



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Reversión del fenotipo obeso en ratones tratados con AAV9 que expresan la carnitina palmitoiltransferasa 1A humana en hígado

Minéia Weber Blattes

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Departament de Bioquímica i Fisiologia

Facultat de Farmàcia i Ciències de l'Alimentació

**Reversión del fenotipo obeso en ratones
tratados con AAV9 que expresan la carnitina
palmitoiltransferasa 1A humana en hígado**

Minéia Weber Blattes

2016



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

FACULTAT DE FARMÀCIA

Programa de Doctorat en Biotecnologia

**Reversión del fenotipo obeso en ratones tratados con
AAV9 que expresan la carnitina palmitoiltransferasa 1A
humana en hígado**

Memoria presentada por Minéia Weber Blattes, licenciada en Farmacia, para optar al título de Doctor por la Universidad de Barcelona.

Esta Tesis se ha realizado bajo la dirección de la Doctora Dolors Serra Cucurull y la Doctora Laura Herrero Rodríguez, en la Sección de Bioquímica y Biología Molecular, del Departamento de Bioquímica y Fisiología de la Facultad de Farmacia de la Universitat de Barcelona.

Dra. Dolors Serra Cucurull

Dra. Laura Herrero Rodríguez

Minéia Weber Blattes

Barcelona, 2016

A mis padres, Geraldo y Jurema.

Al Ricardo y José Inácio.

AGRADECIMIENTOS

En primero lugar a la Dra. Dolors Serra por haberme dado la oportunidad de realizar esta Tesis. Muchas gracias por cogerme de la mano y enseñarme todo lo que he aprendido de investigación, por tu dedicación, por tu risa y por haberme guiado durante este largo camino. Gracias por la comprensión, por haber hecho creer que yo podría hacerlo. Lo he hecho, pero si no fuera tu, no lo habría alcanzado. Sí me pongo a escribir ya veras que no caberá en esta hoja. Cuando sea ´mayor` si llego a ser la mitad de lo que és ya estaré muy contenta. Hoy puede ser un gran día, plantéatelo así...

A Dra. Laura por todos los ensinamentos con los animals, por la paciencia en la hora de pinchar por la cola, por su alegría y amor por la ciencia. Por sus *ánimos campeona, tu puedes!* Lo que me ha hecho creer en mi trabajo.

A la Guillermina por sus consejos y su alegría de vivir. Me encantas.

Al Dr. Joan Mir por no solamente haber compartido poyata, más por ser mi compañero de travesía, por haber compartido los peores y mejores momentos de nuestras Tesis. Gracias por la amistad, por las enseñanzas, las risas, lloros e incluso las clases de castellano, jejejej. Espero pronto compartir poyata contigo.

A la Dra. Josefina Casas y la Dra. Gemma Fabriàs por las análisis de lipidómica. Al Dr. David Sebastián por los experimentos con mitocondrias. A la Dr. Vicenta Llorente por las análisis del metabolismo del colesterol.

Al CNPq por la beca que ha financiado estos estudios.

Quiero agradecer también a todos mis compis del labo, Dra. Mida, Dra. Paula, Dra. Maria, Dra. Raquel, Anna, Lorea, Julia, Nina, Alessandra, Natascia, Blanca, Fran, Jordi, Éilis, Dra. Sofia, Dr. David, Eduviges y la Sandra. Espero no haber olvidadome de nadie. Muchas gracias por todo lo que hemos compartido.

A mis padrinos, Régis y Neidi, que siempre desean mi éxito.

A mi familia que, mismo lejos, siempre ha estado presente y vibrando con mis victorias. En especial a mis padres, que sin ellos no seria nadie. Gracias por la confianza deposita en mi y por hacer que cada día quiera ser mejor.

A familia Lovatto Blattes por todo el cariño y cuidado.

A mi equipo de apoyo, que no han pensado dos veces en venir a ayudarme neste año sola: mi madre, mi suegra y mi cuñada Letícia. Muchas gracias!

A la Anne, porque sin ella seguro que este camino se me haría mucho más difícil. Gracias por compartir lo bueno y lo malo, por estar siempre lista y ayudar en todos los momentos. Gracias por hacerte cargo del José Inácio y por quererle muchísimo. Muchas, muchas gracias!

Al Ricardo por compartir todo conmigo, las alegrías y las penas. Por acreditar en mí y por los ánimos durante esta Tesis. Por este año durillo que pasamos lejos, pero de corazón cercano. Eu te amo!

Finalmente, al José Inacio que, sin dudas, ha sido el mejor experimento de esta Tesis. Gracias por hacerme ver la vida con otros ojos, por hacerme creer que puedo todo. Por tu sonrisa de todos los días que ha sido mi mayor fuerza para llegar al fin.

Muito obrigada!

ABSTRACT

Obesity is a multifactorial chronic disease, characterized by excessive accumulation of fat throughout the body. Obesity is associated with severe metabolic disorders such as insulin resistance, type 2 diabetes mellitus, cardiovascular disease, and cancer among others and has become a serious public health problem of the XXI century. Recently, a great effort has been made to understand the pathophysiological mechanisms of obesity and to find potential new effective therapeutic strategies.

The liver plays a key role in regulating body energy homeostasis and lipid and glucose metabolism. In conditions of chronic energy excess, there is a considerable lipid accumulation, altering the hepatic lipid metabolism that entails the development of fatty liver disease, increased hepatic gluconeogenesis, insulin resistance and subsequently to more serious changes as steatohepatitis, cirrhosis, and hepatocellular carcinoma. Since fatty liver is caused by an imbalance between input and output of lipids, we hypothesize that an intervention that stimulates hepatic fatty acid oxidation will lead to decreased hepatic steatosis and an improved obese phenotype. Previous studies by our group and Monsenego *et al.* have shown that increased expression of Carnitine Palmitoyltransferase 1A (CPT1A), the key enzyme regulating the entry of fatty acids into the mitochondria to be oxidized, in the liver prevents high-fat diet-induced obesity in mice.

Given these promising results and in order to target a potential gene therapy for obesity, in this study we have expressed in liver of obese mice a permanently active mutated human form of CPT1A (hCPT1AM) using adeno-associated virus (AAV) serotype 9. These viral vectors allow a long term (1 year) and a high degree of expression of the gene of interest. hCPT1AM expression in liver of obese mice resulted in increased flux of fatty acids into the mitochondria and increased fatty acid oxidation. These led to an activation of lipolysis and hepatic autophagy, an improvement in cholesterol metabolism, decreased hepatic steatosis, improved hepatic insulin sensitivity and decreased hyperglycemia, hyperinsulinemia and weight. Therefore, hCPT1AM overexpression is able to reverse obesity and many its associated derangements, being a potential effective strategy for the treatment of the disease.

RESUMEN

La obesidad es una enfermedad crónica de origen multifactorial y se caracteriza por una acumulación excesiva de grasa en todo el organismo. La obesidad y los trastornos metabólicos asociados, como son la resistencia a la insulina, la diabetes *mellitus* tipo 2, la enfermedad cardiovascular, el cáncer y otras patologías, se han convertido en un grave problema de salud pública del siglo XXI. En los últimos años se está realizando un gran esfuerzo para entender los mecanismos fisiopatológicos de la obesidad y también en la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas efectivas¹.

El hígado juega un papel clave en la homeostasis energética del organismo regulando el metabolismo lipídico y de la glucosa. En condiciones de exceso crónico de energía se produce una considerable acumulación de lípidos, alterando el metabolismo lipídico hepático que conlleva al desarrollo de la enfermedad del hígado graso, al aumento de la gluconeogénesis hepática, a la resistencia a la insulina y posteriormente a alteraciones más graves como la esteatohepatitis, la cirrosis y el carcinoma hepatocelular. Dado que un hígado graso es consecuencia de un desequilibrio entre la entrada y la salida de lípidos, nuestra hipótesis es que una intervención que estimule la oxidación hepática de los ácidos grasos (AG) dará lugar a una disminución de la esteatosis hepática y una mejora del fenotipo obeso. Estudios previos realizados por nuestro grupo y Monsenego *et al.* han mostrado que un aumento de la expresión de la carnitina palmitoiltransferasa 1A, enzima limitante de la entrada de los AG en la mitocondria para ser oxidados, en hígado previene la obesidad inducida por dieta grasa en ratones.

