición celular del tejido adiposo

Este tejido se compone de varias unidades estructurales que se clasifican en tres: 1) los adipocitos, células que representan la mayor proporción de este tejido, 2) la fracción estromal vascular (FEV) que confiere soporte a los adipocitos, y la fracción de 3) matriz extracelular, que otorga la vascularización e innervación al TA. En conjunto, estas unidades estructurales permiten la correcta funcionalidad de los procesos metabólicos e inmunitarios de un individuo (Figura 6 y 7) (47,48).

Adipocitos

Los adipocitos son células especializadas que funcionan como depósitos de lípidos, son las células más abundantes del TA, y se clasifican en tres tipos según el tipo de TA al que pertenezcan. El TA blanco se compone de 1) adipocitos blancos uniloculares, los principales efectores de los procesos de lipogénesis y lipólisis (44).

El TA marrón se compone por 2) adipocitos marrones multiloculares, con una gran cantidad de mitocondrias que le otorgan su coloración característica, se encargan de la producción de energía, la cual es disipada en forma de calor en el proceso de termogénesis (44). El TA beige lo componen los 3) adipocitos beige parecidos a los marrones, al ser células multiloculares y termogénicas. Estas células, responden a estímulos como el frío y algunas citocinas que inducen la termogénesis gracias al aumento de sus mitocondrias, similar a lo observado en adipocitos marrón (44,47).

Fracción Estromal Vascular (FEV)

El TA contiene la FEV (Figura 7), que incluye diversas células como los preadipocitos que son precursores del adipocito, altamente fagocíticos (47). Los fibroblastos ejercen funciones secretoras de colágeno, reparación de tejidos y cicatrización, migran a sitios dañados y secretan citocinas inflamatorias (IL-1, IL-6, TNF- α), antivirales (Interferones de tipo I (IFN-I)) y estimulantes de la producción celular (IL5: eosinófilos, IL11: plaquetas, factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF): granulocitos). Estas citocinas son un grupo de proteínas y glucoproteínas producidas por diversos tipos celulares, que regulan las respuestas inmunitaria e inflamatoria (47,49). Las células madre presentes en este tejido, dan origen a diferentes tipos de adipocitos y otras células, acorde con los estímulos locales o ambientales (47). Hay macrófagos que fagocitan, procesan y presentan antígenos, los cuales, presentan principalmente el fenotipo M2 (o antiinflamatorio) con secreción de IL-4, IL-5, IL-10 y IL-13 que favorecen la inmunidad humoral e inducen la producción de anticuerpos, y TGF- β , el cual también es inducido por otras células como linfocitos T asesinos naturales (NKT), linfocitos T CD4⁺CD25⁺ y eosinófilos. En conjunto tienen una función de protección frente a daños y posibles infecciones del tejido adiposo.

Matriz extracelular

Finalmente, el TA contiene a la matriz extracelular (Figura 7) que es producida tanto por adipocitos como por células estromales (células madre). Esta estructura también considerada como exoesqueleto del TA, consiste en una red de fibras reticulares finas y fibras nerviosas amielínicas que forman una canasta de colágeno peri-adipocito (42,50). Es una matriz altamente vascularizada conteniendo mastocitos, células endoteliales y pericitos en los vasos sanguíneos del tejido conectivo, las cuales generan láminas basales de proteínas y proteoglicanos cuya función es mantener a las células en su lugar respectivo, reduciendo las fuerzas externas para asegurar la estructura, proteger a la célula de rupturas mecánicas y mantener la funcionalidad del tejido adiposo (19,42,51).

Adipose Tissue

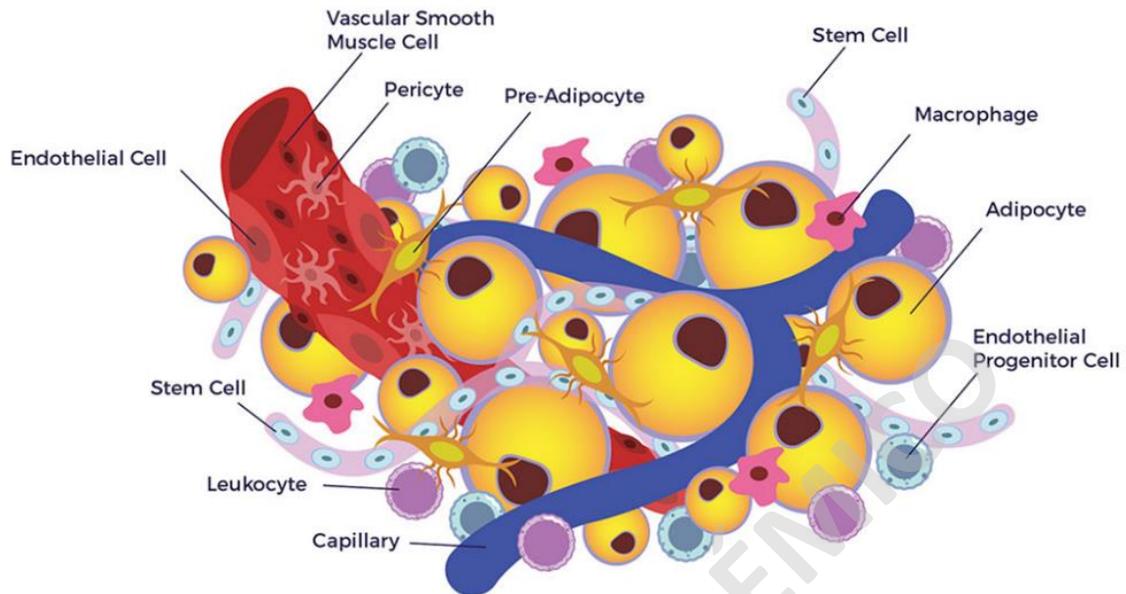


Figura 7. Ilustración representativa de la estructura celular del tejido adiposo. Las unidades estructurales del tejido adiposo se pueden separar en adipocitos (amarillos) células especializadas en almacenar lípidos. La FEV que incluye a los preadipocitos (células estrelladas), macrófagos (rosado), células madre (celeste), leucocitos (morado); y la matriz extracelular vascularizada (en azul) células progenitoras endoteliales (celeste), células endoteliales y pericitos (rojo). Las unidades estructurales de este tejido le otorgan su característica de tejido conectivo altamente vascularizado y de órgano endocrino activo y que permite el almacenamiento de grasas. Extraído de sitio web “*AMBROSE CELL THERAPY, Why adipose tissue?*”.

1.3.4 Descripción y localización anatómica del hígado

El hígado es un órgano dinámico, heterogéneo y conservado en todos los vertebrados, se encuentra bajo un control fisiológico altamente regulado para contribuir al metabolismo energético del organismo (52,53). Es una víscera maciza revestida por un tejido conjuntivo fibroso, organizado en unidades funcionales poligonales denominadas lóbulos hepáticos, los que están encerrados por una red altamente vascularizada. Se divide por surcos que forman cuatro lóbulos distintos cuyos patrones de distribución difieren entre las especies ratón y humano, sin embargo, la estructura funcional de estos está muy conservada en ambas especies (Figura 10) (54–56).

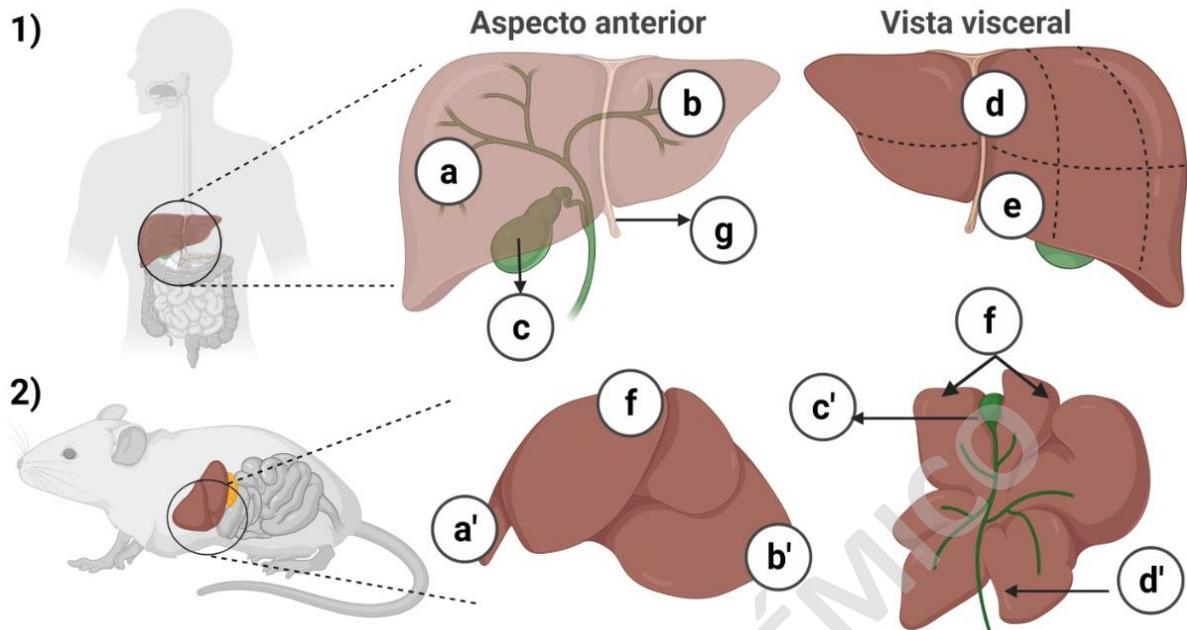


Figura 8. Comparación esquemática de la anatomía macroscópica del hígado en ratón y humano. En el esquema se visualiza la localización anatómica del hígado, como también el aspecto anterior y la vista visceral. **(1) Hígado humano:** es la glándula más grande del cuerpo humano con un peso aproximado de 1,5 kilogramos. Se localiza en el cuadrante abdominal superior derecho del abdomen cerca del estómago, los intestinos, la vesícula biliar y el páncreas. Se divide en cuatro lóbulos: derecho de mayor tamaño (a), izquierdo (b), caudado (d) y cuadrado, es marcado por varios ligamentos prominentes asociados a la superficie como el ligamento falciforme (g) que divide al lóbulo derecho e izquierdo. La vesícula biliar está presente en la superficie inferior del lóbulo hepático derecho (c). **(2) Hígado murino:** pesa entre 2 a 3 g (3 a 5% del peso corporal), ocupa toda la región sub-diafragmática, y también se divide en cuatro lóbulos: derecho hemisectado (a'), izquierdo de mayor tamaño (b'), mediano (f) y caudado (d'). La vesícula biliar del ratón sobresale por debajo del istmo central del lóbulo mediano (c'). Creado en Biorender por Catalina Guerra (2021).

El hígado realiza múltiples funciones de almacenamiento y regulación del volumen circulante de sangre, así como también se encarga de la filtración sinusoidal de partículas extrañas que pudiesen ingresar al hígado (53,56,57). Cumple funciones secretoras y excretoras como la formación de bilis (sustancia que permite la emulsión de las grasas consumidas en ácidos grasos), actúa como centro de desintoxicación para la biotransformación de xenobióticos, entre otras funciones. Esto último gracias a que este órgano, es el primero en entrar en contacto con los nutrientes y xenobióticos absorbidos por la vía enteral a través de la vena porta (53,57,58). Está involucrado en el metabolismo de los macronutrientes (proteínas, hidratos de carbono y otros) de acuerdo con las necesidades energéticas del organismo. También, otorga apoyo al sistema inmunológico, y por último participa en la homeostasis de los lípidos y el colesterol (53–55,59).

1.3.5 Composición celular del hígado

El parénquima hepático consta de cuatro tipos principales de células: 1) los hepatocitos, que son las células más abundantes, contienen un prominente aparato de Golgi y Retículo Endoplasmático Rugoso (RER), y gracias a ello llevan a cabo las funciones biosintéticas del hígado (57); los hepatocitos están separados por capilares sinusoidales que forman lobulillos organizados por una vena central, rodeada por las trabéculas de hepatocitos, acordonados por la triada portal (constituida por la arteria hepática, vena porta y conductos biliares) que permiten el riego sanguíneo del hígado (Figura 9)(55). 2) Las células endoteliales recubren los sinusoides, sirven como interfaz entre la sangre y los hepatocitos (57). 3) Las células de Kupffer (KC) son los macrófagos residentes del tejido hepático, reconocen a los estímulos patógenos introducidos a través de la circulación portal, incluso pueden realizar funciones pro o antiinflamatorias y participar en la cicatrización de heridas hepáticas y finalmente, 4) las células estrelladas que representan una población celular que pueden estar en estado inactivo o activado; en el estado inactivo se encargan de almacenar vitamina A en gotas de lípidos, y en el estado activado ayudan a la reparación del hígado lesionado hepático mediante deposición y organización de colágeno (53,57).

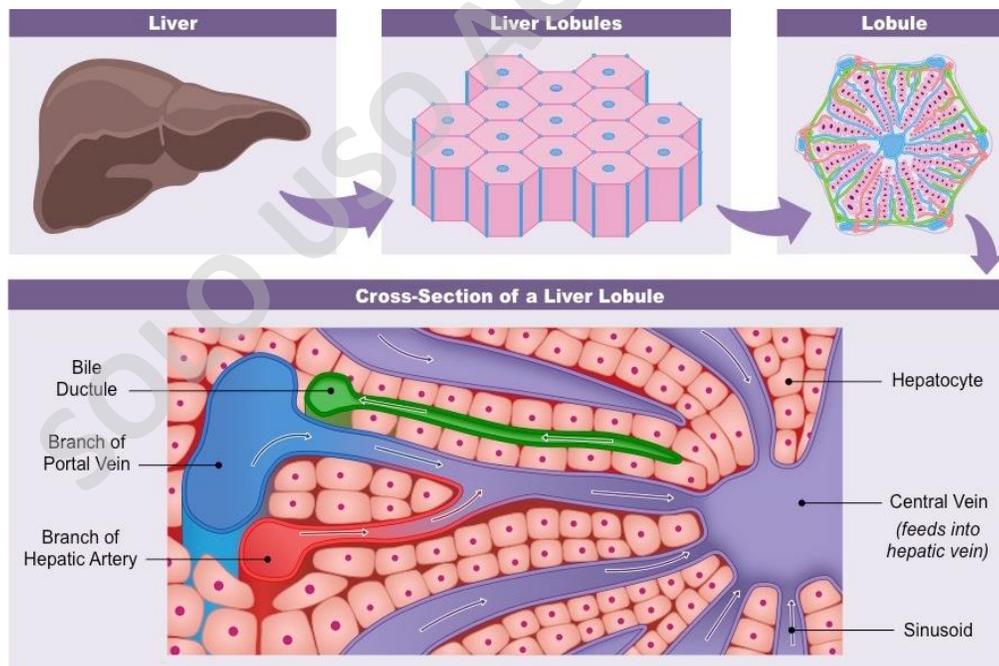


Figura 9. Estructura macromolecular del hígado. El tejido hepático está funcionalmente estructurado a nivel de órgano (superior izquierda) y en unidades o lóbulos hepáticos (medio y superior derecha). En el panel inferior se muestra una sección transversal de un lóbulo hepático, donde la sangre llega al hígado a través de la vena porta y la arteria hepática y luego fluye a través de la sinusoide hasta la vena central. El sinusoide hepático es la unidad funcional mínima del hígado donde se produce el intercambio entre la sangre y los hepatocitos a través del endotelio sinusoidal. Modificado de Mescher A.L Histología básica de Junqueira: texto y atlas. 2010 (60).

1.3.6 Cambios que ocurren en el tejido adiposo y el hígado en la obesidad

Ambos tejidos responden de forma distinta durante la obesidad, pero tienen la similitud de que las células metabólicas como los adipocitos y hepatocitos están estrechamente unidas a células inmunes como las Kupffer o los macrófagos residentes del TA principalmente (33).

1.3.6.a Tejido adiposo en obesidad

En la obesidad ocurre una expansión del TA provocada por un aumento en el número (hiperplasia) y tamaño (hipertrofia) de los adipocitos, así como también un incremento en los compartimentos inflamatorios y endoteliales de la FEV, con el fin de ajustarse al suministro y acumulación excesiva de nutrientes (9,13,25) (Figura 10). Durante esta patología se produce un estado de inflamación crónica de bajo grado, tanto en el tejido adiposo como en el hepático; el cual se inicia por una estimulación de la secreción de citoquinas proinflamatorias en respuesta a la sobre nutrición, seguida por los otros tipos de células constitutivas del tejido adiposo (61). Es decir, en el caso de las células inmune que forman parte de estos tejidos se observa una reducción en los macrófagos del fenotipo M2 o anti-inflamatorio (también considerado pro regenerativo) y aumenta la población de macrófagos proinflamatorios M1, activando vías de señalización intracelular de tipo proinflamatorias que provocan una disfunción del tejido adiposo, contribuyendo al estado inflamatorio crónico de bajo grado (en ausencia de patógenos) durante la obesidad (39,61,62). A su vez, se produce la liberación creciente de FFA desde los adipocitos hiperplásicos, aumentando la entrega de AG al hígado y a los tejidos periféricos (8,57).

Estos cambios en la composición del tejido adiposo generan un aumento en la secreción de leptina por parte de los adipocitos, la que suprime el apetito, activa la saciedad temprana, disminuye la resistencia a la insulina en condiciones habituales, e induce un aumento de citocinas inflamatorias (23,47,63). Al mismo tiempo, disminuye la secreción de adiponectina, citocina que regula a homeostasis de la glucosa y la oxidación de ácidos grasos, entre otros, y tiene potentes propiedades antiinflamatorias, antidiabéticas y antiaterogénica (40,47,63) (Figura 10).

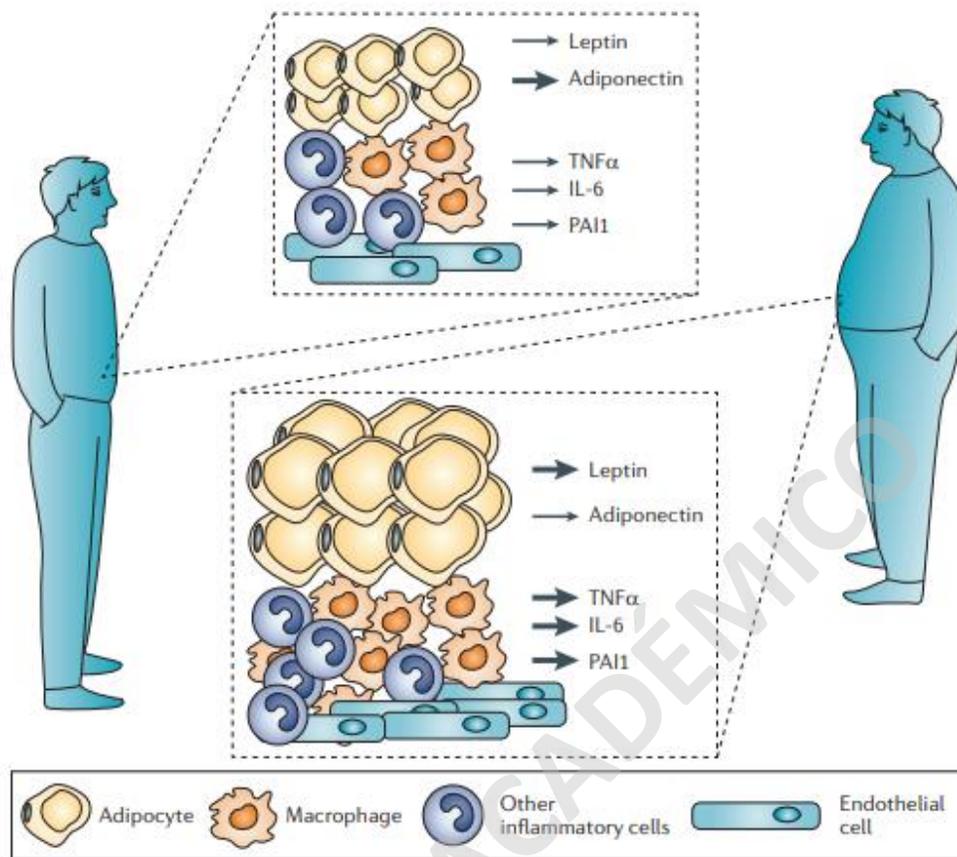


Figura 10. Cambios inducidos por la obesidad en el tejido adiposo. El tejido adiposo se puede fraccionar en adipocitos (amarillo) que contienen lípidos y en la fracción estroma vascular, que contiene preadipocitos, macrófagos (anaranjado), otras células inflamatorias (azul) y células endoteliales (celestes). En el estado obeso, hay un aumento en el tamaño y el número de adipocitos, así como en los compartimentos inflamatorios y endoteliales de la fracción estroma-vascular para ajustarse a los excesos de nutrientes y su almacenamiento. Este cambio en la composición del tejido adiposo da como resultado un aumento de la secreción de leptina y citocinas inflamatorias, con una disminución de la secreción de adiponectina. Extraído de Gökhan S. Hotamisligi Fundamentos del inmunometabolismo e implicaciones para la salud y la enfermedad metabólicas. (2006)(64).

1.3.6.b Hígado en obesidad

El hígado es un órgano esencialmente metabólico y, en pacientes con obesidad ocurren diversas alteraciones por un incremento de lípidos en este órgano (esteatosis) (Figura 11), que dan paso a mecanismos de daño y diferentes patologías (65). Las principales patologías hepáticas son la esteatosis hepática no alcohólica o también denominada enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD), esteatohepatitis no alcohólica (NASH) y la cirrosis hepática, siendo la NAFLD la más influenciada por la obesidad (8,37,65). Los mecanismos detrás de estas patologías se originan por la influencia del VAT, donde se acumula de manera excesiva la grasa, la cual es liberada en gran cantidad como AGL a la sangre, produciendo una llegada masiva de estos hacia el hígado a través de la vena porta (66).

Este incremento masivo de TG excede la capacidad metabólica de los hepatocitos, la cual resulta en una citotoxicidad causante de la muerte de estas células (lipotoxicidad) (8,37,65). Otros cambios que puede desencadenar la acumulación de TG es el desarrollo de fibrosis, donde hay un depósito progresivo en la matriz extracelular del parénquima hepático compuesto por los hepatocitos, células endoteliales, células estrelladas y células de Kupffer, alterando la arquitectura del tejido, produciendo una disfunción del órgano (33,67). A su vez, esto puede desencadenar una respuesta inflamatoria, la cual es mediada en gran parte por los macrófagos (KC), ya que, se ha demostrado que la acumulación lipotóxica por parte de los KC en el hígado con esteatosis conduce a un manejo desregulado de los lípidos y un aumento de la expresión de genes proinflamatorios (68). Paralelamente, el TNF- α secretado por el VAT pueden inducir los procesos de apoptosis e inflamación (37). Esto puede influir en la progresión de la patología a esteatohepatitis no alcohólica (NASH), fibrosis avanzada, cirrosis y carcinoma hepatocelular (69).

