



Protección del ayuno ante los efectos tóxicos generados por la doxorubicina

Trabajo de fin de grado

Lucas Morató Nieto

Supervisores:

Marta Barradas, Pablo J. Fernández-Marcos, Adrián Plaza

Centro de investigación IMDEA

Madrid 2021

Abstract

El ayuno es una intervención nutricional que consiste en la privación de la ingesta de alimentos durante un periodo de tiempo superior a 10-12 horas. Lo primero que sucede durante el ayuno es una bajada de glucemia e insulinemia. Esto activa la glucogenólisis, proceso caracterizado por la liberación de glucosa a partir del glucógeno almacenado, en hígado y en músculo. A continuación, se da la producción de glucosa a partir de precursores no glucídicos (gluconeogénesis). Cuando estos procesos no consiguen mantener la glucemia, se activa la lipólisis, caracterizada por la liberación de ácidos grasos al torrente sanguíneo, los cuales se utilizan en el hígado formando los cuerpos cetónicos. Para poder estudiar los efectos beneficiosos del ayuno realizamos tres experimentos. Primero, una cinética de la variación de la glucemia, cetonemia y peso corporal durante el ayuno. Donde obtuvimos una visión temporal del proceso, pudiendo compararla con las similitudes de la cinética en los humanos. En segundo lugar, comprobamos las variaciones que provoca el ayuno en la expresión génica de las células polinucleadas de sangre periférica (PBMCs). Por último, estudiamos si el ayuno presenta un efecto protector frente a los efectos adversos de la doxorubicina. Para ello realizamos dos experimentos: primero, se hizo una cinética con la variación del peso entre los ratones ayunados y los ratones control, para ver si los efectos adversos de la quimioterapia disminuían con el ayuno; y segundo, estudiamos la variación en los marcadores de toxicidad entre ratones ayunados y controles. Con los resultados obtenidos en la variación de la expresión génica de las PBMCs no podemos concluir que haya una disminución significativa, debido a un fallo experimental. Por otro lado, se ha demostrado que los ratones que han realizado ayuno pierden menos peso frente aquellos que han mantenido una dieta normal durante la administración de doxorubicina. Lo que significa que el ayuno promueve un efecto protector, aunque solo se observe una disminución significativa en uno de los marcadores de toxicidad del corazón, mientras que en el resto se mantienen constantes. En futuros estudios se quiere estudiar más marcadores de toxicidad para corroborar el efecto de protección.

Índice

1. Introducción.....	1
1.1 El ayuno.....	1
1.2 Resultados del estudio previo.....	3
1.2.1 Variación en las membranas de los ácidos grasos.....	3
Figura 1. Comparación de ácidos grasos de las membranas de los eritrocitos antes y después del ayuno.	3
Figura 2. Análisis de las correlaciones de los cambios entre las situaciones basales y de ayuno de los ácidos grasos.....	4
1.2.2 Variación de los miARN circulantes.....	5
Figura 3. Correlación entre la variación de los ácidos grasos de membrana y de los miARN circulantes.	6
1.2.3 Variación génica en las PBMCs.....	7
Figura 4. Variación de la expresión génica en PBMCs durante el ayuno.	7
1.2.4 La quimioterapia.....	8
Figura 5. Comparación de la toxicidad por quimioterapia entre ratones en ayuno y ratones control.	9
2. Materiales y métodos.....	11
2.1 Animales de experimentación.....	11
2.2 Medidas del laboratorio.....	12
2.2.1 Extracción de las PBMCs.....	12
Figura 6. Procedimiento experimental de la extracción de las PBMCs mediante Histopaque®-1077.	12
2.2.2 Homogeneización de tejidos.....	13
2.2.3 Extracción de RNA.....	13
2.2.4 RT-qPCR.....	16
Figura 7. Gráfico explicativo sobre el procedimiento experimental de las RT-qPCR en las placas 384.	19
Figura 8. Ciclos del termociclador.....	20
2.3 Análisis estadístico.....	21
3. Resultados.....	22
3.1 Evolución de peso corporal, glucemia y cetonemia durante el ayuno en ratón.....	22
Figura 9. Cinética de la variación de la glucosa, el peso corporal y los cuerpos cetónicos durante el ayuno.	23

Figura 10. Medición de glucosa, peso corporal y cuerpos cetónicos a las 24 horas...	25
3.2 Variación de la expresión génica en las PBMCs durante el ayuno	25
Figura 11. Variación de la expresión génica en PBMCs.....	26
3.3 El efecto protector del ayuno frente a los efectos nocivos de la quimioterapia	27
3.3.1 Cinética de la variación del peso corporal durante la administración de doxorubicina	27
3.3.2 Variación en los marcadores de toxicidad	28
Figura 12. Comparación de la variación del peso entre los ratones en ayuno y control tratados con doxorubicina.....	30
Figura 13. Comparación relativa de los pesos de los órganos entre la situación basal y el ayuno.....	31
Figura 14. Comparación de la variación de la expresión génica en hígado entre control y ayuno durante la administración de doxorubicina.....	33
Figura 15. Comparación de la variación de la expresión génica en el corazón entre control y ayuno durante la administración de doxorubicina.....	34
Figura 16. Comparación de la variación de la expresión génica en los riñones entre control y ayuno durante la administración de doxorubicina.....	35
3.4 Correlación de todas las variaciones causadas por el ayuno.....	35
Figura 17. Mapa de calor de las correlaciones de la variación de las PBMCs, marcadores de toxicidad, hemogramas y peso.....	37
4. Discusión.....	39
5. Agradecimientos	44
6. Bibliografía.....	45
7. Anexos.....	47

1. Introducción

1.1 El ayuno

El ayuno se entiende como la no ingesta de ningún tipo de alimento que aporte energía, o en realizar una ingesta mínima (200 kcal/día), diferenciándolo así de la restricción calórica, la cual consiste en una reducción de las calorías ingeridas, entre 20 y 40% menos de lo normal. Los periodos más típicos de ayuno suelen variar entre las 12 horas y las 3 semanas (Longo & Mattson, 2014a). Durante el ayunado se generan diversos cambios en nuestro organismo de manera secuencial. En primer lugar, al haber una disminución de la glucemia (glucosa en sangre), se libera glucosa del hígado y del músculo que se encontraba almacenada en forma de glucógeno. Tras esta liberación, cuando los niveles de glucosa no pueden mantenerse en sus niveles óptimos, se activa la liberación de ácidos grasos provenientes del tejido adiposo. Este proceso se denomina lipólisis y se genera después de 10-12 horas de ayuno o durante un ejercicio prolongado. Debido a esta liberación de ácidos grasos al torrente sanguíneo se realiza la cetogénesis, proceso por el cual los ácidos grasos liberados se transforman, en el hígado, en cuerpos cetónicos. Esta formación se realiza en las mitocondrias de los hepatocitos por medio de una beta-oxidación. No solo ocurre la cetogénesis, sino que, además, en el hígado, se activa la gluconeogénesis, a través de la cual se genera glucosa a partir de precursores no glucosídicos, como algunos aminoácidos, lactatos, piruvatos, etcétera. Durante el ayunado todos estos mecanismos están regulados por procesos hormonales de gran importancia, como son el descenso de los niveles de insulina y leptina en sangre, o el aumento de los niveles de ghrelina y glucagón en sangre (Alam *et al.*, 2019; Antoni *et al.*, 2017; de Cabo & Mattson, 2019).

Como fuente de energía alternativa a la glucosa durante el ayuno se generan los cuerpos cetónicos. Los dos principales son: el ácido acetoacético o acetoacetato (AcAc) y el ácido betahidroxibutírico o β -hidroxibutirato (3HB) (Izuta *et al.*, 2018; Laffel, 1999). El cerebro, junto a otros órganos, emplea estas fuentes de energía por medio de la cetólisis, proceso por el cual los cuerpos cetónicos se convierten en acetoacetyl-Coenzima A y acetyl coenzima A, aportando así la energía necesaria para sus funciones, que en situaciones normales realizaría la glucosa por si sola.

En la actualidad se puede encontrar distintos tipos de ayuno. El ayuno largo, el cual consiste en una restricción alimenticia de entre 8 horas y 21 días (Longo & Mattson, 2014b; Phillips, 2019). El ayuno intermitente, que consiste en ayunar uno o dos días enteros por semana, mientras que el resto se mantiene una dieta normal (Stockman *et al.*, 2018). Y, por último, el ayuno corto, el cual presenta un tiempo máximo de no más de 48 horas. Será este último el tipo de ayuno estudiado en el proyecto. Para que comiencen todos los procesos, antes mencionados, relacionados con el ayuno, el tiempo mínimo de ayunado debe ser de unas 12 horas.

El ayuno presenta efectos beneficiosos para la salud, entre los cuales se encuentra la protección frente a la quimioterapia (J. Zhang *et al.*, 2020; Zorn *et al.*, 2020). Para demostrar dicho efecto, el laboratorio IMDEA *food institute*, en el cual me incorporé, realizó un estudio cuyo fin era encontrar los mecanismos moleculares por los que el ayuno genera una protección frente a estos medicamentos. A continuación, se presentan los resultados del estudio realizado previamente a mi llegada al laboratorio, el cual fue empleado como base para realizar el presente proyecto.

El estudio se realizó tanto en humanos como ratones. Se estudió la variación entre las situaciones iniciales y las situaciones después del ayuno. En primer lugar, se observó una variación en la composición de las membranas de los eritrocitos. Caracterizando de este modo unos marcadores que permitieron dividir a los sujetos en dos poblaciones según la composición de las membranas, pudiendo evaluar así las distintas respuestas al ayuno según el grupo inicial al que pertenecían los pacientes. Los grupos se dividieron en aquellos que presentaban ácidos grasos monoinsaturados y saturados (MUFAs y SFA, de las siglas en inglés, respectivamente) altos, y aquellos que presentaban ácidos grasos polinsaturados (PUFAs, de las siglas en inglés) altos.

Además, se estudió la variación entre el ayuno y la situación inicial de la expresión génica de las células mononucleadas de sangre periférica (PBMCs en inglés) y de los micro ARN (miARN) circulantes. Por otro lado, se evaluaron los efectos tóxicos de la quimioterapia con oxaliplatino, y se comprobó cómo el ayuno generaba protección frente a los efectos nocivos de este fármaco. Por último, se observó que había distintos grados de toxicidad en función de las distintas composiciones de las membranas. Gracias a este estudio se puede predecir cuáles serán las distintas respuestas al ayuno con el solo hecho de conocer las diferentes composiciones de las membranas de los eritrocitos.

1.2 Resultados del estudio previo

1.2.1 Variación en las membranas de los ácidos grasos

En primer lugar, se compararon las membranas de los eritrocitos en el tiempo inicial o basal y después del ayuno, siendo este de 36 horas en humanos y 24 en ratones. El resultado en humanos fue menos impactante, ya que el único cambio significativo en la membrana de los eritrocitos fue el del ácido linoleico (*Figura 1 a*). En cambio, en los ratones la variación fue mayor, apreciándose una disminución de los ácidos grasos monoinsaturados (MUFAs) y los saturados (SFA), mientras que los polinsaturados (PUFAs) tendían a aumentar de manera significativa (*Figura 1 b*). Con estas tendencias, se generaron dos grupos, los MUFAs/SFA y los PUFAs.

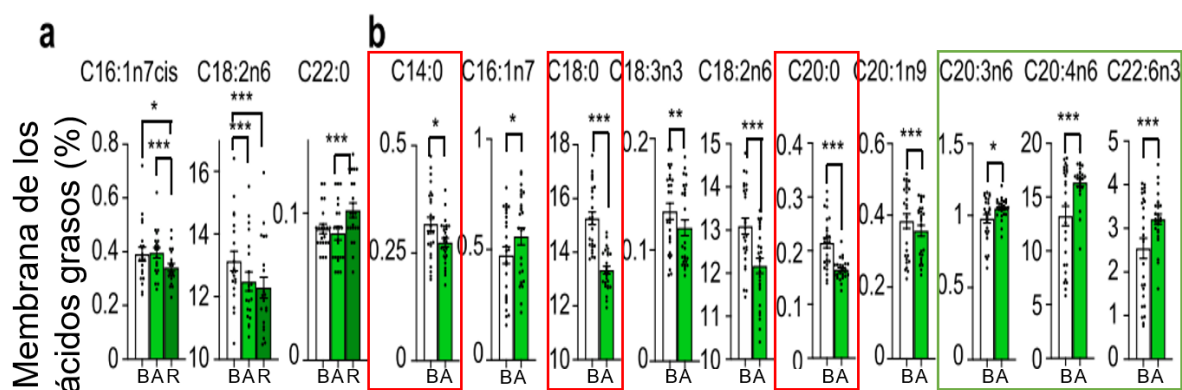


Figura 1. Comparación de ácidos grasos de las membranas de los eritrocitos antes y después del ayuno.

Se midieron los porcentajes de los niveles de ácidos grasos de los eritrocitos, tanto en humanos (**a**) como en ratones (**b**). En humanos se midieron en tiempo basal (12 horas de ayuno) (B), después de 36 horas de ayuno (A) y cuando volvieron a comer (R). En ratón se midieron en tiempo basal (tras 1 hora de ayuno) (B) y tras 24 horas de ayuno (A). Los recuadros rojos muestran MUFAs y los SFAs mientras que los verdes muestran los PUFAs. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de una vía con la corrección de Tukey (**a**) y la prueba t de Student no pareada de dos colas (**b**). *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$. Gráfica adaptada del estudio *Fatty acids homeostasis during fasting predicts protection from chemotherapy toxicity*. Barradas M., et al. (pendiente de publicación).

Posteriormente se estudió la relación de la variación entre todos los ácidos grasos de las membranas de los eritrocitos (*Figura 2*). El gráfico muestra las correlaciones de los deltas (la variación de la composición de las membranas de los eritrocitos en el ayuno menos la composición de las membranas en el momento inicial o basal) entre todos los ácidos grasos, tanto los MUFAs/SFA como los PUFAs. Si ambos varían de manera directa se representa de rojo, si lo hacen de manera inversa se representa de azul. Se puede observar cómo los MUFAs/SFA se relacionan de manera directa entre ellos, al igual que los PUFAs, en cambio, la relación entre los MUFAs/SFA y los PUFAs se da de manera inversa. Se generan de nuevo los mismos dos grupos antes mencionados, MUFAs/SFA por un lado y PUFAs por otro.

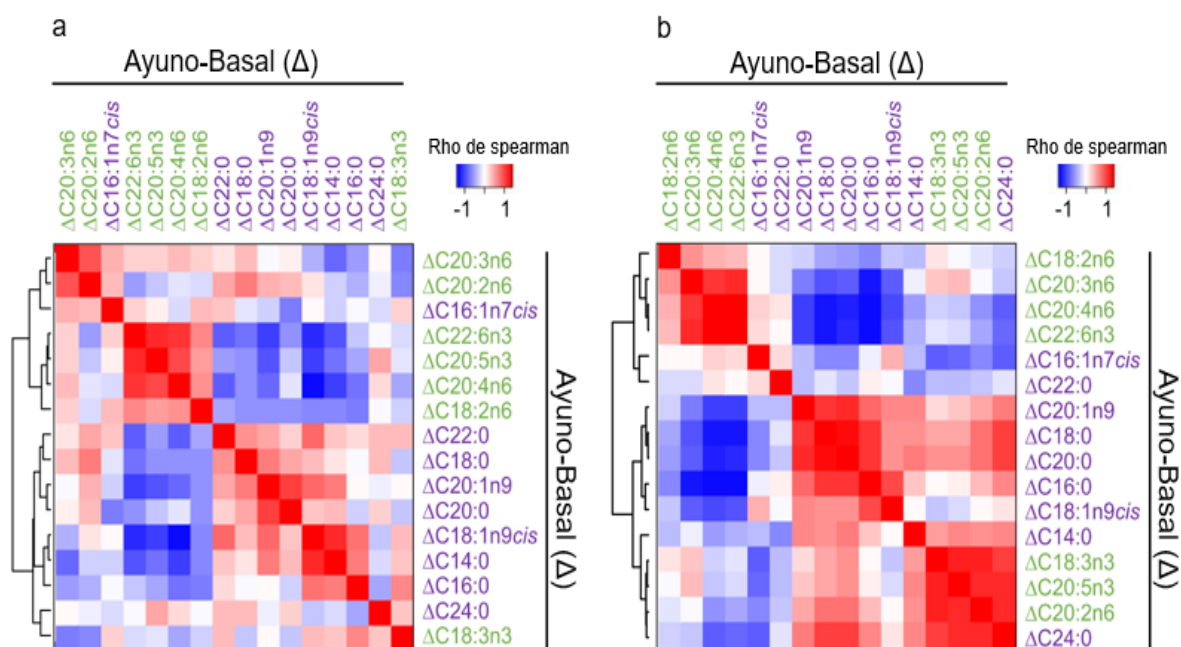


Figura 2. Análisis de las correlaciones de los cambios entre las situaciones basales y de ayuno de los ácidos grasos.