Ante esos resultados prometedores y con el fin de ir dirigidos hacia una posible terapia génica de la obesidad, en este estudio hemos expresado en hígado de ratones obesos una forma humana mutada de CPT1A permanentemente activa (hCPT1AM) mediante la utilización de virus adenoasociados (AAV) del serotipo 9. Estos vectores víricos permiten un alto grado y durante largo plazo (1 año) la expresión del gen de interés. La expresión de la hCPT1AM en hígado de ratones obesos ha dado lugar a un aumento del flujo de los AG hacia la mitocondria y una mayor oxidación de dichos AG que ha conducido a: una activación de la lipólisis y la autofagia hepáticas, una mejora del metabolismo del colesterol, una disminución de la esteatosis hepática, una mejora de la sensibilidad hepática a la

insulina y una disminución de la hiperglicemia, la hiperinsulinemia y el peso. Por tanto, la sobreexpresión de la hCPT1AM es capaz de revertir la obesidad y muchos de sus problemas asociados y puede ser una buena estrategia para el futuro tratamiento de la enfermedad.

Sumario	
ABSTRACT	9
RESUMEN	10
ABREVIATURAS.....	17
Capítulo 1. INTRODUCCIÓN.....	22
OBESIDAD	23
DIABETES	24
RESISTENCIA A INSULINA.....	26
Señalización de la insulina	26
METABOLISMO HEPÁTICO EN LA OBESIDAD.....	27
Alteraciones en el metabolismo hepático de la glucosa.....	28
Alteraciones en el metabolismo hepático de los lípidos	30
METABOLISMO DE ÁCIDOS GRASOS Y TRIGLICÉRIDOS.....	31
Síntesis <i>de novo</i>	31
Almacenamiento de lípidos y lipólisis.....	33
METABOLISMO DEL COLESTEROL.....	35
METABOLISMO DE LÍPIDOS COMPLEJOS: FOSFOLÍPIDOS Y ESFINGOLÍPIDOS	38
AUTOFAGIA	41
Maquinaria molecular de la autofagia.....	42
Regulación de la autofagia.....	44
Macrolipofagia y NAFLD	45
OXIDACIÓN DE LOS ÁCIDOS GRASOS	46
SISTEMA CARNITINA PALMITOIL-TRANSFERASA.....	47
Regulación a nivel transcripcional.....	48
Regulación por malonil-CoA.....	49
ESTRATEGIAS TERAPEUTICAS PARA EL TRATAMIENTO DE LA OBESIDAD	51
Terapia génica por AAVs.....	53
Capítulo 2. OBJETIVOS	54
Capítulo 3. MATERIALES y MÉTODOS	56
1. ANIMALES.....	57
1.1 Dietas empleadas.....	57
1.2 Determinación del peso e ingesta.....	57
2. VIRUS ADENO-ASOCIADOS (AAVs).....	57
3. PROCEDIMIENTOS CON ANIMALES.....	58

3.1 Identificación.....	58
3.2 Administración de los AAVs.....	59
3.3 Determinación de la glucosa y test de tolerancia a glucosa (GTT).....	60
3.4 Anestesia	60
3.5 Medición del consumo de oxígeno mediante calorimetría indirecta.....	60
3.6 Termografía con cámara de infrarrojos.....	61
4. CULTIVOS PRIMARIOS.....	61
4.1 Hepatocitos de ratón	61
4.2 Obtención de hepatocitos primarios de ratón	62
4.3 Tratamientos en hepatocitos.....	66
4.3.1 Estimulación de la insulina.....	66
4.3.2 Flujo de la autofagia	66
5. DETERMINACIONES EN SUERO.....	67
5.1 Obtención del suero.....	67
5.2 Insulina.....	67
5.3 β -Hidroxibutirato (BHB)	68
5.4 Colesterol total, HDL, TG, ALT y AST	68
6. DETERMINACIÓN DE METABOLITOS EN HÍGADO.....	68
6.1 Triglicéridos (TG)	68
6.2 Determinación del ATP	69
6.3 Determinación de β -hidroxiburitato.....	70
6.4 Oil Red O	70
7. ANÁLISIS DE LIPIDÓMICA	70
8. OBTENCIÓN DE PROTEÍNAS Y CUANTIFICACIÓN POR EL MÉTODO DE BRADFORD	71
8.1 Extracción de proteínas de tejido congelado.....	71
8.2 Extracción de proteínas a partir de hepatocitos	72
8.3 Cuantificación de proteínas por el método de Bradford	72
9. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS ENRIQUECIDOS DE MITOCONDRIAS.....	73
9.1 Extracción de mitocondrias de hígado	74
9.2 Extracción de mitocondrias de hepatocitos primarios	74
10. ENSAYO DE LA ACTIVIDAD CPT1	75
10.1 Ensayo de actividad de la CPT1 en presencia de inhibidores.....	78
11. ENSAYO DE OXIDACIÓN DE LOS ÁCIDOS GRASOS.....	78
11.1 Oxidación de oleato a ASP	81
12. CONSUMO DE OXÍGENO	82

13. ANALISIS DE NIVELES DE PROTEÍNA POR WESTERN BLOT	83
13.1 Separación electroforética en gel de poliacrilamida (<i>SDS-PAGE</i>)	83
13.2 Electroforesis:.....	85
13.3 Transferencia.....	85
13.4 Bloqueo de la membrana.....	86
13.5 Unión al anticuerpo primario	86
13.6 Unión al anticuerpo secundario.....	87
13.7 Detección	88
14. MÉTODOS DE TRABAJO CON RNA	88
14.1 Extracción de RNA de tejidos.....	88
14.2 Valoración de la concentración del RNA.....	89
14.3 RT (REVERSE TRANSCRIPTASE)-PCR.....	89
14.4 PCR cuantitativa en tiempo real (<i>qRT-PCR</i>)	90
14.5 Análisis de los datos.....	91
15. ANÁLISIS HISTOLÓGICOS.....	91
16. MÉTODOS BIOINFORMÁTICOS	93
17. MÉTODOS ESTADÍSTICOS.....	93
Capítulo 4. RESULTADOS.....	94
1. EFECTO DE LA SOBREEXPRESIÓN DE hCPT1AM EN HÍGADO DE RATONES	
ALIMENTADOS CON DIETA NORMAL	95
1.1 Análisis de los niveles de la proteína CPT1A	96
1.2 Análisis de los niveles de la actividad de CPT1.....	97
2. EFECTO DE LA SOBREEXPRESIÓN DE hCPT1AM EN HÍGADO DE RATONES	
ALIMENTADOS CON DIETA GRASA Y DIETA CONTROL.....	97
2.1 Desarrollo del fenotipo obeso	98
2.2 Test de tolerancia a glucosa (GTT).....	99
2.3 Medición del consumo de oxígeno mediante calorimetría indirecta	101
2.4 Efecto de la sobreexpresión de hCPT1AM en el peso y la glucosa	103
2.5 Análisis de los niveles de proteína y actividad de CPT1	104
2.6 Análisis de los niveles de oxidación de los ácidos grasos	106
3. ANÁLISIS DE DOSIS DE AAVS.....	107
3.1 Test de tolerancia a la glucosa (GTT).....	108
3.2 Análisis de la sobreexpresión en los niveles de proteína CPT1A.....	109
3.3 Análisis histológico del efecto de la sobreexpresión de hCPT1AM en hígado ...	110
3.4 Análisis de los parámetros de glucosa, insulina y peso.....	111