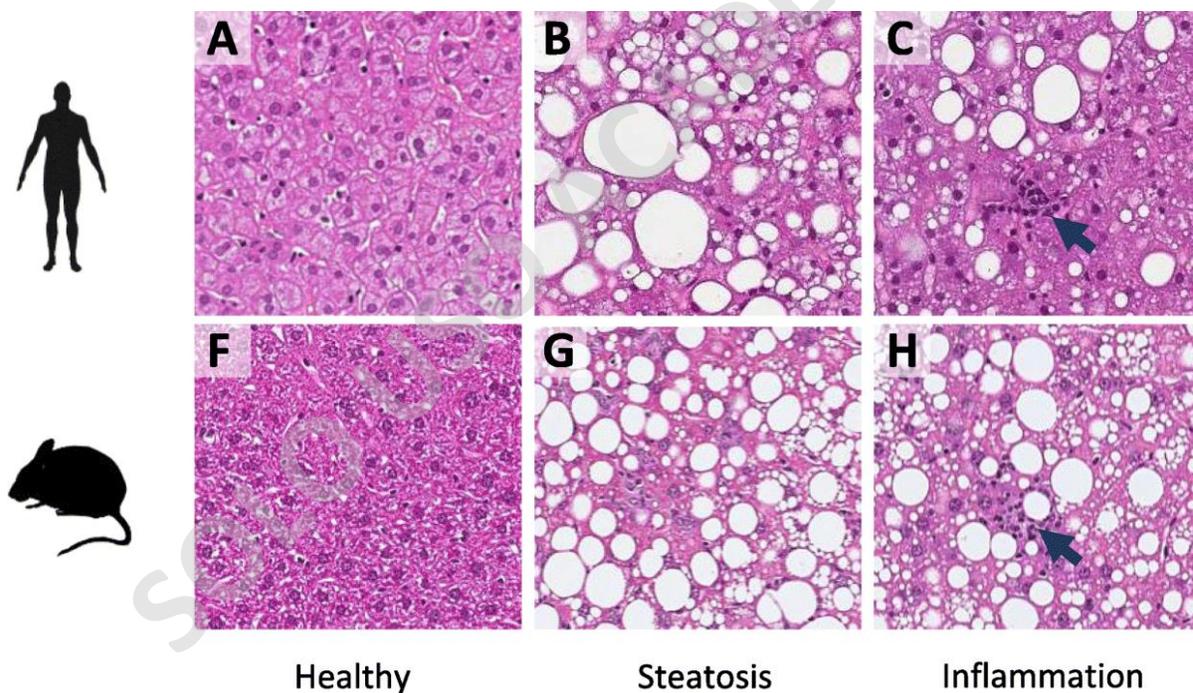


Figura 11. Cambios inducidos por la obesidad en el hígado. La obesidad influye en el desarrollo de enfermedades que afectan al hígado caracterizadas por un aumento del contenido lipídico en los hepatocitos (esteatosis) y por otra parte la inflamación del tejido hepático. Tanto el humano como el ratón presentan indicadores histopatológicos similares con respecto a estas dos alteraciones morfológicas. Los paneles muestran imágenes representativas de secciones de hígado de individuos sanos de peso normal (A y F) e individuos con NASH (B, C, G y H) teñidos con hematoxilina eosina (HE) para evaluación de esteatosis e inflamación. Los paneles superiores corresponden a muestras de humano y los paneles inferiores a muestras de ratón. Modificado de Henrik H. Hansen y cols. (2020). Traducibilidad humana del modelo de ratón obeso inducido por dieta GAN de esteatohepatitis no alcohólica (70).

1.3.7 Asociación entre obesidad e inmunidad, tratamientos y nuevas perspectivas

Ha surgido evidencia que asocia la regulación metabólica con el sistema inmunológico a través de conversaciones moleculares cruzadas y dinámicas para coordinar la preservación de la homeostasis en organismos metazoarios avanzados y la redistribución adecuada de la energía durante los desafíos inmunológicos (64,71). Es así que, se ha descrito que independiente que las células metabólicas y células inmunes residentes en los tejidos metabólicos ejercen funciones distintas, el soporte metabólico de un organismo tiene un papel importante en modificar la capacidad inmunitaria del organismo para combatir agresiones o daños celulares a través de la respuesta inflamatoria, favoreciendo o suprimiendo algunas vías de señalización (7). En otras palabras, una función inmune alterada contribuye en el desarrollo de la obesidad, así mismo la obesidad ha arrojado recuentos alterados de respuestas inmunitarias mediadas por células (71–73).

Si bien es cierto que se han descrito mecanismos moleculares, genéticos y fisiológicos que subyacen a la obesidad, y se han reportado vínculos entre el sistema inmune y la obesidad, los tratamientos actuales no se centran en esta relación, sino que se enfocan en la pérdida de peso mediante planes de alimentación saludable y actividad física regular, cambio de hábitos, medicamentos para bajar de peso, dispositivos para adelgazar, cirugía bariátrica y dietas especiales (74). Sin embargo, algunos pacientes no pueden perder suficiente peso para mejorar su salud o no pueden evitar recuperar el peso perdido por estos tratamientos. En tales casos, lo clásico es agregar tratamientos con medicamentos y/o dispositivos para bajar de peso o cirugía bariátrica, lo que trae consigo complicaciones para el paciente por los largos periodos de recuperación en el caso de la cirugía, los efectos “rebote” y los efectos secundarios que acarrearán los medicamentos que se utilizan (74).

En la actualidad, los tratamientos existentes han sido insuficientes para solucionar un problema pandémico como lo es la obesidad, por lo tanto, aproximaciones inmunológicas o intervenciones genéticas en las vías lipogénicas y lipolíticas suponen innovadores candidatos para terapias a futuro. Considerando que el sistema inmunológico tiene una estrecha relación con el metabolismo mediante la activación de vías de señalización inmune tanto en células inmune como metabólicas, se han alzado como nuevos candidatos para futuras terapias de enfermedades metabólicas, incluyendo la obesidad (75). En particular, la vía de señalización de STING que detecta el ADN de doble hebra (dsADN) citosólico ha surgido como un mediador clave en las respuestas inflamatorias de Interferones de tipo I y ha sido asociada con el metabolismo.

1.4 Vía de señalización de la proteína STING

Esta vía de señalización involucra a los efectores inmunes innatos mediando las respuestas inflamatorias de Interferones de tipo I en las células inmunitarias. Esto para defenderse de las infecciones virales y bacterianas (exógenas), o bien ADN propio mitocondrial o nuclear (endógenos) liberado hacia el citoplasma de células dañadas o senescentes, asegurando la preservación de la homeostasis del organismo (62,66–68).

1.4.1 Expresión de la vía de señalización de STING en tejidos y tipos celulares

Esta vía se expresa en una diversidad de tejidos, pero mayoritariamente en células del sistema inmune, ya que, participa de la respuesta inmunitaria en los procesos de infección, inflamación y cáncer. Sin embargo, se ha reportado estar expresada en una variedad de células no inmunes como los adipocitos, macrófagos residentes del tejido hepático (células de Kupffer), hepatocitos, queratinocitos y fibroblastos (71,76–78). STING es una proteína de transmembrana de tipo 1 ubicada en la membrana del retículo endoplásmico (RE) con su dominio funcional hacia el citosol. Es codificada por el gen Tmem173 localizado en la segunda banda del brazo largo del cromosoma 18 en ratón y en el brazo largo del cromosoma 5 en humanos. La proteína tiene una localización diferencial de acuerdo a condiciones no-patológicas y patológicas donde experimenta un tráfico subcelular desde el citoplasma hasta el núcleo, respectivamente (78–80).

1.4.2 Función canónica de la señalización de STING

Varias perturbaciones de la homeostasis celular pueden favorecer la acumulación de ADN citosólico, como son las infecciones virales o por procariotas intracelulares, aumento de la captación de ADN microambiental, fagocitosis de células muertas, daño al ADN mitocondrial (mtADN) o genómico potencialmente relacionado con la senescencia celular e inestabilidad cromosómica (81). En condiciones fisiológicas, las células de mamíferos degradan eficazmente el ADN citosólico mediante nucleasas como la exonucleasa 3 de reparación primaria 1 (TREX1) y la ribonucleasa H2 (RNasa H2) (81). El ADN citosólico es reconocido con mayor frecuencia por sensores especializados como es la GMP-AMP sintasa cíclica (cGAS) (Figura 12). Frente al dsADN esta sintasa lo detecta como un Patrón Molecular Asociado a Patógenos (PAMP), si es de origen exógeno potencialmente patogénico como los virus o bacterias. También detecta dsADN como un Patrón Molecular Asociado a Daño (DAMP) si es de origen endógeno como aquel proveniente de mitocondrias o núcleos dañados, o de células senescentes (81,82).

Luego, los dímeros de cGAS activo condensan ATP y GTP para sintetizar al segundo mensajero [G(2',5')pA(3',5')p] cíclico (cGAMP) (Figura 12). A este segundo mensajero se une la proteína transmembrana 173, también conocida como STING. Cuando STING está inactiva, su extremo C-terminal (CTT) la auto inhibe y se libera al momento esta unión con cGAMP, generando cambios conformacionales llevando a la liberación de sus CTT y a la polimerización de la misma proteína (80,81) (Figura 12). STING interactúa directamente con las moléculas Quinasa de unión a TANK 1 (TBK1), factor regulador de interferón 3 (IRF3) y factor nuclear kappa B (NF-kB) activando una cascada de respuestas inmunitarias que conducen a la resolución de la infección viral o a la eliminación de las células dañadas de forma canónica (79,80,83).

Una vez activada, STING se traslada en vesículas desde el RE hacia un compartimiento perinuclear intermedio llamado ERGIC (RE-Golgi), donde inicia el proceso de autofagia, que contribuye a la eliminación del ADN citosólico y los patógenos, en el caso de infecciones, o ADN citosólico y células dañadas y/o senescentes por otra parte (Figura 12). Durante el proceso de translocación STING recluta a TBK1, TBK1 se trans-autofosforila y luego fosforila a STING en su CTT. STING fosforilado recluta a IRF3 para su fosforilación por TBK1, quien homodimeriza y transloca al núcleo (80,83) (Figura 12). Luego, TBK1 fosforila al Inhibidor del factor nuclear kappa B (IKK). IKK fosforilado, libera a NF-kB (84). Estos factores transcripcionales activados se trasladarán al núcleo para inducir la expresión de varios genes inmunomoduladores, como la IL-6 e Interferón alfa y beta (IFN- α , IFN- β), permitiendo la activación de un estado anti patógeno y pro-inflamatorio (Figura 12). Después del proceso de translocación, STING se dirigirá al lisosoma para su degradación y así evitar la sobre inmunización (84) (Figura 12). Esta degradación es conducida por varias modificaciones post-transcripcionales de STING como la fosforilación por la serina/treonina quinasa similar a UNC-51 (ULK1) y TBK1, como también por la ubiquitinación ejecutada por la proteína de unión a ubiquitina p62 (85).

Esta vía de señalización ha sido bien estudiada por su participación en la detección de la localización subcelular anormal del ADN exógeno y su activación resulta en la protección del organismo frente a potenciales infecciones (83). Sin embargo, no solo provee de un estado anti patógeno, más bien, tiene una implicancia en la regulación de otros procesos fisiológicos que responden a la liberación de ADN genómico citosólico (85). Esto es, disfunción mitocondrial, estrés de retículo, senescencia celular, muerte celular programada, entre otros menos estudiados. Estos procesos llevan a la liberación de ADN genómico al citosol favoreciendo su acumulación, lo cual, contribuye a la senescencia celular y también la activación de esta vía de señalización en orden de mantener la homeostasis celular (85,86).

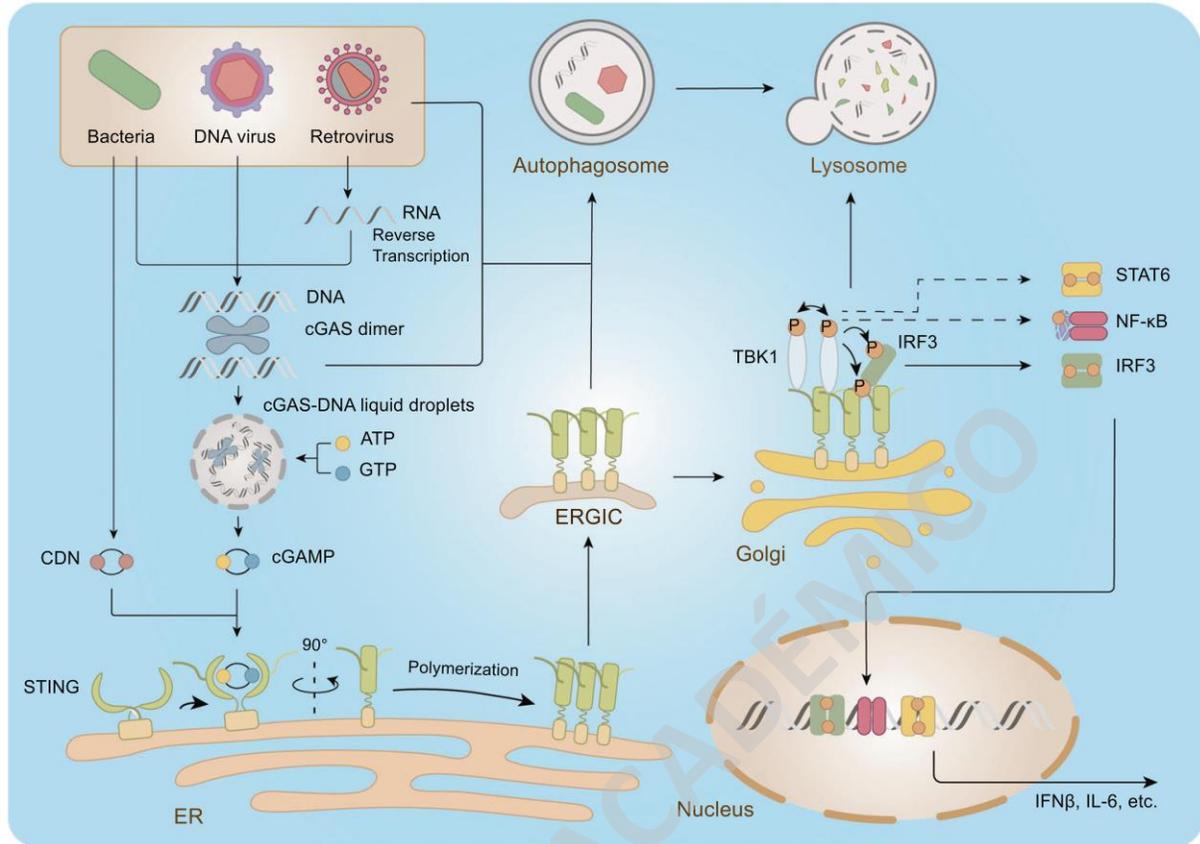


Figura 12. Vía de detección de DNA citosólico con la activación río debajo de STING. El ADN citosólico es detectado por cGAS, dando como resultado la formación de gotas líquidas de cGAS-ADN, en las que cGAS con ATP y GTP cataliza la producción de cGAMP. Se une STING a su ligando y sufre cambios conformacionales, liberando sus CTT y polimerizándose. STING polimerizado se traslada desde el ER al Golgi a través de ERGIC, donde inicia el proceso de autofagia, contribuyendo a la eliminación del ADN citosólico y los patógenos. Durante la translocación, STING recluta a TBK1, este último se somete a trans-autofosforilación y luego fosforila a STING en su CTT. STING fosforilado ahora recluta a IRF3 para fosforilación y activación por TBK1. También activa a NF-κB y STAT6. Estos factores transcripcionales activados se trasladan al núcleo para inducir la expresión de varios genes inmunomoduladores, como IFN-α, IFN-β e IL-6, que actúan de manera autocrina y paracrina, limitando la infección o daño celular. Luego del proceso de translocación, STING se dirige al lisosoma para su degradación y evitar la sobre inmunización. Otros estímulos distintos a cGAMP (no canónica), también pueden activar a STING, como el estrés de retículo, los liposomas virales y los dinucleótidos cíclicos (CDNs), incluso múltiples CDNs también pueden estimular la degradación de STING autofágica a través de unc-51 como la quinasa 1 de activación de la autofagia (ULK1) (80,81,83). Extraído de Zhangliang Cheng y cols. Las interacciones entre la vía cGAS-STING y los patógenos. (2020)(84).

1.4.3 Vía de señalización de STING en metabolismo y obesidad

Se ha descrito que los niveles de expresión o actividad de los componentes de esta cascada de señalización, incluyendo a STING y TBK1 están regulados positivamente (*upregulated*) bajo condiciones de obesidad en modelos murinos (71,76,87). La activación de la vía de STING en tejido adiposo de ratón puede ser gatillada por la liberación de mtDNA hacia el citoplasma, en condiciones de una dieta alta en grasas, aumentando la respuesta inflamatoria estéril crónica, la cual es un proceso inflamatorio que inicia en ausencia de patógenos persistente en el tiempo que no termina cuando debería (41,46). Se ha reportado en algunos estudios la contribución de esta vía en el aumento de inflamación estéril, favoreciendo los signos y/o aparición de algunos desórdenes metabólicos como la resistencia a la insulina, la enfermedad de hígado graso, la obesidad, entre otras, que, si se padecen al mismo tiempo, pueden llegar a generar síndrome metabólico (71,76,88).

La proteína STING ha sido ampliamente estudiada en la respuesta inmune de los mamíferos, de hecho, homólogos de esta proteína están presentes en casi todos los reinos animales. Sin embargo, el papel de STING en la inmunidad innata de los insectos se ha identificado recientemente, teniendo efectos antivirales y antimicrobianos. En un estudio donde se quiso evaluar la participación en el metabolismo lipídico de *Drosophila melanogaster* de STING (dSTING) se efectuó una delección del gen, lo cual provocó que las moscas fueran sensibles a la falta de nutrientes y al estrés oxidativo (89). También, en este mismo trabajo observaron que con el mutante de dSTING, se redujo el almacenamiento de los lípidos y se reguló negativamente la expresión de los genes asociados al metabolismo de los lípidos. Se demostró también que dSTING interactúa con las enzimas sintetizadoras de lípidos acetil-CoA carboxilasa (ACC) y la sintasa de ácidos grasos (FAS). Inclusive, dSTING co-localizó con ACC y FAS en la región cortical de RE del cuerpo graso, sugiriendo un posible papel regulador en la biosíntesis de lípidos. Por último, este trabajo demostró que la delección de dSTING resultó en una localización alterada de ACC en las células del cuerpo graso y una actividad muy reducida de FAS en ensayos in vitro, sugiriendo entonces que STING podría participar en el destino de las enzimas metabólicas desde el RE hacia la mitocondria (89).

1.5 Resumen de los antecedentes

En vista de lo expuesto en los antecedentes, la obesidad es una patología que afecta a hombres y mujeres a toda edad, va en aumento y junto con ello la manifestación de comorbilidades ponen en riesgo la salud de las personas considerándose un problema de salud pública grave. De manera que conocer los mecanismos moleculares, genéticos y fisiológicos que subyacen a la obesidad, permiten un mejor entendimiento tanto de esta patología como el conjunto de enfermedades asociadas a esta. Por este motivo, el estudio del vínculo entre las diversas moléculas que dan origen a la obesidad, y sus comorbilidades asociadas, representa un blanco de investigación para su utilidad clínica y de esta forma buscar posibles blancos moleculares para ofrecer diagnósticos tempranos o bien, formular estrategias de intervención con potencial terapéutico.

La regulación metabólica y el sistema inmunológico se asocian mediante conversaciones coordinadas recíprocas. El soporte metabólico de un organismo modifica la capacidad inmunitaria de este para combatir agresiones o daños celulares a través de la respuesta inflamatoria, favoreciendo o suprimiendo algunas vías de señalización. Considerando que el sistema inmunológico es la primera línea de defensa del organismo, las vías de señalización inmune han surgido como nuevos candidatos para la terapia de enfermedades metabólicas. La vía de la proteína STING pese a ser una efectora de la respuesta inmune, se ha detectado en una variedad de células distintas de las células inmunitarias, y ha sido asociada en contextos metabólicos mediante una actividad de regulación positiva en obesidad y patologías asociadas a la obesidad. Mientras que la inhibición de esta vía, por el contrario, supone una regulación negativa de los parámetros metabólicos alterados en estas condiciones disminuyendo la severidad de las enfermedades y otorgando una protección contra la obesidad y el desarrollo de enfermedades metabólicas. Los estudios han sugerido que STING podría participar en la regulación del almacenamiento de las grasas a través de la interacción con complejos enzimáticos involucrados en la síntesis y transporte de lípidos o bien, en el destino de estos complejos enzimáticos desde el RE hacia la mitocondria.

Por lo tanto, comprender las relaciones entre STING y el metabolismo de los lípidos proporcionaría información relevante sobre los mecanismos y cascadas de señalización asociadas a la desregulación metabólica inducida por la obesidad. En este contexto, la identificación de estas vías y función, podrían generar nuevas estrategias biotecnológicas potenciales para el diagnóstico temprano y/o tratamiento para las enfermedades metabólicas.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis de trabajo

La proteína STING participa en la regulación del almacenamiento de grasas.

Objetivos

Objetivo general

Evaluar la contribución de STING en el almacenamiento de grasas.

Objetivos específicos

1. Evaluar cambios en el peso corporal asociados a la ausencia de STING en ratones silvestres (Wild Type) y ratones carentes de la proteína STING (STINGKO) a diferentes edades.
2. Analizar comparativamente parámetros metabólicos en ratones silvestres y ratones STINGKO a diferentes edades.
3. Evaluar la relación *in silico* de la proteína STING con enzimas asociadas al metabolismo lipídico en ratón y humano.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materiales

Los materiales utilizados para la ejecución de esta tesis se enlistan en la siguiente tabla, incluyendo reactivos, insumos comerciales y equipos de análisis.

Tabla 1. Listado de los materiales usados en la presente tesis.

REACTIVO O RECURSO	FUENTE Y CARACTERÍSTICAS
Insumos comerciales	
Kit para determinar colesterol	CHOLESTEROL LiquiColor (Humano)
Kit para determinar triglicéridos	TRYGLYCERIDES LiquiColor ^{mono} (Humano)
Glucómetro	Abbot Freestyle Optium: Sistema de monitoreo glucosa en sangre
Tiras reactivas para glucosa	Abbot Freestyle Optium: Tiras reactivas glucosa en sangre
Coagulante	Four Paws [®] , Polvo antiséptico coagulante 0.5 oz
EDTA	Milipore, OmniPur [®] Grado Biol. Mol
NaOH	Merck, EMSURE [®] Grado Biol. Mol
Microplacas	Multiplacas SPL Life Sciences 96PS
Equipos	
Balanza	JADEVER JWE-6K (6kg x 0,2g)
Aparato de suspensión	Alambre metálico (2mm ancho x 55cm largo) fijado a dos soportes verticales de acrílico (35cm altura).
Campo abierto	Caja de plexiglás blanco de 40x40x40 cm ³
Lector de microplacas	Tecan, Infinite [®] 200 PRO NanoQuant
Estufa/incubadora	Thermo Scientific [™] 51031562, HERATHERM [™]
Centrífuga	Eppendorf 5415C; Thermo Scientific [™] Fresco [™] 17
pH-metro	Hannah instruments, HI 2221 Calibration Check Ph/ORP meter
Microscopio óptico	Nikon, MODELO ECLIPSE E200LED MV R
Microtomo	Thermo scientific Microm HM 315
Placa fría	Unidad de enfriamiento para bloques de parafina PA/K ARQUIMED
Baño termorregulado	Leica, modelo HI 1210

3.2 Ratones (*Mus musculus*) de experimentación

Los animales utilizados en este trabajo fueron mantenidos en el Bioterio de la Universidad Mayor bajo condiciones de temperatura controlada a 22°C, con consumo *ad libitum* de agua y alimento Lab Diet 5P00 Prolab RMH 3000. Los animales contaron con supervisión veterinaria durante los 7 días de la semana.

El manejo animal se realizó bajo la Resolución VRI N12018: Manual de Procedimientos Bioterio, que promueve las normas éticas de trabajo con animales de acuerdo con la Ley 20380 de protección de animales en Chile y cuenta con la aprobación del comité de bioética y bioseguridad de la Universidad Mayor. Se utilizaron ratones de la cepa endogámica C57BL6J (B6) silvestres o Wild Type (WT) y ratones STING *Knock Out* (STINGKO) o carentes de la proteína STING, los que también corresponden al mismo *background* B6. Los ratones STINGKO fueron adquiridos en la empresa *The Jackson Laboratory*, E.E.U.U. Estos ratones STINGKO carecen de los exones 3-5 del gen *Tmem173* (o *Sting*) que codifica para la proteína STING. Los ratones homocigotos para este alelo (*Sting* $-/-$) son viables y fértiles. Para los grupos experimentales requeridos en este trabajo, se utilizaron ratones macho WT y STINGKO de tres rangos etarios: jóvenes entre 1 a 4 meses, adultos de 12 a 15 meses y envejecidos de 21 a 24 meses (Tabla 2).

Tabla 2. Grupos experimentales de ratones WT y STINGKO.