Mapas de calor que representan el coeficiente de correlación rho de Spearman entre los cambios (ayuno menos basal) de los ácidos grasos de las membranas de los eritrocitos tanto de humanos (**a**) como de ratón (**b**). Los colores rojos representan una correlación directa y los azules una correlación indirecta. Se pueden observar los MUFAs/SFAs (representados en morado) y los PUFAs (representados en verde). La estadística se realizó mediante la prueba Spearman (**a-b**). Gráfica adaptada del estudio *Fatty acids homeostasis during fasting predicts protection from chemotherapy toxicity*. Barradas M., et al. (pendiente de publicación).

1.2.2 Variación de los miARN circulantes

A continuación, se quiso comprobar si esta variación de la composición de ácidos grasos de las membranas se correlacionaba también con una variación en los niveles de miARN circulantes, antes y después del ayuno. Se midieron las cantidades de miARN circulantes en el plasma sanguíneo y se observó que había una variación significativa en 8 de los miARN, donde la mayoría de estos disminuía.

Posteriormente se estudió la función de estos 8 miARN que variaron de manera significativa, y se apreció que algunos estaban estrechamente relacionados con el metabolismo de lípidos, además de con la vía de PI3K, que presenta una relación importante con la insulina (Alliouachene *et al.*, 2015). Por último, se quiso ver si la variación de estos miARN se correlacionaba con la variación de los ácidos grasos de las membranas de los eritrocitos antes mencionada. Por lo que se generó un gráfico en el cual se mostró la relación de la variación de los ácidos grasos y los miARN (*Figura 3*). De igual manera que antes, las relaciones directas se representan en rojo, mientras que las relaciones indirectas se indican en azul. Se muestra el delta, es decir, la diferencia entre el valor del ayuno menos el basal, tanto de los ácidos grasos de membranas de los eritrocitos como de la cantidad de miARN circulantes. Se puede observar que se vuelven a generar los mismos grupos de antes, los MUFAs/SFA por un lado y los PUFAs por otro, correlacionándose de manera directa e indirecta respectivamente con los miARN.

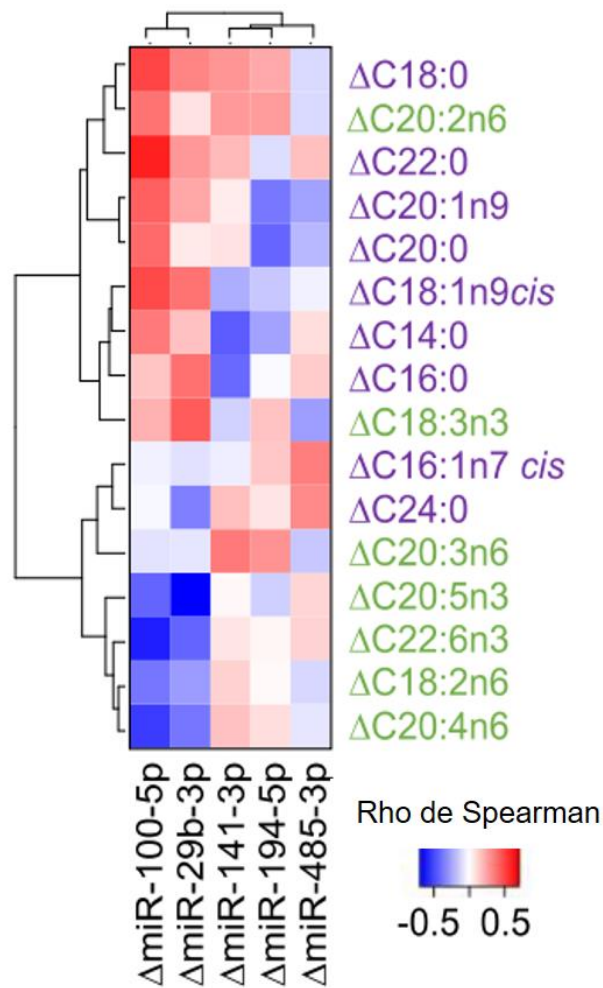


Figura 3. Correlación entre la variación de los ácidos grasos de membrana y de los miARN circulantes.

Mapas de calor que representan la correlación rho de Spearman entre los cambios (ayuno menos basal) de los ácidos grasos de las membranas de los eritrocitos y los cambios de los miARN circulantes provocados por el ayuno. Los colores rojizos representan una relación directa y los azulados una relación indirecta. Se pueden observar los MUFAs/SFAs (representados en morado) y los PUFAs (representados en verde). La estadística se realizó mediante la prueba Spearman. Gráfica adaptada del estudio *Fatty acids homeostasis during fasting predicts protection from chemotherapy toxicity*. Barradas M., *et al.* (pendiente de publicación).

1.2.3 Variación génica en las PBMCs

Por otro lado, se quiso ver si había una variación en los niveles de expresión génica antes y después del ayunado. La forma de medirlo menos invasiva para los seres humanos es mediante una extracción de sangre, por lo que se emplearon las PBMCs. Los genes estudiados fueron *Scd1*, *Srebf1a* e *Insig1*. *Srebf1a* es un factor de transcripción que se une a elementos reguladores del esteroles en el ADN. Además, presenta una función en la inducción de la lipogénesis, proceso por el cual el acetil-Coenzima A es convertido a ácidos grasos para su almacenaje como triglicéridos en la grasa (Liang *et al.*, 2020). Por otro lado, *Insig1*, es el gen regulador de *Srebf1a*. También denominado, gen inducido por insulina (Y. Zhang *et al.*, 2019). Por último, *Scd1* o estéril-Coenzima A 9-desaturasa es una encima importante en el metabolismo de ácidos grasos (Zou *et al.*, 2020). A modo de resumen, *Srebf1a* está regulado por *Insig1* y su diana es *Scd1*.

Se realizó una RT-qPCR con muestras tomadas antes y después del ayuno. En la *figura 4* se puede observar la variación en la expresión de estos genes, tanto en humano, después de 36 horas de ayuno (*Figura 4 a*), como en ratón, después de 24 horas (*Figura 4 b*). La expresión de estos genes se ve reducida de manera significativa. En el caso de los humanos, se les volvió a medir una vez volvían a un consumo normal y los valores retornaban a unos niveles similares a los iniciales.

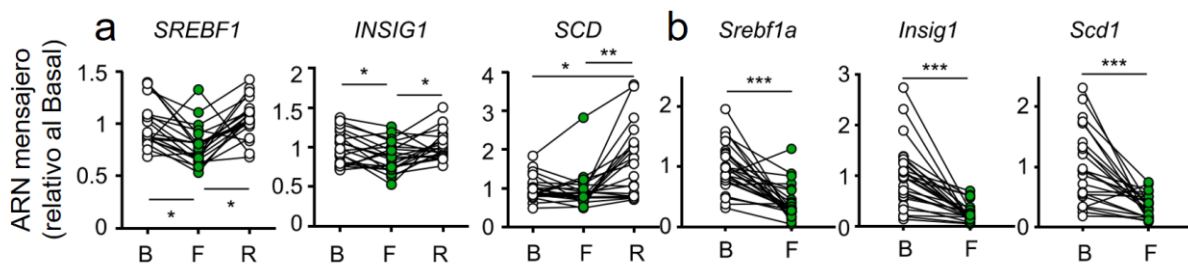


Figura 4. Variación de la expresión génica en PBMCs durante el ayuno.

PBMCs de sangre humana (**a**) o de ratón C57BL/6OlaHsd (**b**) se aislaron antes del ayuno (estado basal) (B), tras 36 horas de ayuno en humano o 24 horas en ratón (F), y tras un día de realimentación (R), y se analizó la expresión de los genes indicados mediante una RT-qPCR. Los puntos representan medidas de expresión en cada individuo del estudio. Las medidas pareadas del mismo individuo se unen con líneas. Las diferencias estadísticas se cuantificaron mediante una prueba ANOVA de una vía

(a) y una prueba t de Student pareada de dos colas (b). *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$. Gráfica adaptada del estudio *Fatty acids homeostasis during fasting predicts protection from chemotherapy toxicity*. Barradas M., et al. (pendiente de publicación).

1.2.4 La quimioterapia

La quimioterapia es un tratamiento cuya finalidad es eliminar células que presentan una proliferación descontrolada, como la que realizan las células cancerosas o tumorales. Se basa en el uso de químicos muy potentes y tóxicos que provocan la muerte de dichas células.

El oxaliplatino es un medicamento de platino de tercera generación. Se emplea para el tratamiento de cáncer colorrectal, pulmón y pancreático entre otros. Se introdujo en el 2000 para el tratamiento de la metástasis colorrectal, en el cual el cisplatino y el carboplatino, sus predecesores, no tenían ningún efecto. Se administra vía intravenosa y se elimina por medio de los riñones en unas 48 horas. Su efecto se basa, una vez es internalizado en la célula, en la unión a moléculas nucleofílicas, principalmente ADN, aunque también ARN y proteínas. Este anticancerígeno genera aductos intracatenarios entre dos guaninas o entre guanina y adenina, inhibiendo así la replicación y traducción del ADN (Martinez-Balibrea et al., 2015).

Este fue el quimioterapéutico empleado en la investigación previa del laboratorio al que me incorporé, para estudiar la protección de sus efectos nocivos cuando se realiza el ayuno. Con el fin de comparar la toxicidad se generaron dos grupos, uno de ratones controles y otro en el cual se realizó ayuno. Se estudiaron los niveles de toxicidad, por un lado, mediante la variación en la expresión de marcadores genéticos de toxicidad (*Figura 5 a, b y c*), y, por otro lado, se cuantificó la variación en el peso (*Figura 5 d*) y en el número de plaquetas (*Figura 5 e*). Los tejidos estudiados fueron el riñón (*Figura 5 a*), el corazón (*Figura 5 b*) y el hígado (*Figura 5 c*). Se puede ver como la variación en la expresión de los genes de toxicidad disminuye de manera significativa en todos los tejidos estudiados, haciendo una mención especial a la cantidad de genes que variaron de manera significativa en el hígado, mostrando así cómo el ayuno resulta beneficioso y protector frente a la quimioterapia. Por otro lado, el peso corporal de los ratones que ayunaron se encuentra significativamente más elevado que aquellos que no realizaron ayuno (*Figura 5 d*). Al igual que en el conteo de plaquetas, donde los ayunados presentan una mayor cantidad de plaquetas de manera significativa (*Figura 5 e*). Con todos estos experimentos se demuestra el efecto protector del ayuno frente a los efectos nocivos del oxaliplatino.

El estudio previamente explicado fue enviado a revisión a la revista *Nature communication*. De este modo, los revisores contestaron con una serie de preguntas a resolver para poder publicar el estudio. Fue en este momento donde yo me incorporé y ayudé en el proceso con la realización de estas respuestas. Los resultados mostrados a continuación son las distintas contestaciones que se dieron a las diferentes cuestiones realizadas.

Para poder llevar a cabo estas respuestas, se dividió el estudio en tres bloques. En primer lugar, se generó una cinética de la variación de la glucosa y cuerpos cetónicos en sangre y del peso corporal, utilizando 4 ratones macho. En segundo lugar, se estudió la variación génica en las PBMCs debido al ayuno, empleando 24 ratones macho (4 control y 20 con ayuno de 24 horas). Por último, se observó el efecto protector de la quimioterapia a través de 24 ratones macho, a los cuales se les inyectó una dosis de 15 mg/kg de doxorubicina (4 control, 20 ayunaron 48 horas).

Otro del quimioterápico muy empleado hoy en día es la doxorubicina, siendo este el empleado en este estudio. Es un antibiótico no selectivo de clase I de antraciclina. Las antraciclinas son citostáticos obtenidos a partir de microorganismos *streptomyces*. Se emplea para el tratamiento de cáncer de vejiga, mama, estómago, pulmón, ovarios y tiroides, entre otros muchos (Rivankar, 2014a). El mecanismo por el cual actúa todavía no está del todo claro. Se sabe que se intercala entre las cadenas de ADN inhibiendo la producción de macromoléculas. La doxorubicina estabiliza a la topoisomerasa II después de romper la cadena de ADN, impidiendo así que la doble hélice se vuelva a cerrar deteniendo los procesos de replicación y traducción. También, genera un daño mitocondrial, por lo que se generan radicales libres que dañan tanto el ADN como la membrana celular (Rivankar, 2014b). El principal problema de este medicamento es su enorme toxicidad cardíaca, la cual lleva a muerte por apoptosis y necrosis de los cardiomiocitos. Como se ha comentado con anterioridad, una de las dianas es la mitocondria, que al dañarla reduce la cantidad de ATP disponible, siendo esta la razón de su alta cardiotoxicidad, ya que los cardiomiocitos necesitan grandes cantidades de energía (Koleini & Kardami, 2017).

Por otro lado, además de los genes mencionados en el estudio previo, se estudiará también la variación en la expresión de los genes *Lpcat1* y *Erg28*. *Lpcat1* es miembro de la familia aciltransferasa de 1-acil-sn-glicerol-3-fosfato y juega un papel importante en el metabolismo de los fosfolípidos (Law *et al.*, 2019). Por otro lado, *Erg28*, está relacionado con la membrana del retículo endoplasmático, en la desmetilación del esteroide C-4 durante la biosíntesis del ergosterol (Gachotte *et al.*, 2001).

2. Materiales y métodos

2.1 Animales de experimentación

Los ratones empleados para el estudio fueron machos de la cepa C57BL/6JOlaHsd de entre 12 y 14 semanas de edad. Todos los experimentos con ratones se realizaron en el animalario del Centro Nacional de Biotecnología (CNB), siguiendo un protocolo ético aprobado por el comité ético CNB-CSIC.

Para llevar a cabo la cinética, se empezó el ayuno a las 7:00 am y se fueron haciendo mediciones en sangre, las cuales se obtuvieron mediante un pequeño corte por la cola. Las mediciones de glucosa y cuerpos cetónicos se realizaron usando un glucómetro sistema nova pro GLU/KET (*Menarini Diagnostics*). Y el peso corporal se midió en una balanza. Estas medidas se fueron tomando a distintas horas: 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 24, 36, 48, desde el inicio del ayuno.

Para la obtención de las PBMCs se realizaron dos extracciones. La primera muestra se obtuvo una semana antes del ayuno. Se extrajeron 100 µl de sangre mediante punción en la vena submandibular y se guardaron en tubos K2EDTA a las 9:00 am. Al ser una gran cantidad de sangre la que se extrajo a los ratones, se esperó una semana a que se recuperaran, después se realizó el ayuno de 24 horas y se extrajo posteriormente la segunda muestra de sangre (100 µl) de la misma manera, en tubos K2EDTA mediante punción en la vena submandibular a las 9:00 am.