4. EFECTO DE LA SOBREEXPRESIÓN DE hCPT1AM EN HÍGADO DE RATONES ALIMENTADOS CON DIETA GRASA Y DIETA CONTROL.....	113
4.1 Test de tolerancia a la glucosa (GTT).....	114
4.2 Efecto de la sobreexpresión de hCPT1AM en los niveles de glucosa, insulina y peso en el sacrificio	115
4.3 Análisis de la capacidad infectiva de los AAVs, de los niveles de proteína y actividad de CPT1.....	117
4.4 Ensayo de oxidación de ácidos grasos (FAO)	118
4.5 Estudio de la capacidad respiratoria mitocondrial.....	119
4.6 Estudio histológico y macroscópico del hígado.....	120
4.7 Contenido de TG en el hígado.....	122
4.8 Estudio de los niveles de s cuerpos cetónicos.....	123
4.9 Efecto en la producción de ATP en el hígado.....	125
4.10 Análisis a través de termografía por radiación infrarroja.....	126
4.11 Mejora de los parámetros séricos y daño hepático.....	128
4.12 Efecto de la expresión de la hCPT1AM en la lipólisis	129
En conjunto todos estos resultados indican que la sobreexpresión de la hCPT1AM es capaz de reactivar el proceso lipolítico reprimido por acción de la dieta grasa.	131
4.13 Efecto de la expresión de hCPT1AM en el proceso de autofagia	131
4.14 Análisis de la síntesis de lípidos	133
4.15 Análisis lipídómico de hígado y suero	135
4.16 Estudio del metabolismo del colesterol	144
4.17 Resistencia hepática a la insulina y metabolismo de la glucosa	148
Capítulo 5. DISCUSIÓN.....	151
1. Análisis de la capacidad de AAV9 de transducir la expresión de la isoforma CPT1AM humana en hígado de ratones obesos	153
2. El aumento de la FAO en el hígado mejora el fenotipo obeso.....	156
2.1 Peso.....	156
2.2 Normalización de la señalización de la insulina en hígado	157
2.3 Mejora del metabolismo de la glucosa en ratones obesos debido al aumento de la β -oxidación	159
2.4 El aumento de la FAO en el hígado disminuye la esteatosis hepática y mejora el metabolismo lipídico	160
2.5 El aumento de β -oxidación de ácidos grasos activa la lipólisis y la autofagia y la disipación de energía en ratones obesos.....	162
2.5.1 Lipólisis	162

2.5.2 Autofagia.....	163
2.5.3 Destinos del acetyl-CoA.....	164
2.6 El aumento de β -oxidación de ácidos grasos normaliza la lipogénesis hepática <i>de novo</i> en ratones obesos.....	165
2.7 Efecto de un aumento de la β -oxidación en el metabolismo del colesterol.....	165
2.8 Efecto de un aumento de la β -oxidación en las especies lipídicas de hígado y suero	167
Capítulo 6. CONCLUSIONES.....	170
Capítulo 7. BIBLIOGRAFÍA	172
PUBLICACIONES	200

ABREVIATURAS

AAV	virus adenoasociado
Ab	anticuerpo
ABCA	transportadores de casete de unión a ATP subfamilia A
ABCG	transportadores de casete de unión a ATP subfamilia G
Abs	absorbancia
ACC	acetil-CoA carboxilasa
ACS	acil-CoA sintetasa
A.E.	actividad específica
AG	ácido graso
AMP	monofosfato de adenosina
AMPK	proteína quinasa activada por AMP
AKT	AKT proteína quinasa
ASP	productos ácidos solubles
ATG	proteínas relacionadas a autofagia
ATGL	lipasa adiposa de triglicéridos
ATP	trifosfato de adenosina
BSA	albumina bovina sérica
C	concentración
cDNA	DNA complementario
CE	esteres de colesterol
CerS	ceramida sintasa
Ci	curí
ChAT	colina acetiltransferasa
CHREBP	proteína de unión a elemento en respuesta a los carbohidratos
CoA	coenzima A
COT	carnitina octanoiltransferasa
cpm	cuentas por minuto
CPT1	carnitina palmitoiltransferasa 1
CPT1A	carnitina palmitoiltransferasa 1 A
CPT1AM	carnitina palmitoiltransferasa 1 A mutada
hCPT1AM	carnitina palmitoiltransferasa 1 A mutada humana

CrAT	carnitina acetiltransferasa
DAG	diacilglicerol
DEPC	dietilpirocarbonato
DGAT	diacilglicerol-aciltransferasa
DIO	dieta que induce obesidad
DM2	diabetes tipo 2
DMSO	dimetil sulfóxido
DNA	ácido desoxiribonucleico
dNTPs	2'-deosinoxinucleosidos 5'-trifosfato
DTE	ditioeritrol
DTT	ditiotreitrol
ECF	facilitador quimiofluorescente
EDTA	ácido etilenediamina-tetraacetico
EGTA	ácido etilenglicol-bis (aminoetil ether)-N,N,N',N'-tetracetico
ELISA	ensayo de inmunoanálisis unido a una enzima
ER	retículo endoplasmático
ETR	cadena de transporte de electrones
FA-CoA	acil-CoA graso
FAO	oxidación de ácidos grasos
FAS	ácido graso sintasa
FC	FC
FBS	suero bovino fetal
FFA	ácidos grasos libres
for	<i>forward</i>
FXR	receptor X de farnesiloide
G6Pasa	glucosa-6-fosfatasa
gc/kg	copias genómicas por quilogramo
GFP	proteína verde fluorescente
GK	glucoquinasa
GLUT2	transportador-2 de la glucosa
GPAT	glicerol 3-fosfato aciltransferasa
GSK	quinasa glucógeno sintasa
GSH	glutación (forma reducida)

GTT	test de tolerancia a la glucosa
h	hora
HBSS	solución salina tamponadora <i>Hank</i>
HEPES	ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanosulfónico
HFD	dieta rica en grasas
HMG-CoA	3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A
HMGCR	enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A reductasa
HRP	<i>horseradish</i> peroxidasa
HSL	lipasa sensible a hormonas
IMC	índice de masa corporal
Ip	intraperitoneal
IRS	substrato del receptor de la insulina
JNK	quinasa c-Jun N-terminal
<i>K_m</i>	constante de <i>Michaelis</i>
kDa	kilodalton
KRBH	Solución <i>Krebs-Ringer</i> bicarbonato hepes
LC3	proteína de cadena liviana-3 asociada a microtúbulos
LCFA	ácidos grasos de cadena larga
LD	gotas de lípidos
LDL	lipoproteína de baja densidad
LDLr	receptor de lipoproteína de baja densidad
LLP	lipoproteína-lipasa
M	molar (mol/l)
mA	miliamper
MCD	malonil-CoA descarboxilasa
min	minuto
mL	mililitro
mRNA	RNA mensajero
mTor	proteína blanco de rapamicina en mamíferos
MTP	proteína de transferencia de triglicéridos microsomal
NADPH	nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (forma reducida)
NAFLD	enfermedad hepática grasa no alcohólica
NASH	esteatohepatitis no alcohólica

NCD	dieta control
OMS	Organización Mundial de la Salud
PBS	tampón salino fosfato
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PDK	quinasa de piruvato-deshidrogenasa
PEG	polietilenglicol
PEPCK	fosfoenolpiruvato-carboxiquinasa
PI3K	fosfatidilinositol 3-quinasa
PIP2	fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato
PIP3	fosfatidilinositol-(3,4,5)-trisfosfato
PKB	proteína quinasa B
PKC	proteína quinasa C
PK	piruvato quinasa
PLINs	perilipinas
R.E.	radioactividad específica
rev	<i>reverse</i>
RNA	ácido ribonucleico
rpm	revoluciones por minuto
seg	segundos
SCD-1	esteroil coenzima-A desaturasa
SDS	sodio dodecil sulfato
SM	esfingomielina
SPT	serina palmitoil transferasa
SR-BI	receptor <i>scavenger</i> clase B tipo I
SREBP	proteína de unión al elemento regulador esteroil
TG	triglicéridos
TA	temperatura ambiente
TEMED	N,N,N'N'-tetrametil-etilenediamina
TNF α	tumor - necrosis factor α
Tris	Tris(hidroxietyl)aminoetano
U	unidades
UCP	proteína desacopladora
UV	ultravioleta

V	volts
VLDL	lipoproteínas de muy baja densidad

Capítulo 1. INTRODUCCIÓN

OBESIDAD

La obesidad se caracteriza por el acúmulo excesivo de grasa en el tejido adiposo y en otros órganos debido a un desequilibrio entre la ingesta calórica y el gasto energético. La obesidad se ha convertido en los últimos años en uno de los principales problemas de salud pública en muchas partes del mundo. En 2001 la Organización Mundial de la Salud (OMS) introdujo el término de “globesidad”.