Modelo/cepa	Edad (meses)	Grupo
WT (C57BL/6J)	1-4	jóvenes
	12-15	adultos
	21-24	envejecidos
STINGKO	1-4	jóvenes
	12-15	adultos
	21-24	envejecidos

3.3 Análisis del peso corporal e ingesta de alimento

Como primera estrategia experimental se realizó una medición del peso corporal en ratones WT y STINGKO en etapas juveniles, adultas y envejecidas (Tabla 2). Una vez obtenido este dato, se continuó con un seguimiento del peso corporal en conjunto con la ingesta de alimento por un periodo estival de cinco semanas a los mismos grupos experimentales descritos en la Tabla 2. Estos animales se pesaron en una balanza digital una vez por semana durante 5 semanas consecutivas. Además, se pesó el alimento ingerido de la siguiente manera: se dejaron 200 gramos de alimento por cada jaula inicialmente, a la semana siguiente se pesó la cantidad de alimento remanente y se volvieron a dejar 200 gramos de alimento, así sucesivamente hasta completar las 5 semanas de observación total.

Posteriormente, para determinar la ingesta de alimento se restaron los gramos de alimento remanente (AE) a los gramos de alimento previamente dejados (AD) por cada caja, esto se dividió por 7 al ser una medición semanal. Luego, ese consumo semanal (CS) se dividió por el número de ratones por cada caja (n) y se obtuvo el consumo por ratón final (CRF) (ecuación 1).

$$\text{Ec. 1} \quad \text{CS} = \frac{\text{AE (g)} - \text{AD (g)}}{7} \rightarrow \text{CRF} = \frac{\text{CS (g)}}{n}$$

3.4 Ensayos de conducta sedentaria y fuerza animal

3.4.1 Prueba de Campo Abierto (*Open Field test*)

Mediante este ensayo, considerado como un ejercicio no forzado, se evaluó la distancia recorrida del ratón. Cada animal fue colocado en una caja de plexiglás blanco (Campo Abierto) de 40 x 40 cm de área, sin tener estímulos sensoriales externos. Se midió la actividad de desplazamiento de cada animal de manera libre durante 10 minutos, desplazamiento que fue grabado por el software ANY-maze v6.34 (Figura 13A) (90,91).

3.4.2 Prueba de suspensión en alambre (*Hanging test*)

Este ensayo se realizó mediante el uso de un alambre metálico de 2mm de diámetro y 55cm de largo, unido a dos soportes de acrílico a 35 cm de altura (Figura 13B). Se depositó a cada ratón sobre el centro del alambre, el cual se agarra usando sus extremidades anteriores. Para analizar su capacidad de mantenerse suspendido, se usó el método "Caídas (*Falls*)". Esta prueba consiste en el registro del número de veces que el ratón cae desde el alambre al mesón con un máximo de 10 caídas permitidas, por tiempo máximo de 180 segundos (92).

3.5 Análisis del peso y tamaño de tejido adiposo abdominal

Se extrajo el tejido adiposo abdominal de los ratones de los grupos experimentales descritos en la Tabla 3, el que fue pesado y medido en su largo y ancho. Posterior a eso, se utilizaron las ecuaciones 2 y 3 para obtener un valor de área del tejido adiposo abdominal. En primer lugar, se multiplicó el peso (en gramos) (P) por el largo x el ancho (en centímetros) (ecuación 2), y este nuevo valor (A) se normalizó respecto al peso corporal de cada animal (en gramos) (PC) (ecuación 3) obteniéndose un área de tejido adiposo abdominal.

$$\text{Ec. 2} \quad P \text{ (g)} \times \text{largo (cm)} \times \text{ancho (cm)} = A \left[\frac{\text{g}}{\text{cm}^2} \right] \quad \text{Ec. 3} \quad \text{Normalización} = \frac{A \left[\frac{\text{g}}{\text{cm}^2} \right]}{\text{PC (g)}}$$

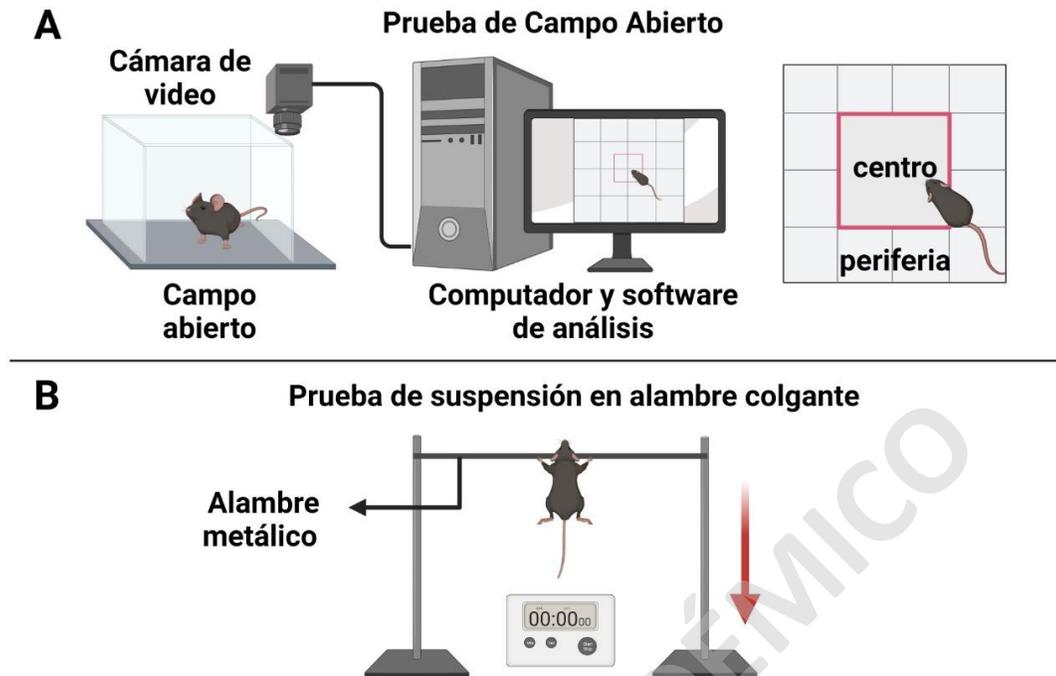


Figura 13. Esquema de las pruebas de suspensión y de Campo Abierto. En **A** se muestra un esquema general de la prueba de Campo Abierto, indicando al animal dentro del Campo Abierto, su comportamiento es registrado por una cámara de video directamente hacia un software de análisis AnyMaze, también se indica la zona de la periferia y el centro del Campo. En **B** se muestra al animal colgando desde sus extremidades superiores en el alambre metálico del aparato utilizado en la prueba de suspensión a 35 cm de altura, la flecha simboliza la caída del animal. Creado en Biorender por Catalina Guerra (2021).

3.6 Histología de tejido hepático

Se realizaron cortes histológicos en micrótopo (3 μm) de tejido hepático procesados en parafina, de los ratones de los grupos experimentales descritos en la Tabla 2. Luego, se hizo una tinción de hematoxilina eosina (H&E) y se adquirieron imágenes utilizando el microscopio óptico Nikon ECLIPSE E200LED. Posteriormente, se analizó la inclusión de grasa en el tejido hepático de la siguiente manera: se adquirió una imagen con objetivo 10X y se dividió en 4 cuadrantes, luego se contó la presencia (valor de 1) o ausencia (valor de cero) de grasa en cada cuadrante y se generó un puntaje final de inclusión, siendo el puntaje máximo de 4 (Figura 14). De esta forma se comparó entre las condiciones WT y STINGKO de los grupos experimentales de la Tabla 2.

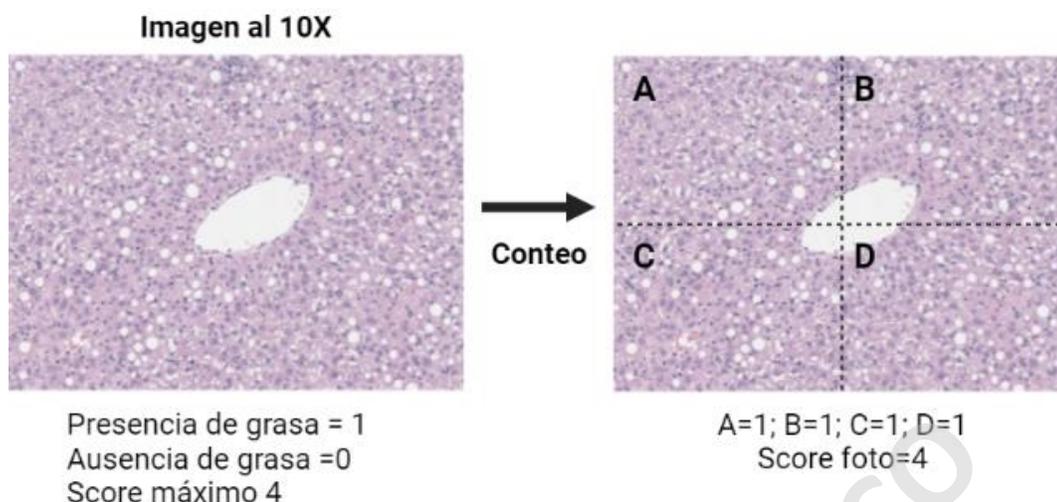


Figura 14. Esquema explicativo del análisis utilizado para la evaluación de la inclusión de grasa en tejido hepático. A cada imagen con aumento 10X obtenida se le dividió en cuadrantes determinados por las líneas punteadas. Luego, se contó un valor de 1 para la presencia de inclusión de grasa en aquel cuadrante que lo presentara y un valor de 0 para aquel cuadrante que no presentara inclusión, generando un puntaje final por cada imagen. En la figura se muestran secciones de hígado murino con esteatosis a modo de ejemplo (93). Creado en Biorender por Catalina Guerra (2021).

3.7 Medición de parámetros bioquímicos: glucosa, triglicéridos y colesterol sanguíneos

Para el análisis de estos parámetros se extrajo sangre venosa de la cola de los ratones (Tabla 2), en las que se midieron tres parámetros bioquímicos asociados con la obesidad, como: glucosa circulante, colesterol total y triglicéridos plasmáticos.

3.7.1 Medición de glucosa (hemoglucotest)

Se realizó una medición de glucosa circulante posterior a 4 horas de ayuno, donde se extrajo una gota de sangre y se midió la glucosa en una tira reactiva *Abbot Freestyle Optium* con glucómetro *Abbot Freestyle Optium*, el que entregó los valores en unidades mg/dl.

3.7.2 Medición de colesterol y triglicéridos sanguíneos

Se recolectaron 100 μ L de sangre en tubos eppendorf conteniendo 10 μ L de 10% EDTA. Luego se centrifugó a 4000 rpm durante 15 min a temperatura ambiente, y se guardó el sobrenadante (plasma) a -20°C hasta su uso. Después, se usaron los kits comerciales *LiquiColor*® con sus respectivos estándares (200 mg/dl) para determinar los niveles de colesterol y triglicéridos. Se midieron las absorbancias a una longitud de onda de 546 nm en el lector de microplacas Tecan, *Infinite*® 200PRO NanoQuant con el software de lectura de microplacas *i-control*™. A partir de la ecuación 4 se obtuvo un factor de dilución (FD) al dividir la absorbancia obtenida del estándar en la concentración de este mismo.

Luego, con la ecuación 5 se obtuvo la concentración final (CF) de colesterol y triglicéridos al multiplicar las absorbancias correspondientes a muestras de colesterol o triglicéridos respectivamente, por el FD.

$$\text{Ec. 4 } FD = \frac{\text{Absorbancia del estándar}}{\text{Concentración del estándar}} \quad \text{Ec. 5 } CF = \text{Absorbancia colesterol o TG} \times FD \text{ [mg/dl]}$$

3.8 Construcción de redes de interacción in silico

Se utilizó el software Cytoscape v3.8.0 (94) para ejecutar un análisis exploratorio de posibles interacciones entre los genes que codifican para los componentes de la vía de STING y proteínas del metabolismo lipídico. Se generó un listado de interés, donde se identificaron los genes que codifican para las principales proteínas involucradas en el metabolismo lipídico de acuerdo con la literatura, junto con estudios que han relacionado a STING con algunas de estas enzimas. Luego, se ingresó este listado (Tabla 3) en la casilla de búsqueda del plugin GENEMania (95) para las especies *Mus musculus* y *Homo sapiens* por separado. Esta aplicación usa una gran base de datos de redes de interacción funcional de múltiples organismos, usando un enfoque de culpabilidad por asociación (85) y así identifica los genes más relacionados con aquellos genes de consulta (Tabla 3). A partir de esto, se generaron redes con nodos conectados mediante diferentes tipos de interacciones encontradas por el software.

Tabla 3. Listado de los genes utilizados en análisis de redes de interacción, análisis de anotación funcional y la búsqueda de expresión diferencial.

Identificador ratón	Identificador humano	Proteína	Nombre (descripción)
<i>Tmem173</i>	STING	STING	Proteína estimuladora de los genes de interferón
<i>Mb21d1</i>	cGAS	cGAS	GMP-AMP sintasa cíclica
<i>Irf3</i>	IRF3	IRF3	Factor regulador del interferón 3
<i>Nkap</i>	NFκB	NFκB	Factor nuclear kappa B
<i>Tbk1</i>	TBK1	TBK1	Quinasa de unión a TANK 1
<i>Ifnar1</i>	IFNAR1	IFNAR1	Subunidad 1 del receptor de interferón alfa y beta
<i>Ifnar2</i>	IFNAR2	IFNAR2	Subunidad 2 del receptor de interferón alfa y beta
<i>Ifna</i>	IFN alfa	IFN alfa	Interferón alfa
<i>Ifnb1</i>	IFN beta	IFN beta	Interferón beta 1
<i>Acs16,</i>	ACSL	ACSL	Acil-CoA sintetasa
<i>Gpat3</i>	GPAT	GPAT	glicerol-3-fosfato acetil transferasa
<i>Agpat</i>	AGPAT	AGPAT	Acil-3 fosfato aciltransferasa
<i>Dgat1</i>	DGAT	DGAT	diacilglicerol aciltransferasa
<i>Pepck1 y 2</i>	PEPCK	PEPCK	Fosfoenol piruvato carboxiquinasa
<i>Acly</i>	ACL	ACL	ATP- citrato liasa
<i>Npc1</i>	NPC	NPC	NPC Transportador intracelular de colesterol 1
<i>Acaca</i>	ACC	ACC	Acetil-Coa carboxilasa
<i>Fasn</i>	FAS	FAS	Complejo multienzimático ácido graso sintasa

3.9 Análisis de anotación funcional

Se trabajó en la plataforma web DAVID v6.8 (<https://david.ncifcrf.gov/tools.jsp>), para realizar una identificación de términos biológicos enriquecidos, particularmente análisis de anotación, visualización y descubrimiento integrado de términos GO (ontología de genes) para el listado de genes de interés en las especies *Mus musculus* y *Homo sapiens*. Se ingresó el listado exhibido en la Tabla 3 y se obtuvieron clusters de asociación de anotaciones funcionales agrupando genes inmunitarios y metabólicos. Los análisis estadísticos entregados por las herramientas de DAVID incluyen valor p para cada término GO.

3.10 Análisis *in silico* de la expresión diferencial de genes de la vía de señalización de STING

Para llevar a cabo este análisis se realizó un trabajo computacional que permitiera la identificación de genes o vías moleculares que se expresan de forma diferencial (DE) en condiciones normales versus obesidad, y en diferentes edades. Para esto, se utilizaron sets de datos (en adelante datasets) transcriptómicos desde experimentos de secuenciación de RNA (RNA-Seq).

3.10.1 Obtención de datasets de experimentos de RNA-Seq

Se realizó una búsqueda de datasets con la herramienta Gene Expression Omnibus (GEO) de NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) bajo los términos “*Mus musculus/Homo sapiens* (especie), *liver/adipose* (tejidos), *ageing-aging/obesity* (condición biológica)”. Luego, se obtuvieron las listas de acceso SRA (Sequence Read Archive) (<https://trace.ncbi.nlm.nih.gov/Traces/sra>) mediante la herramienta Run Selector de NCBI (<https://trace.ncbi.nlm.nih.gov/Traces/study/?go=home>).

3.10.2 Análisis de datasets de RNA-Seq

Posterior a la obtención de los datasets, se subieron los archivos txt de las listas de acceso mediante la herramienta *Upload data* en la plataforma de análisis de datos basada en web: Galaxy (<https://usegalaxy.org/>). Aquí se analizaron los datasets de acuerdo con el protocolo “*Reference-based RNA-Seq data analysis (Galaxy Training Materials)*” (96). Esto consistió en un perfilado de la expresión génica de un listado de genes de interés, que incluye aquellos que codifican para los componentes de la vía de señalización de STING, y aquellos que codifican para enzimas del metabolismo lipídico (Tabla 3). Luego, se comparó entre las condiciones normales o de control versus tratamientos o alteraciones, según correspondiera el caso, siguiendo un flujo de trabajo que se muestra en la Figura 15.

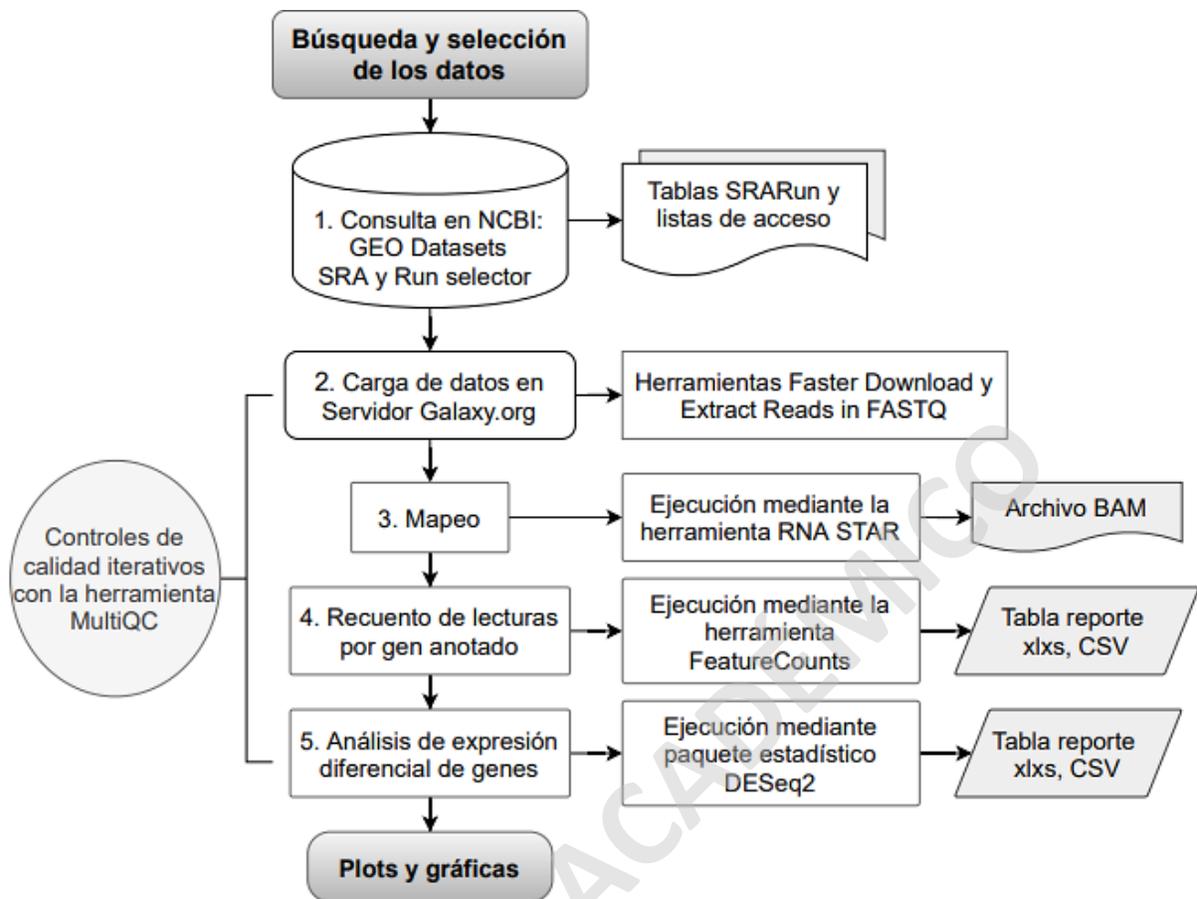


Figura 15. Flujo del trabajo computacional realizado para análisis de expresión diferencial de genes de datasets de experimentos de RNA-Seq. Se consultó la base de datos NCBI con las herramientas GEO, SRA y Run selector para obtener las tablas y listas de acceso SRARun (1), luego se cargaron los datos en el servidor público Galaxy (2) donde se efectuaron las etapas 3 a 5. Se ejecutó la etapa de mapeo (3) mediante la herramienta RNA STAR v2.7.8. a Galaxy y se generó un archivo BAM que luego fue utilizado como *input* para realizar el recuento de lecturas por gen anotado (4) mediante la herramienta Feature Counts v2.0.1 Galaxy. Posterior a eso, se llevó a cabo el análisis de expresión diferencial de genes a través del paquete estadístico DESeq2 v2.11.40.6+galaxy1 con el reporte de datos generado en la etapa 4 como *input*. A su vez, se realizaron controles de calidad iterativos con la herramienta MultiQC entre cada etapa. Creado en <https://app.diagrams.net/>.

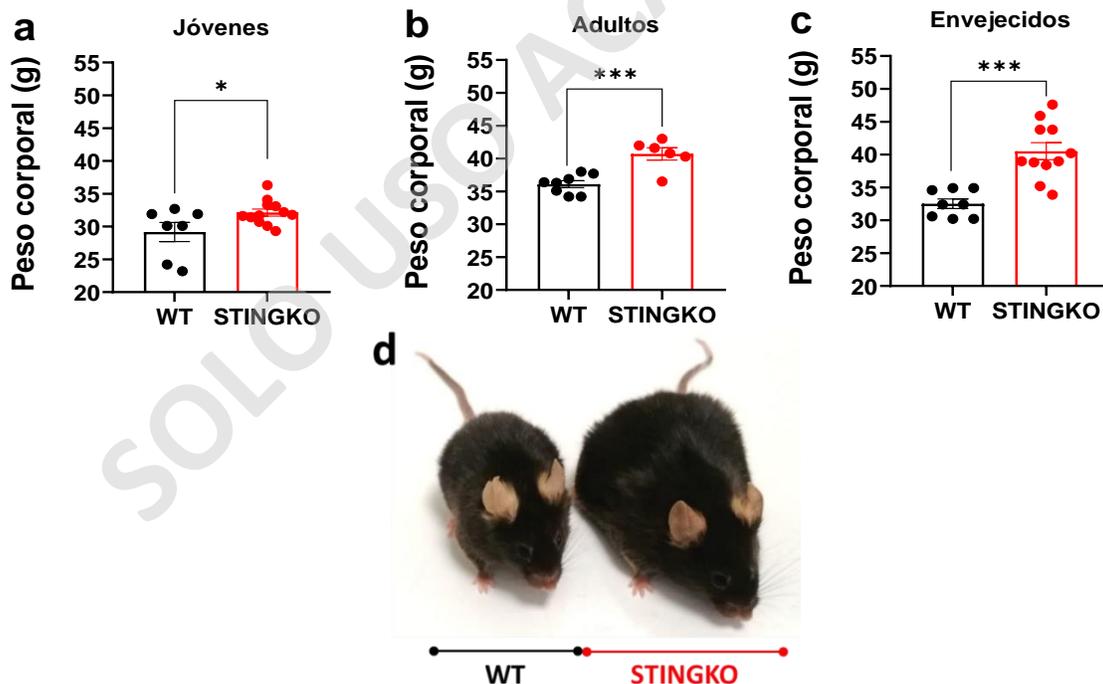
3.11 Análisis estadístico y construcción de gráficos

La construcción de gráficos y los distintos análisis estadísticos se ejecutaron en el software GraphPad PRISM v8.0. Para significancia entre grupos de datos se usó ANOVA de una vía, ANOVA de dos vías, Test de chi cuadrado y T-test de dos colas sin emparejar según correspondiera. Todos los valores fueron expresados en media \pm error estándar de la media (SEM). Para aquellos datos con valor p mayores a 0,05 se consideraron no significativos (ns), mientras que los valores iguales o inferiores a 0,05 se consideraron significativos, a saber: *p \leq 0,05, **p \leq 0,01, ***p \leq 0,0001.

4. PRESENTACIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

4.1 Diferencias de peso corporal en presencia y ausencia de la proteína STING. Los ratones STINGKO presentaron mayor peso corporal que los WT en todas las edades evaluadas

En primer lugar, se decidió evaluar el peso corporal entre los ratones WT y STINGKO machos a diferentes edades con la finalidad de conocer si existían diferencias entre estos a las distintas edades analizadas. Para ello, los ratones fueron pesados vivos a edades jóvenes (1 a 3 meses), adultos (12 a 15 meses) y envejecidos (21 a 24 meses). Se observó que los ratones WT pesaron alrededor de los 30, 35 y 35 g en las etapas juveniles, adultas y envejecidas respectivamente (Figura 16 a-c), mientras que los ratones STINGKO pesaron alrededor de 35, 45 y 50 g en estas mismas etapas respectivamente (Figura 16 a-c). Es decir, los ratones STINGKO pesaron, 5, 10 y 15 gramos más que los WT en las etapas jóvenes, adultas y viejas respectivamente. Basados en estos resultados se puede decir que los ratones STINGKO presentan un mayor peso corporal que los ratones WT a todas las edades estudiadas y esta diferencia aumenta con la edad (Figura 16).



4.2 La diferencia de peso corporal observada entre los ratones WT y STINGKO no está asociada a una mayor ingesta de alimento por parte de los STINGKO

Dado el resultado anterior, se quiso indagar si la causa de la diferencia de peso entre los ratones WT y STINGKO se debía a una mayor ingesta de alimento. Es por esto que se monitoreó el peso corporal y la ingesta de alimento de los mismos grupos experimentales (Tabla 2), durante 1 mes y medio. Los resultados de este seguimiento arrojaron un consumo de alimento similar entre ratones WT y STINGKO a todas las edades evaluadas (Figura 17 a-c). Los valores obtenidos respecto al peso corporal indican que entre WT y STINGKO hay diferencias considerables en el peso (similar a lo observado en la Figura 16), es decir, una diferencia de peso estadísticamente significativa de 10 gramos en promedio en etapas juveniles y adultas, mientras que en etapas envejecidas se encontró una diferencia de 15 gramos (Figura 17 d-f). Por lo tanto, tomando en consideración los resultados de este monitoreo, la diferencia de peso corporal observada entre ratones WT y STINGKO no está asociada a una mayor ingesta de alimento a las diferentes edades evaluadas (Figura 17).

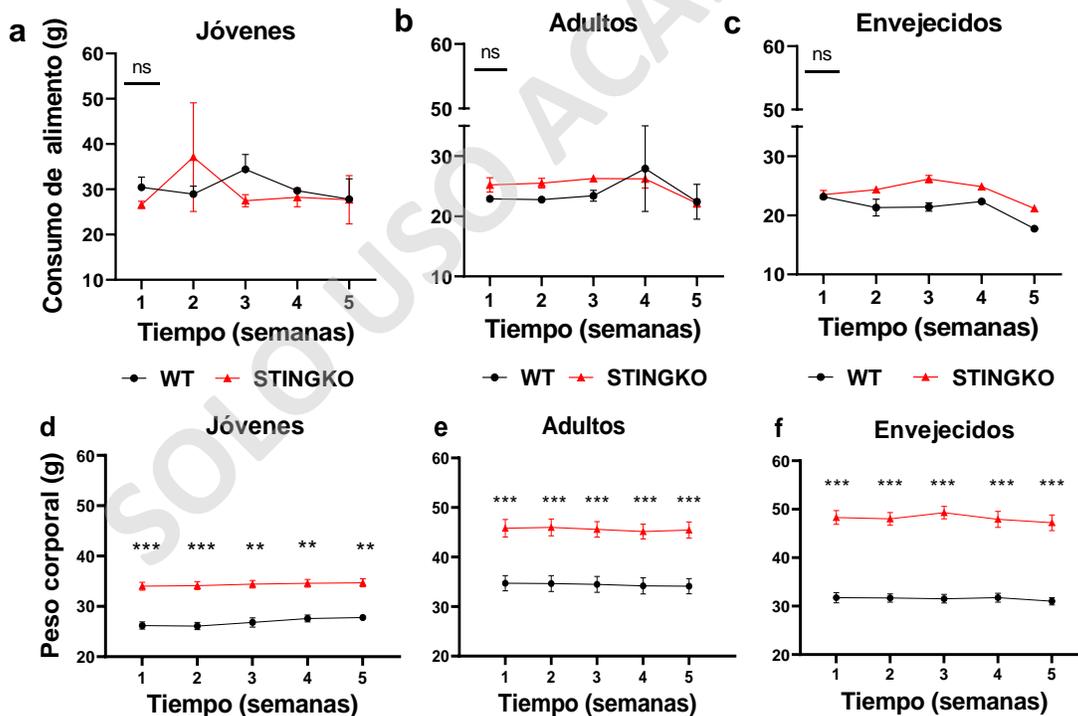


Figura 17. La diferencia de peso observada entre los ratones STINGKO y WT no está asociada a una mayor ingesta de alimento. En a-c se muestra el consumo de alimento en gramos (eje y) y el tiempo de seguimiento en semanas (eje x), para ratones WT y STINGKO jóvenes (3-4 meses), adultos (12-15 meses) y envejecidos (22-24 meses). En d-f se muestra el peso corporal en gramos para los mismos grupos descritos. Todos los valores expresados como media \pm SEM. ANOVA de dos vías, ns: $p > 0.05$, significativo para: * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$.

4.3 Los ratones WT y STINGKO no presentaron diferencias en la capacidad de movilizarse

Puesto que en ausencia de la proteína STING se manifiesta un mayor peso corporal en todas las etapas, pero que no se debe a un mayor consumo de alimento, se quiso evaluar si estos ratones son más sedentarios que los WT. Es por esto que se realizó la prueba de Campo Abierto (*OFT*), la cual permite someter a los ratones a un ejercicio no forzado dentro de un área determinada y monitorear su actividad física general, durante 10 min. A partir de ello, se determinó la distancia total recorrida como un referente a ausencia o presencia de conductas sedentarias que podrían presentarse durante el tiempo que contempla el test (Figura 18) (90,97).

Se encontró que tanto los ratones WT como los STINGKO a todas las edades medidas recorrieron distancias similares dentro del Campo Abierto durante los 10 min de prueba, sin diferencias estadísticamente significativas. Para el grupo de ratones jóvenes se determinó que los WT recorren 30,6 metros y STINGKO recorren 27,4 metros en promedio (Figura 18 a). En el grupo de los adultos se recorrieron 16,1 y 12,1 metros por los ratones WT y STINGKO respectivamente (Figura 18 b). Finalmente, en el grupo de ratones envejecidos los WT recorrieron 14,2 y los STINGKO 16,2 metros de distancia (Figura 18 c). Esto sugiere entonces, que a pesar del mayor peso corporal de los ratones carentes de la proteína STING, no hubo conductas sedentarias, ya que, la distancia recorrida es similar que la de los ratones silvestres. Por lo tanto, el mayor peso corporal observado en los STINGKO no se debe a un mayor consumo de alimento o a un mayor sedentarismo (Figuras 17 y 18).

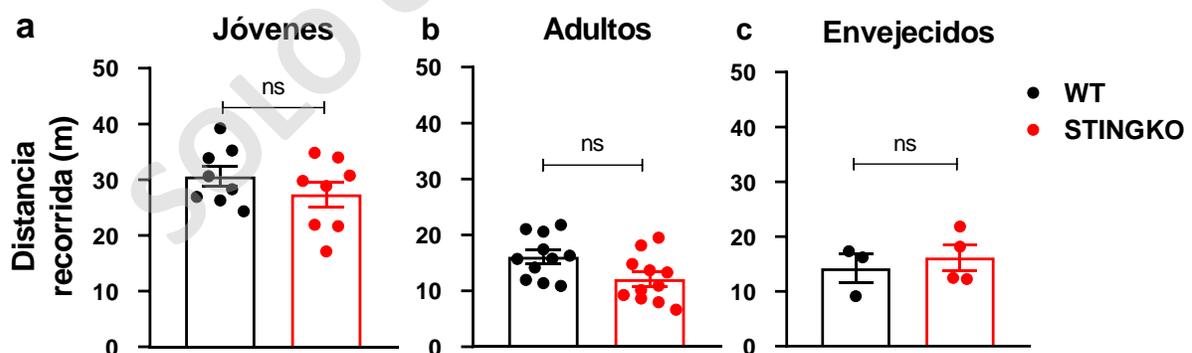


Figura 18. Los ratones WT y STINGKO no presentaron diferencias en su capacidad de movilizarse. Distancia recorrida en metros que exploraron los ratones jóvenes (1-4 meses), adultos (12-15 meses) y envejecidos (21-24 meses) durante la prueba de Campo Abierto. Todos los valores expresados como media \pm SEM. T-test de dos colas no emparejado, ns: $p > 0.05$, * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$.

4.4 Los ratones STINGKO demostraron menor fuerza y mayor fatiga que los WT a todas edades evaluadas

Dados los resultados del peso corporal e ingesta de alimento, se quiso evaluar si este exceso de peso corporal estuviera asociado a una diferencia en la masa muscular y/o la capacidad muscular global, ya que, se ha reportado que la obesidad tanto induce alteraciones en el músculo esquelético que resultan en una disminución de la fuerza y potencia relativa, como también aumento en la fatiga voluntaria prematura en humanos y modelos animales obesos (28). Por este motivo, se realizó la prueba de suspensión, que sirve para evaluar la función muscular global y la fatiga en roedores (92). En este ensayo se encontró que los ratones WT presentaron un mejor rendimiento para sostener su propio peso que los STINGKO en todas las edades medidas (Figura 19).

A edades juveniles, los ratones STINGKO presentaron una latencia a caer más temprana que los WT al pasar los 100 segundos (Figura 19 A). En edades adultas, se observa una reducción significativa de la latencia a caer en los ratones STINGKO desde el inicio de la prueba, alcanzando las caídas máximas permitidas antes del tiempo máximo de prueba (Figura 19 B). Por último, en edades envejecidas, se observa una latencia similar entre ratones WT y STINGKO, sin embargo, estos últimos nuevamente alcanzan sus caídas máximas antes del tiempo máximo que dura la prueba (Figura 19 C). Estos resultados indican que los ratones STINGKO presentan una fatiga prematura comparados con los WT, esto permite deducir que el incremento de peso corporal de estos ratones KO, no se debe a un incremento en la masa y capacidad muscular y que probablemente el exceso de peso se pueda deber a un incremento en grasa corporal acumulada (92).

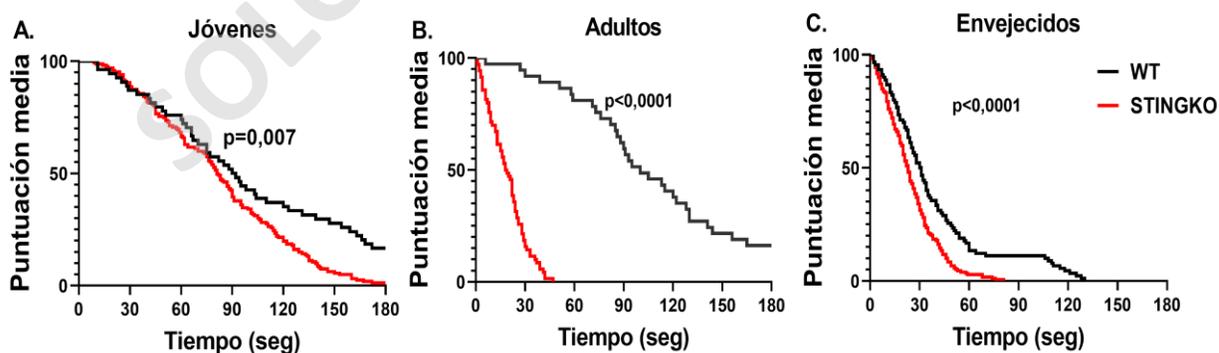


Figura 19. Los ratones STINGKO demostraron menor fuerza y mayor fatiga que los WT a todas edades evaluadas Mediciones de fuerza muscular de las extremidades anteriores para ratones jóvenes (A)(1-4 meses), adultos (B)(12-15 meses) y envejecidos (C)(21-24 meses) durante la prueba de suspensión. Puntuaciones medias (de 100 a 0) y latencia a caer en segundos. Todos los valores expresados como media \pm SEM. Test de Chi cuadrado, ns: $p > 0.05$, * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$.

4.5 Los ratones STINGKO presentaron una mayor área corporal de contenido adiposo que los WT

Para conocer la causa de la diferencia de peso corporal entre los ratones STINGKO y WT, se quiso indagar si este se debía a una mayor acumulación de grasa abdominal. Para ello, se pesó y midió la grasa (Figura 20 b) de cada grupo experimental como se describió en la metodología y se encontró que los ratones WT presentaron un tejido adiposo de menor área que los STINGKO (Figura 20). En edades juveniles se ve una tendencia al aumento del área del tejido adiposo comparado con los WT (Figura 20 C), sin embargo, no se observó una diferencia estadísticamente significativa. En el caso de ratones adultos y envejecidos, se vio que el grupo STINGKO presentó una mayor área de tejido adiposo abdominal comparado con los WT; esta diferencia fue un 13,5% mayor significativamente (Figura 20 D y E). Estos resultados sugieren que la obesidad observada en los ratones STINGKO se debe al aumento del TA producto de una mayor acumulación de las grasas en este tejido en edades adultas y envejecidas (Figura 20).

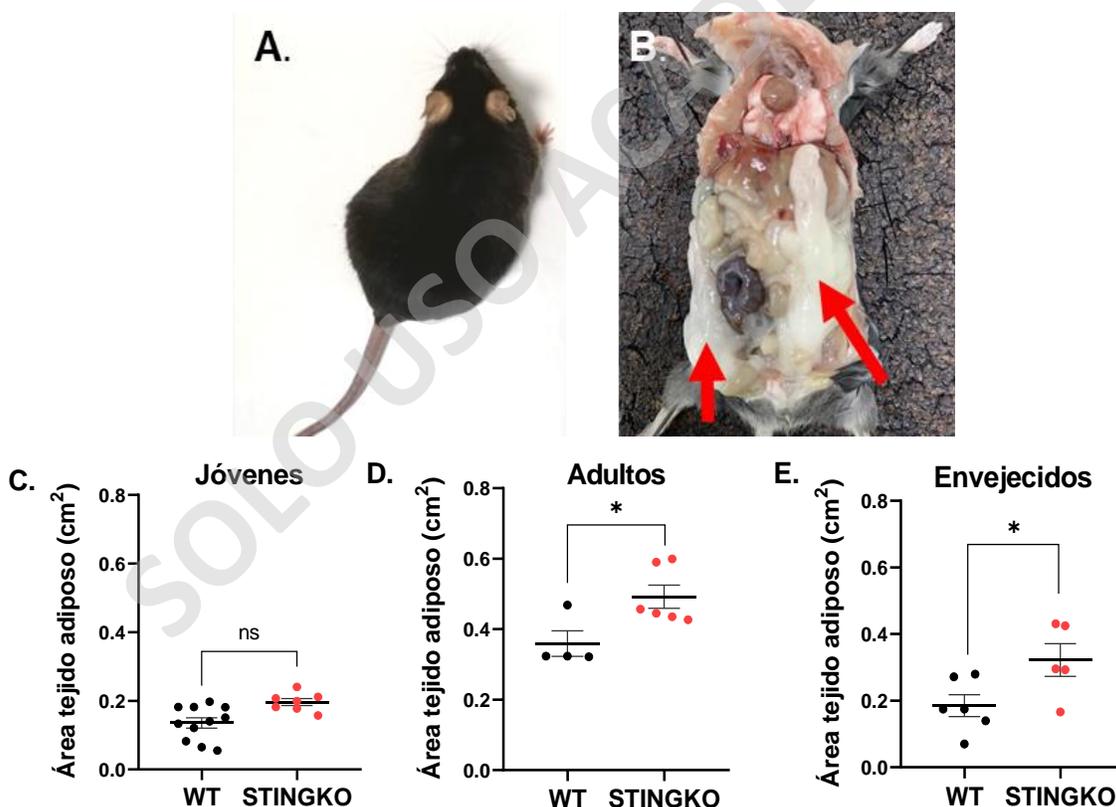


Figura 20. Los ratones STINGKO presentaron una mayor área corporal de contenido adiposo que los WT. Se muestra una vista posterior de ratón STINGKO obeso (A) y una vista anterior disectada del mismo (B) a modo indicativo del tejido analizado (señalado con flechas rojas). En C-E se muestra una relación entre el peso del TA con su ancho y largo, normalizado al peso corporal de ratones WT y STINGKO jóvenes (1 a 4 meses), adultos (12 a 15 meses) y envejecidos (21 a 24 meses) de meses de edad. Todos los valores expresados como media \pm SEM. T-test de dos colas no emparejado ns: $p > 0.05$, * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$.

4.6 Los ratones STINGKO presentan esteatosis a edades adultas y envejecidas

En vista de que durante la obesidad se manifiestan alteraciones como la esteatosis hepática no alcohólica (36,37), se quiso analizar histológicamente el tejido hepático y conocer si existía una acumulación de grasas diferencial entre los ratones WT y STINGKO a distintas edades. Las imágenes de histología obtenidas mostraron una menor acumulación de grasas en el hígado de ratones WT en comparación a los STINGKO (Figura 21 A-C vs D-F). Se obtuvieron puntajes de esteatosis 0 en los hígados de ratones WT a toda edad y STINGKO jóvenes (Figura 21 A-C y D, 1-3), mientras que para los STINGKO juveniles y envejecidos se obtuvieron puntajes promedio de 1,66 y 2,66 respectivamente (Figura 21 E y F, 2 y 3), presentando una diferencia 2 veces mayor a los WT.

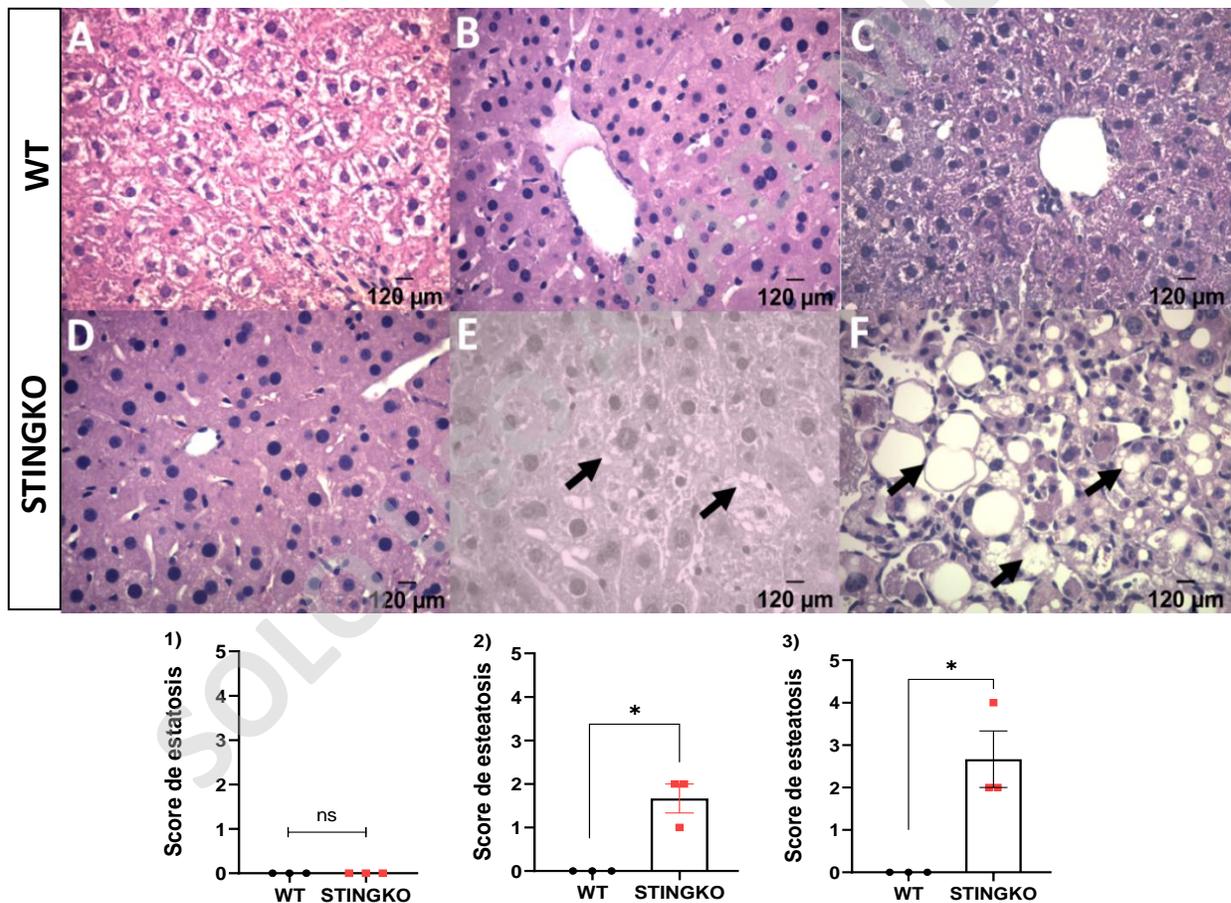


Figura 21. Los ratones STINGKO presentan esteatosis a edades adultas y envejecidas. Imágenes representativas de secciones de hígado teñidas con hematoxilina eosina para evaluación de esteatosis. Muestras de ratones WT (superior) y STINGKO (inferior). Jóvenes (1 a 4 meses)(A y D), adultos (12 a 15 meses)(B y E) y envejecidos (21 a 24 meses)(C y F). Puntajes de esteatosis para jóvenes (1), adultos (2) y envejecidos (3). Imágenes tomadas al 40X, inclusiones de grasa en flechas negras. Todos los valores expresados como media \pm SEM. T-test de dos colas no emparejado, ns: $p > 0.05$, * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$.

Tomando en cuenta los resultados de los parámetros histológicos comparados, se puede deducir que la obesidad observada en los ratones STINGKO se explicaría por una mayor acumulación de grasas tanto en el TA como el tejido hepático de ratones STINGKO (Figuras 20-21).

4.7 Los ratones STINGKO presentaron un incremento en la concentración circulante de colesterol y triglicéridos durante todas las etapas de su vida

Dos parámetros bioquímicos clínicos que son íntimamente asociados y rutinariamente determinados durante desordenes metabólicos como la obesidad, son el colesterol y los triglicéridos (88,98,99). Dado el fenotipo observado en los ratones STINGKO, quisimos conocer si junto con el peso corporal aumentado, los niveles de estos parámetros bioquímicos podrían también estar alterados.

En las mediciones realizadas no se presentaron diferencias en los niveles de glucosa circulante (mg/dl) entre ratones WT y STINGKO en ninguna de las edades medidas (Figura 22 a-c). Sin embargo, los ratones WT presentaron niveles de triglicéridos alrededor de 175, 150 y 160 mg/dl en edades jóvenes, adultas y envejecidas respectivamente (Figura 22 d-f). Contrario a lo observado en ratones WT, los ratones STINGKO presentaron alrededor de 200, 225 y 225 mg/dl en las mismas edades respectivamente (Figura 22 d-f). Es decir, se observó un aumento significativo de 25, 75 y 75 mg/dl para cada edad respectiva. Así mismo, los niveles de colesterol total encontrados para los ratones WT fueron alrededor de 70, 80 y 60 mg/dl para edades jóvenes, adultas y envejecidas respectivamente (Figura 22 g-i). Mientras que los ratones STINGKO presentaron 140, 150 y 150 mg/dl en las mismas edades respectivas (Figura 22 g-i). Las diferencias significativas en este caso fueron de 50,70 y 70 mg/dl para cada edad respectiva.

En conjunto, los resultados del monitoreo de peso corporal, los análisis histológicos de tejido adiposo y hepático, junto con las mediciones de colesterol y triglicéridos, sugieren que la proteína STING estaría asociada al metabolismo lipídico durante toda la vida, modulando la acumulación de las grasas y/o su utilización energética en los tejidos metabólicos como el tejido adiposo y hepático (3,7,52).