Para el estudio de la toxicidad, se inyectó intraperitonealmente doxorubicina. Se administró una dosis de 15 mg/kg 24 después del inicio del ayuno. El ayuno continuó durante 24 horas más, siendo así un total de 48 horas de ayuno con una inyección de doxorubicina en mitad.

2.2 Medidas del laboratorio

2.2.1 Extracción de las PBMCs

Las muestras de sangre fueron procesadas entre 1 y 2 horas después de la extracción. Se utilizó el kit Histopaque®-1077 (Sigma-Aldrich, 10771), compuesto empleado para genera un gradiente para la separación de las PBMCs. Se diluyeron los 100 µl de sangre 1:2 con tampón fosfato salino (PBS) y se añadió, gota a gota, encima del Histopaque. Después se centrifugó a 400 x g durante 30 minutos a temperatura ambiente, con la mínima aceleración y sin ninguna desaceleración para generar el gradiente. La parte opaca encima del Histopaque, que contiene las PBMCs, se transfirió a un Eppendorf utilizando una pipeta Pasteur. A continuación, se resuspendió en PBS, se centrifugó y se precipitó el ARN, después se quitó el PBS y se repitió el proceso 3 veces para lavar así las PBMCs. El pellet se resuspendió con TRI-Reagent (Sigma-Aldrich) y se conservó a -80°C hasta que todas las muestras fueron procesadas.

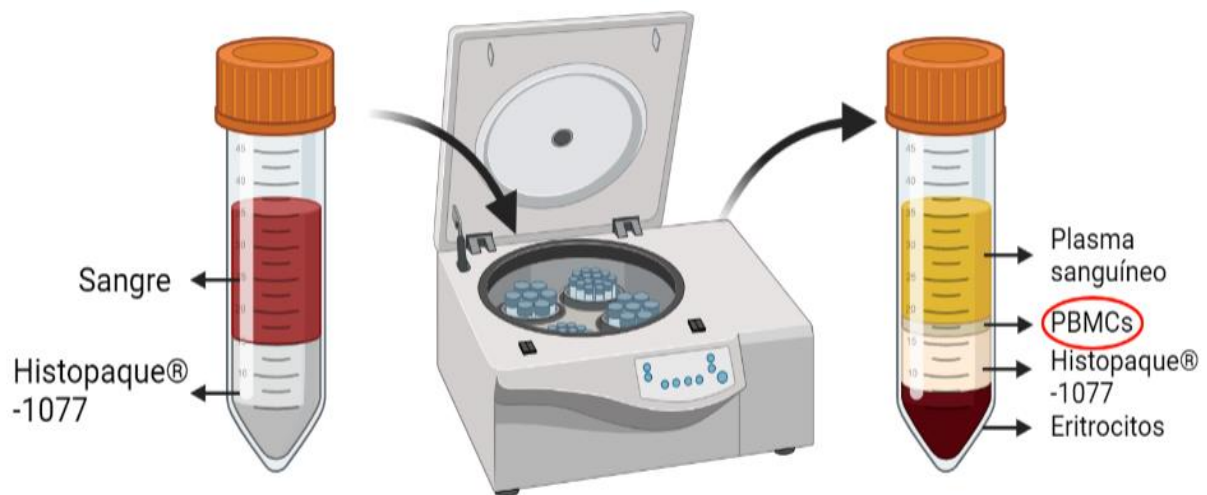


Figura 6. Procedimiento experimental de la extracción de las PBMCs mediante Histopaque®-1077.

Es quema del proceso de la extracción de las PBMCs. La figura se generó mediante la aplicación de BioRender.

2.2.2 Homogeneización de tejidos

Para realizar la RT-qPCR primero se homogeneizaron los tejidos estudiados: corazón, hígado y riñón, empleando el homogeneizador T 10 *basic* ULTRA-TURRAX® (IKA). En primer lugar, se añadió a la muestra de tejido 500 µl de TRI-Reagent (compuesto que inhibe la actividad de RNasas, virus u otros agentes infecciosos), después, se homogeneizó. A continuación, se limpió el homogeneizador. Este paso se realizó usando 7 tubos. Los dos primeros contenían agua, los dos siguientes RNasa-zap, para eliminar cualquier resto de RNasa que pudiera haberse quedado en el aparato durante la homogeneización. A continuación, dos tubos con etanol 70% para eliminar la espuma que se genera con el RNasa zap, ya que este contiene detergente. Por último, se pasó una vez más por un tubo con agua para eliminar los restos de etanol. Después de este lavado exhaustivo se repitió el proceso desde el inicio con el resto de las muestras. El lavado es fundamental para evitar cualquier contaminación cruzada entre muestras ya que modificaría el resultado.

2.2.3 Extracción de RNA

La extracción de RNA se llevó a cabo mediante dos protocolos:

1. TRI-Reagent ARN/ADN/Proteína agente aislamiento (Thermo Fisher). Para la extracción del ARN de los tejidos de corazón, riñón e hígado.

Los productos empleados fueron: cloroformo o 1-bromo-3-cloropropano, isopropanol y etanol. En nuestro caso empleamos cloroformo en vez de 1-bromo-3-cloropropano.

Los pasos de la extracción son: homogeneización (apartado 2.2.2), fase de separación, precipitación del ARN, lavado del ARN y solubilización del ARN.

1.1 Fase de separación: Una vez se descongelaron las muestras se dejaron a temperatura ambiente durante 5 minutos, para permitir la disociación de complejos núcleo-proteicos. A continuación, se añadieron 100 µl de cloroformo, que al ser más denso que el agua, caerá al fondo mientras que el agua estará en la superficie. Se mezclaron ambos componentes mediante agitación durante 15 segundos y se mantuvieron a temperatura ambiente entre 2 y 15 minutos (hasta que empiezan a separarse ambas fases. Esto se realiza con el fin de que no se inviertan las fases durante el centrifugado). A continuación, se centrifugaron durante 15 minutos a 12.000 x g a 4°C. Cuando se sacaron las muestras de la centrífuga se pudo observar de abajo a arriba, una fase orgánica de lípidos de color rojo, una interfase de cloroformo con el ADN y las proteínas, y encima la capa de agua con el ARN.

1.2 Precipitación del ARN: como se ha mencionado, es en la fase acuosa donde se encuentra nuestro ARN, dicha fase es transferida a unos tubos Eppendorf nuevos. Para la precipitación del ARN se añadieron 250 µl de isopropanol, se mezclaron y se mantuvo la mezcla a temperatura ambiente durante 5-10 minutos. Después se centrifugó durante 8 minutos a 12.000 x g a 4°C. Una vez finalizó la centrífuga, se observó un pellet blanco que es el ARN.

1.3 Lavado del ARN: primero se quitó el sobrenadante y se lavó el pellet de ARN con 500 µl etanol al 75% en agitación usando un *vortex* (scientific industries). A continuación, las soluciones restantes se centrifugaron durante 5 minutos a 7.500 x g a 4°C. En caso de que no se haya formado pellet de ARN, se centrifuga a 12.000 x g.

1.4 Solubilización del ARN: se retiró el etanol dejando solo el pellet y se deja secar entre 3-5 minutos. Es muy importante evitar que el ARN se seque por completo, no debe haber etanol, pero no debe estar completamente seco. Cuando el etanol se haya evaporado se añade agua (se añadió una cantidad de agua según la cantidad de ARN del que se disponía) y se mezcla el pellet de ARN para homogeneizar bien la muestra. Después se congelas las muestras a -80°C para facilitar la solubilización.

2. Direct-zol™ RNA Microprep (Zymo Research). Para la purificación del ARN de las PBMCs.

Direct-zol™ RNA Microprep (Zymo Research) es un kit comercial utilizado para la purificación y extracción del ARN. En dicho kit podemos encontrar los siguientes elementos:

- TRI-Reagent
- Solución tampón para lavar el ARN
- DNasa I (liofilizada)
- Solución tampón de digestión de ADN
- Agua libre de DNasa y RNasa
- Columnas de Zymo-spin™ IC
- Tubos de recolección.

El protocolo consiste en dos partes:

1. **Preparación de la muestra:** primero se realizó la homogeneización del tejido con TRI-Reagent (apartado 2.2.2).
2. **Purificación del ARN:**

2.1 Se añadió al *Eppendorf* la misma cantidad de etanol que previamente habíamos añadido de TRI-Reagent (500 µl) para homogeneizar las muestras y se mezcló.

2.2 Se transfirió la mezcla a las columnas de Zymo-spin™ IC, se introdujeron en los tubos de recolección y se centrifugaron. Todas las centrifugaciones se realizaron a temperatura ambiente, a 16.000 x g durante 30 segundos. Al finalizar se descartó el eluyente.

2.3 Se recomienda el tratamiento con DNasa, pero en nuestro caso no se realizó, ya que es más caro y no se aprecia suficiente diferencia en la purificación del ARN. Además, los oligonucleótidos empleados para la qPCR posterior se dirigieron a dos exones distintos, lo que minimizó el efecto de cualquier posible contaminación por ADN.

2.4 Se añadió 400 µl de solución tampón de prelavado para lavar el ARN, se centrifugó y se descartó el eluyente. Este paso se repitió 2 veces.

2.5 Se añadió 700 µl de Buffer de lavado para realizar otro lavado. En este caso se centrifugó durante 1 minuto, y se transfirió la columna a un Eppendorf (libre de RNasa)

2.6 Para eluir el ARN que está en la membrana de la columna se añadió 15 µl de agua libre de DNasa y RNasa directamente a la columna y se centrifugó. Finalmente se obtuvo el ARN en el Eppendorf en un volumen final de 15 µl.

Para finalizar ambos procesos, se realizó una medición de la concentración de ARN en las muestras. Para ello se empleó el NanoDrop (Thermo Scientific™ Espectrofotómetros NanoDrop™ 2000).

2.2.4 RT-qPCR

El ARN de las PBMCs se purificó mediante el kit Directzol ARN microprep, (Zymo Research R2060). Este ARN se retro-transcribió a ADN copia (cADN) mediante oligonucleótidos aleatorios y transcriptasa Rvs de cADN de alta capacidad, usando un kit Applied Biosystems™ (Thermo Fisher). Para la realización de la PCR cuantitativa se siguieron las instrucciones del proveedor (máster mix de GoTaq qPCR, Promega, A6002) utilizando el termociclador ABI PRISM 7900 (Thermo Fisher). La cuantificación se realizó mediante el método $\Delta\Delta C_t$ ($\Delta\Delta C_t = [C_t \text{ del gen de interés} - C_t \text{ del gen control}]$). La expresión de cada gen se normalizó utilizando la expresión de los genes control o housekeeping (β -actina y 36b4). Los oligonucleótidos utilizados para los distintos genes fueron:

- *β -actin:*
 - ❖ Forward (Fwd): 5´ GGACCACACCTTCTACAATG 3´
 - ❖ Reverse (Rvs): 5´ GTGGTGGTGAAGCTGTAGCC 3´
- *36b4:*
 - ❖ Fwd: 5´ AGATTCGGGATATGCTGTTGG 3´
 - ❖ Rvs: 5´ AAAGCCTGGAAGAAGGAGGTC 3´
- *Sreb1a:*
 - ❖ Fwd: 5´ CGGGGAACCTTTTCCTTAACGTG 3´
 - ❖ Rvs: 5´ CTCTCAGGAGAGTTGGCACC 3´
- *Scd1:*
 - ❖ Fwd: 5´ TCCCGGGAGAATATCCTGGTT 3´
 - ❖ Rvs: 5´ ACAGGAACTCAGAAGCCCAAAG 3´
- *Insig1:*

- ❖ Fwd: 5' CCTTGACTTTAGCAGCCCTCT 3'
- ❖ Rvs: 5' TCGTCCTATGTTTCCCCTGT 3'
- *Erg28*:
 - ❖ Fwd: 5' CTCTACACTGGCAAGCCAAAC 3'
 - ❖ Rvs: 5' TGAGAGCAGCGTCCAGATCC 3'
- *Lpcat1*:
 - ❖ Fwd: 5' CAGGACTCGCGAAGGAAGAC 3'
 - ❖ Rvs: 5' ACTCCAGGAATGAACGCACC 3'
- *Il1b*:
 - ❖ Fwd: 5' AAAAGCCTCGTGCTGTCG 3'
 - ❖ Rvs: 5' AGGCCACAGGTATTTTGTGCG 3'
- *Tgfb*:
 - ❖ Fwd: 5' TGCGCTTGCAGAGATTAATA 3'
 - ❖ Rvs: 5' CTGCCGTACAACCTCCAGTGA 3'
- *Ctgf*:
 - ❖ Fwd: 5' AGAACTGTGTACGGAGCGTG 3'
 - ❖ Rvs: 5' TGCTTTGGAAGGACTCACCG 3'
- *BmHc1*
 - ❖ Fwd: 5' TGCAGCAGTTCTTCAACCAC 3'
 - ❖ Rvs: 5' TCGAGGCTTCTGGAAGTTGT 3'
- *Anf1*
 - ❖ Fwd: 5' ATCTGCCCTCTTGAAAAGCA 3'
 - ❖ Rvs: 5' ACACACCACAAGGGCTTAGG 3'
- *Cyp21a1*
 - ❖ Fwd: 5' GATGCAAGATGTGGTGGTGC 3'
 - ❖ Rvs: 5' GCTCACAGAACTCCTGGGTC 3'
- *Sult1c2*
 - ❖ Fwd: 5' GCCAGACGACCTCCTCATTT 3'
 - ❖ Rvs: 5' GCTGAGTGGGAAGATGGGTC 3'
- *Cyp2e1*
 - ❖ Fwd: 5' GACCACCAGCACAACCTCTGA 3'
 - ❖ Rvs: 5' CTCATGCACTACAGCGTCCA 3'
- *Afp*
 - ❖ Fwd: 5' GCTGCTCAGTACGACAAGGT 3'
 - ❖ Rvs: 5' TGGTTGTTGCCTGGAGGTTT 3'

- *Casp3*
 - ❖ Fwd: 5' GAGCTGGACTGTGGCATTGA 3'
 - ❖ Rvs: 5' GCTGCAAAGGGACTGGATGA 3'
- *Sox2*
 - ❖ Fwd: 5' ACGCCTTCATGGTATGGTCC 3'
 - ❖ Rvs: 5' GCTTCTCGGTCTCGGACAAA 3'
- *Hmox1*
 - ❖ Fwd: 5' AGCCCCACCAAGTTCAAACA 3'
 - ❖ Rvs: AAGTGACGCCATCTGTGAGG 3'
- *Ccl2*
 - ❖ Fwd: 5' CCACTCACCTGCTGCTACTC 3'
 - ❖ Rvs: 5' GGACCCATTCTTCTTGGGG 3'
- *Myh14*
 - ❖ Fwd: 5' TGATCGCTGCTCTGGAGTCT 3'
 - ❖ Rvs: 5' GAACTACCTCCTTCAGCCGC 3'
- *Atf3*
 - ❖ Fwd: 5' TACCGTCAACAACAGACCCC 3'
 - ❖ Rvs: 5' CCGCCTCCTTTTCCTCTCAT 3'
- *Kim1*
 - ❖ Fwd: 5' TGAAAAGGAAGTCAGCATCTCT 3'
 - ❖ Rvs: 5' CTGCCCTCAAGGTCTATCT 3'
- *Clu*
 - ❖ Fwd: 5' GTCCACTCAAGGGAGTAGGT 3'
 - ❖ Rvs: 5' CCTAGTGTCCTCCAGAGCATC 3'
- *B2m*
 - ❖ Fwd: 5' TGGTCTTTCTGGTGCTTGTCT 3'
 - ❖ Rvs: 5' TCAGTATGTTCCGGCTTCCCA 3'
- *Lcn2*
 - ❖ Fwd: 5' TGTCACCTCCATCCTGGTCA 3'
 - ❖ Rvs: 5' ACTGGTTGTAGTCCGTGGTGT 3'
- *Cst3*
 - ❖ Fwd: 5' GAGCGAGTACAACAAGGGCA 3'
 - ❖ Rvs: 5' GGCTGGTCATGGAAAGGACA 3'
- *Atf3*
 - ❖ Fwd: 5' TACCGTCAACAACAGACCCC 3'
 - ❖ Rvs: 5' CCGCCTCCTTTTCCTCTCAT 3'

Para llevar a cabo la PCR cuantitativa en primer lugar se preparó la máster mix que contenía:

- SYBR Green (5 μ l): agente intercalante empleado para medir la cantidad de DNA amplificado.
- Tinte (0,2 μ l)
- H₂O DNasa y RNasa free (1,8 μ l)
- Oligonucleótidos (1 μ l)

Después se añade la master mix a las placas de 384 pocillos. Por último, se agrega la muestra de cADN de los 24 ratones, por duplicado, es decir 48 muestras de cada gen.