En clínica y en estudios epidemiológicos la obesidad en adultos humanos se evalúa con el índice de masa corporal (IMC) que es una medida de la grasa corporal. El IMC se calcula como el peso en kg dividido por la altura al cuadrado en metros. La OMS ² define el sobrepeso como un IMC igual o mayor de 25kg/m² y la obesidad como un IMC igual o superior a 30kg/m².

La OMS estima que en 2014 1,9 billones de adultos estaban con sobrepeso y más de 600 millones son obesos, correspondiendo al 13 % de la población adulta del planeta³.

Hay tres causas principales que explican la creciente prevalencia de la obesidad: (1) Ingesta de calorías: se ha producido un aumento drástico en el consumo total de calorías durante las dos últimas décadas. En la mayoría de los países desarrollados, el total de los niveles de ingesta de calorías son por encima del 2.000Kcal/día y llega a acercarse a 3.000Kcal/día. (2) Calidad de las calorías: se ha producido un cambio de las dietas ricas en verduras, frutas y pescado (grasas especialmente saturadas) y las dietas altas en azúcar. La ingesta crónica de dietas grasas, la fructosa y el consumo frecuente de alimentos procesados aumenta el riesgo de obesidad. (3) La falta de ejercicio: el estilo de vida sedentario es también un importante contribuyente al aumento de peso. Los bajos niveles de actividad física están estrechamente relacionados con el aumento de peso corporal.

La obesidad es un factor de riesgo para otras condiciones patológicas tales como la resistencia a la insulina y la DM2 ⁴, así como la enfermedad hepática grasa no alcohólica (NAFLD ^{5,6}, las enfermedades cardiovasculares (ECV) ⁷ y el cáncer ⁸.

Dieta, ejercicio, y otras modificaciones de estilo de vida son la primera opción para la protección contra la obesidad. Sin embargo, el cumplimiento de

estas modificaciones es difícil de mantener por períodos largos de tiempo. Medicamentos contra la obesidad son en gran medida ineficaces. Por otro lado la cirugía bariátrica ofrece la reducción eficiente y rápida de peso pero en muchos casos el peso se recupera con el tiempo. Por lo tanto, hay una gran necesidad de nuevos estudios para conocer como se regula la homeostasis energética y también discernir los mecanismos moleculares por los cuales la obesidad causa diabetes y otras complicaciones como NAFLD.

DIABETES

La diabetes es una enfermedad provocada por una desregulación en el metabolismo de los carbohidratos y los AGs, ya sea debido a un fallo en la producción de insulina o a un fallo en su acción sobre los tejidos diana. Esto conlleva la presencia de niveles de glucosa elevados tanto en situaciones de ayuno como en estados post prandiales si no se trata adecuadamente. Esta hiperglucemia en ayunas es en definitiva consecuencia de la falta de insulina o de su correcta acción en el hígado y en los tejidos periféricos, y de niveles aumentados de glucagón. Además, los AGs del tejido adiposo son liberados anormalmente, promoviendo la estimulación de la cetogénesis hepática. Estos desórdenes metabólicos conducen a los principales síndromes de la diabetes: poliuria, polifagia y polidipsia. La diabetes se asocia también con neuropatías, nefrología, retinopatías, enfermedades coronarias y muerte prematura ⁹. El resultado es una disminución de la calidad de vida y de la esperanza de vida. Todas estas complicaciones asociadas son las responsables del gran impacto sanitario y socioeconómico que conlleva esta enfermedad ¹⁰.

Mantener una dieta sana y realizar ejercicio regularmente son dos aspectos muy importantes para la prevención y el tratamiento de la diabetes. Incluso manteniendo un estilo de vida sano, muchos pacientes necesitan intervención farmacológica, que puede consistir en una única o una combinación de las siguientes medicaciones orales: sulfonilureas (estimulan la secreción de insulina por la célula β pancreática), metformina (inhibe la producción hepática de glucosa) o tiazolidindionas (sensibilizan el músculo y el tejido adiposo a la insulina).

El 5-10% de los pacientes diabéticos padecen diabetes del tipo 1 o diabetes mellitus dependiente de insulina. Estos pacientes son completamente dependientes de insulina exógena debido a una destrucción autoinmune de las células productoras de insulina (células β) del páncreas. Este tipo de diabetes aparece antes de los 25 años de edad. La diabetes tipo 1 se diagnostica después de la aparición de síntomas como son una gran sed (polidipsia), mucha hambre (polifagia) y pérdida abundante de orina (poliuria). En ocasiones puede aparecer cetoacidosis diabética que puede comportar la entrada en coma de los pacientes.

La DM2 o diabetes no dependiente de insulina es mucho más común y afecta al 75-90% de los pacientes diabéticos. La enfermedad se caracteriza por: 1) la resistencia a la insulina, definida como la incapacidad de la hormona para suprimir la producción hepática de glucosa y para promover la captación de glucosa por parte de los tejidos periféricos, y 2) una función disminuida de la célula β del páncreas. Cronológicamente y metabólicamente la enfermedad podría seguir este curso: la resistencia a la insulina parece ser la lesión primaria, debida a factores genéticos, la edad, estilo sedentario de vida o a cambios metabólicos producidos por la obesidad ¹¹. Esta resistencia a la insulina causa un fallo en la captación de glucosa por los distintos tejidos entre ellos el músculo. Además, en el tejido adiposo, la resistencia a los efectos antilipolíticos de la insulina causa una liberación aumentada de AGs. Asimismo, estos AGs atenúan la capacidad de la insulina de inhibir la producción de glucosa hepática, logrando una situación de hiperglucemia o para responder a las acciones de la insulina ¹².

Esta desregulación en el metabolismo lipídico y de carbohidratos acelera la progresión de la resistencia a la insulina. Normalmente la célula β del páncreas intenta compensar el estado de resistencia a la insulina incrementando la secreción de insulina. Pero finalmente la célula β pierde la capacidad de producción de insulina dejando de responder apropiadamente a las concentraciones de glucosa. Esto conduce a un deterioro de la homeostasis de la glucosa y a la aparición de la intolerancia a la glucosa.

La DM2, a diferencia de la de tipo 1, está fuertemente asociada a la obesidad ¹³. La OMS estima que el sobrepeso y la obesidad causan el 44% de los casos de DM2 (World Health Organization, 2015). Así mismo, alrededor del 80%

de los individuos con DM2 son obesos, y más concretamente con obesidad visceral central.

RESISTENCIA A INSULINA

El aumento prolongado de la concentración de AGs en plasma causa una reducción en la acción de la insulina en diversos tejidos, principalmente hígado, tejido adiposo y músculo ¹⁴⁻¹⁶. En ratones, un aumento de lípidos en la dieta da lugar a obesidad y DM2. Los ratones C57BL/6J solamente presentan DM2 después de volverse obesos. En estos animales, la obesidad inducida por dieta se caracteriza por depósitos selectivos de grasa en el mesenterio ¹⁷, observación consistente con los estudios en que la obesidad visceral es uno de los factores más importantes de riesgo ¹⁸.

Señalización de la insulina

La insulina es una hormona anabólica y es esencial para el mantenimiento de la homeostasis de glucosa y del crecimiento y diferenciación celular. Después de una comida esta hormona es secretada por las células beta de los islotes pancreáticos en respuesta al aumento de los niveles circulantes de glucosa y de aminoácidos. La insulina regula la homeostasis de glucosa a varios niveles, reduciendo la producción hepática de glucosa (vía la disminución de la gluconeogénesis y glucogenolisis) y aumentando la captación periférica de glucosa, especialmente en tejidos muscular y adiposo.