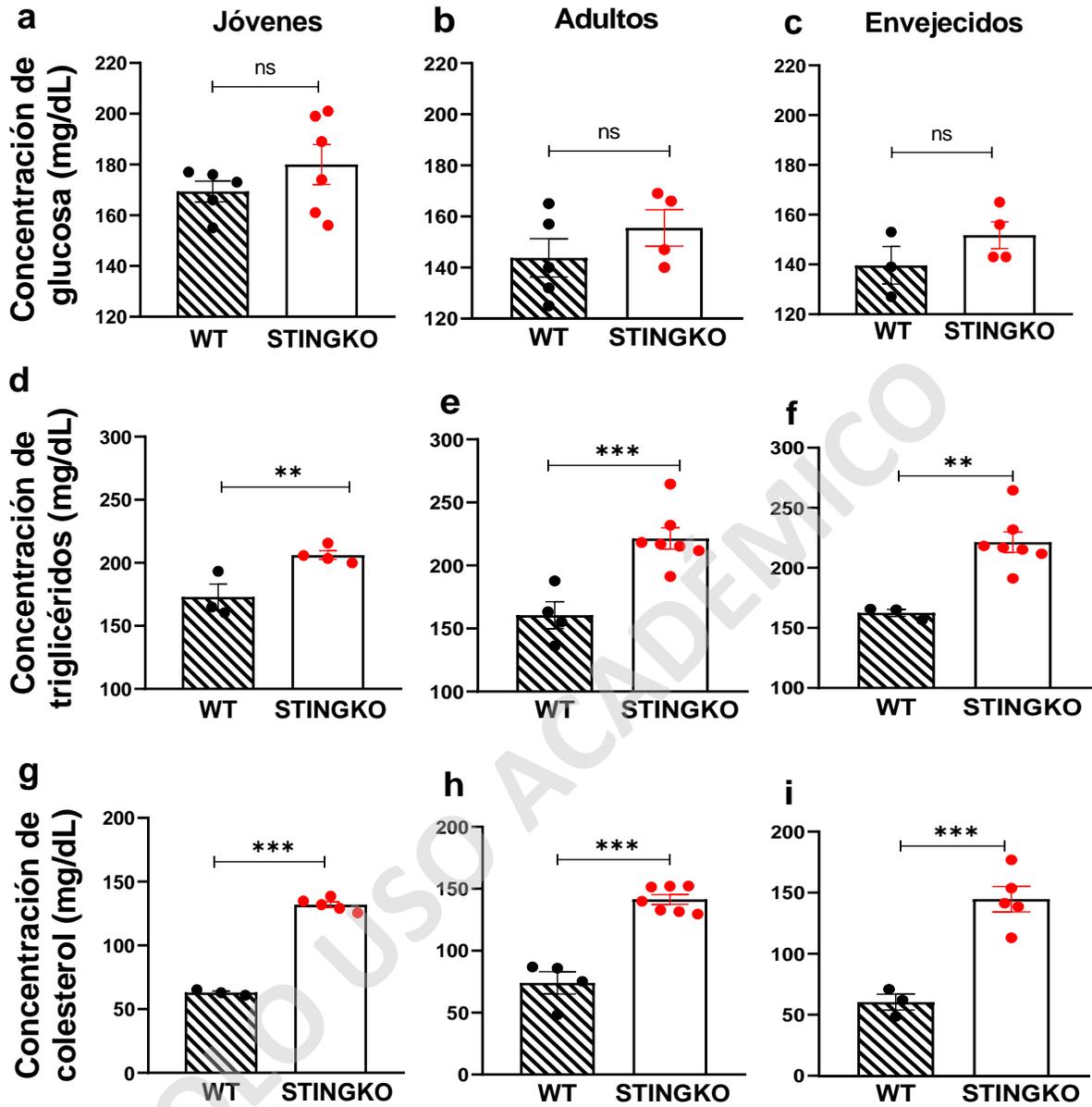


Figura 22. Los ratones STINGKO presentaron un incremento en la concentración circulante de colesterol y triglicéridos durante todas las etapas de su vida. La concentración de glucosa (a-c), triglicéridos (d-f) y colesterol (g-i) en mg/dl para ratones WT y STINGKO. Jóvenes (1-4 meses), adultos (12-15 meses) y envejecidos (21-24 meses). Todos los valores expresados como media \pm SEM. T-test de dos colas no emparejado ns: $p > 0.05$, * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$.

4.8 Se encontraron interacciones predictivas entre STING y proteínas relacionadas con el metabolismo lipídico, en ratón y humano

Considerando que los resultados obtenidos sugieren la participación de STING en el almacenamiento de grasas, se realizó un análisis exploratorio de redes de interacción molecular para intentar dilucidar la interacción que podría tener STING con otras proteínas y/o vías de señalización asociadas al metabolismo energético y que pudieran dar luces del mecanismo posible que explique los resultados obtenidos en este trabajo.

Se generaron dos redes de interacción molecular teniendo como entrada el listado de genes de la Tabla 3, una para ratón y otra para humano (Figura 23 A y B). Las potenciales interacciones se obtuvieron a través de análisis computacionales integrados en grandes bases de datos como IntAct (Molecular Interaction Database) (100), 2ID (Integrated Interactions Database) (101) que entregan predicciones basándose en “*Text mining*” de literatura o datos subidos directamente por investigadores o instituciones de investigación. Se tienen en consideración dominios de proteína, co-expresión de genes y términos de ontología de genes (GO).

La red generada para ratón contiene 35 nodos con 120 conexiones encontradas. De estas 120 conexiones posibles, STING no mostró una interacción física con ningún gen asociado al metabolismo lipídico. Sin embargo, sí se logró distinguir una interacción de tipo predictiva con un nodo vecino que corresponde a *Npc1*, gen que codifica para la proteína Transportadora de colesterol intracelular NPC1 (Figura 23 A), que cumple una función crucial en el tráfico intracelular del colesterol (102). Una mutación en cualquiera de las dos proteínas lisosomales NPC1 o NPC2, provoca acumulación del colesterol y otros lípidos en los lisosomas de todas las células del organismo dando lugar a la enfermedad de Niemann-Pick C, una enfermedad de almacenamiento lisosómico (103).

En la red generada para humano, se encontraron 36 nodos y 127 conexiones, donde se vio que el resultado encontrado para ratón con respecto a STING y a NPC1 se repitió, sin embargo, en este caso se informó una interacción física entre ambos genes (Figura 23 B). A pesar de haber encontrado que STING estaría interactuando con una proteína del metabolismo lipídico no se especifica en la red de ratón que origen tiene la predicción para dicha interacción. Por el contrario, la red de humano consideró como física la interacción entre STING y NPC1.

Lo interesante de estos resultados es que tanto STING como NPC1 son proteínas que participan de procesos que involucran a los lisosomas (104), los cuales son orgánulos degradativos y metabólicos centrales en las células (105,106). Ambos genes se ubican en el cromosoma 18 en ratón, *Npc1* tiene su locus en la primera banda del brazo largo (18 q11-q12), y *Tmem173* tiene su locus en la segunda banda del brazo largo (18Qa11) (107,108). Además, ambas proteínas residen en el RE y poseen dominios transmembrana (103,109).

Otra perspectiva interesante es que, un análisis de anotaciones funcionales para el listado de genes de interés de la Tabla 3 generó 3 *clusters* de anotaciones, tanto para ratón como humano donde, fue posible agrupar a STING con enzimas del metabolismo lipídico (Material suplementario 9.1). Estos *clusters* reciben las siguientes denominaciones de acuerdo con las asociaciones gen-término correspondiente reportadas: 1) Metabolismo lipídico global y mitocondria, 2) Actividad transferasa y de *binding* y 3) Localización intracelular: RE, Membranas y dominios transmembranas (Material suplementario 9.1, Tabla 4).

Estos resultados permiten por una parte acotar la búsqueda de interacciones entre STING y el metabolismo al relacionarlo directamente con una de las proteínas de interés (NPC1). También, las anotaciones funcionales encontradas para los genes de interés sugieren el contexto biológico en el cual se estarían dando estas interacciones. Esto debido a que en el caso de STING y NPC1 se agruparon en el *cluster* 3 de términos GO asociados a localización celular, como por ejemplo citosol, membrana y retículo endoplasmático (Tabla 4). De esta manera también se pudo agrupar a los genes inmunitarios y metabólicos de interés en el *cluster* 1 y 2 (Tabla 4), cuyos términos GO compartidos están asociados a actividad transferasa y de unión a nucleótidos (ATP) y lo más novedoso, términos GO referentes al metabolismo y biosíntesis de lípidos, respectivamente. Todo esto permite inferir que STING estaría participando junto a las enzimas del metabolismo lipídico bajo los mismos contextos biológicos y estarían relacionados en la red biológica de los organismos *Mus musculus* y *Homo sapiens*, lo cual, refuerza la premisa de que STING estaría participando en procesos metabólicos de una manera no descrita hasta el momento.

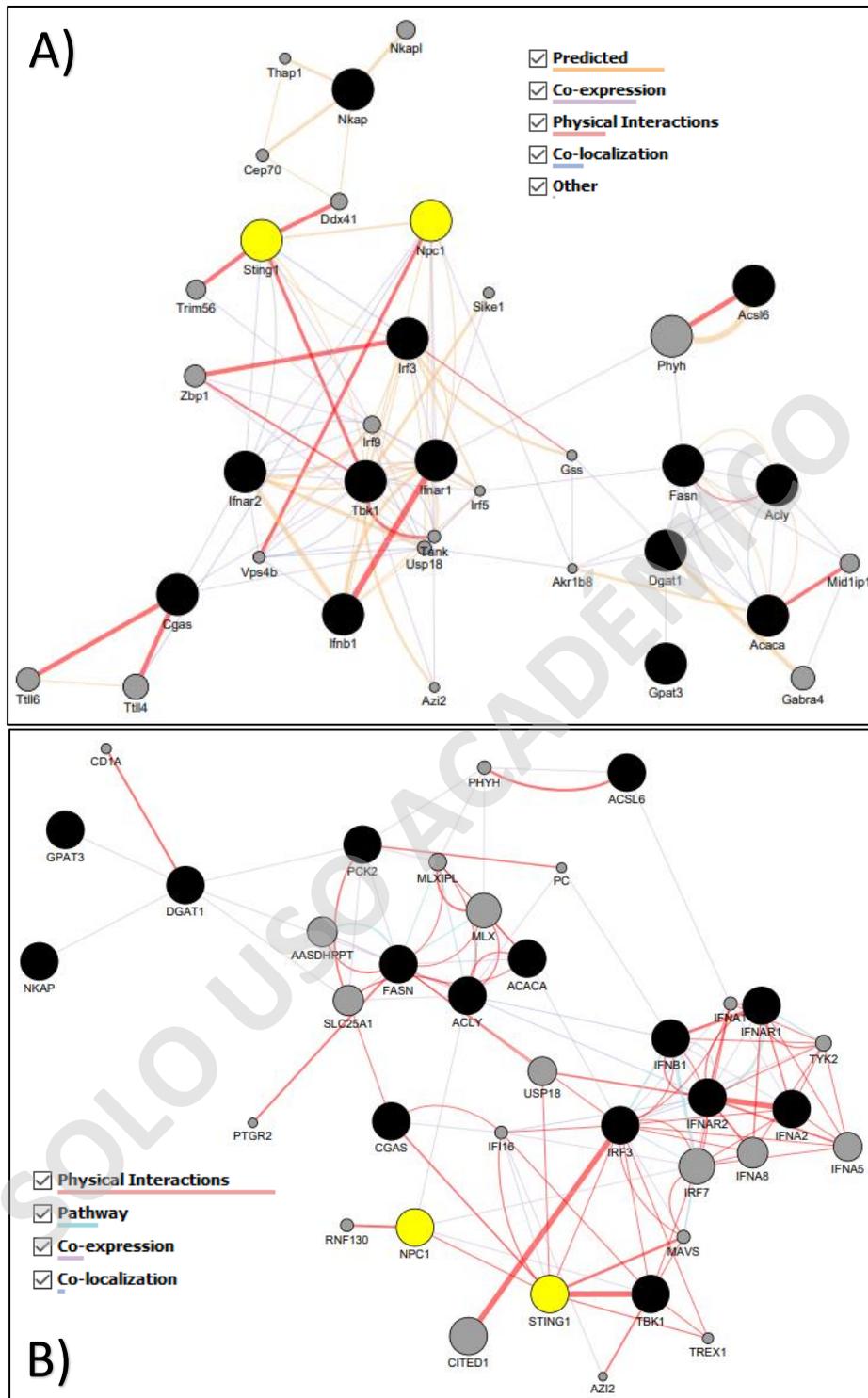


Figura 23. Red de interacción de genes que codifican para las proteínas que participan en la vía de señalización de STING y en el metabolismo de los lípidos. A) red de interacción generada para ratón, B) red de interacción generada para humano. En negro se muestran los nodos de genes consultados y en gris aquellos más relacionados a ellos según la búsqueda, en amarillo se resaltó a STING y a NPC1. Los tipos de conexiones se muestran a un costado de la figura para mejor entendimiento visual. Estas son: interacciones físicas (rojo), vías de señalización (celeste), co-expresión (lila), co-localización (azul) y predichas (mostaza).

4.9 El gen *Tmem173* se expresa mayormente en células de la FEV en comparación con adipocitos, en el tejido adiposo de ratones jóvenes

Dado que se ha documentado la expresión de STING en diferentes células inmunes que componen los tejidos metabólicos, no se ha determinado hasta nuestro conocimiento, qué tipo celular tiene una mayor o menor expresión del gen *Tmem173* que codifica para STING. Para esto, se realizó un análisis *in silico* de la expresión de *Sting* en adipocitos y en la fracción estromal vascular de ratones de 2 meses de edad. En primer lugar, se obtuvo el recuento de lecturas (*Counts*) para cada gen a partir de los archivos BAM del dataset utilizado. A partir de la normalización de estos *Counts*, se determinaron los valores Fold change \log_2 (FC) para determinar la expresión diferencial de STING por tipo celular. Se determinó un valor FC de 0,240 en células de la FEV y un valor FC de 0,150 en adipocitos de las muestras analizadas, indicando que los ratones de 2 meses de edad expresan mayores niveles de STING en la FEV en comparación con los adipocitos (Figura 24).

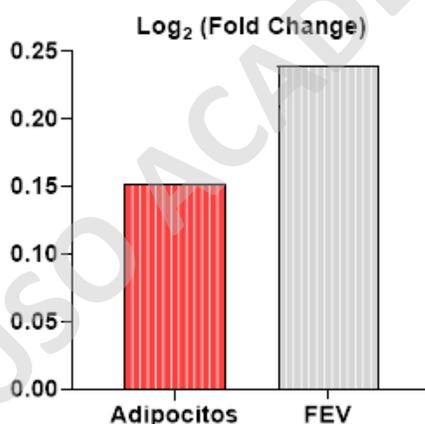


Figura 24. El gen *Tmem173* se expresa mayormente en células de la Fracción Estromal Vascular en comparación con adipocitos. Valores de expresión en Log₂ (Fold Change) asignados para el gen *Tmem173* en células de la fracción estromal vascular (FEV) (rojo) y adipocitos (gris). Valores obtenidos mediante paquete estadístico DESeq2.

4.10 El gen *Tmem173* se encuentra menormente expresado en tejido adiposo de ratones con obesidad inducida por dieta

Se siguió un flujo de trabajo computacional (Figura 15) para determinar los niveles de expresión de los genes que codifican para las proteínas de la vía de señalización de STING en condiciones control versus obesidad, y además en edades jóvenes versus envejecidas.

Se obtuvo el recuento de las lecturas (*Counts*) a partir de archivos BAM del dataset utilizado para cada gen de interés (Tabla 3) (Figura 25 a). A partir de estos de *Counts* se determinó la expresión diferencial, encontrando una expresión disminuida del gen *Tmem173*, con un *Fold Change* (FC) de -0,129 en el tejido adiposo de ratones macho con obesidad inducida por una dieta alta en grasas y no así en el tejido adiposo de ratones control (Figura 25 b y c). Así mismo, se expresan *Tbk1*, *Ifnar2* y *Mb21d1* con FC de -0,018, -0,101 y -0,139 respectivamente. Por el contrario, se encontró que *Nfkb*, *Ifnar1* e *Irf3* se sobre-expresan en el tejido adiposo de ratones obesos con FC de 0,023, 0,034 y 0,115 respectivamente. Por otra parte, no se detectó expresión de IFN- α e IFN- β en este dataset (Figura 25).

4.11 El gen *Tmem173* se encuentra menormente expresado en el tejido adiposo de ratones envejecidos

Para un segundo dataset de ratón, también se obtuvo una expresión disminuida del gen *Tmem173* con un *Fold Change* (FC) de -0,200 en el tejido adiposo de ratones envejecidos (21 meses) y no así en el tejido adiposo de ratones jóvenes (3 meses) (Figura 26 b). Así mismo, se expresan *Tbk1*, *Ifnar2* y *Mb21d1* con FC de -0,028, -0,110 y -0,139 respectivamente. Por el contrario, se encontró que *Nfkb*, *Ifnar1* e *Irf3* se sobre-expresan en el tejido adiposo de ratones envejecidos con FC de 0,030, 0,034 y 0,120 respectivamente. En este dataset tampoco fue posible detectar expresión de Interferones alfa y beta (Figura 26 b).

4.12 El gen *Tmem173* tiene una expresión reducida en tejido hepático de ratones envejecidos

Para este dataset, se determinó una expresión disminuida del gen *Tmem173* con un FC de -0,013 en el tejido hepático de ratones envejecidos y no así en el tejido adiposo de ratones jóvenes (Figura 27). De igual manera se expresan *Nfkb* (*Nkap* en este dataset), *Ifnar2* y *Tbk1* con FC de -0,025, -0,082 y -0,349 respectivamente (Figura 27 b y c). Tampoco fue posible detectar expresión de interferón alfa en este dataset, por otra parte, se entró que los genes *Ifnb1*, *Ifnar1*, *Irf3* y *Mb21d1* tienen una sobre-expresión en el tejido hepático de ratones envejecidos con FC de 0,017; 0,025; 0,186 y 0,191 respectivamente (Figura 27 b y c). Adicionalmente, se obtuvieron resultados similares a los observados en los datasets de ratón, para datasets humanos (Valores FC obtenidos en material suplementario 9.2). Es por ello que las siguientes figuras exhiben los resultados únicamente de datasets de ratón (Figuras 25 a 27).

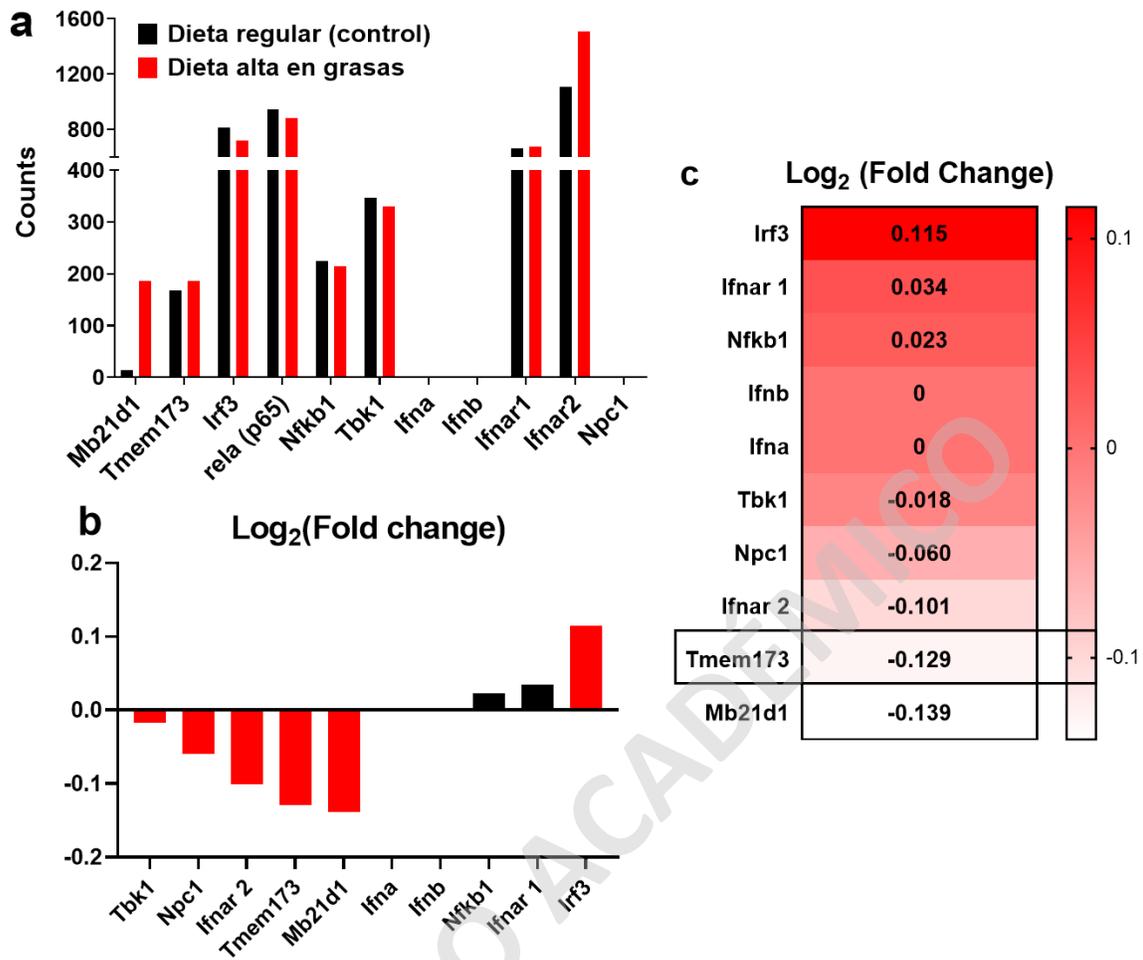


Figura 25. El gen Tmem173 se encuentra menormente expresado en tejido adiposo de ratones con obesidad inducida por dieta. En **A** se muestra el número de lecturas (*Counts*) que la herramienta *FeatureCounts* le asignó a cada gen de interés dentro del dataset, a partir de los archivos BAM de este dataset. En **B** se muestran los valores Log₂ (*Fold Change*) $p > 0,005$ obtenidos a partir de la normalización ejecutada por el paquete estadístico DESeq2.