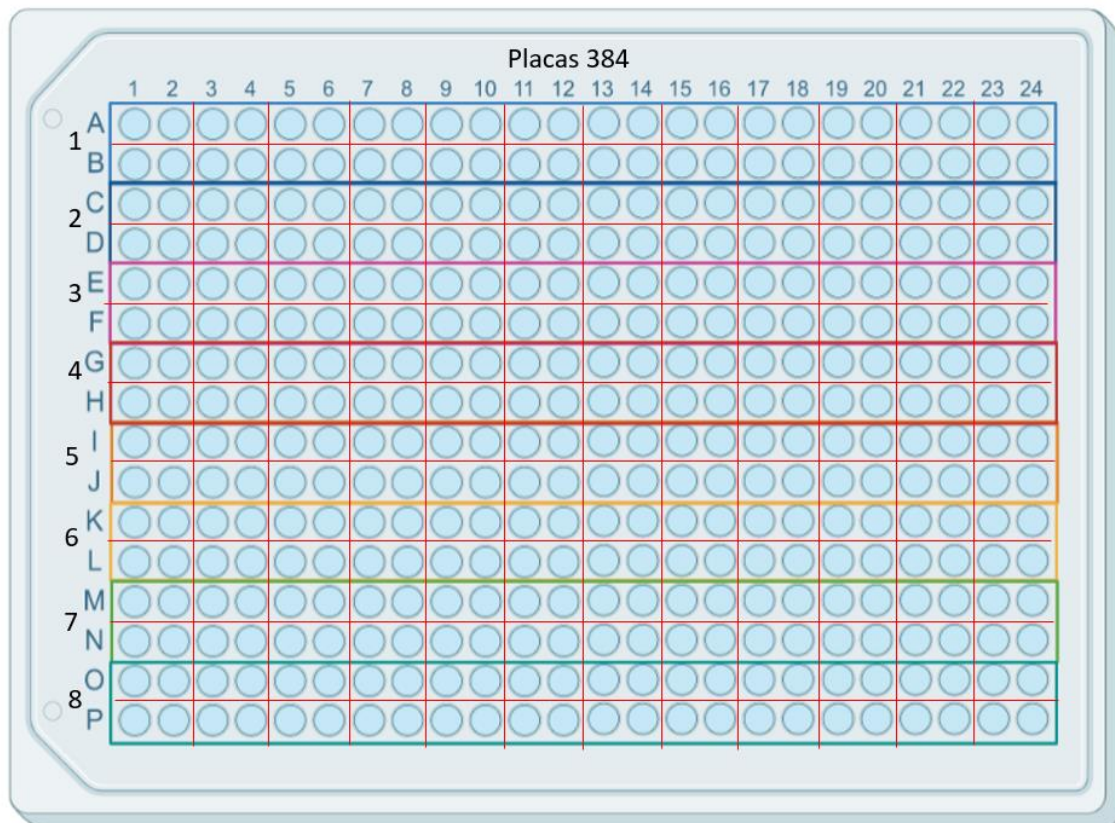


Figura 7. Gráfico explicativo sobre el procedimiento experimental de las RT-qPCR en las placas 384.

Se muestra una placa de 384 pocillos, la cual está dividida cada dos filas por líneas, que representa cada gen, un total de 8 genes por placa. Cada dos pocillos en fila están separados por líneas rojas que representan los duplicados de cada ratón.

En el termociclador los ciclos que se emplearon fueron:

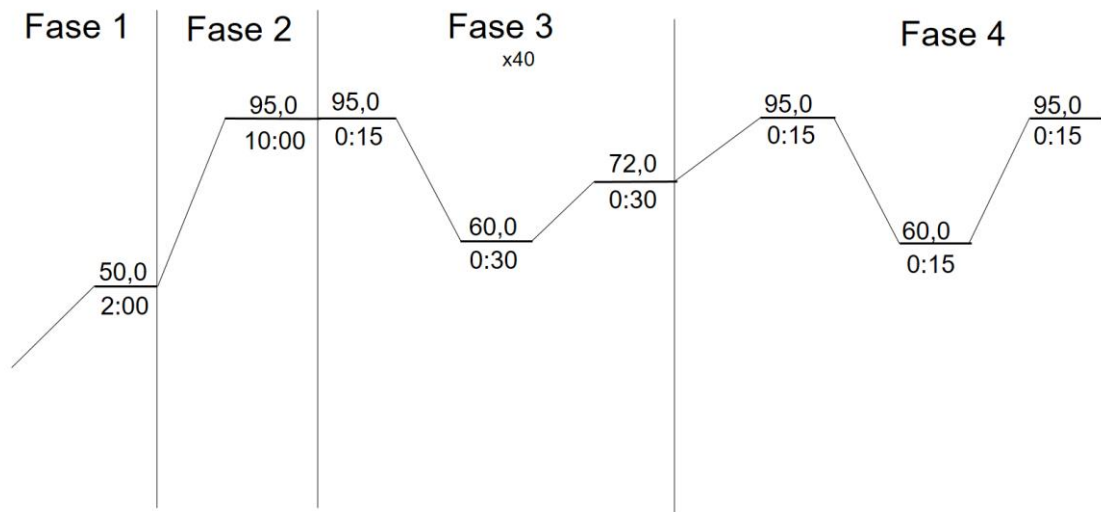


Figura 8. Ciclos del termociclador.

Se muestran los 4 ciclos unidos mediante una línea que representa la continuidad en los cambios de la temperatura, aumentando o disminuyendo 0,5°C cada vez, tanto en la subida como en la bajada de la temperatura. Se muestra encima de las líneas la temperatura (en °C) y debajo el tiempo (minutos:segundos). La fase 3 repite su ciclo 40 veces. En rojo se muestra el momento en el cual el termociclador realiza las mediciones gracias al fluoróforo SYBR Green.

Después de las 4 fases el termociclador realiza un aumento progresivo de la temperatura. Este aumento se realizó con el fin de generar una desnaturalización de las hebras de ADN. Si la reacción es muy específica habrá sólo hebras de ADN de un solo tamaño, por lo que la temperatura de separación de estas hebras será similar, de este modo la señal producida por este producto específico será un único pico de fluorescencia. En cambio, si la reacción no ha sido específica, los tamaños de las cadenas de ADN serán muy distintos por lo que la variación en las temperaturas de desnaturalización será muy dispersa, y habrá varios picos. Esto se realiza para comprobar si la reacción ha sido o no específica.

2.3 Análisis estadístico

Los programas empleados fueron GaphPad Prism 8 para Windows y R (versión 3.6.1). Los datos incompletos (primer ratón de las PBMCs), se completaron mediante imputaciones, que se realizaron mediante el paquete missForest de R.

Diferencias entre dos grupos se analizaron mediante la prueba Student t-test de dos colas. Las diferencias entre 3 o más grupos se analizaron mediante la prueba ANOVA de una vía, seguido de una corrección por comparaciones múltiples de Tukey. La prueba de Spearman se empleó para la correlación de las *figuras 2,3 y 17*.

Para generar la *figura 17* se realizó mediante el programa R empleando el script que se encuentra indicado en el anexo 1.

Los datos empleados para generar la figura se obtuvieron de la siguiente forma:

- Para los genes de las PBMCs se obtuvieron las diferencias d2-1 (ayuno – basal) ($2^{(\text{genes control (actina y 36B4)} - \text{cada gen})}$), normalizadas con los valores basales de los 20 ratones que luego ayunarán durante 24 horas.
- Para los genes de toxicidad se obtuvieron mediante los $2^{(\text{genes control-genes})}$ normalizados con los valores de los 4 animales control.
- Para los pesos relativos se realizó una normalización frente a los valores basales o iniciales.

3. Resultados

3.1 Evolución de peso corporal, glucemia y cetonemia durante el ayuno en ratón.

Lo primero que se realizó fue una cinética de la variación de la glucosa y cuerpos cetónicos en sangre, y del peso de los ratones (*Figura 9*). Esto se hizo por varios motivos. En primer lugar, para comprobar la similitud que presentaba con respecto a los humanos. Y por otro lado, para obtener una visión global de los cambios y fluctuaciones que acontecen al proceso de ayuno. Se obtuvieron 12 medidas a diferentes horas (0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 24, 36, 48). El proceso comenzó a las 7 am, momento en el cual se encienden las luces en el animalario. Es aquí cuando los ratones cesan de comer, ya que son animales nocturnos y solo se alimentan por las noches. Por lo tanto, la primera muestra de sangre que se obtiene es justo en el momento que dejan de comer.

Se extrajo la sangre de los ratones mediante un corte en la cola y se fueron tomando las medidas en las diferentes horas (*Figura 9 a*). En el caso de la glucosa (*Figura 9 b*) se observa un descenso constante y gradual. A partir de las 24 horas, donde el cambio comienza a ser significativo, empieza un descenso mucho más brusco que al inicio. Por otro lado, el peso corporal (*Figura 9 c*) de los ratones también se caracteriza por un descenso, pero en este caso es una disminución mucho más pequeña a lo largo del tiempo y no empieza a ser significativa hasta las 16 horas de ayuno. Por último, los cuerpos cetónicos (*Figura 9 d*) aumentan al principio de una manera muy lenta, y no es hasta las 16 horas cuando este cambio comienza a ser significativo. A partir de aquí, su aumento se da de manera más acentuada, hasta encontrarse en niveles muy superiores en las 48 horas, siendo más del doble de su cantidad inicial.

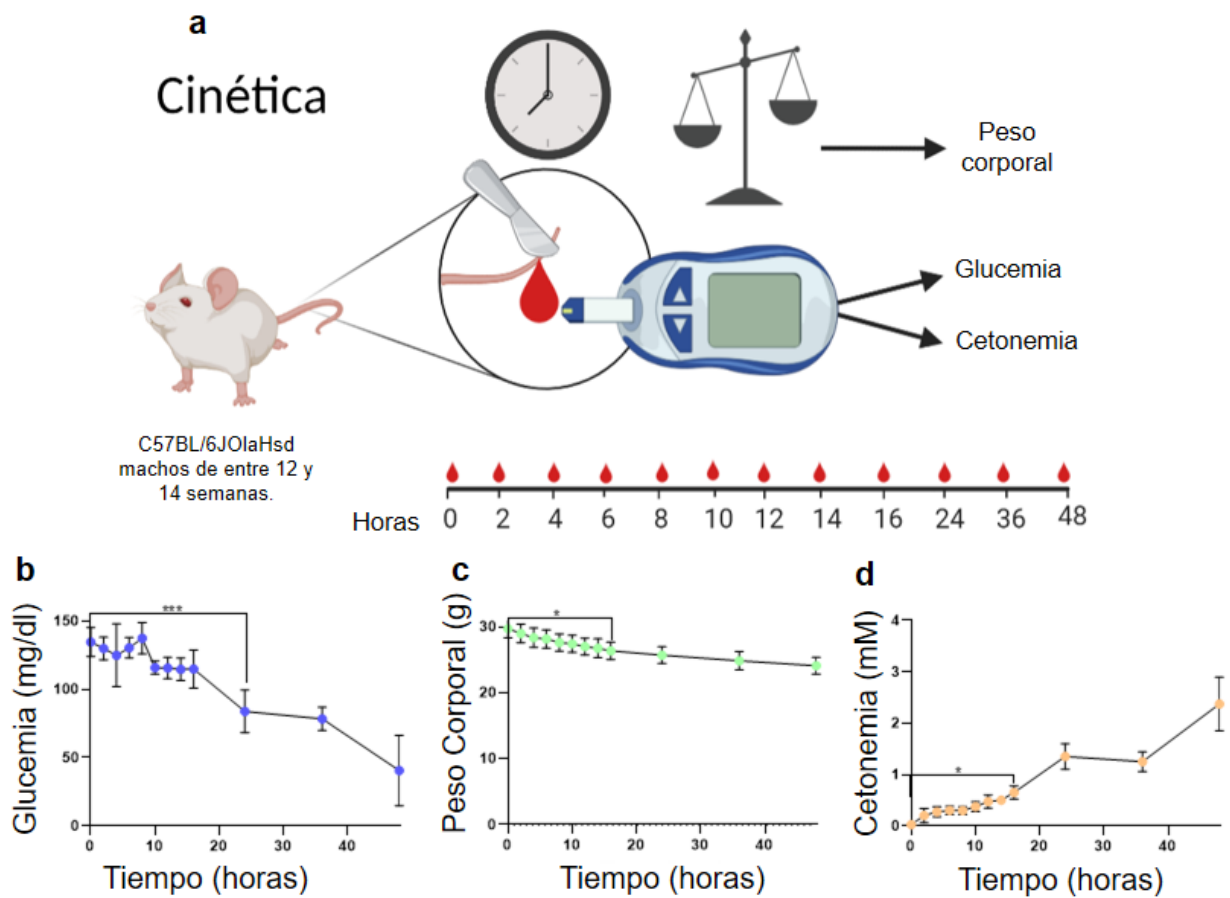


Figura 9. Cinética de la variación de la glucosa, el peso corporal y los cuerpos cetónicos durante el ayuno.

Se muestra un esquema del proceso (a), 4 ratones macho C57BL/6JOlaHsd de 12-14 semanas de edad se sometieron a ayuno y se midió la glucemia (b), el peso corporal (c) y la cetonemia (d) a los tiempos indicados. Los puntos representan la media de las mediciones. Las barras de error representan el error estándar de la media (SEM). La estadística se realizó mediante una prueba ANOVA de una vía y la corrección por comparaciones múltiples de Tukey. *, $p < 0,05$; ***, $p < 0,001$.

Por otro lado, se realizaron unas mediciones para poder comprobar que el ayuno funcionó correctamente (Figura 10), y así continuar el experimento posterior de las PBMCs. Se generaron dos grupos, uno control el cual seguiría una dieta constante y otro al que se le realizó un ayuno de 24 horas. Antes de realizar ningún ayuno, se procedió a medir la glucemia, la cetonemia y el peso corporal. Después, se sometieron a los ratones a 24 horas de ayuno y

se volvió a medir la glucemia, cetonemia y el peso corporal una vez cumplidas estas 24 horas. Esto se realizó antes de la extracción de las PBMCs a modo de control sobre el ayuno.

Se tomaron muestras de sangre y se midieron tanto la glucemia (*Figura 10 a*), como los cuerpos cetónicos en sangre (*Figura 10 b*). Además, se obtuvo el peso corporal (*Figura 10 c*) al inicio y tras 24 horas, tanto de los ayunados como de los controles. Se observa como en la glucosa y el peso corporal hay una bajada significativa respecto al grupo control. Por otro lado, hay un aumento significativo en la concentración de cuerpos cetónicos. Por último, se puede apreciar como los 3 parámetros son compatibles con el gráfico de la cinética anterior, demostrando que el ayuno funcionó adecuadamente, lo que permitió proseguir con las muestras de sangre para la extracción de las PBMCs.