La señalización intracelular de la insulina empieza con su unión a un receptor específico de membrana, una proteína heterotetramérica con actividad quinasa, compuesta por dos subunidades alfa y dos subunidades beta, que actúan como una enzima alostérica en la cual la subunidad alfa inhibe la actividad tirosina quinasa de la subunidad beta (figura 1). La unión de la insulina a subunidad alfa permite que la subunidad beta adquiera actividad quinasa, produciendo una alteración conformacional y autofosforilación, que aumenta todavía más la actividad quinasa del receptor ¹⁹.

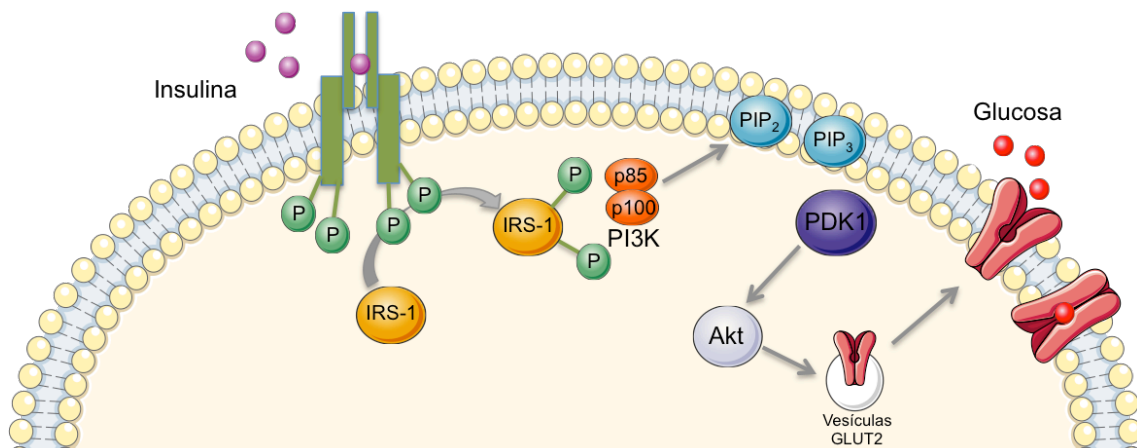


Figura 1: Cascada de señalización de la insulina en hígado.

Una vez activado, el receptor de insulina fosforila varios sustratos proteicos en residuos de tirosina denominados IRS-1 e IRS-2.²⁰ Luego tiene lugar la fosforilación de la proteína fosfatidilinosil 3-quinasa (PI3K), considerada un componente clave para que ocurra la captación de glucosa, después de su activación interacciona con las proteínas p110 y p85, permitiendo la fosforilación de fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP₂) para formar fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PIP₃) en la membrana plasmática. La formación de PIP₃ permite el reclutamiento de la PIP₃ con la proteína fosfatidilinosil-quinasa dependiente de proteína 1 (PDK1) y Akt^{21,22}.

Una vez fosforilada la Akt en el citoplasma, fosforilará e inactivará GSK-3, la enzima responsable del último paso para la síntesis de glucógeno. Esta inhibición disminuye el nivel de fosforilación de la glucógeno sintasa (GS), aumentando así su actividad. Por otra parte, la cascada de señalización inducida por la insulina es capaz también de activar la proteína fosfatasa 1, que desfosforilará la glucógeno sintasa aumentando su actividad²³. Además la señalización vía Akt también estimulará la translocación a la membrana de los transportadores de glucosa (GLUT2) en dirección a la membrana plasmática para la captación de glucosa (figura 1).

METABOLISMO HEPÁTICO EN LA OBESIDAD

El hígado es el órgano vital en los vertebrados y juega un papel fundamental en la coordinación metabólica de todo el cuerpo, incluyendo el metabolismo de carbohidratos, lípidos, proteínas, metabolismo de xenobióticos y

destoxificación. Algunas de las funciones más importantes del hígado son la gluconeogénesis, la glucólisis, la glucogenogénesis, la lipogénesis, la síntesis de colesterol, síntesis de factores de coagulación como el fibrinógeno, la conversión de amonio en urea, la producción y excreción de la bilis, la síntesis de proteínas plasmáticas y la producción de proteínas inflamatorias ²⁴. Muchas de estas funciones metabólicas que se llevan a cabo en el hígado están controladas por la acción de varias hormonas circulantes como la insulina. La insulina es una hormona con múltiples efectos en el metabolismo del cuerpo. Promueve la captación de glucosa por parte del tejido adiposo y el músculo y frena la producción de glucosa mediante la inhibición de la glucogenólisis y la gluconeogénesis en el hígado. La insulina también juega un papel clave en la síntesis y el almacenamiento de grasa, síntesis proteica, crecimiento celular, proliferación y diferenciación celular ²⁵. Muchas de las funciones del hígado se ven totalmente alteradas por la obesidad y el sobrepeso provocando una desregulación del metabolismo. El metabolismo hepático de la glucosa y de los lípidos en una situación de obesidad ha sido ampliamente estudiado y cabe destacar las recientes revisiones²⁶⁻²⁸.

Alteraciones en el metabolismo hepático de la glucosa

Se ha descrito que niveles elevados de FFA de forma continuada en suero estimulan la producción de glucosa hepática mediante la activación de la gluconeogénesis y de la glucogenólisis siendo estas, en gran parte, las responsables de la hiperglucemia en ayunas ²⁴. En el hígado en una situación normal, la correcta transducción de la señal de insulina conduce a la fosforilación de la Akt, que activa el factor de transcripción Foxo1. Este interviene en la regulación de la producción de glucosa hepática inhibiendo la vía de la gluconeogénesis. La acumulación en exceso de intermediarios lipídicos en el hígado como los diacilgliceroles (DAG), activa la quinasa PKCε, interfiriendo con la cascada de señalización de la insulina lo que impide la correcta fosforilación de la Akt y como último paso impide también la activación de Foxo1. De esta manera se produce un aumento de la producción de glucosa hepática mediante un incremento de los principales enzimas claves de la gluconeogénesis como la PEPCK (Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa) y G6Pasa (glucosa 6 fosfatasa) ²⁹. Una

consecuencia de esta alteración en la transmisión de la señal de la insulina es la reducción en la translocación de los transportadores de glucosa (Glut2) a la membrana de los hepatocitos reduciendo la captación de glucosa por parte del hígado. La confirmación que defectos en la señalización de la insulina en el hígado correlacionan directamente con una hiperglucemia se ha podido observar en animales que presentan una delección específica en el receptor de la insulina en el hígado ³⁰. Estos animales muestran una severa intolerancia a la glucosa, mientras que esta delección en músculo o en el tejido adiposo no tiene efectos sobre los niveles de glucosa y insulina ³¹. Todo ello indica que la resistencia hepática a la insulina es necesaria para desarrollar hiperglucemia e intolerancia a la glucosa.

Otro punto clave en el metabolismo de la glucosa y la resistencia a la insulina es el complejo de la piruvato deshidrogenasa que controla el flujo del piruvato hacia acetil-CoA para ser oxidado en el ciclo de Krebs ³². Se ha descrito que en diferentes situaciones como el ayuno, la diabetes o la ingesta de dietas ricas en grasas que provocan niveles elevados de FFA en el suero, éstas aumentan los niveles de la PDK4 en el hígado, inhibiendo el complejo de la piruvato deshidrogenasa y favoreciendo la oxidación de AGs ³³.

Otra hormona importante en el control de los niveles de glucosa es el glucagón. El glucagón promueve la síntesis de glucosa durante el ayuno. Generalmente, en un estado normal, los propios niveles de glucosa y la ingesta de alimentos reducen los niveles de glucagón, en cambio, en pacientes obesos y/o diabéticos se mantienen niveles elevados de glucagón. Este incremento en la secreción del glucagón afecta a la producción hepática de la glucosa activando la gluconeogénesis y la glucogenólisis ³⁴.