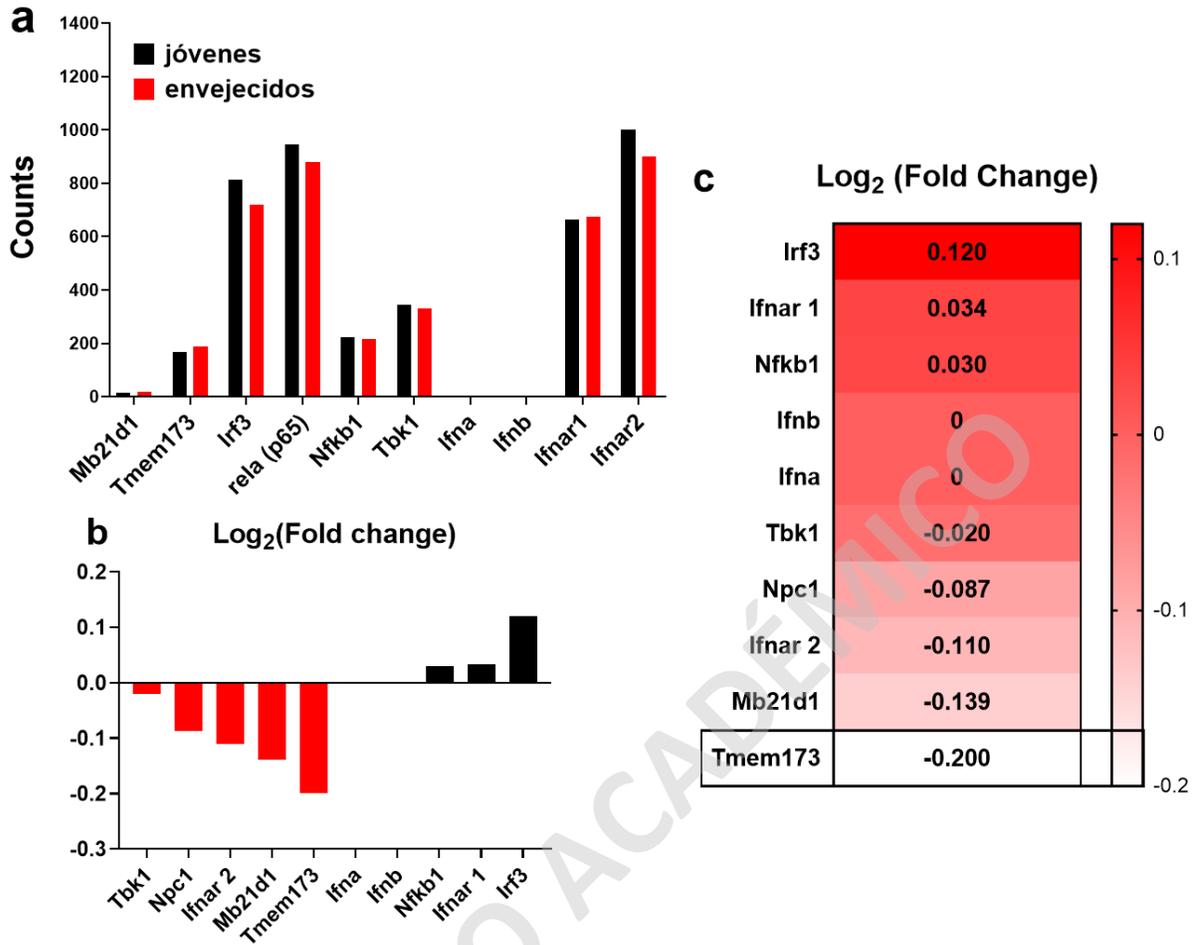


Figura 26. El gen Tmem173 se encuentra menormente expresado en el tejido adiposo de ratones envejecidos. En **A** se muestra el número de lecturas (*Counts*) que la herramienta *FeatureCounts* le asignó a cada gen de interés dentro del dataset, a partir de los archivos BAM de este dataset. En **B** se muestran los valores $\text{Log}_2(\text{Fold Change})$ $p > 0,005$ obtenidos a partir de la normalización ejecutada por el paquete estadístico DESeq2.

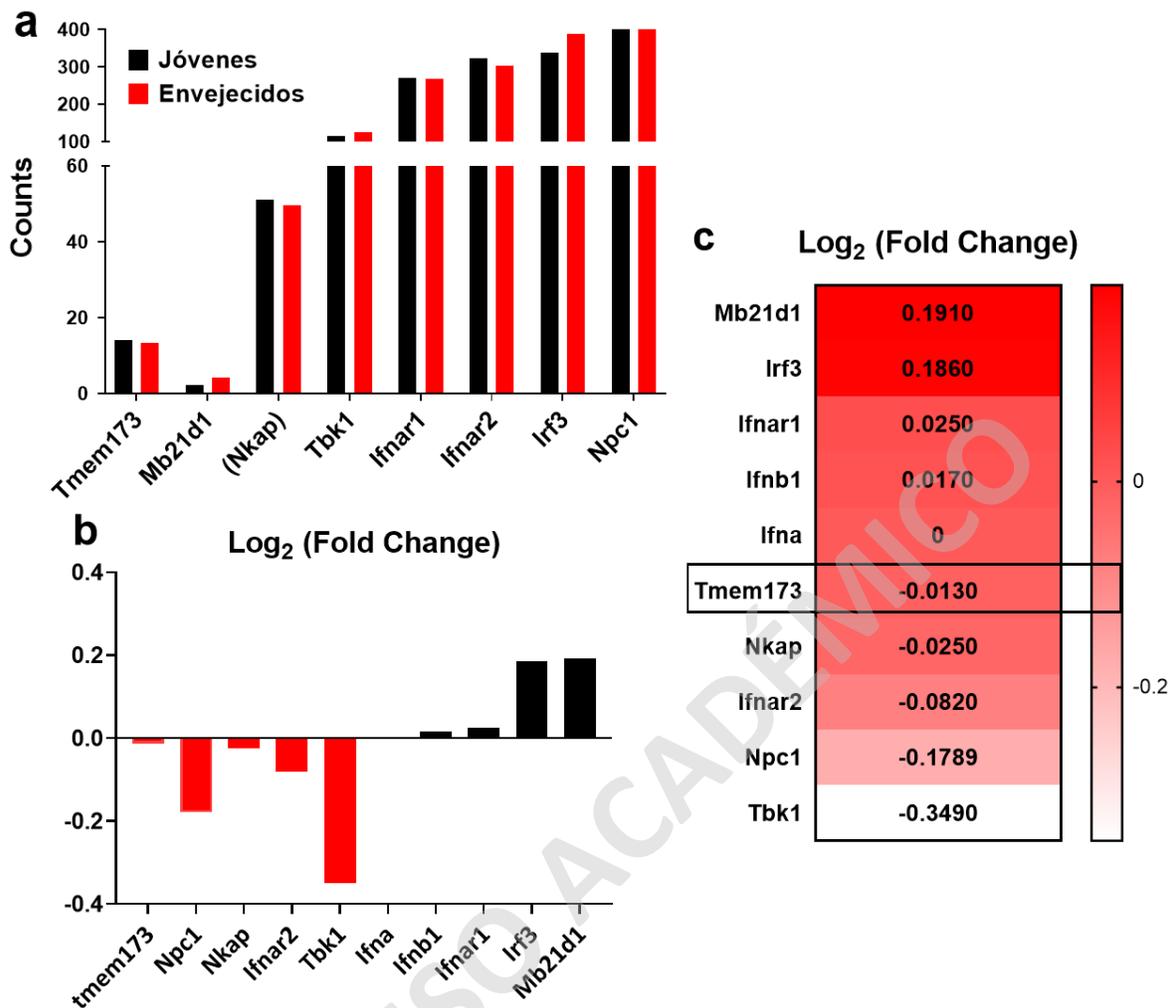


Figura 27. El gen *Tmem173* tiene una expresión reducida en tejido hepático de ratones envejecidos. En **A** se muestra el número de lecturas (*Counts*) que la herramienta *FeatureCounts* le asignó a cada gen de interés dentro del dataset, a partir de los archivos BAM de este dataset. En **B** se muestran los valores $\text{Log}_2(\text{Fold Change})$ $p > 0,005$ obtenidos a partir de la normalización ejecutada por el paquete estadístico DESeq2.

Estos resultados de expresión diferencial en ratón dan cuenta a una expresión con regulación a la baja (*down-regulated*) del gen *Tmem173* tanto en tejido adiposo como tejido hepático, en obesidad y a mayor edad. Así mismo, al analizar la expresión de *Tmem173* junto con *Npc1* en estos tejidos, se encontró que esta expresión fue compartida bajo las mismas condiciones (Figuras 25 a 27), reforzando la potencial interacción directa entre STING y NPC1 encontrada en las redes de la Figura 23. .

5. DISCUSIÓN

La obesidad es un problema de salud pública en la sociedad moderna que debe abordarse con urgencia, siendo una de las principales causantes, la ingesta excesiva de nutrientes que excede el gasto energético (3,6). Con el tiempo, se han desarrollado múltiples estrategias terapéuticas con el propósito de prevenir o revertir este problema de salud, ya que pese a ser tratable en la mayoría de los casos, es responsable de 4,7 millones de muertes prematuras anuales en casi todo el mundo (3,10,12). Uno de los enfoques para abordar esta enfermedad es la intervención farmacológica de moléculas o sus vías de señalización asociadas a la fisiopatología de la obesidad, es por esto que surge la oportunidad de indagar en algunas de ellas (23). En este trabajo, se evaluó la contribución de la proteína STING en el metabolismo lipídico. Para lo cual se usaron ratones STINGKO (Full KO) de JAX® MICE&SERVICES (código 025805) nulos para la proteína STING en todos los tejidos y en todas las etapas del desarrollo (110).

Al comparar los pesos corporales de ratones WT frente a STINGKO se encontró que estos últimos pesan entre 10 a 15 gramos promedio más que los WT (Figuras 16 y 17), alcanzando valores por sobre la media establecida para ratones WT adultos (111,112). Esta diferencia se logró apreciar en todos los grupos etarios evaluados en la medición de peso único junto con peso e ingesta de alimento realizada durante un mes y medio consecutivo (Figura 17). Este resultado discrepa de lo descrito en la literatura ya que se ha mencionado que la activación de esta vía promueve la obesidad y el desarrollo de algunas enfermedades metabólicas. Por el contrario, se ha descrito que al suprimir a STING (ratones STINGKO Gt/Gt (Jaxmice) se genera una protección frente la obesidad y disminuye el peso corporal (71,76,77,113).

Ahora bien, las conductas sedentarias se correlacionan estrechamente con el desarrollo de la obesidad, por eso en este trabajo se consideró el sedentarismo como un parámetro importante a evaluar como explicación al incremento de peso observado en los ratones STINGKO (26,27). La prueba de Campo Abierto es un ensayo que evalúa principalmente la conducta de los roedores, pero también la actividad locomotora y la falta de ella, en un ambiente de ejercicio libre (114–116). Los resultados de esta prueba sugieren que el incremento de peso en los ratones STINGKO no se debe a una disminución de la actividad locomotora, ya que, recorren las mismas distancias que los WT, lo cual también se puede interpretar como una ausencia de conductas sedentarias (Figura 18) (117). Esto concuerda con otro estudio donde se midió la distancia recorrida entre ratones WT y STINGKO, sin embargo, es necesario mencionar que en este estudio el KO utilizado fue el ratón STING fl/fl (Jaxmice), diferente al utilizado en esta tesis y se usó para conocer la contribución de la proteína STING en el desarrollo cerebral (118).

Otro factor a considerar en el desarrollo de la obesidad es la disfunción muscular global que se ha reportado durante la última década en humanos obesos y en modelos animales inducidos con *High Fat Diet* (HFD) (28). Es por esto que en este trabajo se realizó la prueba de suspensión, el cuál es un ensayo estandarizado, y ampliamente descrito que permite evaluar la función muscular global y la fatiga en roedores (92,119). Se encontró que los ratones WT presentaron un rendimiento mejor en comparación a los STINGKO, reflejado en su capacidad de mantenerse suspendidos por el tiempo total de la prueba, a diferencia de los ratones STINGKO, que se fatigan rápidamente y caen en un periodo de tiempo mucho menor (Figura 18). A pesar de que no se tienen reportes de estudios previos donde ratones STINGKO ejecutaran esta prueba, los resultados sugieren que el incremento de peso en estos animales no se debería a una diferencia de mayor masa muscular, y el desempeño podría estar influenciado por el incremento de peso corporal y la pérdida progresiva natural de la fuerza a edades más avanzadas como ocurre en humanos, la cual, se caracteriza por una pérdida involuntaria de masa muscular esquelética que contribuyen a la discapacidad y pérdida de la independencia del individuo (28,120).

La acumulación de una cantidad excesiva de grasa corporal induce una diversidad de anomalías que afectan el metabolismo de los lípidos y la glucosa principalmente, dando origen a enfermedades como la resistencia a la insulina, dislipidemias (concentraciones altas de TG y colesterol plasmáticos), enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD), prediabetes y diabetes tipo 2 (88,121). Estas anomalías pueden ser detectadas a través de pruebas rutinarias para determinar si los niveles de ciertos parámetros bioquímicos pertenecen a rangos normales o alterados (96,97). Es así como el incremento de peso observado en este trabajo, sumado al aumento en los parámetros bioquímicos de colesterol y triglicéridos, los análisis de tejido adiposo y la evaluación histológica del tejido hepático, documentan que estos ratones STINGKO presentan una acumulación excesiva de grasas (considerado como un estado de obesidad) (Figuras 16 y 17, 20 a 22) (111,112).

Por otra parte, la obesidad influencia tanto la acción de insulina como la función de las células β pancreáticas (121). Una disminución de la función de las células β provoca un descenso progresivo del control glucémico, dada la disfunción en la secreción adecuada de insulina, lo que da lugar a la prediabetes y en última instancia, a la diabetes de tipo 2 (122,123). Esto genera un aumento tanto en la glucemia en ayunas y la glucemia posprandial (nivel de glucosa en sangre tras la ingesta de alimento) (121). Dados estos antecedentes se esperaba que los niveles de glucosa circulante estuvieran más altos en los ratones STINGKO, sin embargo, no se encontraron diferencias significativas (Figura 22 a-c).

Lo anterior podría deberse a que en este estudio se obtuvo un valor de glucosa basal, que por lo general presenta valores normales en pacientes obesos (121), y no se realizó una medición más completa a diferentes intervalos de tiempo previo y posterior a la ingesta de alimento. Es por esto que en un futuro sería ideal realizar mediciones de glicemia en ayunas y postprandial, como también, medir la curva de insulina para asegurar si existen diferencias entre los ratones WT y STINGKO. Este resultado contradice el estudio de Yongsheng Yu y cols. donde se encontró una mayor concentración de glucosa circulante en ratones STINGKO. Sin embargo, en este estudio utilizaron ratones STINGKO^{Gt/Gt} (Golden ticket), los cuales expresan a STING, pero esta proteína carece del motivo que permite la unión de la proteína a TBK1, y por lo tanto, no realiza la señalización río abajo, a diferencia de nuestro KO, en el que la proteína STING está completamente ausente (77,124).

En este trabajo se evidenció que los ratones STINGKO muestran una obesidad espontánea no inducida ya sea, por mayor ingesta de alimento, o por la utilización de fórmulas dietarias altas en grasas. Estos son parámetros relevantes de destacar, ya que, los animales WT y STINGKO usados en este estudio fueron alimentados siempre con la fórmula dietaria estándar del bioterio, compuesta por un 26,126% proteína, contenido graso de 14,377% y carbohidratos 59,497% (125). Mientras que en estudios en los que han vinculado a la proteína STING con obesidad o metabolismo, han utilizado fórmulas dietarias altas en grasas HFD con un 45 o 60% de contenido graso para inducir obesidad o han utilizado modelos de ratón obesos como el ob/ob por ejemplo (76,126,127). También es necesario tener en cuenta que en la literatura, se induce la obesidad en etapas juveniles del desarrollo animal, desde las 8 semanas hasta edades adultas de 6 meses de vida aproximadamente (76,126). En cambio, en este estudio se usaron rangos de edades que van desde las juveniles de entre 1 a 4 meses, adultos entre 12 y 15 meses y envejecidos de entre 20 a 24 meses (Tabla 3).

Otro aspecto que necesita abordarse es la diversidad de ratones STINGKO que se usa en la literatura, siendo el STINGKO^{Gt/Gt} (Golden ticket), el mayormente utilizado hasta el momento, los cuales tienen un alelo mutante sin sentido I199N del gen *Sting*, que expresa la proteína STING, pero la cual no es funcional (124). En estos animales se ha reportado que la pérdida de STING es beneficiosa para los ratones, ya que, esta pérdida de función de STING, protege frente al incremento de peso corporal y reduce parámetros metabólicos principales como la glucosa, colesterol y triglicéridos (77,127). También existen ratones STINGKO obtenidos mediante herramientas de modificación génica como Crispr-Cas9 y CreLoxp (126), en los cuales, los resultados también se contradicen a los expuestos en este trabajo (76,126).

Entonces, dado que en los otros modelos la proteína STING está presente, pero le faltan ciertas secciones o presenta mutaciones y en el caso de esta tesis la proteína simplemente no está presente (71,76,117), se puede decir que los resultados observados indicarían que hay regiones proteicas de STING que tendrían actividades celulares aún no descritas y que se relacionan con el metabolismo lipídico.

Para intentar explicar por qué la ausencia de STING podría generar acumulación de grasas en los tejidos, se realizaron análisis bioinformáticos, que permiten predecir interacciones entre STING y moléculas relacionadas al metabolismo de los lípidos. Se encontró que STING tiene una conexión con el Transportador de colesterol intracelular (NPC1) (Figura 23), que terminó siendo una interacción comprobada por el estudio de Ting-Ting Chu y cols. (2020) (128). El tráfico intracelular de colesterol mediado por NPC1 involucra a los lisosomas, cuyas funciones degradativas son fundamentales para mantener la homeostasis celular, y las alteraciones de estos procesos generan una serie de trastornos catalogados colectivamente como enfermedades de almacenamiento lisosómico (129). Una de estas enfermedades es Niemann-Pick, donde el transportador de colesterol NPC tiene un funcionamiento anormal conduciendo a la acumulación de colesterol y otros lípidos en varios tejidos del cuerpo, incluido el tejido cerebral (103,130).

Los genes que codifican para STING y NPC1 se localizan en el cromosoma 18 de ratón. *Npc1* tiene su locus en la primera banda del brazo largo (18 q11-q12), mientras que *Tmem173* tiene su locus en la segunda banda del brazo largo (18Qa11) (107,108). Ambas proteínas participan de procesos que involucran a los lisosomas (104), los cuales son orgánulos celulares degradativos y metabólicos centrales, cuyas funciones son esenciales para el funcionamiento saludable de las células y todo el organismo (105,106,129). Sirven como centros de reciclaje celular, centros de señalización críticos para la detección de energía y aminoácidos, y la regulación de la autofagia (106,129). Además, los lisosomas interactúan con otros orgánulos intracelulares (por ejemplo, las mitocondrias, el RE) para la regulación homeostática mutua (106). Por lo tanto, no es sólo que compartan loci, además están relativamente cerca con una proximidad de unas 24 Mb (128), por lo cual es muy probable que sean genes ligados y que los alelos para estos genes se heredarían juntos con mayor frecuencia bajo los mismos contextos biológicos (131,132).

Siguiendo con esta perspectiva, los resultados del análisis de anotaciones funcionales para el listado de genes de interés de la Tabla 3, entregó información sobre los posibles contextos celulares compartidos entre Tmem173 y genes del metabolismo lipídico tanto en ratón como humano. Al agrupar a Tmem173 con Npc1, Acaca y Fasn en clusters de localización celular (RE, Golgi, membranas), metabolismo lipídico global y actividad transferasa (Material suplementario 9.1) (132). Esta sería la primera aproximación hacia la contribución de STING en el metabolismo lipídico, reforzando la premisa de que STING estaría participando junto a las enzimas del metabolismo lipídico en contextos biológicos similares en la red biológica de *Mus musculus* y *Homo sapiens*, de una manera no descrita hasta el momento (132).

La expresión de STING (Tmem173) se ha reportado en diversas células no inmunitarias, sin embargo, no fue posible encontrar en la literatura una caracterización que dé cuenta qué tipo celular del tejido adiposo y hepático expresa mayores niveles de Tmem173 (76,77,126). De ahí que los resultados de este estudio indican que Tmem173 tiene una mayor expresión en la FEV en comparación a los adipocitos del tejido adiposo de ratones de 2 meses de edad. También, se cuestionó la expresión de este gen en tejido hepático, pero, por limitantes de acceso a datasets públicos para este tejido, sólo se cuenta con resultados para el tejido adiposo. Además, los resultados de expresión diferencial refuerzan la idea de que STING estaría relacionada con NPC1, ya que, ambos se están expresando bajo las mismas condiciones (Figuras 25 a 27), es decir, con una regulación a la baja (*down-regulated*) en obesidad (Figuras 25 a 27) (96). Esto, a su vez concuerda con los resultados en los que se observó un aumento del peso corporal en ausencia de STING (Figuras 16 y 17).

Ahora bien, STING es una proteína residente del RE que requiere de modificaciones postraduccionales para su activación y de la señalización río abajo para la respuesta de IFN I, como son la fosforilación, ubiquitinación, y la palmitoilación en el aparato de Golgi (132,133). Además, necesita de una degradación mediada por el tráfico para salir del RE en vesículas hacia los lisosomas y evitar la sobre inmunización (84). En relación a esto, recientemente, se hizo un estudio en el cual se identificó a NPC1 como un cofactor en el tráfico de STING, donde ambas proteínas interactúan y NPC1 recluta a STING hacia el lisosoma para su degradación, esto tanto en células humanas como de ratón (128). En ese trabajo se encontró que la deficiencia de NPC1 provoca la acumulación de colesterol y otros lípidos en el lisosoma, resultando en niveles bajos de colesterol en el RE, lo que permite la activación de la translocación del complejo "Proteína de unión al elemento regulador de esteroides (SBREP) - proteína activadora de la escisión de SREBP (SCAP)" (SREBP2-SCAP) desde el RE hacia el Golgi.

SREBP2 se escinde en el Golgi y el fragmento transcripcionalmente activo de SREBP2 transloca al núcleo para activar genes de síntesis de colesterol como el Elemento regulador de esteroides que se une al factor de transcripción 2 (Srebf2), 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa (Hmgcr) y 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A sintasa 1 (Hmgcs), quienes regulan el proceso normal biosintético del colesterol (128,133). Entonces, durante la síntesis de colesterol, STING interactúa con el complejo SREBP2 – SCAP en el retículo endoplasmático, en el cual SREBP2 prepara el tráfico de STING al enlazarse a él, activando así a STING, lo cual fue comprobado mediante experimentos de expresión de mRNA, *Western blot* y microscopía confocal (128). Además de esto, se concluyó que la falta de NPC1 bloquea la correcta degradación de STING y genera un aumento crónico de esta proteína (128).

En otro estudio reciente en que se demuestra la interacción entre STING y el metabolismo lipídico se encontró una interacción entre STING y las enzimas sintetizadoras de lípidos acetil-CoA carboxilasa (ACC) y sintasa de ácidos grasos (FAS) en *Drosophila melanogaster* (moscas) (89). Inclusive se vio que dSTING (*Drosophila* STING) co-localizó con ACC y FAS en la región cortical de RE del cuerpo graso de la mosca, sugiriendo un posible papel regulador de STING en la biosíntesis de lípidos, ya que, al estar ausente la función de STING en estas moscas, ambas enzimas biosintetizadoras de lípidos no pudieron localizarse correctamente en su compartimento normal, resultando en actividades enzimáticas reducidas, y por lo tanto, se vio una disminución del almacenamiento de los lípidos. Además, se observó que en estas moscas ocurrió una regulación negativa de la expresión de los genes asociados al metabolismo de los lípidos (89).

Propuesta de las interacciones que tendría STING con enzimas del metabolismo lipídico

Tomando en cuenta los resultados de este trabajo junto con lo descrito en la literatura, especialmente estos dos últimos estudios, se propone que STING es un adaptador de la localización y tráfico subcelular de enzimas involucradas en la síntesis y transporte del metabolismo lipídico como son ACC, FAS y NPC1 (Figura 28). Estas enzimas se expresan de manera ubicua en una amplia variedad de tejidos, teniendo mayor expresión en tejido adiposo subcutáneo que en tejido hepático (134–137). De manera tal que, en la normalidad STING estaría interactuando con estos complejos enzimáticos específicamente en los lisosomas. Además de lo anterior, estaría ocurriendo un mecanismo de retroalimentación negativa en el que se induzca la degradación correcta de STING para prevenir una activación prolongada de la vía, ergo, la producción excesiva de IFN y citoquinas pro-inflamatorias que en altas cantidades pueden ser dañinas.

Entonces, al no estar STING durante toda la vida de un individuo, esto daría paso a la localización alterada de proteínas involucradas en la síntesis y transporte de lípidos generando por un lado: 1) una disminución en la síntesis *de novo* de ácidos grasos por la disminución de la actividad de ACC y FAS, pero, 2) una acumulación de colesterol en los lisosomas al disminuir NPC1, dando paso a la acumulación de grasa en los adipocitos principalmente, en vez de ser utilizadas como fuente de energía en el músculo por ejemplo.

Es probable que la delección y/o mutaciones de STING no tengan relación con la generación de obesidad, sino que, quizás la pérdida de interacciones con otras proteínas a través de sus dominios de transmembrana sea la que genere este cambio. Específicamente, se propone en este trabajo, que la interacción de STING con enzimas del metabolismo lipídico, las que residen también en sistemas de endomembranas, podría regular el movimiento (tráfico subcelular) y por ende, el destino y la correcta funcionalidad de este grupo de enzimas. Hasta nuestro conocimiento, esta teoría no ha sido comprobada y se menciona como un mecanismo posible que explique el fenotipo observado en los ratones STINGKO.