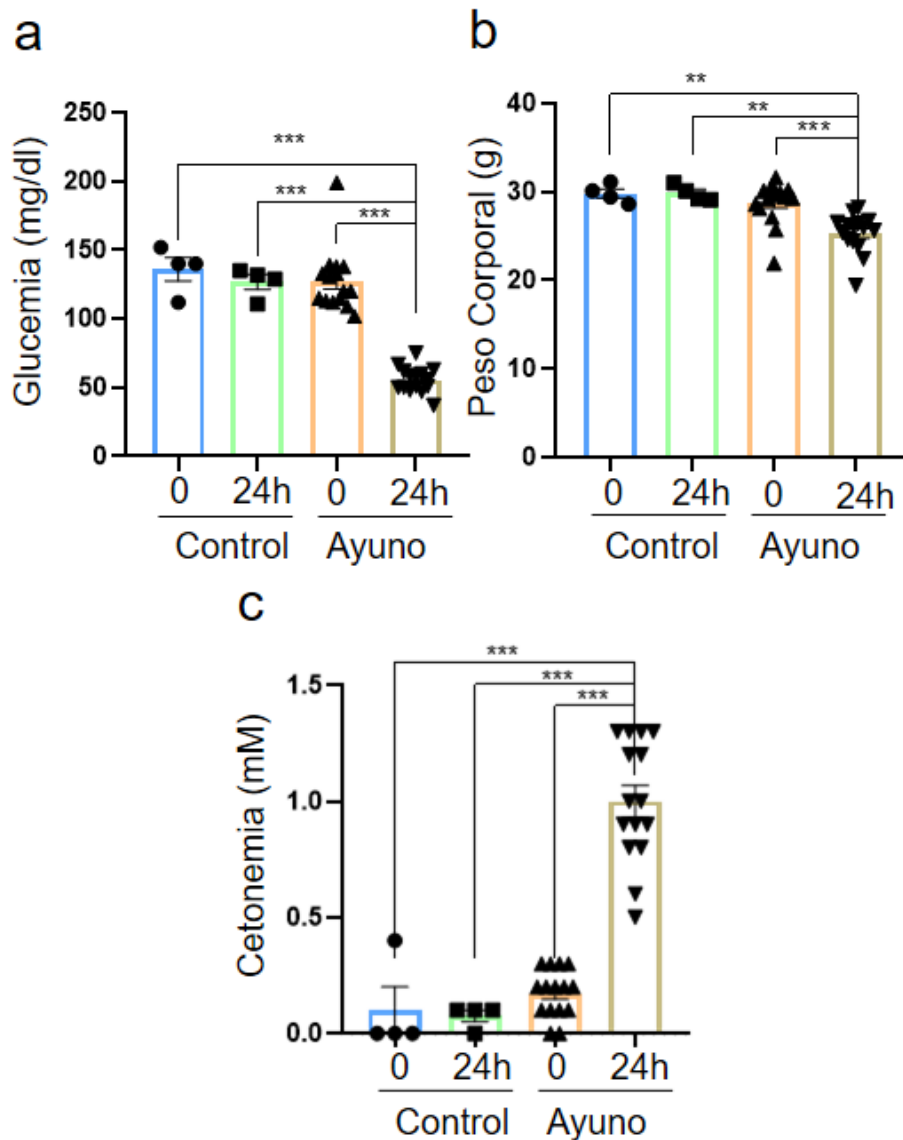


Figura 10. Medición de glucosa, peso corporal y cuerpos cetónicos a las 24 horas.

Se emplearon 24 ratones macho C57BL/6OlaHsd, de los cuales 20 ayunaron y 4 fueron los controles. Antes de la extracción de sangre para las PBMCs se procedió a medir glucosa (**a**), peso corporal (**b**) y cuerpos cetónicos (**c**) en tiempo basal y después de un ayuno de 24 horas. Las barras muestran la media de glucosa (**a**) peso corporal (**b**) y cuerpos cetónicos (**c**). Las barras de error indican el error estándar de la media (SEM). Las diferencias estadísticas se determinaron mediante la prueba de ANOVA de una vía con corrección por comparaciones múltiples de Tukey. **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$.

3.2 Variación de la expresión génica en las PBMCs durante el ayuno

Una vez se comprobó que el ayuno se produjo de manera correcta, se procedió a realizar la extracción del ARN de las PBMCs. Las mediciones de ARN se realizaron en el espectrofotómetro (Nanodrop), donde se observó que la concentración de material genético fue escasa, ya que la cantidad de PBMCs de las que se disponía era insuficientes. Los ratios 260/280 (que muestra la integridad del material genético) y 260/230 (que muestra la contaminación por alcoholes, proteínas o demás extractos celulares) fueron cercanos a 2, por lo que el ARN extraído estaba en buenas condiciones y bien purificado.

Después de la extracción y purificación del material genético se realizó una RT-qPCR (*Figura 11*) para comparar la variación de la expresión entre los ratones ayunados y los no ayunados. Los genes seleccionados fueron, *Scd1*, *Srebf1a*, *Insig1*, *Lpcat1* y *Erg28*, que como ya se ha mencionado, fueron los genes que en el estudio previo tuvieron una disminución significativa. Además, de *Lpcat1* y *Erg28*, los cuales se quiso estudiar si también disminuían. En la figura se muestran todos los genes en la situación basal (tiempo 0) y después de 24 horas de ayuno. En la parte de la izquierda de cada gráfica se encuentra el grupo control, en el cual se mantuvo una dieta constante, y en la derecha el grupo de ayuno, donde los ratones permanecieron 24 horas sin alimento. Como se puede observar, sólo hay una disminución significativa en *Erg28*. En el resto de los genes no, aunque sí que se puede apreciar una ligera tendencia a disminuir, no obstante, no es significativa, por lo que no se puede establecer ninguna conclusión. Por otro lado, hay un aumento significativo en los controles. Es decir, hay una variación significativa del control a las 24 horas respecto del estado inicial en los genes *Scd1* y *Srebf1a*.

Esto implica que algo no ha salido como debería, ya que los controles han variado de forma extrínseca al proceso estudiado.

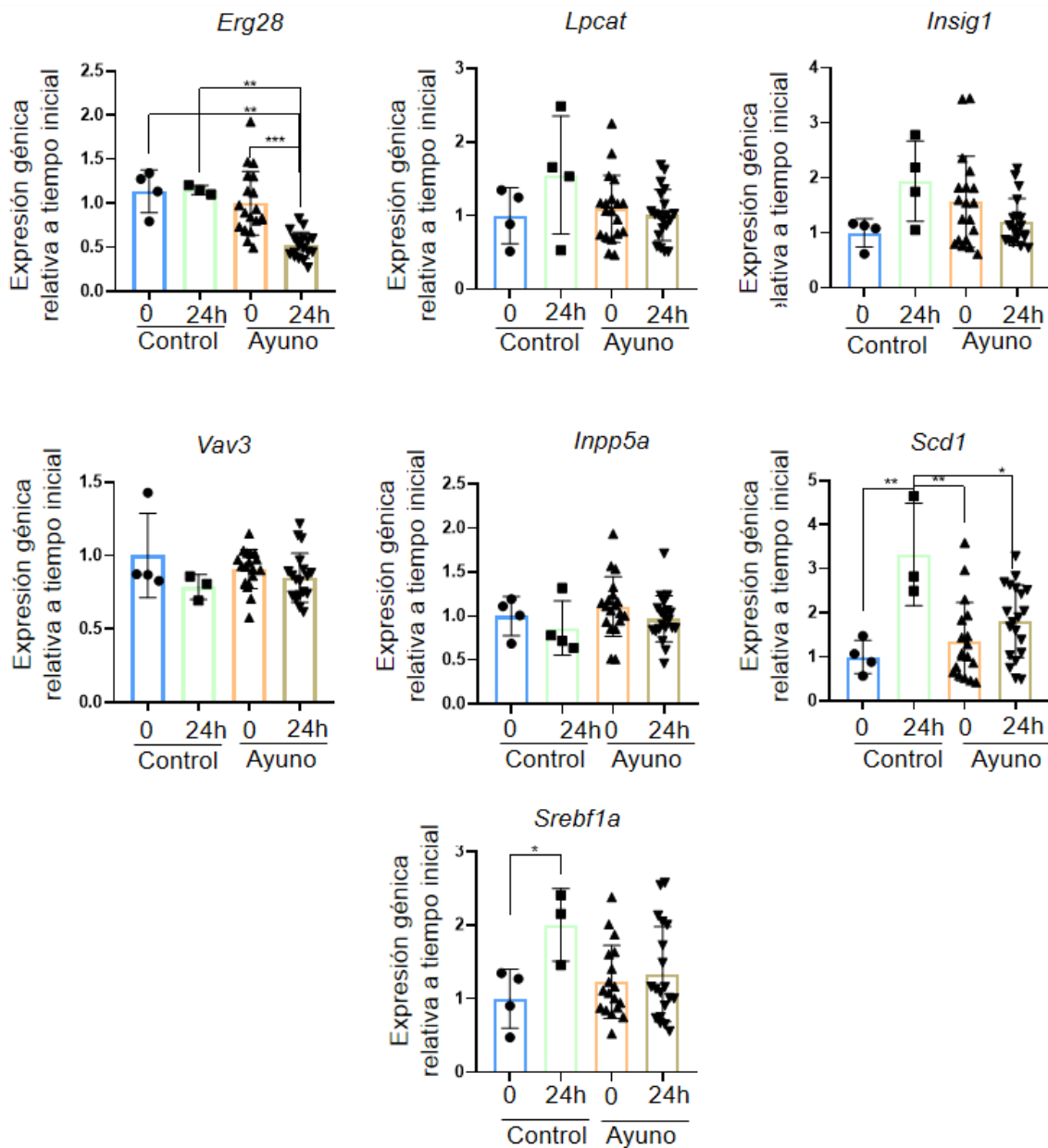


Figura 11. Variación de la expresión génica en PBMCs.

Se emplearon 24 ratones macho C57BL/6OlaHsd, de los cuales 20 ayunaron y 4 se mantuvieron alimentados. Se tomaron medidas tanto de los controles como de los ayunados, al inicio y tras 24 horas de ayuno. Las barras muestran la media de la expresión génica relativa respecto a la situación basal. Las barras de errores muestran el error estándar de la media (SEM). La estadística se realizó mediante una prueba ANOVA de una vía con corrección por comparaciones múltiples de tukey. *, p<0,05; **, p<0,01 ***, p<0,001

3.3 El efecto protector del ayuno frente a los efectos nocivos de la quimioterapia

Para estudiar el efecto protector del ayuno en la quimioterapia se tomaron varios parámetros de toxicidad en ratones tratados con doxorubicina. En primer lugar, se midió la pérdida de peso, ya que los ratones dejan de comer debido a la toxicidad y el malestar causados por la quimioterapia. Por otro lado, también se realizó un estudio de marcadores génicos de toxicidad asociados al daño en distintos órganos.

Para ambos experimentos, se generaron dos grupos de ratones, un grupo que no realizaría ayuno, y el otro realizaría un ayuno de 48 horas. A ambos se les inyectó el quimioterápico de manera intraperitoneal, a las 24 horas del inicio del ayuno, es decir, en mitad del proceso de ayunado. La dosis de doxorubicina fue de 15 mg/kg.

3.3.1 Cinética de la variación del peso corporal durante la administración de doxorubicina

Los ratones del grupo ayuno realizaron un ayuno de 24 horas, posteriormente se les inyectó la dosis de doxorubicina y se prosiguió con el ayunado durante 24 horas más. Después de un total de 48 horas de ayuno se les devolvió el alimento (*Figura 12 a*). En el caso de los ratones control, no se les realizó ningún procedimiento hasta 24 horas después del inicio del ayuno del otro grupo, donde se les inyectó la misma dosis (15 mg/kg) intraperitonealmente. Después solo se les realizó un pesado diario en ambos grupos durante 6 días.

Como se puede ver en la *figura 12 b* en las primeras 24 horas hay un descenso del peso en ambos grupos, incluido el grupo control, sobre el cual todavía no se había realizado ningún procedimiento. En el caso del grupo del ayuno, se puede ver un fuerte descenso hasta las 48 horas, manteniéndose comparable con el gráfico de la cinética del peso corporal (*Figura 9 c*). En el día uno a ambos grupos se le inyectó la dosis, antes mencionada, del quimioterápico, y se pudo observar una pequeña disminución en el peso de los ratones control, mientras que en el caso de los ayunados el descenso del peso siguió siendo más o menos constante.

Después de 48 horas, a los ayunados se les devolvió el alimento, valorándose como en sólo 24 horas aumentaron más de un 10% su masa corporal, igualándose así al peso de los controles en ese mismo momento. A partir de este día, los ratones del grupo del ayuno que ya tienen alimento mantienen un leve ascenso del peso hasta alcanzar unos valores del 95% respecto al valor inicial, es decir, que al final de los 6 días y con los efectos nocivos de la quimioterapia sólo han perdido un 5% de su peso total. Por otro lado, en el grupo de los controles, el descenso se mantiene más o menos constante hasta el día 6 donde se aprecia una pérdida de más de un 10% de su peso inicial. Estos resultados muestran de manera significativa como el ayuno ha logrado que los ratones padezcan en menor medida los efectos nocivos de la doxorubicina, manteniendo así una dieta constante respecto a los ratones control, debido a esta protección frente a los efectos adversos (*Figura 12 b*).

3.3.2 Variación en los marcadores de toxicidad

Por otro lado, se estudiaron marcadores de expresión génica de toxicidad. Los tejidos de los cuales se obtuvieron las muestras fueron hígado, corazón y riñón. Los ratones fueron tratados de la misma manera que antes: se generaron dos grupos, el control y el ayuno, a los cuales se les quito la comida, se les administró la doxorubicina 24 horas después y se mantuvo el ayuno 24 horas más. En los controles se realizó el mismo procedimiento exceptuando el ayunado. La dosis de doxorubicina fue la misma que antes, 15 mg/kg.

En primer lugar, se procedió a ver la toxicidad mediante la variación en la expresión génica de marcadores de toxicidad en el hígado, riñón y corazón. En el caso del riñón se vio que presentaba una disminución casi significativa, con un p valor de un 0,0541, en el tamaño macroscópico (*Figura 13*), por lo que se pensó que la toxicidad en este tejido sería mayor en los controles. En la figura 9 se muestra los pesos relativos al peso inicial del ratón de los 3 órganos, riñón (*Figura 13 a*), corazón (*Figura 13 b*) e hígado (*Figura 13 c*).

Primero se obtuvieron los datos del hígado (*Figura 14*), en la parte de la izquierda, en azul, se muestran los controles y a la derecha, en marrón, se muestran los ayunados de 48 horas. Como se puede observar, no se aprecia ninguna bajada significativa en ninguno de los 10 genes. Tampoco se percibe una clara tendencia a descender, sino que más bien hay un equilibrio en el cual se entiende que no ha habido ninguna variación debida al ayuno.

En segundo lugar, se observan los datos del corazón (*Figura 15*). De igual manera que antes a la izquierda están los controles y a la derecha los ayunados de 48 horas. En este caso, *myh14* si que presenta una disminución significativa respecto al control, lo que indica una menor toxicidad, a pesar de que *Anf1* muestra un aumento significativo. Por otro lado, el resto de los genes se mantienen fuera de la significancia, al igual que antes, sin presentar una tendencia clara a disminuir.

Por último, en el tejido de riñón (*Figura 16*) hay una bajada significativa el gen *I11 β* , y un aumento significativo en el gen *Clu*. Del mismo modo que en los tejidos anteriores no se aprecia una diferencia significativa en el resto de los genes, ni una clara tendencia a aumentar o disminuir.