En un estudio en humanos con hígado graso se ha observado que estos han disminuido en un 20 a 35% su capacidad de suprimir la producción hepática de glucosa en respuesta a una infusión de insulina ^{5,35}. Además se ha observado en otro estudio que dicho aumento en la producción de glucosa durante una hiperinsulinemia es debida tres rutas: 1) la gluconeogénesis producida a partir de los intermediarios del ciclo de Krebs, 2) gluconeogénesis a partir de glicerol y 3) de la glucogenólisis ³⁶. Todo ello indica que en un estado obeso e insulino resistente son varios los mecanismos por los cuales aumentan peligrosamente los niveles de glucosa en sangre: 1) la síntesis de glucosa hepática se ve fuertemente

aumentada y 2) la captación de glucosa por parte del hígado, músculo y tejido adiposo se ve reducida.

Alteraciones en el metabolismo hepático de los lípidos

El hígado tiene una función central en el control del metabolismo intermediario de los lípidos, pues es responsable de captar y determinar el direccionamiento de las grasas presentes de acuerdo con las condiciones metabólicas y hormonales del individuo ³⁷. El flujo de lípidos en el hígado es bidireccional, pudiendo ser secretados, re-captados i/o reutilizados por el propio hígado ³⁸. Las grasas que llegan a este tejido pueden ser también secretadas y utilizadas por las lipoproteínas en tejidos periféricos tales como el músculo esquelético y tejido adiposo ³⁹.

El acúmulo de triglicéridos (TG) puede llevar al NAFLD. Históricamente, NAFLD se refiere a la acumulación de TG en el hígado en ausencia de consumo excesivo de alcohol. NAFLD abarca un espectro de trastornos hepáticos que van desde la esteatosis simples progresando hacia la esteatohepatitis no alcohólica (NASH), fibrosis, cirrosis hasta la insuficiencia hepática en fase terminal. La esteatosis simple se define histológicamente como >5% esteatosis hepática en ausencia de inflamación o daño hepatocelular, mientras que NASH se caracteriza por la inflamación y daño hepatocelular con grados variables de fibrosis. La esteatosis simple raramente progresa a una enfermedad hepática avanzada, mientras que NASH tiene el potencial de progresar a cirrosis y a carcinoma hepatocelular ⁶ (Figura 2).

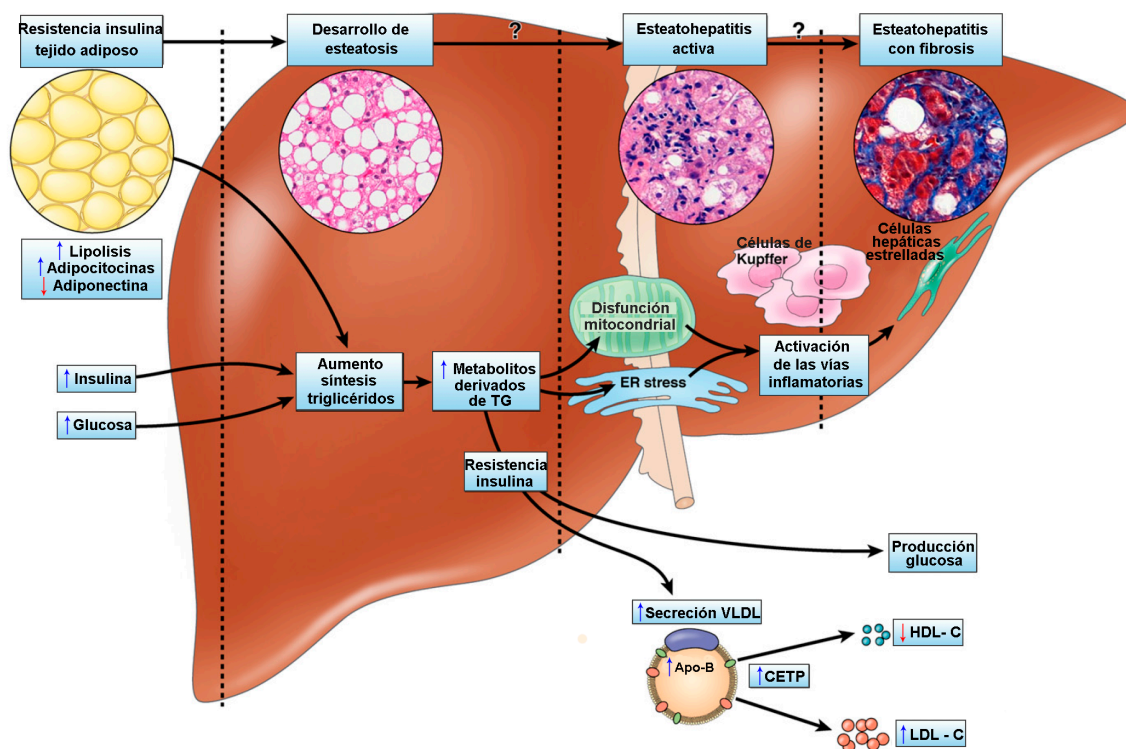


Figura 2: Representación esquemática de la fisiopatología del NAFLD y NASH (Adaptado de Cusi, 2012).

METABOLISMO DE ÁCIDOS GRASOS Y TRIGLICÉRIDOS

Síntesis *de novo*

La síntesis *de novo* de AG es un mecanismo metabólico de conversión del exceso de carbohidratos en AG y que serán posteriormente esterificados con glicerol-3-fosfato para formar TG (figura 3). Los tejidos lipogénicos, incluyendo el tejido adiposo blanco, glándulas mamarias y el hígado, expresan las enzimas clave para la síntesis de AGs. La ACC (acetil-CoA carboxilasa) convierte acetil-CoA a malonil-CoA y se considera una etapa limitante en la síntesis de AG ⁴⁰, mientras la FAS (ácido graso sintasa) es el complejo enzimático multifuncional responsable por la síntesis endógena de AG a partir de los precursores acetil-CoA y malonil-CoA. Durante este proceso, el palmitato (ácido graso saturado de 16 carbonos) es sintetizado por secuencias repetitivas de reacciones, en las cuales cada molécula de malonil-CoA ofrece dos carbonos ⁴¹. Luego son alargados y se insaturan por acción de las enzimas *Elovl6* y esteroil coenzima-A desaturasa (SCD-1). Posteriormente serán transferidos al glicerol por la glicerol 3-fosfato

aciltransferasa (GPAT) y la diacilglicerol aciltransferasa (DGAT) para la formación del TG.

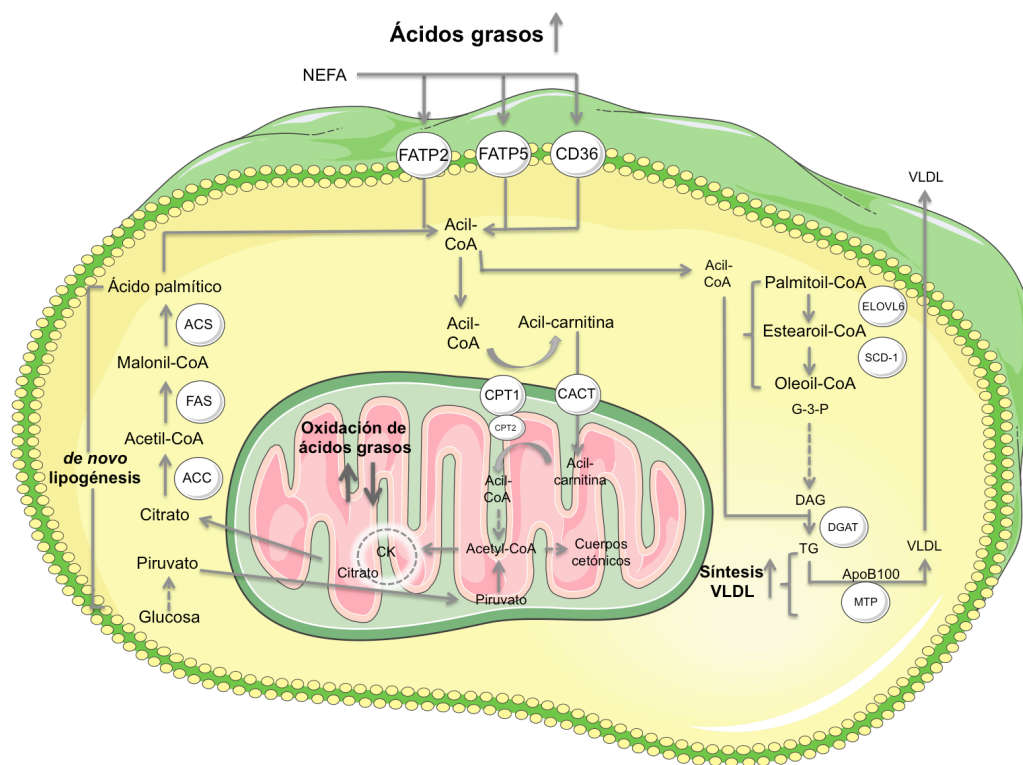


Figura 3: Metabolismo hepatocelular de los lípidos (Adaptado de Kawano, 2013⁴²).