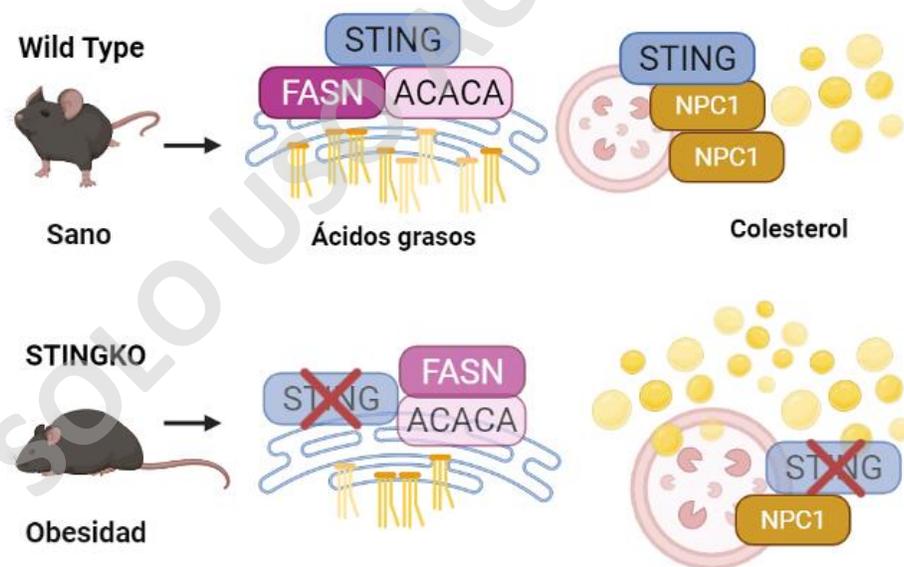


Figura 28. Modelo propuesto de las interacciones entre STING y las enzimas del metabolismo lipídico. STING en azul, FAS en burdeo, ACC en rosado y NPC1 en café claro. Este esquema muestra las interacciones posibles que estarían ocurriendo para dar manifestación de un fenotipo obeso cuando no se tiene la función de STING. En primer lugar, estaría la contribución de STING en la localización de las enzimas lipogénicas en las membranas del retículo endoplasmático, y por otra parte estaría la acción de NPC1 como cofactor del tráfico lisosomal de STING y viceversa. Por lo tanto, en el ratón KO al faltar STING se altera la comunicación intracelular normal entre STING y las enzimas del metabolismo lipídico, de manera tal que ACC y FAS disminuirían su actividad de síntesis de ácidos grasos. Mientras que, NPC1 disminuiría en los lisosomas y, por ende, se acumularía colesterol en los lisosomas de igual forma provocando obesidad en el individuo.

6. CONCLUSIONES

El propósito de esta tesis fue evaluar la participación de la proteína STING en el metabolismo lipídico, en particular su contribución en el almacenamiento de las grasas. A partir de los resultados de este estudio se enuncian las siguientes conclusiones:

- Se evidenció un incremento significativo del peso corporal en los ratones STINGKO a todas las edades medidas.
- Este incremento en el peso corporal no estuvo asociado a una mayor ingesta de alimento, ni tampoco a una falta de actividad física. En paralelo, se observó una menor fuerza muscular global y aumento de la fatiga en los ratones STINGKO a todas las edades medidas.
- Se comprobó una mayor acumulación de grasa en los tejidos hepático y adiposo en ratones carentes de la proteína STING, acompañado de una elevada concentración sanguínea de triglicéridos y colesterol en todas las edades medidas.
- A través de los análisis *in silico* se encontraron relaciones potenciales entre STING y enzimas del metabolismo lipídico.
- Se encontró también mediante análisis bioinformáticos que el gen de STING se expresaba con regulación negativa en condiciones de obesidad y en edades avanzadas. Adicionalmente, se demostró que los adipocitos aportan más niveles de STING con respecto a la fase estromal vascular del tejido adiposo, en ratones sanos de 2 meses de edad.
- Se propuso un modelo que plantea a STING como un regulador de la localización y tráfico subcelular de enzimas involucradas en la síntesis y transporte de lípidos como son ACC, FAS y NPC1.

Al contrastar la hipótesis planteada para este trabajo de tesis con los resultados presentados y las conclusiones obtenidas, es posible afirmar que la proteína STING participa en la regulación de la utilización/almacenamiento de las grasas o lípidos.

7. IMPLICANCIAS, RECOMENDACIONES Y/O PROYECCIONES FUTURAS

Este trabajo da luces sobre la participación de la vía de señalización de la proteína STING, en funciones diferentes a las relacionadas con el sistema inmunológico y no descritas hasta ahora, como sería la regulación de procesos como es el metabolismo lipídico. En particular, estos resultados demuestran el desarrollo espontáneo de obesidad y alteraciones en los principales marcadores clínicos de obesidad y enfermedades metabólicas en los ratones full KO para la proteína STING. Es así como el *background* genético estaría implicado en el fenotipo observado, ya que, al estar interrumpido el gen que codifica para la proteína STING, y por lo tanto, esta interrupción impide su transcripción, implica que el ratón STINGKO no exprese ningún segmento de la proteína, condición determinante para el desarrollo espontáneo o no de obesidad.

Otra de las implicancias de este estudio son las potenciales relaciones que tendría STING con enzimas del metabolismo lipídico, que a través de las interacciones moleculares propuestas dan lugar a la regulación del tráfico subcelular, esto podría ocurrir tanto en las células pertenecientes al sistema inmune que forman parte de los tejidos metabólicos, así como también en células estructurales como la FEV, adipocitos y hepatocitos. Estas interacciones nos permiten predecir que existe una coordinación entre los productos de la señalización inmune de la proteína STING, como son las citoquinas proinflamatorias, y los productos del metabolismo lipídico como el colesterol y los ácidos grasos en una conversación dinámica organizada que no ha sido explorada.

Un aspecto para tener en consideración son algunas restricciones logísticas y operacionales, en particular que al estudiar diferencias físicas, fisiológicas y conductuales en edades avanzadas podría significar un contratiempo dada la salud deteriorada de animales envejecidos, lo cual, reduce las réplicas biológicas a medida que se van realizando los experimentos. Sin embargo, los rangos de edades utilizados en este trabajo corresponden a una guía etaria inicial para experimentos futuros. Otro factor que debe considerarse también es que la prueba de suspensión, que pese a ser un ensayo ampliamente utilizado y estandarizado, sus resultados pueden verse afectados en este caso por las diferencias de peso encontradas entre los WT y STINGKO. Por lo cual, sería ideal aplicar otras pruebas de medición de fuerza, como la prueba de fuerza de agarre ("*Grip strength*") y complementar con análisis histológicos de tejido muscular, para así confirmar o descartar la existencia de cambios morfológicos que pudiesen incidir en la funcionalidad y de esta forma explicar el resultado observado.

Se debe considerar también que, pese a lo conveniente de los análisis de expresión diferencial, estos fueron realizados con muestras de ratones sanos u obesos, pero no en ratones carentes de STING. Por lo tanto, aunque han resultado esclarecedores respecto a la expresión de STING en los tejidos de interés para este estudio, también hay un factor de *background* genético a considerar. Paralelamente, se propone un modelo de las potenciales interacciones a través de las cuales se explicaría el fenómeno observado, no se ha comprobado experimentalmente aún y sería un aporte poder demostrar esta hipótesis, dado que se estaría demostrando una nueva función de esta proteína.

Tomando los antecedentes de implicancias, consideraciones y limitantes expuestas en este capítulo, surgen las siguientes proyecciones para continuar a futuro:

- Secuenciación de RNA de los ratones STINGKO para analizar los cambios en el transcriptoma de estos animales, idealmente del tejido adiposo y hepático, en los diferentes rangos etarios utilizados en este estudio. De esta forma es posible conocer los niveles de expresión reales de los componentes de la vía de señalización de STING y las enzimas del metabolismo lipídico. Adicionalmente, realizar secuenciación *single-cell* de adipocitos, hepatocitos y los macrófagos residentes del tejido adiposo y hepático principalmente, de ratones WT en los rangos etarios utilizados en este estudio para conocer qué tipo celular aporta más respecto a la expresión de la proteína STING con respecto al otro.
- Experimentos de co-localización de la proteína STING con marcadores lisosomales y enzimas del metabolismo lipídico, para dilucidar las interacciones propuestas que se estarían dando en el tejido adiposo y hepático, que expliquen el fenómeno observado.
- Como **proyección biotecnológica**, se propone el desarrollo de un ensayo de ELISA para la detección de STING y su posterior uso clínico como un biomarcador en la obtención de diagnósticos preventivos para la obesidad (Figura 29).

En el mercado existen kits comerciales capaces de detectar proteínas intracelulares (138–141), sin embargo, no se ha creado uno para detectar la proteína STING directamente. En vista de que se ha demostrado que se puede detectar los niveles de STING en la sangre (linfocitos circulantes y monocitos) (142–146), se esperaría que este ensayo pudiese predecir de forma cuantitativa y específica los cambios en los niveles de STING o p-STING (fosfo-STING) en la sangre de pacientes, convirtiéndolo en una alternativa de fácil detección.

Las aproximaciones por seguir para el desarrollo del kit preventivo deberían incluir varios pasos de estandarización, comenzando por establecer los niveles normales de la proteína en rangos de edades juveniles, adultas y envejecidas, en personas sanas, y por sexo. Con esto se podrá diferenciar en las diferentes edades los niveles de STING y considerarlos como reducidos o aumentados. Lo siguiente sería demostrar que en la población de pacientes con sobrepeso y obesos, y con enfermedades metabólicas, que STING se reduce.

Visto de esta forma entonces, se propone la creación de un kit preventivo para ser usado en clínica que aproveche la tecnología del ensayo “*In-Cell ELISA*” (140,141), que es un método colorimétrico simple y conveniente para cuantificar las proteínas intracelulares en células enteras. Esto permitiría la medición de STING en células sanguíneas, sin necesidad de obtener un lisado celular, aplicando una tinción de células enteras con un tiempo mínimo de intervención, con la especificidad y reproducibilidad de un ELISA convencional. Es así como una vez obtenida la tabla de valores de STING en sangre en un número muy amplio de individuos con las características mencionadas, y así generar el producto final (kit), el personal de salud podría usar los valores determinados de STING como un biomarcador temprano en el desarrollo de la obesidad o de enfermedades metabólicas asociadas al metabolismo lipídico. Así se podrían obtener diagnósticos tempranos y preventivos para la obesidad a diferentes edades.

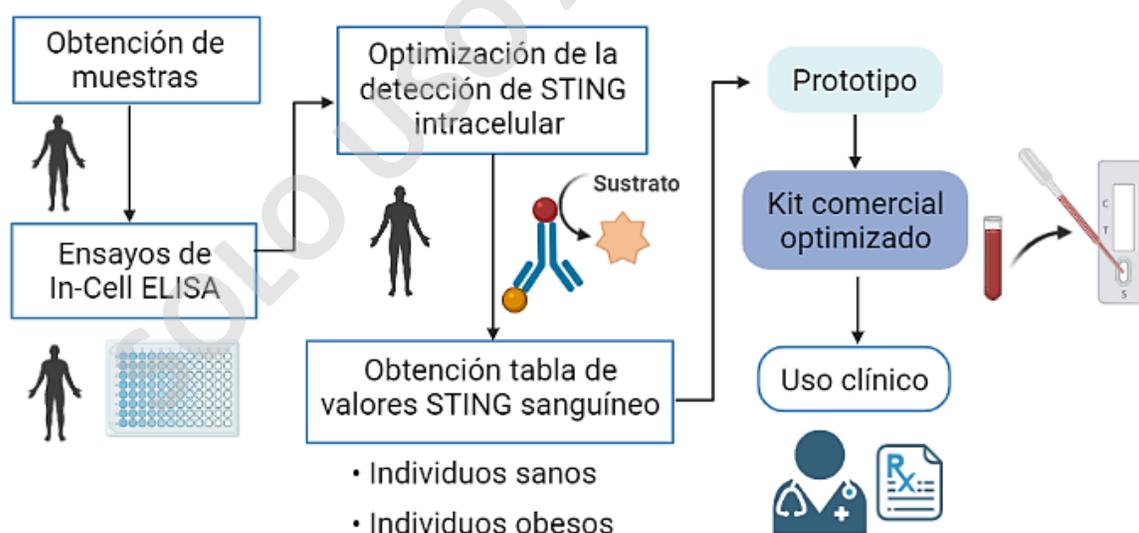


Figura 29. Esquema del desarrollo de un futuro kit de detección de STING. A partir de la obtención de muestras humanas se pretende detectar a STING mediante ensayos de *In-cell ELISA* para su posterior optimización y proceder a medir los niveles de esta proteína para determinar los rangos normales en individuos sanos. Posteriormente, se medirán los niveles de STING en pacientes obesos para determinar que se reduce en esta condición y así proceder con el prototipo del kit comercial para la detección de STING sanguíneo, el cual, servirá para obtener diagnósticos preventivos de la obesidad y otras patologías metabólicas. Creado en Biorender por Catalina Guerra (2022).

8. REFERENCIAS

1. Centro de Biología Integrativa | U. Mayor [Internet]. [cited 2021 Apr 30]. Available from: <https://cib.umayor.cl/about>
2. Centro de Genómica y Bioinformática - Universidad Mayor [Internet]. [cited 2021 Jun 3]. Available from: <https://cgb.umayor.cl/nosotros>
3. Organización Mundial de la Salud. Obesidad y sobrepeso [Internet]. 2021 [cited 2021 Jul 5]. Available from: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>
4. Upadhyay J, Farr O, Perakakis N, Ghaly W, Mantzoros C. Obesity as a Disease. *Med Clin North Am* [Internet]. 2018;102(1):13–33. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.mcna.2017.08.004>
5. Flores C. Especial sobre obesidad: la otra pandemia [Internet]. 2021 [cited 2021 Sep 16]. Available from: <https://www.uchile.cl/noticias/173299/especial-sobre-obesidad-la-otra-pandemia>
6. Higuera-Hernández MF, Reyes-Cuapio E, Gutiérrez-Mendoza M, Rocha NB, Veras AB, Budde H, et al. Fighting obesity: Non-pharmacological interventions. *Clin Nutr ESPEN*. 2018;25:50–5.
7. Ralston JC, Lyons CL, Kennedy EB, Kirwan AM, Roche HM. Fatty Acids and NLRP3 Inflammasome-Mediated Inflammation in Metabolic Tissues. *Annu Rev Nutr*. 2017;37:77–102.
8. Naumnik B, Myśliwiec M. Consequences of obesity. *Case Reports Clin Pract Rev*. 2010;16(8):84–92.
9. Blancas-Flores G, Almanza-Pérez JC, López-Roa RI, Alarcón-Aguilar FJ, García-Macedo R, Cruz M. La obesidad como un proceso inflamatorio. *Bol méd Hosp Infant Méx*. 2010;67(2):88–97.
10. Blumenthal D, Seervai S. Rising Obesity in the United States Is a Public Health Crisis [Internet]. 2018 [cited 2021 Sep 16]. Available from: <https://www.commonwealthfund.org/blog/2018/rising-obesity-united-states-public-health-crisis>
11. Obesity [Internet]. [cited 2021 Sep 20]. Available from: <https://www.who.int/health-topics/obesity>

12. Ritchie H, Roser M. Causes of death - Our World in Data [Internet]. 2018 [cited 2021 Sep 16]. Available from: <https://ourworldindata.org/obesity>
13. Atalah S E. EPIDEMIOLOGÍA DE LA OBESIDAD EN CHILE. *Rev méd (La Paz)*. 2012;23(2):9–10.
14. Petermann F, Durán E, Labraña AM, Martínez MA, Leiva AM, Garrido-Méndez A, et al. Factores asociados al desarrollo de obesidad en Chile: resultados de la Encuesta Nacional de Salud 2009-2010. *Rev Med Chil [Internet]*. 2017 [cited 2021 Sep 20];145(6):716–22. Available from: <http://dx.doi.org/10.4067/s0034-98872017000600716>
15. Vio F, Albala C, Kain J. Nutrition transition in Chile revisited: mid-term evaluation of obesity goals for the period 2000-2010. *Public Health Nutr [Internet]*. 2021;11(4):405–12. Available from: <https://www.cambridge.org/core>.
16. Gobierno de Chile M de S, Bedregal P y cols. Estudio de carga de enfermedad y carga atribuible. 2008;1–101.
17. Ministerio de Salud. Encuesta Nacional de Salud 2016-2017 Primeros resultados. Dep Epidemiol Div Planif Sanit Subsecr Salud Pública [Internet]. 2017;61. Available from: http://web.minsal.cl/wp-content/uploads/2017/11/ENS-2016-17_PRIMEROS-RESULTADOS.pdf
18. MINSAL. Obesidad un problema país: Evaluación de la ley sobre composición nutricional de los alimentos y su publicidad. Gob Chile [Internet]. 2017; Available from: <https://www.minsal.cl/wp-content/uploads/2017/01/4-Proceso-de-Implementación.pdf>
19. Suárez-Carmona W, Jesús Sánchez-Oliver A, Antonio González-Jurado J, Dirigir Correspondencia SE, González A, Facultad J. ARTÍCULOS ORIGINALES Fisiopatología de la obesidad: Perspectiva actual Pathophysiology of obesity: Current view. Available from: <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-75182017000300226>
20. Mayoral LP-C, Andrade GM, Mayoral EP-C, Huerta TH, Canseco SP, Canales FJR, et al. Obesity subtypes, related biomarkers & heterogeneity. *Indian J Med Res [Internet]*. 2020 Jan 1 [cited 2021 Aug 24];151(1):11. Available from: DOI: 10.4103/ijmr.IJMR_1768_17
21. Muñoz M, Mazure RA, Culebras JM. Obesity and the immune system. *Nutr Hosp*. 2004;19(6):319–24.
22. Imperial College London WHO. Tenfold increase in childhood and adolescent obesity in four

- decades [Internet]. 2017 [cited 2021 Aug 4]. Available from: https://www3.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=13798:obesity-trends-by-imperial-college-london-and-who-2017&Itemid=42457&lang=en
23. Gonzalez-Muniesa P. Obesity. *Nat Rev Dis Prim.* 2017;3(17034):1–18.
 24. Garcia-Estañ J, Helena Hryciw D, La Cava A, Matarese G, Francisco V, Pino J, et al. Obesity, Fat Mass and Immune System: Role for Leptin. 2018; Available from: www.frontiersin.org
 25. San-Cristobal R, Navas-Carretero S. Contribution of macronutrients to obesity: implications for precision nutrition. *Nat Rev Endocrinol.* 2020;(16):305–20.
 26. Martínez-Gómez D, Eisenmann JC, Gómez-Martínez S, Veses A, Marcos A, Veiga OL. Sedentarismo, adiposidad y factores de riesgo cardiovascular en adolescentes. Estudio AFINOS. *Rev Española Cardiol [Internet].* 2010 Mar 1 [cited 2021 Sep 21];63(3):277–85. Available from: <http://www.revespcardiol.org/es-sedentarismo-adiposidad-factores-riesgo-cardiovascular-articulo-13147695>
 27. Leiva AM, Adela Martínez M, Cristi-Montero C, Salas C. El sedentarismo se asocia a un incremento de factores de riesgo cardiovascular y metabólicos independiente de los niveles de actividad física. Vol. 145, *Rev Med Chile.* 2017.
 28. Bollinger LM. Potential contributions of skeletal muscle contractile dysfunction to altered biomechanics in obesity. *Gait Posture [Internet].* 2017;56(May):100–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.gaitpost.2017.05.003>
 29. Kornberg H. Metabolism - biology [Internet]. 2021. Available from: <https://www.britannica.com/science/metabolism>
 30. Blanco, A. Blanco, G. Metabolism. In: *Medical biochemistry.* Elsevier. 2017;275–81.
 31. Blüher M, Mantzoros CS. From leptin to other adipokines in health and disease: Facts and expectations at the beginning of the 21st century. *Metabolism [Internet].* 2015 Jan;64(1):131–45. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0026049514003102>
 32. Martínez JA, Martí A. Metabolismo lipídico y lipogénesis : aplicación de isótopos estables.
 33. Domínguez M, Colmenero J, Bataller R. Treatment of liver fibrosis. *Gastroenterol Hepatol.* 2009;32(9):627–32.

34. Thompson T. Lipid - biochemistry. Encyclopedia Britannica. 2020.
35. Griffin BA. Lipid metabolism. Surgery [Internet]. 2013;31(6):267–72. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mpsur.2013.04.006>
36. Saponaro C, Gaggini M, Carli F, Gastaldelli A. The subtle balance between lipolysis and lipogenesis: A critical point in metabolic homeostasis. *Nutrients*. 2015;7(11):9453–74.
37. Wree A, Kahraman A, Gerken G, Canbay A. Obesity Affects the Liver – The Link between Adipocytes and Hepatocytes. 2011;124–33.
38. Tam BT, Morais JA, Santosa S. Obesity and ageing: Two sides of the same coin. *Obes Rev* [Internet]. 2020 Apr 1 [cited 2021 Jul 4];21(4):e12991. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/obr.12991>
39. Dashty M. Differential Role of AMP-Activated Protein Kinase in Brown and White Adipose Tissue Components and Its Consequences in Metabolic Diseases. *J Diabetes Metab*. 2016;07(07).
40. Khandekar MJ, Cohen P, Spiegelman BM. Molecular mechanisms of cancer development in obesity. *Nat Rev Cancer* [Internet]. 2011;11(12):886–95. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrc3174>
41. Frigolet ME, Gutiérrez-Aguilar R. Los colores del tejido adiposo The colors of adipose tissue GACETA MÉDICA DE MÉXICO ARTÍCULO DE REVISIÓN Correspondencia. 2020 [cited 2021 Jul 29]; Available from: www.gacetamedicademexico.com
42. Laguna M. Tejido adiposo: Definición, ubicación, función | Kenhub [Internet]. 2021 [cited 2021 Aug 24]. Available from: <https://www.kenhub.com/es/library/anatomia-es/tejido-adiposo>
43. Marcano Y, Torcat J, Ayala L, Verdi B, Lairat C, Maldonado M, et al. Funciones endocrinas del tejido adiposo. *Rev Venez Endocrinol y Metab*. 2006;4(issue 1):15–21.
44. Sánchez JC, Romero CR, Muñoz LV, Alonso Rivera R. El órgano adiposo, un arcoiris de regulación metabólica y endocrina. *Rev Cuba Endocrinol*. 2016;27(1):105–19.
45. Srikakulapu P, Mcnamara CA. B Lymphocytes and Adipose Tissue Inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2020;(May):1110–22.
46. Universidad de Navarra. Tejido adiposo - de Medicina TEMA 5. [Internet]. [cited 2021 Sep 21].

Available from: <https://www.studocu.com/es/document/universidad-de-navarra/histologia/tejido-adiposo/2430021>

47. Vega-Robledo GB, Rico-Rosillo MG. Adipose tissue: Immune function and alterations caused by obesity. *Rev Alerg Mex.* 2019;66(3):340–53.
48. AMBROSE Cell Therapy. Why Adipose Tissue? [Internet]. [cited 2021 Sep 21]. Available from: <https://ambrosecelltherapy.com/why-adipose/>
49. X. Filella, R. Molina y AM. Ballesta. Estructura y función de las citocinas. *Med Integral* 2002;39(2):63-7.
50. Sbarbati A. Subcutaneous adipose tissue classification. *Eur J HHistocHemistry.* 2010;54(e48).
51. Mariman ECM, Wang P. Adipocyte extracellular matrix composition, dynamics and role in obesity. *Cell Mol Life Sci.* 2010;67(8):1277–92.
52. Rui L. Energy metabolism in the liver. *Compr Physiol* [Internet]. 2014 [cited 2021 Jul 5];4(1):177–97. Available from: </pmc/articles/PMC4050641/>
53. Trefts E, Gannon M, Wasserman DH. *The liver.* 2018;27(21).
54. M, Ross y W, Pawlina. HISTOLOGÍA TEXTO Y ATLAS COLOR CON BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR. 5ta ° EDIC. Panamericana EM, editor. Buenos Aires; 2008.
55. Ortega-Ribera M, Yeste J, Villa R, Gracia-Sancho J. Nanoengineered Biomaterials for the treatment of liver diseases. *Nanoeng Biomater Regen Med.* 2019 Jan 1;417–41.
56. Rogers AB, Dintzis RZ. Hepatobiliary System [Internet]. *Comparative Anatomy and Histology.* Elsevier Inc.; 2018. 229–239 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-802900-8.00013-0>
57. Victor P-C, Eric OP. Liver. *Pediatrics.* 2004;113(4):1097.
58. Wieser V, Adolph TE, Grander C, Grabherr F, Enrich B, Moser P, et al. Adipose type i interferon signalling protects against metabolic dysfunction. *Gut.* 2018;67(1):157–65.
59. Sol DEL. Anatomía Quirúrgica y Radiológica del Hígado . *Fundamentos para las Resecciones Hepáticas.* 2017;35(4):1525–39.
60. Stenvall A, Larsson E, Strand SE, Jönsson BA. A small-scale anatomical dosimetry model of the

liver. *Phys Med Biol*. 2014;59(13):3353–71.