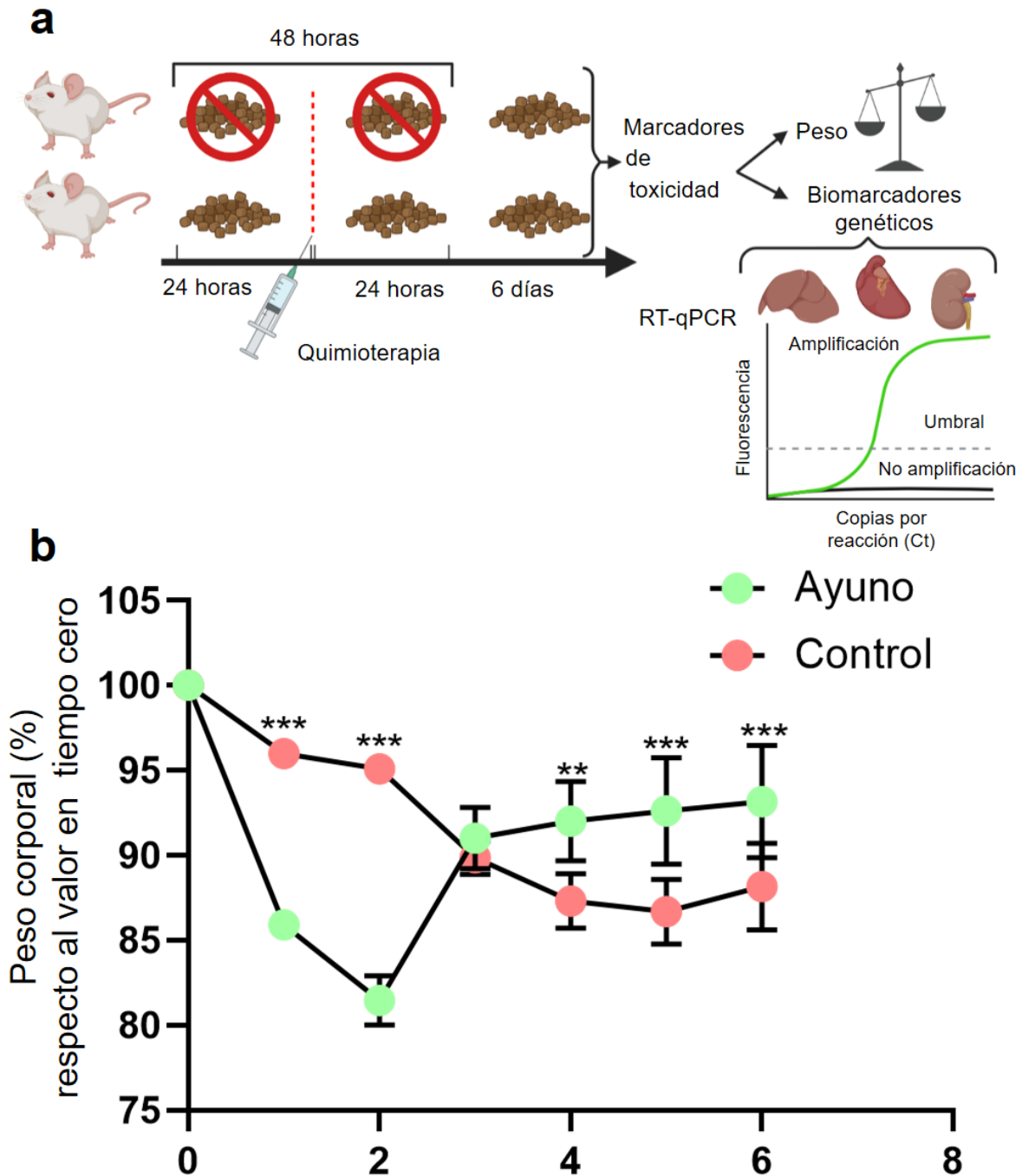


Figura 12. Comparación de la variación del peso entre los ratones en ayuno y control tratados con doxorrubicina.

Se emplearon 24 ratones macho C57BL/6OlaHsd, de los cuales 20 ayunaron y 4 mantuvieron una dieta normal. Se expone una visión global del proceso (a). Se muestran los porcentajes de peso respecto al primer valor en el día 0 (b). Los puntos muestran el porcentaje de la media de los pesos de los ratones. Las barras de error muestran la SEM. La estadística se realizó mediante una prueba ANOVA de dos direcciones con corrección por comparaciones múltiples de tukey (b). **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$.

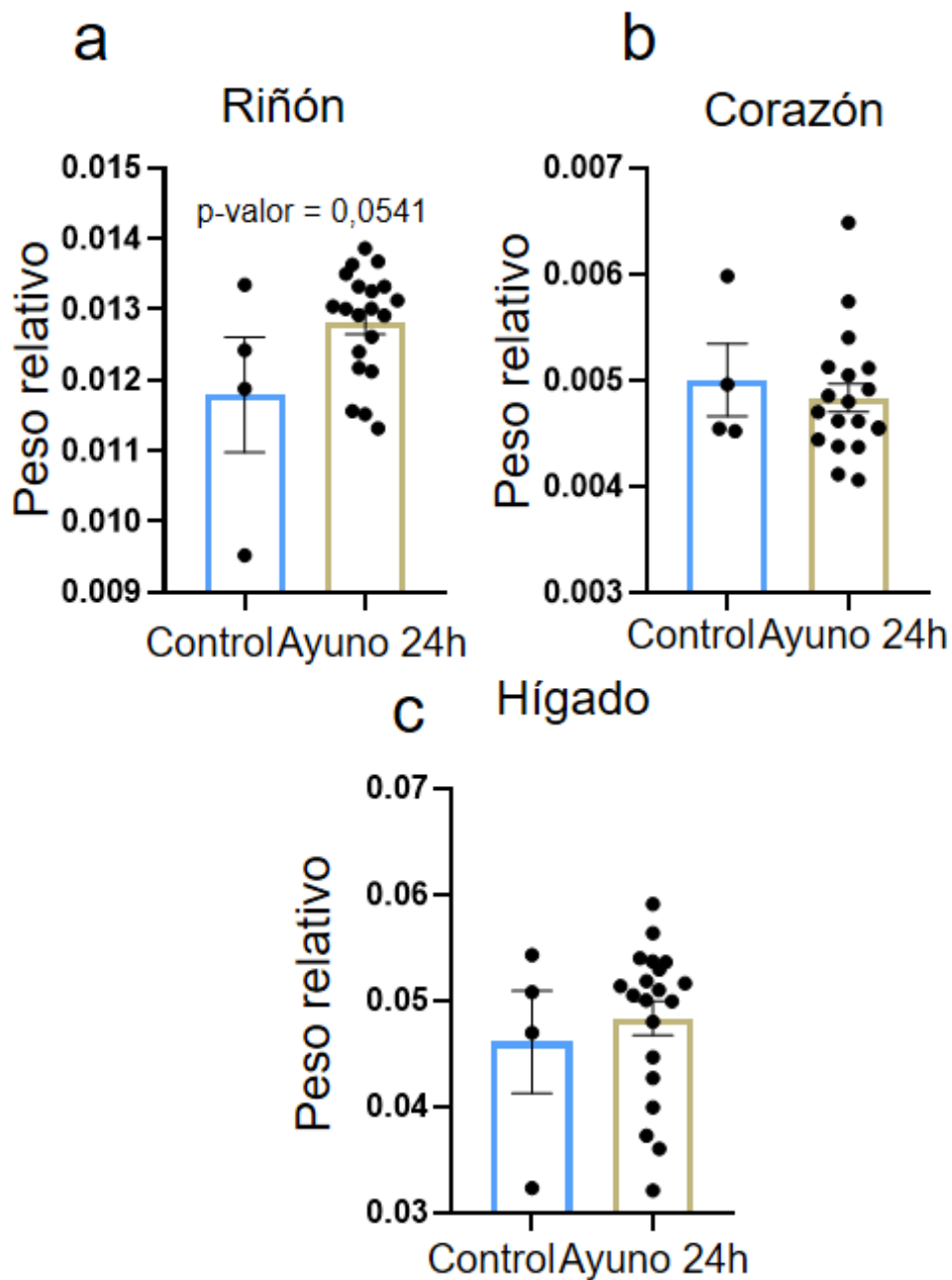


Figura 13. Comparación relativa de los pesos de los órganos entre la situación basal y el ayuno.

Se emplearon 24 ratones macho C57BL/6OlaHsd, de los cuales 20 ayunaron y 4 mantuvieron una dieta normal. Las barras indican la media del peso relativo de los órganos, mientras que los puntos indican los valores individuales de cada ratón. Las barras de error representan el error estándar de la media (SEM). La estadística se realizó una prueba de t test. Los p-valores fueron; riñón 0,0541, corazón 0,6170 e hígado 0.5959.

Hígado

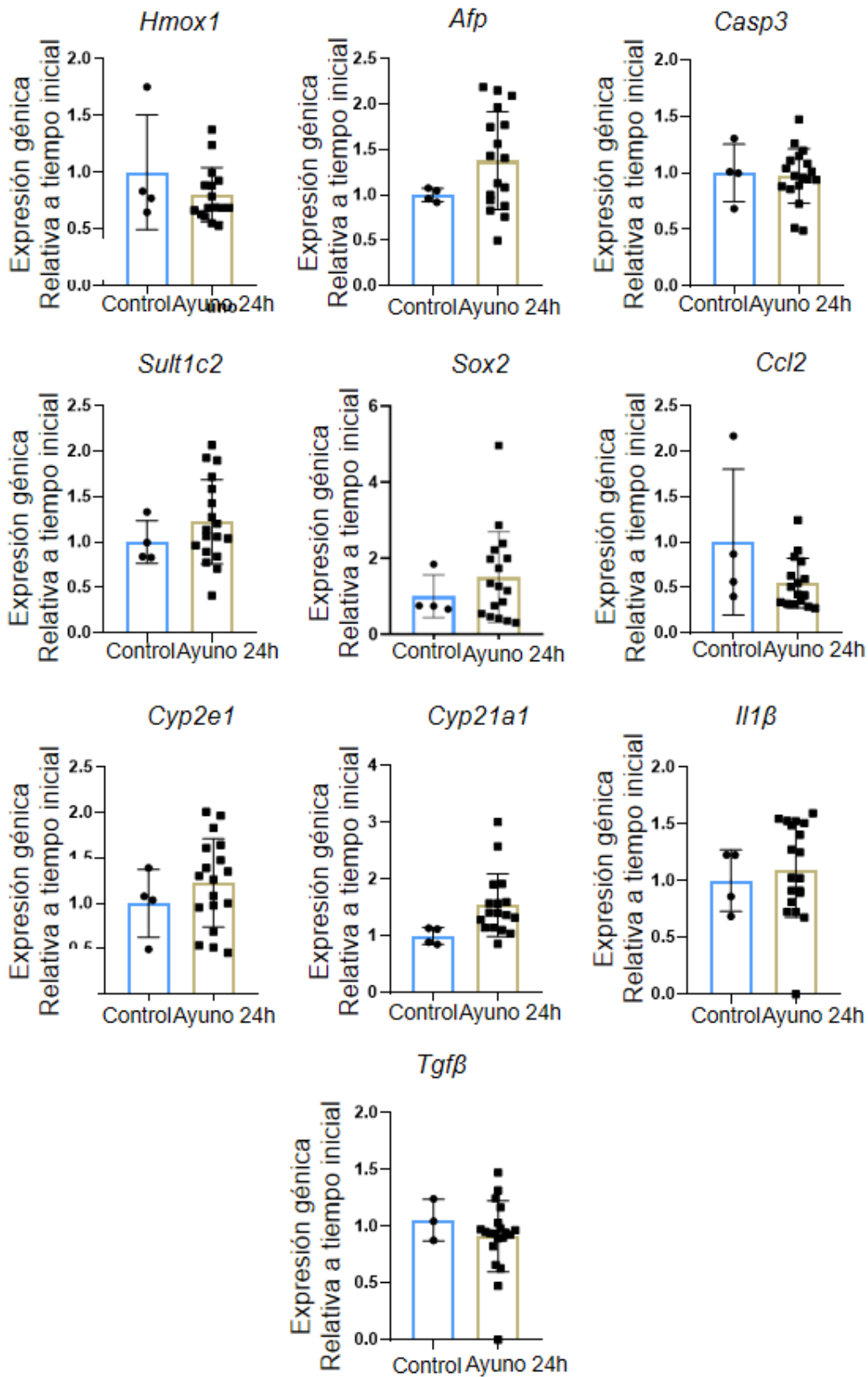


Figura 14. Comparación de la variación de la expresión génica en hígado entre control y ayuno durante la administración de doxorubicina.

Se emplearon 24 ratones macho C57BL/6OlaHsd, de los cuales 20 ayunaron y 4 mantuvieron una dieta normal. Las barras muestran la media de la expresión génica relativa al tiempo inicial. Los puntos y los cuadrados muestran los valores individuales de cada ratón. Las barras de error muestran la SEM. La estadística se realizó mediante un t-test no pareado.

Corazón

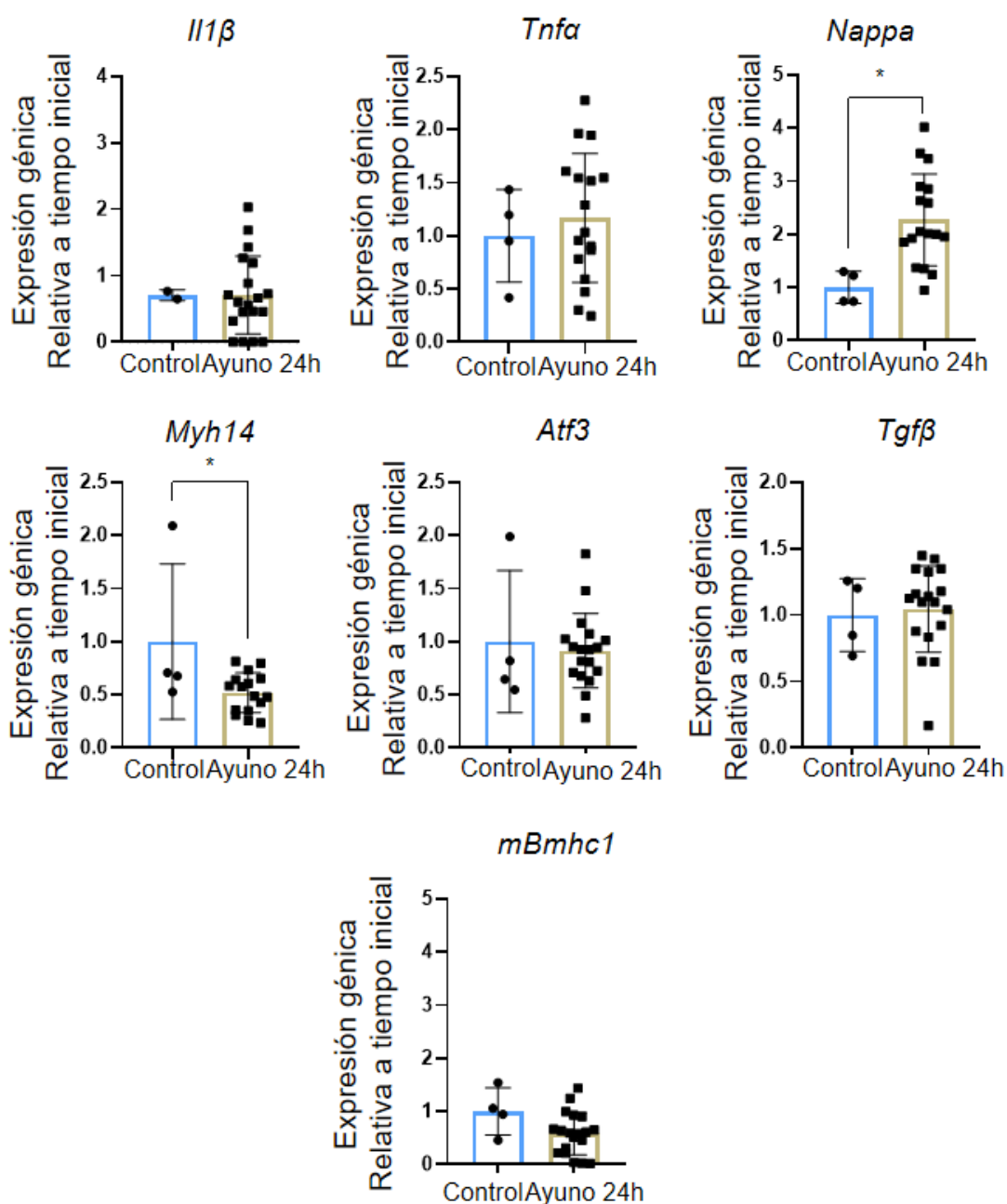


Figura 15. Comparación de la variación de la expresión génica en el corazón entre control y ayuno durante la administración de doxorubicina.