De entre los factores nucleares que están implicados en la síntesis de los AG y TG podemos destacar el proteína de unión al elemento regulador estero (SREBP). Los SREBPs forman parte de la familia de factores de transcripción que primeramente fueron involucrados en la viabilidad celular del colesterol y 3 son los miembros descritos: SREBP-1a, SREBP-1c y SREBP2⁴³. SREBP-1c es la forma involucrada en la síntesis *de novo* de AG y TG. Actúa activando la transcripción de genes involucrados en la síntesis de AG y TG como los que codifican ACC, FAS, Elovl-6 y SCD-1. Se ha observado que SREBP1c está aumentado en animales obesos y resistentes a la insulina. Otro factor de transcripción que también se ha relacionado recientemente con la síntesis de lípidos en hígado es la proteína que se une al elemento de respuesta a carbohidratos (ChREBP). Su inhibición en hígado de ratones ob/ob reduce la esteatosis hepática y la resistencia a la insulina⁴⁴.

En un estado de resistencia a la insulina se incrementan los niveles de ácidos grasos libres (FFA) en el plasma, los cuales aumentan la captación de éstos

por parte de los hepatocitos aumentando sus niveles. Bajo condiciones de resistencia a la insulina la lipasa sensible a hormonas (HSL) no actúa correctamente sobre el tejido adiposo y no se inhibe la lipólisis, como consecuencia de este hecho se produce una liberación en exceso de FFA por parte del tejido adiposo blanco. Además, en un estado de obesidad, los niveles de insulina son más elevados y hacen incrementar la expresión de factores de transcripción como el de SREBP-1c ⁴⁵ el cual es un activador de la vía lipogénica, aumentando la síntesis hepática de FFA, TG, colesterol y fosfolípidos.

Se ha descrito que la deficiencia en diferentes modelos de animales de la SCD1 protege de la adiposidad y de la esteatosis hepática ⁴⁶. Otro enzima clave en la síntesis de TG es la DGAT que regula el último paso para la formación de los TG ⁴⁷. Se han identificado dos genes diferentes para la DAGT: DAGT1 y DAGT2 que catalizan reacciones similares. Estudios realizados con ratones *Dagt1* ^{-/-}, sugieren que la DGAT1 no es una enzima que tenga un efecto directo en el metabolismo de TG y no es esencial para la vida ⁴⁸. En cambio, estudios realizados con ratones *Dgat2* ^{-/-} mostraron una severa reducción en los niveles de TG, demostrando que la DGAT2 es fundamental para la síntesis de TG en mamíferos y crucial para la supervivencia de los animales ⁴⁹.

Almacenamiento de lípidos y lipólisis

Los lípidos son almacenados como TG en forma de vesículas o también denominados cuerpos lipídicos dentro del tejido hepático (gotas lipídicas – LD). Estas vesículas, a partir de ahora llamadas LD, están formadas por una membrana rica en proteínas entre las que cabe destacar las denominadas perilipinas (PLINs). Las PLINs además de favorecer la estabilidad de las gotas de lípidos (LD) están involucradas en los mecanismos de acúmulo y degradación de lípidos ⁵⁰. Se ha observado que tres son las PLINs (PLIN2, PLIN3 y PLIN5) que parecen participar en la acumulación de TG en el hígado, cada una de ellas con papeles distintos debido a sus específicas características estructurales.

La PLIN2 está intrínsecamente asociada con la superficie de los LD y se cree que su función se basa en la movilización y almacenamiento de lípidos neutros. Se ha demostrado que los niveles de PLIN2 son directamente

proporcionales a los niveles de lípidos intracelulares encontrados dentro de las células y están aumentados en enfermedades donde hay un acúmulo de grasa ⁵¹.

En estudios realizados en muestras de hígados humanos de individuos normales y esteatóticos se ha observado que tanto la PLIN2 como PLIN3 están presentes en todas las muestras analizadas Straub y col. ⁵². Sin embargo sólo la PLIN2 parece estar aumentada en los hígados de los individuos esteatóticos, correlacionándose su aumento con el aumento de LD en estos individuos. Los niveles de PLIN3 detectados en las muestras de individuos control y esteatóticos no presentaron cambios lo que sugiere que la PLIN3 presenta un papel de menor importancia en el desarrollo de enfermedades del hígado graso.

La PLIN5 se expresa en los tejidos que exhiben altos niveles de oxidación de ácidos grasos (FAO), incluyendo el corazón, el músculo esquelético y el hígado. En hígado, un aumento de su expresión se ha relacionado con la inducción de la esteatosis hepática a través de la inhibición de la liberación de AGs por el LD ^{53,54}. Otros estudios han confirmado que en hígado la PLIN5 está implicada en la acumulación de TG inhibiendo la lipólisis al inhibir la actividad de la lipasa ATGL ⁵⁵. Por el contrario, en tejidos oxidativos como el músculo, PLIN5 estaría más bien implicada en la promoción de las interacciones entre LD y mitocondrias, sin embargo se desconoce el papel fisiológico que PLIN5 puede desempeñar con dichas interacciones ⁵⁶.

Una de las enzimas que ha adquirido un papel relevante en el recambio de TG, la señalización de AGs y su partición en hígado es la lipasa ATGL ⁵⁷. Su asociación con PLIN5 en la superficie del LD parece ser crucial para regular su actividad lipolítica ⁵⁸.

Otro enzima que parece tener importancia en la degradación hepática de TG es la lipasa sensible a hormonas (HSL). La HSL es fosforilada y activada por la proteína quinasa A promoviendo su translocación desde el citosol a la superficie de los LDs. *In vitro*, HSL cataliza la hidrólisis de múltiples ésteres de carboxilato, entre ellos TG y DAG, siendo 10 veces más efectiva sobre DAG. Además, también puede actuar sobre monoacilgliceroles y ésteres de colesterol (CE) ⁵⁹. Los monoacilgliceroles producto de la HSL serán finalmente hidrolizados por la monoacilglicerol lipasa (MGL) para rendir glicerol y AG. Este enzima se encuentra

ampliamente distribuido en distintos compartimentos celulares como el citosol, la membrana plasmática y los LDs y parece que su actividad no está muy regulada.

METABOLISMO DEL COLESTEROL

La homeostasis del colesterol es regulada por procesos complejos que implican la síntesis y secreción de lipoproteínas, mediante la actividad de receptores celulares específicos para las lipoproteínas, de enzimas lipolíticas y de proteínas de transferencia de lípidos ⁶⁰.

El hígado es un órgano clave implicado en la regulación del metabolismo del colesterol y adquiere el colesterol por síntesis *de novo* y a partir de todas las clases de lipoproteínas plasmáticas: lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), lipoproteínas de densidad intermedia (IDL), lipoproteínas de baja densidad (LDL) y lipoproteínas de alta densidad (HDL) ⁶¹. La síntesis *de novo* de colesterol se produce en el retículo endoplasmático (ER) y está estrictamente regulada por la enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A reductasa (HMGCR), que cataliza la primera reacción de la biosíntesis de colesterol.