61. Gregor MF, Hotamisligil GS. Inflammatory mechanisms in obesity. *Annu Rev Immunol*. 2011;29:415–45.
62. López de Heredia U. Las técnicas de secuenciación masiva en el estudio de la diversidad biológica. *Munibe Ciencias Nat*. 2016;64:7–31.
63. Gater DR, Farkas GJ, Tiozzo E. Pathophysiology of Neurogenic Obesity After Spinal Cord Injury. *Top Spinal Cord Inj Rehabil*. 2021;27(1):1–10.
64. Hotamisligil GS. Foundations of Immunometabolism and Implications for Metabolic Health and Disease. *Immunity*. 2017;47(3):406–20.
65. Marchesini G, Moscatiello S, Domizio S Di, Forlani G. Obesity-Associated Liver Disease. 2008;93(November):74–80.
66. Bray GA. Obesity is a chronic, relapsing neurochemical disease. *Int J Obes*. 2004;28(1):34–8.
67. Dees C, Chakraborty D, Distler JHW. Cellular and molecular mechanisms in fibrosis. *Exp Dermatol*. 2021;30(1):121–31.
68. Daemen S, Schilling JD. The Interplay Between Tissue Niche and Macrophage Cellular Metabolism in Obesity. Vol. 10, *Frontiers in Immunology*. 2020.
69. Hardy T, Oakley F, Anstee QM, Day CP. Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Pathogenesis and Disease Spectrum. *Annu Rev Pathol Mech Dis*. 2016;11:451–96.
70. Hansen HH, Ægidius HM, Oró D, Evers SS, Heebøll S, Eriksen PL, et al. Human translatability of the GAN diet-induced obese mouse model of non-alcoholic steatohepatitis. *BMC Gastroenterol*. 2020;20(1):1–12.
71. Bai J, Liu F. The cGAS-cGAMP-STING pathway: A molecular link between immunity and metabolism. *Diabetes*. 2019;68(6):1099–108.
72. Marti A, Marcos A, Jaobesity M, Rev O, Martí A, Marcos A, et al. Marti A, Marcos A, Martinez JAObesity and immune function relationships. *Obes Rev* 2: 131-140. 2001;(January 2018):131–40.
73. Go S. 5th International Immunonutrition Workshop Chronic and degenerative diseases Obesity,

inflammation and the immune system *Proceedings of the Nutrition Society*. 2021;(March 2012):332–8.

74. Diseases NI of D and D and K. Treatment for Overweight & Obesity [Internet]. 2018. Available from: <https://www.niddk.nih.gov/health-information/weight-management/adult-overweight-obesity/treatment>
75. Loos RJF, Rankinen T. Gene-Diet Interactions on Body Weight Changes. 2005;29–34.
76. Bai J, Cervantes C, Liu J, He S, Zhou H, Zhang B, et al. DsbA-L prevents obesity-induced inflammation and insulin resistance by suppressing the mtDNA release-activated cGAS-cGAMP-STING pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017;114(46):12196–201.
77. Yu Y, Liu Y, An W, Song J, Zhang Y, Zhao X. STING-mediated inflammation in Kupffer cells contributes to progression of nonalcoholic steatohepatitis. *J Clin Invest*. 2019;129(2):546–55.
78. The Human Protein Atlas. TMEM173 The Human Protein Atlas project. Available from: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000184584-TMEM173/cell>
79. Ishikawa H, Barber GN. STING is an endoplasmic reticulum adaptor that facilitates innate immune signalling. *Nat* 2008 4557213 [Internet]. 2008 Aug 24 [cited 2021 Sep 21];455(7213):674–8. Available from: <https://doi.org/10.1038/nature07317>
80. Ergun SL, Li L. Structural Insights into STING Signaling. *Trends Cell Biol* [Internet]. 2020;30(5):399–407. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2020.01.010>
81. Galluzzi L, Vanpouille-Box C, Bakhom SF, Demaria S. SnapShot: CGAS-STING Signaling. *Cell* [Internet]. 2018;173(1):276–276.e1. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2018.03.015>
82. Motwani M, Pesiridis S, Fitzgerald KA. DNA sensing by the cGAS–STING pathway in health and disease [Internet]. Vol. 20, *Nature Reviews Genetics*. Nature Publishing Group; 2019 [cited 2021 Jul 4]. p. 657–74. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41576-019-0151-1>
83. Chen Q, Sun L, Chen ZJ. Regulation and function of the cGAS-STING pathway of cytosolic DNA sensing. *Nature Immunology* [Internet]. 2016 Sep 20 [cited 2021 Jul 4];17(10):1142–9. Available from: <https://www.nature.com/articles/ni.3558>
84. Cheng Z, Dai T, He X, Zhang Z, Xie F, Wang S, et al. The interactions between cGAS-STING

- pathway and pathogens. *Signal Transduct Target Ther* [Internet]. 2020;5(1). Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41392-020-0198-7>
85. Gao M, He Y, Tang H, Chen X, Liu S, Tao Y. cGAS/STING: novel perspectives of the classic pathway. *Mol Biomed*. 2020;1(1):1–16.
 86. Vanpouille-Box C, Demaria S, Formenti SC, Galluzzi L. Cytosolic DNA Sensing in Organismal Tumor Control. Vol. 34, *Cancer Cell*. 2018. p. 361–78.
 87. Zhao P, Wong K in, Sun X, Reilly SM, Uhm M, Liao Z, et al. TBK1 at the Crossroads of Inflammation and Energy Homeostasis in Adipose Tissue. *Cell* [Internet]. 2018 Feb 8 [cited 2021 Jul 5];172(4):731-743.e12. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29425491/>
 88. Lizarzaburu Robles JC. Síndrome metabólico: concepto y aplicación práctica. *An la Fac Med*. 2014;74(4):315.
 89. Akhmetova K, Balasov M, Chesnokov I. Drosophila STING protein has a role in lipid metabolism. *bioRxiv* [Internet]. 2021;(205):2021.02.04.429825. Available from: <https://doi.org/10.1101/2021.02.04.429825>
 90. Gould TD, Dao DT, Kovacsics CE. The Open Field Test. *Neuromethods* [Internet]. 2009 [cited 2021 Nov 12];42:1–20. Available from: https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-60761-303-9_1
 91. Open Field | Behavioral and Functional Neuroscience Laboratory | Stanford Medicine [Internet]. [cited 2021 Nov 12]. Available from: <https://med.stanford.edu/sbfnl/services/bm/sm/openfield.html>
 92. Carlson G, van Putten M, Aartsma-Rus A. The use of four limb hanging tests to monitor muscle strength and condition over time. *Treat-NmdEu*. 2011;(DMD_M.2.1.005):1–11.
 93. Sethunath D, Morusu S, Tuceryan M, Cummings OW, Zhang H, Yin XM, et al. Automated assessment of steatosis in murine fatty liver. Vol. 13, *PLoS ONE*. 2018.
 94. Paul Shannon 1, Andrew Markiel 1, Owen Ozier, 2 Nitin S. Baliga, 1 Jonathan T. Wang, 2 Daniel Ramage 2, Nada Amin 2, Benno Schwikowski, 1, 5 and Trey Ideker2, 3, 4 5, 山本隆久, et al. Cytoscape: A Software Environment for Integrated Models. *Genome Res* [Internet]. 1971;13(22):426. Available from: <http://ci.nii.ac.jp/naid/110001910481/>

95. Montojo J, Zuberi K, Rodriguez H, Kazi F, Wright G, Donaldson SL, et al. GeneMANIA cytoscape plugin: Fast gene function predictions on the desktop. *Bioinformatics*. 2010;26(22):2927–8.
96. Batut B, Freeberg M, Heydarian M, Erxleben A, Videm P, Blank C, et al. Reference-based RNA-Seq data analysis [Internet]. 2021 [cited 2021 Aug 23]. Available from: <https://training.galaxyproject.org/training-material/topics/transcriptomics/tutorials/reference-based/tutorial.html>
97. Rodolfo JIA. Sedentarism , a disease from xxi century. *Clínica e Investig en Arterioscler (English Ed [Internet]*. 2019;31(5):233–40. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.artere.2019.04.001>
98. Gómez Corrales JD, Latorre-Sierra G. Evaluación del paciente obeso. *Med Lab*. 2010;16(07–08):355–72.
99. Salazar Lugo R, Nicolalde Saavedra J, Maldonado Noboa V, Santamaría Coronado M, Barahona Meneses A, Salas Salas H, et al. Nutritional, biochemical parameters and life styles associated with developed of in adults of Imbabura, Ecuador. *Nutr Clin y Diet Hosp*. 2016;36(3):153–61.
100. Aranda B, Achuthan P, Alam-Faruque Y, Armean I, Bridge A, Derow C, et al. The IntAct molecular interaction database in 2010. *Nucleic Acids Res*. 2009;38(SUPPL.1):525–31.
101. Brown KR, Jurisica I. Online predicted human interaction database. *Bioinformatics*. 2005 May;21(9):2076–82.
102. Carstea ED, Morris JA, Coleman KG, Loftus SK, Zhang D, Cummings C, et al. Niemann-Pick C1 disease gene: Homology to mediators of cholesterol homeostasis. *Science (80-)*. 1997 Jul 11;277(5323):228–31.
103. Patterson MC, Vanier MT, Suzuki K, Morris JA, Carstea E, Neufeld EB, et al. Niemann-Pick Disease Type C: A Lipid Trafficking Disorder. In: Valle DL, Antonarakis S, Ballabio A, Beaudet AL, Mitchell GA, editors. *The Online Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease [Internet]*. New York, NY: McGraw-Hill Education; 2019. Available from: <http://ommbid.mhmedical.com/content.aspx?aid=1181465066>
104. Uniprot. Npc1 - NPC intracellular cholesterol transporter 1 precursor - *Mus musculus (Mouse)* - Npc1 gene & protein [Internet]. [cited 2021 Sep 21]. Available from: <https://www.uniprot.org/uniprot/O35604>

105. de Duve C. The lysosome turns fifty. *Nat Cell Biol* [Internet]. 2005;7(9):847–9. Available from: <https://doi.org/10.1038/ncb0905-847>
106. Yang C, Wang X. Lysosome biogenesis : Regulation and functions. 2021;220(6):1–15.
107. UCSC Genome Browser. Mouse NPC1 loci [Internet]. [cited 2021 Sep 21]. Available from: http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgTracks?db=mm9&lastVirtModeType=default&lastVirtModeExtraState=&virtModeType=default&virtMode=0&nonVirtPosition=&position=chr18%3A12189693-12236400&hgsid=1170790421_pdyGZIA9T9UD7F1Ozul6aKaJywyg
108. UCSC Genome Browser. Mouse STING loci [Internet]. [cited 2021 Sep 21]. Available from: https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgTracks?db=mm10&lastVirtModeType=default&lastVirtModeExtraState=&virtModeType=default&virtMode=0&nonVirtPosition=&position=chr18%3A35733679-35740554&hgsid=1170796579_TMOVkTrZI7a99726Sc6Jpmd3n4k4
109. Zierhut C, Funabiki H. Regulation and Consequences of cGAS Activation by Self-DNA. *Trends Cell Biol* [Internet]. 2020;30(8):594–605. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2020.05.006>
110. The Jackson Laboratory. 025805 - B6(Cg)-Sting1<tm1.2Camb>/J [Internet]. Available from: <https://www.jax.org/strain/025805>
111. Puntos finales humanitarios en la experimentación animal [Internet]. Available from: <https://www.humane-endpoints.info/es/raton/salud-y-actividad>
112. The Jackson Laboratory. Body Weight Information for C57BL/6J [Internet]. JAX® Mice Strain - C57BL/6J. 2022 [cited 2022 Jan 18]. Available from: <https://www.jax.org/jax-mice-and-services/strain-data-sheet-pages/body-weight-chart-000664>
113. Zheng M, Zheng M, Xie L, Xie L, Liang Y, Wu S, et al. Recognition of cytosolic DNA attenuates glucose metabolism and induces AMPK mediated energy stress response. *Int J Biol Sci*. 2015;11(5):587–94.
114. Seibenhener ML, Wooten MC. Use of the Open Field Maze to Measure Locomotor and Anxietylike Behavior in Mice. *Journal of Visualized Experiments*. 2015;96.
115. Gould T.D., Dao D.T., Kovacsics C.E. The Open Field Test. In: *Mood and Anxiety Related*

- Phenotypes in Mice. *Neuromethods*, 2009;42. Available from: https://doi.org/10.1007/978-1-60761-303-9_1
116. Open Field | Behavioral and Functional Neuroscience Laboratory | Stanford Medicine [Internet]. Available from: <https://med.stanford.edu/sbfnl/services/bm/sm/openfield.html>
 117. Roemers P, Hulst Y, Heijningen S van, Dijk G van, Heuvelen MJG van, Deyn PP De, et al. Inducing Physical Inactivity in Mice: Preventing Climbing and Reducing Cage Size Negatively Affect Physical Fitness and Body Composition. *Front Behav Neurosci*. 2019;13.
 118. Zhang D, Liu C, Li H, Jiao J. Deficiency of STING Signaling in Embryonic Cerebral Cortex Leads to Neurogenic Abnormalities and Autistic-Like Behaviors. 2020;2002117:1–15.
 119. Wire Hang Test | Behavioral and Functional Neuroscience Laboratory | Stanford Medicine [Internet]. [cited 2021 Sep 21]. Available from: <https://med.stanford.edu/sbfnl/services/bm/sm/wirehang.html>
 120. Burgos Peláez R. Enfoque terapéutico global de la sarcopenia. *Nutr Hosp*. 2006;21(SUPPL. 3):51–60.
 121. Scherer PE. Perspective Why does obesity cause diabetes ? 2022;11–20.
 122. Weyer C, Bogardus C, Mott DM, Pratley RE. The natural history of insulin secretory dysfunction and insulin resistance in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *J Clin Invest*. 1999;104(6):787–94.
 123. Gastaldelli A, Ferrannini E, Miyazaki Y, Matsuda M, DeFronzo RA. Beta-cell dysfunction and glucose intolerance: Results from the San Antonio metabolism (SAM) study. *Diabetologia*. 2004;47(1):31–9.
 124. The Jackson Laboratory. Stingko mice - 035661, 035660, 034435,034434 [Internet]. 2021 [cited 2021 Nov 12]. Available from: <https://www.jax.org/search?q=stingko>
 125. LabDiet®. Prolab®RMH3000-P500 Sheet description. 2021. Available from: https://www.labdiet.com/cs/groups/lolweb/@labdiet/documents/web_content/mdrf/mdi4/~edisp/ducum04_028406.pdf
 126. Bai J, Cervantes C, He S, He J, Plasko GR, Wen J, et al. Mitochondrial stress-activated cGAS-STING pathway inhibits thermogenic program and contributes to overnutrition-induced obesity in

- mice. *Commun Biol* [Internet]. 2020;3(1):1–14. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s42003-020-0986-1>
127. Mao Y, Luo W, Zhang L, Wu W, Yuan L, Xu H, et al. STING-IRF3 triggers endothelial inflammation in response to free fatty acid-induced mitochondrial damage in diet-induced obesity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2017;37(5):920–9.
128. Chu TT, Tu X, Yang K, Wu J, Repa JJ, Yan N. Tonic prime-boost of STING signalling mediates Niemann–Pick disease type C. *Nature* [Internet]. 2021;596(7873):570–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41586-021-03762-2>
129. Lamming DW. Lysosome : The metabolic signaling hub. 2019;(October 2018):27–38.
130. Li X, Saha P, Lib J, Blobel G, Pfeiffer SR. Clues to the mechanism of cholesterol transfer from the structure of NPC1 middle luminal domain bound to NPC2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016;113(36):10079–84.
131. Cantor RM. 8 - Analysis of Genetic Linkage [Internet]. Seventh Ed. Emery and Rimoin’s Principles and Practice of Medical Genetics and Genomics. Elsevier Inc.; 2019. 227–236 p. Available from: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812537-3.00008-1>
132. Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA. Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic Acid Res*. 2009;37(1).
133. Chen W, Li S, Yu H, Liu X, Huang L, Wang Q, et al. ER Adaptor SCAP Translocates and Recruits IRF3 to Perinuclear Microsome Induced by Cytosolic Microbial DNAs. Vol. 12, *PLoS Pathogens*. 2016.
134. Yue F, Cheng Y, Breschi A, Vierstra J, Wu W, Ryba T, et al. A comparative encyclopedia of DNA elements in the mouse genome. *Nature*. 2014 Nov;515(7527):355–64.
135. NCBI. acetyl-Coenzyme A carboxylase alpha [*Mus musculus* (house mouse)] [Internet]. Mouse ENCODE transcriptome data. 2022. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/107476/?report=expression>
136. NCBI. NPC intracellular cholesterol transporter 1 [*Mus musculus* (house mouse)] [Internet]. Mouse ENCODE transcriptome data. 2022. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/18145#gene-expression>

137. NCBI. fatty acid synthase [Mus musculus (house mouse)] [Internet]. Mouse ENCODE transcriptome data. 2022. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/14104#gene-expression>
138. Abcam. In-Cell ELISA protocol. :1–5. Available from: <https://www.abcam.com>
139. Contents K, Buffer B, Stain JGW, Buffer E, Plate T, Assembly S. Pierce® Colorimetric In-Cell ELISA Kits. 0747(62200):1–7.
140. ThermoFisher. In-Cell ELISA Kit, Colorimetric [Internet]. 2022. Available from: <https://www.thermofisher.com/elisa/product/62200>.
141. Abcam. Benefits of In-Cell ELISA [Internet]. Abcam plc. 2022. Available from: <https://www.abcam.com/kits/in-cell-elisa-ice-kits#:~:text=In-Cell ELISA is a,cell-based ELISA or cytoblot>.
142. Hyochol Ahn, PhD, Michael Weaver, PhD, Debra Lyon, PhD, Eunyoung Choi, RN, and Roger B. Fillingim P, Tumber CJFST. Activation of STING in T cells induces type I IFN responses and cell death. *Physiol Behav* [Internet]. 2017;176(1):139–48. Available from: file:///C:/Users/Carla Carolina/Desktop/Artigos para acrescentar na qualificação/The impact of birth weight on cardiovascular disease risk in the.pdf
143. Sokolowska O, Nowis D. STING Signaling in Cancer Cells: Important or Not? *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2018;66(2):125–32.
144. Zhu Y, An X, Zhang X, Qiao Y, Zheng T, Li X. STING: A master regulator in the cancer-immunity cycle. *Mol Cancer*. 2019;18(1):1–15.
145. Wang X, Rao H, Zhao J, Wee A, Li X, Fei R, et al. STING expression in monocyte-derived macrophages is associated with the progression of liver inflammation and fibrosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Lab Investig* [Internet]. 2020;100(4):542–52. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41374-019-0342-6>
146. Cho. STING-Dependent Signaling Instigates IL-10 Controlled Inflammatory Colitis Jeonghyun. *Physiol Behav*. 2016;176(1):100–106.

9. ANEXOS/MATERIAL SUPLEMENTARIO

9.1 Material suplementario: Tabla de *clusters* de anotaciones funcionales

Se introdujo el listado de la Tabla 3 en la plataforma DAVID (132) con sus identificadores respectivos para las especies *Mus musculus* (*m*) y *Homo sapiens* (*h*). A partir de ello, se agrupó a STING con las enzimas del metabolismo lipídico en los siguientes *clusters*: 1) Metabolismo lipídico y mitocondria, 2) Actividad transferasa y de unión, 3) Localización intracelular (Tabla 4). Cada término GO fue asignado en cada *cluster* con un valor p para ratón y humano descrito en la tabla.

Tabla 4. Anotaciones funcionales encontradas en ratón y humano

Cluster 1	Términos GO	valor p (m)	valor p (h)
Genes			
	Procesos biosintéticos de ácidos grasos	1,8E-7	1,2E-3
Gpat3; GPAT	Procesos metabólicos Acetil-CoA	2,5E-5	1,5E-3
Agpat; AGPAT	Biosíntesis de lípidos	7,7E-4	8,4E-3
Dgat1; DGAT	Biosíntesis y metabolismo de ácidos grasos	5,8E-4	6,0E-2
Acly; ACLY	Mitocondria	8,1E-4	6,7E-2
Fasn; FAS	Procesos metabólicos	1,1E-5	3,6E-3
Acaca; ACC	Procesos metabólicos de ácidos grasos	3,5E-3	1,9E-3
Tmem173; TMEM173	Acetilación	4,7E-1	2,0E-2
Nkap; NfkB	Actividad catalítica	3,4E-2	1,5E-2
Mb21d1; MB21D1	Vías de señalización metabólicas	1,9E-2	3,9E-1
Cluster 2	Términos GO	valor p (m)	valor p (h)
Genes			
Acly; ACLY	Transferasa	1,5E-2	6,5E-2
Tbk1; TBK1,	Unión de nucleótidos	3,0E-2	1,9E-3
Fasn; FAS,	Unión de ATP	2,0E-2	1,5E-4
Mb21d1; MB21D1	Región de unión a fosfato de nucleótidos: ATP	3,3E-2	4,6E-2
Tmem173; TMEM173,	Unión de metales	7,9E-2	6,2E-2
Acaca; ACC	Unión de iones metálicos	7,9E-2	3,8E-2
Cluster 3	Términos GO	valor p (m)	valor p (h)
Genes			
Ifnar2; IFNAR2	Membrana plasmática	8,1E-4	7,3E-2
Acly; ACLY	Membrana	4,9E-2	3,0E-3
Npc1; NPC1	Región transmembrana	5,0E-6	1,7E-2
Fas; FASN	Retículo endoplasmático	5,0E-8	6,0E-3
Tmem173; TMEM173	Componente integral transmembrana	6,9E-2	1,6E-2
Ifnar1; IFNAR1	Dominio topológico: citoplasmático	5,4E-2	2,1E-1
Fads1; FADS1	Dominio topológico: intracelular	9,3E-4	8,7E-2

9.2 Material suplementario: Tabla de valores Fold change

Mediante los análisis in silico realizados en Galaxy, se obtuvieron los valores de veces de cambio [(FC) log₂] para los genes de interés de la Tabla 3.

Tabla 5. Valores FC para los genes de interés en tejido adiposo () y hepático (*) de ratón y humano.**

Identificador en ratón	Fold change (log ₂)	Identificador en humano	Fold change (log ₂)
Tmem173	-0,129** ; -0,200** ; -0,013*	STING	-0,225**
Mb21d1	-0,139** ; -0,139** ; 0,191*	cGAS	-0,150**
Irf3	0,115** ; 0,120** ; 0,186*	IRF3	0,135**
Nfkb1	0,023** ; 0,030** ; -0,025*	NFκB	0,036**
Tbk1	-0,018** ; -0,020** ; -0,349*	TBK1	-0,023**
Ifnar1	0,034** ; 0,034** ; 0,025*	IFNAR1	0,046**
Ifnar2	-0,101** ; -0,110** ; -0,082*	IFNAR2	-0,120**
Ifna	0** ; 0** ; 0*	IFN alfa	0**
Ifnb1	0** ; 0** ; 0,017*	IFN beta	0**
Npc1	-0,060** ; -0,087** ; -0,178*	NPC1	-0,095**