Se emplearon 24 ratones macho C57BL/6OlaHsd, de los cuales 20 ayunaron y 4 mantuvieron una dieta normal. Las barras muestran la media de la expresión génica relativa al tiempo inicial. Los puntos y los cuadrados muestran los valores individuales de cada ratón. Las barras de error muestran la SEM. La estadística se realizó mediante un t-test no pareado. *, $p < 0,05$.

Riñón

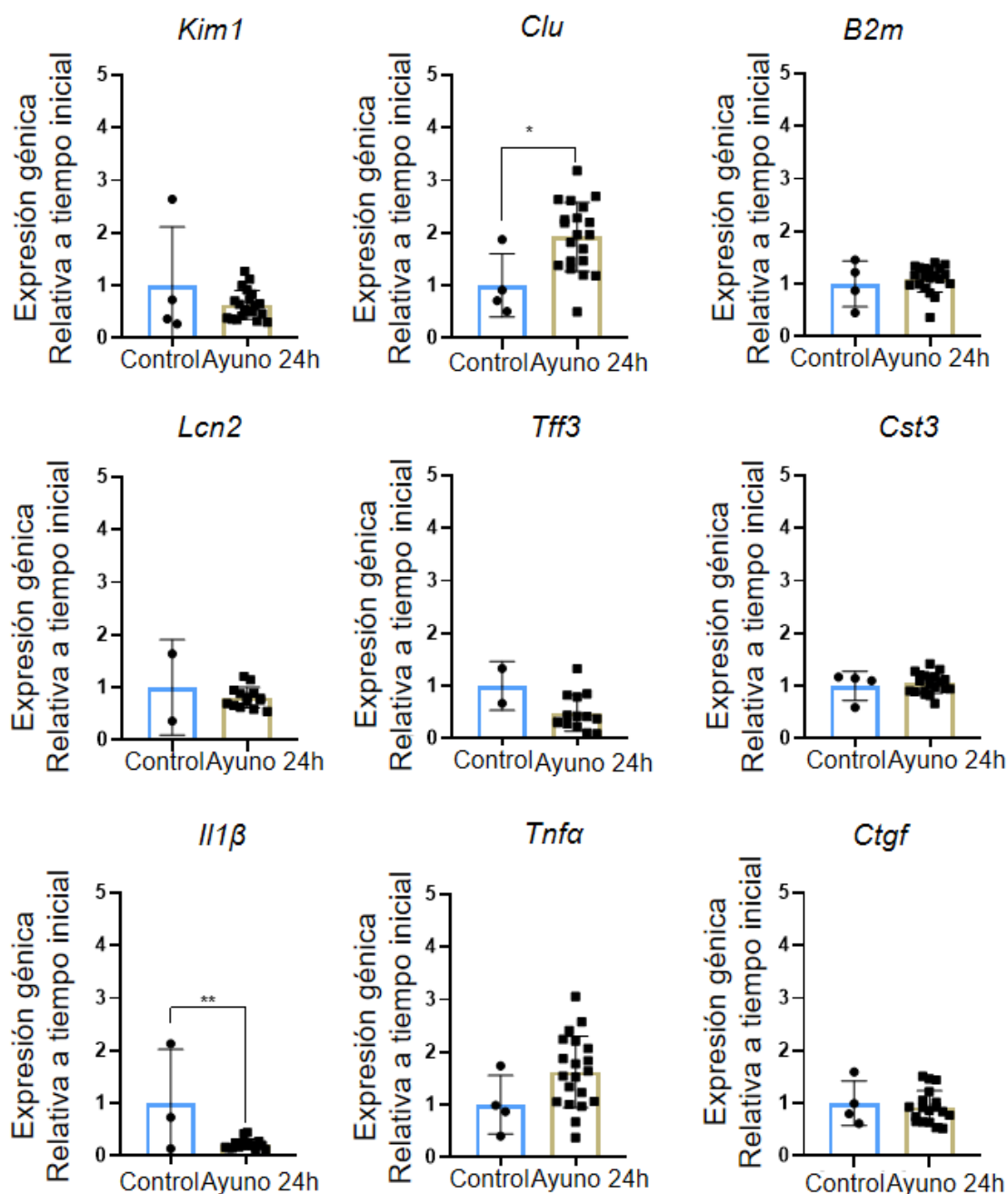


Figura 16. Comparación de la variación de la expresión génica en los riñones entre control y ayuno durante la administración de doxorubicina.

Se emplearon 24 ratones macho C57BL/6OlaHsd, de los cuales 20 ayunaron y 4 mantuvieron una dieta normal. Las barras muestran la media de la expresión génica relativa al tiempo inicial. Los puntos y cuadrados muestran los valores individuales de cada ratón. Las barras de error muestran la SEM. La estadística se realizó mediante un t-test no pareado. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$

3.4 Correlación de todas las variaciones causadas por el ayuno

Para finalizar el estudio, se generó un mapa de calor (Figura 17) donde se correlacionaron todas las variaciones anteriormente estudiadas. Se reunió la variación en la expresión génica de las PBMCs, de los genes *Scd1*, *Srebf1a*, *Insig1*, *Lpcat*, *Erg28*, *Vav3* y *Inpp5a*. Por otro lado, la variación en la expresión de marcadores de toxicidad de los tres tejidos, riñón, hígado y corazón. Los marcadores incluidos fueron *Kim1*, *Tgf- β* , *B2m* y *Clu* (riñón), *Ctgf*, *Il1- β* y *Cyp21a1* (hígado), *Bmhc1*, *Myh14*, *Tgf- β* , *Aff3* y *Anf1* (corazón). Además, se añadieron unos hemogramas en los cuales se midió la cantidad de eritrocitos, hemoglobina y hematocrito en sangre, que como se mostró en el estudio anterior se sabe que tienen relación con la toxicidad. Por último, también se correlacionaron los pesos relativos de riñón, hígado y corazón y la variación en el peso de los ratones: tanto el peso inicial y la pérdida de peso debido al ayuno en porcentaje, como la variación del peso durante la administración de doxorubicina.

En la figura todos los parámetros mencionados se relacionan unos con otros generando un mapa de calor. Al igual que en los anteriores gráficos, las relaciones directas se marcan en colores rojizos mientras que las indirectas lo hacen en colores azulados.

Con esta gráfica se quiere mostrar cómo los datos obtenidos durante toda la investigación no son datos aislados, sino que se correlacionan entre sí. En primer lugar, se puede observar cómo en los genes de las PBMCs hay una relación directa entre ellos, menos en el caso de *Innp5a*, que se relaciona justo de manera inversa al resto. Por otro lado, los marcadores de toxicidad se relacionan entre ellos de manera directa, por lo que, si hay más toxicidad en un órgano, habrá más en el resto. De manera contraria, estos marcadores se relacionan

inversamente con los genes de las PBMCs excepto con *Inpp5a* que lo hacen directamente. En el caso de los hemogramas, un descenso de eritrocitos se verá acompañado de una bajada de hemoglobina y hematocrito, ya que su relación es directa, al igual que con los genes de las PBMCs, mientras que se relacionan indirectamente con la toxicidad. Por último, la correlación con los pesos no está tan clara, en el caso del peso relativo del corazón y el riñón, sí que se puede observar cómo hay una relación directa con las PBMCs y los hemogramas mientras que es indirecta con la toxicidad.

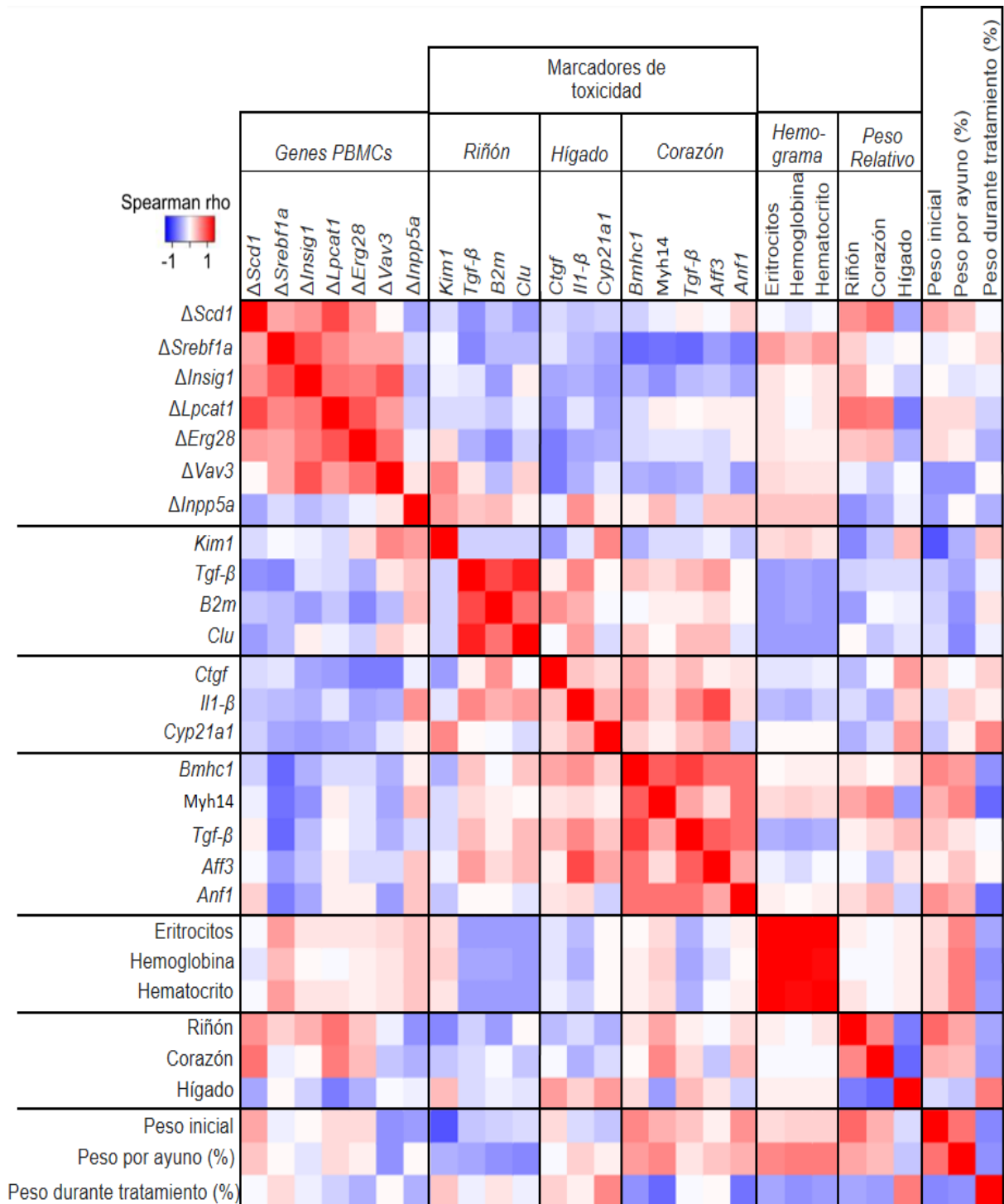


Figura 17. Mapa de calor de las correlaciones de la variación de las PBMCs, marcadores de toxicidad, hemogramas y peso.

Se empleó el programa de R para realizar el gráfico. Los datos para los genes de las PBMCs se obtuvieron de los deltas (ayuno – basal) (del 2^a (genes control (actina y 36B4) – cada gen)) normalizadas con los valores basales de los 20 ratones que posteriormente ayunarán durante 24 horas.

Para los genes de toxicidad se obtuvieron mediante 2^{\wedge} (genes control – el gen de interés) normalizados con los valores de los 4 animales control. Para los pesos relativos se realizó una normalización frente a los valores basales o iniciales. Los colores rojos indican una relación directa mientras que los valores azules muestran una relación indirecta. La estadística se realizó mediante una correlación Rho de Spearman.

4. Discusión

Como se ha demostrado, el ayuno provoca unos cambios importantes en el organismo, no solo la variación en la glucemia y cetonemia, sino también a nivel de la expresión génica. Además de estos cambios, el ayuno genera una protección frente a la quimioterapia.

En la *figura 9* se aprecian estas variaciones generadas por el ayuno. Hay una disminución de glucemia y del peso corporal, mientras se produce un aumento de la cetonemia. Estos cambios no sólo se pueden emplear a modo de control para comprobar si el ayuno se ha realizado con éxito, sino que, además, se puede valorar que la curva es muy similar a la que se produce en el caso de los humanos (Ooi & Pak, 2019). Esto es de gran importancia, ya que se puede comparar de manera más realista y exacta los resultados obtenidos en ratones con los humanos, puesto que la variación durante el ayunado es similar entre ambas especies. Por otro lado, los revisores afirmaron que a las 8 horas ocurre un cambio radical y brusco en los cuerpos cetónicos, diferenciándose así de los humanos. Sin embargo, como se observa en la cinética de la cetonemia, este cambio no se produce, ya que no comienza a ser significativo hasta las 16 horas. Como se ha mencionado anteriormente, estas cinéticas se pueden emplear a modo de examen para comprobar si se ha realizado el ayuno de manera correcta, como en el caso de la *figura 10* donde se observa que los datos de los ratones a las 24 horas de ayuno coincidían con el gráfico de la cinética (*Figura 9*), asegurando que el ayuno se realizó exitosamente.

Por otro lado, en los resultados de las PBMCs, se quiso ver si había un cambio en la expresión génica debido al ayuno. En la *figura 11* se puede ver que en los resultados obtenidos no hay ninguna variación significativa entre la medida basal (0 horas) y las 24 horas de ayuno, lo que significa que no ha habido ningún cambio. Donde sí hay un aumento significativo es en los controles, en los genes *Scd1* y *Srebf1a* entre el estado basal (0 horas) y las 24 horas. En el caso de los demás genes, no se puede afirmar que haya una variación significativa, aunque se aprecia una tendencia a aumentar en todos los controles a las 24 horas. Además, en el caso de *Erg28* o *Vav3*, hay una diferencia significativa entre el control a las 24 horas y el basal (0 horas) del ayuno. Tanto en ambos controles, como en el momento basal del ayuno se deberían encontrar los mismos valores, ya que no se realiza ningún procedimiento que pueda variar los datos, solamente se les extrae la sangre necesaria para realizar el aislamiento del ARN. Todo esto indica que la diferencia significativa que se aprecia en los controles es debida

a un cambio extrínseco al ayuno, ajeno a la variación que se quería estudiar. Dado que, como se ha mencionado, esta variación solo se observó de manera significativa en los controles, se puede concluir que el descenso por el ayuno se pudo encontrar eclipsado por el aumento inesperado en los controles, evitando así que se produjera un aumento significativo en los ratones ayunados.

Este aumento ha podido ser debido a una separación temporal entre la extracción de las primeras muestras de ARN y las segundas. Lo que ha podido causar un cambio en las condiciones, generando esta variación entre los tiempos iniciales y las 24 horas. También se pudo deber a una variación en las condiciones, tanto de estrés, cuidados o temperatura, de los ratones.

En próximos experimentos se quiere realizar la extracción y purificación del ARN tanto del basal como a las 24 horas en el mismo día para evitar así una posible variación en las condiciones. Además de realizar un seguimiento más exhaustivo a los ratones sobre sus condiciones, como por ejemplo saber si se realizarán o no limpiezas de jaula esas semanas, si ha habido una variación en la temperatura o cualquier otro cambio que pueda generar variaciones. Por otro lado, también sería interesante estudiar si estos genes varían de otra forma que no sea sólo mediante al ayuno, es decir, si varían por situaciones de estrés o cambios de temperatura.

En el caso del estudio del efecto protector del ayuno frente a la doxorubicina, se observa en la *Figura 12* como hay una diferencia significativa entre el porcentaje de peso de los ayunados frente a los controles. Con esto se demuestra el efecto protector del ayuno, ya que estos ratones presentan un menor malestar provocado por los efectos nocivos del medicamento, manteniendo así una dieta constante reflejada en la pérdida del peso, la cual disminuye un 5% en el total de los 6 días, mientras que en los controles disminuye más de un 10% en este mismo tiempo. Por otro lado, se puede observar cómo en los ratones control hay un descenso del peso corporal en las primeras 24 horas, aunque durante este periodo no se realizó ningún procedimiento. Esto puede deberse al miedo generado por la limpieza de jaula previa al procedimiento, puesto que a los ratones ayunados se les quitó la comida y los excrementos para que no se alimentaran, a los ratones control se les realizó el mismo proceso para que ambos estuvieran en las mismas condiciones, exceptuando la retirada del alimento. Este miedo pudo haber causado una bajada en el peso, debido a una disminución en la ingesta y un aumento en el metabolismo.

En las *figuras 13, 14 y 15* se quiso estudiar la protección del ayuno frente a la quimioterapia mediante unos marcadores de toxicidad. Se emplearon tres tejidos: hígado, corazón y riñón.

Se decidió el uso del hígado porque en el estudio anterior con oxaliplatino se obtuvieron muchos marcadores de toxicidad. Por otro lado, según fuentes bibliográficas se sabe que el principal efecto secundario de la doxorubicina es la cardiotoxicidad, por lo que se quiso ver si los marcadores de toxicidad aumentaban también en el tejido del corazón. Por último, se estudiaron los marcadores de toxicidad en el riñón, para ver si la toxicidad era mayor en los ratones no ayunados, puesto que como se pudo observar en la variación del tamaño macroscópico del riñón (Figura 13), este presentaba una disminución con un p valor de 0,0541, es decir, presentaba una disminución casi significativa. En el caso del hígado, los marcadores no disminuyeron de manera significativa, esto se pudo deber a que los efectos tóxicos de la doxorubicina se centraron más en el corazón. En cuanto al tejido del corazón, se puede apreciar una única disminución significativa en el gen *Myh14* (Figura 14) y un aumento significativo en el gen *Anf1*. Esto genera confusión ya que se ha demostrado que el ayuno protege frente a la toxicidad (Figura 12), mientras que estos resultados muestran que comparado con los controles no hay una diferencia significativa. Esto puede deberse a un fallo en la elección de estos marcadores de toxicidad en el corazón. Por último, en el tejido del riñón se apreció un descenso significativo únicamente en el marcador de toxicidad $Il1\beta$ y un aumento significativo en el marcador *Clu*, lo que sugiere una mayor toxicidad en este tejido. Con todos los marcadores de toxicidad, no se pudo confirmar la protección por el ayuno demostrada en la figura 12 b. Esto puede deberse a que los marcadores seleccionados no fueron los correctos, o a por un fallo en los controles.

Para terminar, en la figura 16, se muestra un gráfico donde se correlacionan todos los datos obtenidos. Se muestra la variación entre el estado basal y el estado después del ayuno de los ratones que realizaron ayuno. Se puede apreciar cómo en el caso de las PBMCs, todos los genes menos *Inpp5a* se relacionan de manera directa, es decir, si uno presenta una variación muy grande desde el estado basal al ayunado el resto también presentará una gran variación entre ambos estados. Por otro lado, los genes de toxicidad se relacionan de manera directa entre ellos, por lo que si la toxicidad es mayor en un tejido se verán aumentados todos los demás marcadores. La relación entre la toxicidad y la variación génica en las PBMCs es indirecta, lo que significa que cuando en las PBMCs la diferencia entre el estado basal y el ayuno es muy grande, la toxicidad se verá más reducida comparada con un grupo en el que la variación entre ayuno y basal sea más pequeña. De manera opuesta, las PBMCs y los hemogramas se relacionan de manera directa, es decir, que a mayor cambio en la expresión génica, mayor cantidad de eritrocitos, hemoglobina y hematocritos. Siendo coherente con la relación de las PBMCs y los marcadores de toxicidad, los hemogramas se correlacionan indirectamente con la toxicidad, es decir, a mayor toxicidad hay un menor número de

eritrocitos, hemoglobina y hematocritos, a la vez que hay una menor variación en la expresión génica. Por último, las correlaciones con los pesos relativos de los órganos y de los ratones no está tan clara como se puede apreciar en las PBMCs, marcadores de toxicidad y hemogramas.

A modo de resumen, se aprecian en el gráfico dos grupos, los que presentan un cambio mayor en la expresión génica de las PBMCs y los que presentan un cambio menor. El primer grupo presenta además un alto número de eritrocitos, hemoglobina y hematocritos. Por otro lado, muestra una menor toxicidad de los tres tejidos (corazón, hígado y riñón). Por el contrario, el grupo que presenta un cambio menor en las PBMCs tiene un menor número de eritrocitos, hemoglobina y hematocritos mientras que padece una mayor toxicidad. Aunque los marcadores de toxicidad antes no mostraran la protección del ayuno, sí que se observa cómo se correlacionan entre ellos de manera directa y se correlacionan indirectamente con las PBMCs y los hemogramas, indicando que el ayuno genera protección.

Como se puede apreciar, los resultados de los marcadores genéticos de toxicidad en las *figuras 13, 14 y 15* no muestran una variación significativa entre controles y ayunados. En cambio, cuando se comparan en la *figura 16* entre las situaciones basales y después del ayuno, solo en los ratones del grupo ayuno, sí que se aprecia un cambio significativo y unos patrones, como antes se ha explicado, entre los genes de las PBMCs, los marcadores de toxicidad y los hemogramas. Todo esto puede implicar que ha habido un fallo en los controles, puesto que parece como si estos hubieran realizado el ayuno también, ya que los cambios frente a los que verdaderamente sí que han ayunado no son muy significativos.

En un futuro próximo se está planteando obtener también los datos de las membranas de los eritrocitos, puesto que son estos lo que verdaderamente generan ambos grupos. Sin embargo, a pesar de no conocer aún estos datos, se mantienen los mismos grupos que se generaron en el estudio previo con oxaliplatino, lo que nos refuerza la veracidad de los resultados obtenidos.

En estudios posteriores nos gustaría estudiar más marcadores de toxicidad para corroborar el efecto protector del ayuno frente a la doxorubicina que se observa en la variación del peso (*Figura 12*). Además, se va a estudiar la variación de ATP en tejidos del corazón, ya que la toxicidad de la doxorubicina, según la literatura, viene dada por el daño en las mitocondrias, causando así toxicidad en el corazón.

Por otro lado, se quiere estudiar más a fondo cómo mediante una extracción de sangre podemos prever cual será la respuesta al ayuno, permitiendo saber de antemano y de manera

más exacta cuanto beneficiará el ayuno durante la exposición a un quimioterapéutico. Por último, se quiere ver si mediante la realización de ayunos constantes se producen cambios permanentes en nuestro organismo, generando protección frente a tóxicos como la quimioterapia.

5. Agradecimientos

Quería agradecer en primer lugar a Pablo J. Fernández-Marcos por admitirme en el grupo y permitirme realizar las practicas con ellos. Además, por apoyarme y ayudarme a la hora de redactar la presente memoria.

Por otro lado, quería agradecer a Marta Barradas por ser mi tutora más cercana en el ámbito experimental del laboratorio, ya que el estudio previamente explicado había sido realizado por ella. Por enseñarme las técnicas empleadas y por mostrarse siempre dispuesta a explicarme cualquier duda que se me presentaba. Además de estar pendiente de mi en todo momento asegurándose que entendía el porqué de todos los resultados.

También quería agradecer a Adrián Plaza, por su labor con los resultados referentes a la quimioterapia y por todo su trabajo a la hora de seleccionar los marcadores de toxicidad. Así como por enseñarme las técnicas y procedimientos en el laboratorio.

No solo ellos, si no que el resto del grupo me ayudó y me apoyó siempre, por lo que quería agradecer su ayuda y su acogida desde el primer momento, haciendo que todo sea mucho más sencillo.

Por último, quería agradecer a IMDEA por permitirme realizar las prácticas haciendo posible la realización de este proyecto.

6. Bibliografía

- Alam, I., Gul, R., Chong, J., Tan, C. T. Y., Chin, H. X., Wong, G., Doggui, R., & Larbi, A. (2019). Recurrent circadian fasting (RCF) improves blood pressure, biomarkers of cardiometabolic risk and regulates inflammation in men. *Journal of Translational Medicine*, 17(1), 272. <https://doi.org/10.1186/s12967-019-2007-z>
- Alliouachene, S., Bilanges, B., Chicanne, G., Anderson, K. E., Pearce, W., Ali, K., Valet, C., Posor, Y., Low, P. C., Chaussade, C., Scudamore, C. L., Salamon, R. S., Backer, J. M., Stephens, L., Hawkins, P. T., Payrastre, B., & Vanhaesebroeck, B. (2015). Inactivation of the Class II PI3K-C2 β Potentiates Insulin Signaling and Sensitivity. *Cell Reports*, 13(9), 1881–1894. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.10.052>
- Antoni, R., Johnston, K. L., Collins, A. L., & Robertson, M. D. (2017). Effects of intermittent fasting on glucose and lipid metabolism. *Proceedings of the Nutrition Society*, 76(3), 361–368. <https://doi.org/10.1017/S0029665116002986>
- de Cabo, R., & Mattson, M. P. (2019). Effects of Intermittent Fasting on Health, Aging, and Disease. *New England Journal of Medicine*, 381(26), 2541–2551. <https://doi.org/10.1056/nejmra1905136>
- Gachotte, D., Eckstein, J., Barbuch, R., Hughes, T., Roberts, C., & Bard, M. (2001). A novel gene conserved from yeast to humans is involved in sterol biosynthesis. *Journal of Lipid Research*, 42(1), 150–154. [https://doi.org/10.1016/s0022-2275\(20\)32347-6](https://doi.org/10.1016/s0022-2275(20)32347-6)
- Izuta, Y., Imada, T., Hisamura, R., Oonishi, E., Nakamura, S., Inagaki, E., Ito, M., Soga, T., & Tsubota, K. (2018). Ketone body 3-hydroxybutyrate mimics calorie restriction via the Nrf2 activator, fumarate, in the retina. *Aging Cell*, 17(1). <https://doi.org/10.1111/accel.12699>
- Koleini, N., & Kardami, E. (2017). Autophagy and mitophagy in the context of doxorubicin-induced cardiotoxicity. In *Oncotarget* (Vol. 8, Issue 28, pp. 46663–46680). Impact Journals LLC. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.16944>
- Laffel, L. (1999). *Ketone Bodies: a Review of Physiology, Pathophysiology and Application of Monitoring to Diabetes*. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1520-7560\(199911/12\)15:6](https://doi.org/10.1002/(SICI)1520-7560(199911/12)15:6)
- Law, S. H., Chan, M. L., Marathe, G. K., Parveen, F., Chen, C. H., & Ke, L. Y. (2019). An updated review of lysophosphatidylcholine metabolism in human diseases. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 20, Issue 5). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms20051149>
- Liang, C., Qiao, L., Han, Y., Liu, J., Zhang, J., & Liu, W. (2020). Regulatory roles of SREBF1 and SREBF2 in lipid metabolism and deposition in two chinese representative fat-tailed sheep breeds. *Animals*, 10(8), 1–14. <https://doi.org/10.3390/ani10081317>

- Longo, V. D., & Mattson, M. P. (2014a). Fasting: Molecular mechanisms and clinical applications. *Cell Metabolism*, *19*(2), 181–192. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.12.008>
- Martinez-Balibrea, E., Martínez-Cardus, A., Gines, A., Ruiz De Porras, V., Moutinho, C., Layos, L., Manzano, J. L., Buges, C., Bystrup, S., Esteller, M., & Abad, A. (2015). Tumor-related molecular mechanisms of oxaliplatin resistance. *Molecular Cancer Therapeutics*, *14*(8), 1767–1776. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-14-0636>
- Ooi, S. L., & Pak, S. (2019). Short-term Intermittent Fasting for Weight Loss: A Case Report. *Cureus*, *11*(4). <https://doi.org/10.7759/cureus.4482>
- Phillips, M. C. L. (2019). Fasting as a therapy in neurological disease. In *Nutrients* (Vol. 11, Issue 10). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/nu11102501>
- Rivankar, S. (2014a). An overview of doxorubicin formulations in cancer therapy. In *Journal of Cancer Research and Therapeutics* (Vol. 10, Issue 4, pp. 853–858). Medknow Publications. <https://doi.org/10.4103/0973-1482.139267>
- Rivankar, S. (2014b). An overview of doxorubicin formulations in cancer therapy. In *Journal of Cancer Research and Therapeutics* (Vol. 10, Issue 4, pp. 853–858). Medknow Publications. <https://doi.org/10.4103/0973-1482.139267>
- Stockman, M. C., Thomas, D., Burke, J., & Apovian, C. M. (2018). Intermittent Fasting: Is the Wait Worth the Weight? In *Current obesity reports* (Vol. 7, Issue 2, pp. 172–185). NIH Public Access. <https://doi.org/10.1007/s13679-018-0308-9>
- Zhang, J., Deng, Y., & Khoo, B. L. (2020). Fasting to enhance Cancer treatment in models: The next steps. In *Journal of Biomedical Science* (Vol. 27, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s12929-020-00651-0>
- Zhang, Y., Lu, J., Ma, J., & Liu, X. (2019). Insulin-induced gene 1 (INSIG1) inhibits HIV-1 production by degrading Gag via activity of the ubiquitin ligase TRC8. *Journal of Biological Chemistry*, *294*(6), 2046–2059. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.004630>
- Zorn, S., Ehret, J., Schäuble, R., Rautenberg, B., Ihorst, G., Bertz, H., Urbain, P., & Raynor, A. (2020). Impact of modified short-term fasting and its combination with a fasting supportive diet during chemotherapy on the incidence and severity of chemotherapy-induced toxicities in cancer patients - A controlled cross-over pilot study. *BMC Cancer*, *20*(1). <https://doi.org/10.1186/s12885-020-07041-7>
- Zou, Y., Wang, Y. N., Ma, H., He, Z. H., Tang, Y., Guo, L., Liu, Y., Ding, M., Qian, S. W., & Tang, Q. Q. (2020). SCD1 promotes lipid mobilization in subcutaneous white adipose tissue. *Journal of Lipid Research*, *61*(12), 1589–1604. <https://doi.org/10.1194/jlr.RA120000869>

7. Anexos

Anexo 1.

Script realizado para la figura 17 mediante el programa de R.

```
1      install.packages("corrplot")
2      install.packages("cluster")
3      library(corrplot)
4      library(cluster)
5
6      MFS19_2_CP2_Plan_Nacional.sel.var <-
X20210518_Plan_Nacional_MFS19_2_6_R7_CP2
7
8      datos <- na.omit(MFS19_2_CP2_Plan_Nacional.sel.var)
9
10     M <- cor(datos, method = "spearman")
11
12     col3 <- colorRampPalette(c("blue", "white", "red"))
13
14     corrplot (M, tl.col = "black", tl.cex = 0.6, col = col3(50), cl.pos = "n", method = "color").
```