Las LDL son las principales lipoproteínas transportadoras de colesterol hepático hacia los tejidos periféricos. La absorción de colesterol se lleva a cabo por la unión de las LDL a diferentes proteínas de la superficie celular, como el receptor de las LDL (LDLr) y el receptor *scavenger* clase B tipo I (SR-BI) ^{61,62}. A nivel hepático el aumento del contenido intracelular de colesterol induce a una menor síntesis de los LDLr y una reducción de la actividad de la HMG-CoA reductasa. En situaciones de baja concentración de colesterol ocurre lo contrario y es una manera de mantener el contenido de colesterol intracelular constante ⁶³. Independientemente de su origen, el colesterol hepático es regulado por varias rutas metabólicas alternativas: (1) la excreción a la sangre en forma de VLDL o mediante la interacción con transportadores ABCA1 con las partículas nacientes de lipoproteínas de alta densidad (HDL); (2) la excreción y la absorción a través de la bilis vía ABCG5/G8 y *Niemann-Pick C1-like 1* (NPC1L1); (3) la deposición como ésteres de colesterol (CE) y (4) su utilización como sustrato para la síntesis de ácidos biliares ⁶⁴. En condiciones normales, estas vías interactúan entre sí, organizando el colesterol y transportándolo dentro del hepatocito hacia diferentes regiones y orgánulos ^{65,66}.

Las HDLs reducen el exceso de colesterol de los tejidos, transportándolo hacia el hígado, lo que se denomina transporte reverso del colesterol. La función de la HDL depende en buena parte de su contenido de apo-A1, su principal apolipoproteína. Esta apolipoproteína facilita la salida del exceso de fosfolípidos y colesterol intracelular a través de mecanismos específicos que requieren consumo de energía. Este paso, conocido como eflujo, es dependiente de su interacción con transportadores de casete de unión a ATP subfamilia A1 y G1 (ABCA1 y ABCG1) ⁶⁷.

Estas vías metabólicas y de transporte del colesterol y de sus metabolitos son muy complejas y están altamente reguladas. El nivel de expresión de las enzimas que las componen están reguladas por la acción concertada de varios factores de transcripción, entre ellos cabe destacar la proteína de unión al elemento regulador esteroide (SREBP-2), receptor de hígado X alfa (LXR-alfa) y receptor X de farnesol (FXR) ^{68,69}.

La síntesis intracelular del colesterol se controla por un elaborado mecanismo de retroalimentación dependiente del factor de transcripción SREBP-2, que está unido a la membrana del ER ⁷⁰. Cuando el colesterol es abundante, SREBP-2 permanece en el ER. Bajos niveles del colesterol intracelular causan el procesamiento del SREBP-2 por proteasas que lo activan, se desplaza al núcleo para activar la expresión de genes que contienen elementos de respuesta a esteroides en sus promotores, tales como los genes LDLr y HMGCR ^{70,71}.

Los ácidos biliares son esenciales para la correcta absorción de lípidos de la dieta y regulan la transcripción de genes que regulan el metabolismo del colesterol y de los propios ácidos biliares ⁷²⁻⁷⁵. La expresión hepática de colesterol-7 α -hidroxilasa (CYP7A1), enzima limitante de la síntesis de los ácidos biliares por la vía clásica, se inhibe por el aumento de los niveles de ácidos biliares y este mecanismo de retroalimentación está mediado por FXR ^{75,76}. También están regulados por este factor la captación selectiva de CE de las HDLs a través de SR-BI ⁷⁷, la hidrólisis intracelular de CE por hidrolasa de CE neutros ⁷⁸, y el transporte de colesterol por la proteína transportadora de esteroide 2 para su excreción biliar a través de la proteína de unión a ATP casete subfamilia G5/8 (ABCG5/8) ⁷⁹. El heterodímero ABCG5/ABCG8 codifica un par de transportadores ABC que forman un complejo G5G8. Este complejo además de promover la secreción de colesterol

por la bilis, evita la absorción por el intestino de los esteroides de la dieta. La deficiencia de G5G8 da lugar a la reducción de la eliminación del colesterol, a una exacerbada resistencia a la insulina hepática, y al desarrollo de NAFLD en modelos de obesidad inducida por dieta ⁸⁰.

Los datos existentes hasta el momento apoyan que la homeostasis del colesterol está ampliamente desregulada en NAFLD y que las alteraciones de las vías hepáticas del colesterol a diferentes niveles promueven la acumulación de colesterol libre (FC) en las células del hígado. De hecho, se ha demostrado que la síntesis hepática de colesterol está aumentada en NAFLD como se muestra en los estudios que evalúan esta vía en suero como marcadores indirectos de la síntesis de colesterol ⁸¹. Por otra parte, varios estudios han demostrado que la expresión y la actividad de la HMGCR se incrementan en los hígados de pacientes con NAFLD. Los incrementos de la actividad HMGR parecen estar relacionados con una disminución en el grado de fosforilación del enzima ^{63,82,83}. Además, el aumento de los niveles hepáticos de SREBP2 activado en pacientes con NASH también parecen ser responsables del aumento de los niveles de FC hepáticos y de la expresión de LDLr ⁷¹.

El metabolismo de las lipoproteínas también está desregulado en NAFLD ^{84,85}. En pacientes con NAFLD se observa con frecuencia un patrón de dislipidemia aterogénica caracterizado por altas concentraciones de TG en plasma, niveles bajos de colesterol HDL y aumento de LDL ^{86,87}. Este está relacionado con un aumento de la síntesis hepática de lípidos inducido por la insulina ⁸⁸. La sobrecarga de TG en el hígado se asocia a un aumento de la secreción de VLDL al plasma ⁸⁹, que puede determinar un aumento de LDL debido al intercambio de la proteína de transferencia de ésteres de colesterol ⁸⁴, que luego será recaptado por el hígado por endocitosis mediada por LDLr. Se ha observado que LDLr ha aumentado en algunos modelos experimentales de NAFLD/NASH ⁹⁰, lo que podría contribuir a la sobrecarga de colesterol en los hepatocitos. Sin embargo, en un estudio humano reciente se encontró que la expresión hepática LDLr estaba reducida y las concentraciones de LDL en plasma aumentaban en pacientes con NAFLD ⁶³. Por lo tanto, se necesitan más estudios para determinar si LDLr aumenta o baja su expresión en hígado de pacientes con NAFLD/NASH.

El contenido hepático de colesterol puede verse aumentado por una disminución de la ApoA1 y del transportador ABCA1. Estudios *in vitro* en células HepG2 tratadas con FFA insaturados han mostrado una disminución de los niveles de proteína ABCA1 debido a un aumento de su degradación. Este resultado se ha observado también en una situación de NASH donde los niveles de proteína ABCA1 estaban disminuídos ⁹¹. Además, la sobreexpresión de ABCA1 en ratones dio lugar a un aumento de la exportación de colesterol y a una disminución del colesterol celular, de FFA y de TG ⁹². Estos datos sugieren que en NAFLD/NASH una disminución de la expresión de la proteína ABCA1 puede contribuir a un aumento en el almacenamiento de lípidos en hepatocitos.

El papel de la reducción de la excreción biliar de colesterol en NAFLD también se ha examinado. Los ratones deficientes en transportadores esteroides ABCG5/8 reducen la secreción biliar de colesterol y son más susceptibles de padecer esteatosis, resistencia hepática a la insulina y pérdida de control de la glucemia cuando se alimentan con una dieta rica en grasas ⁸⁰. Otros modelos genéticos de esteatosis hepática también presentan una disminución de la secreción biliar de colesterol ^{93,94}. Curiosamente, el aumento de la secreción biliar de colesterol usando vectores adenovirales que codifican ABCG5 y ABCG8 restaura el control glucémico y reduce los TG en plasma de ratones diabéticos ⁹⁵.

METABOLISMO DE LÍPIDOS COMPLEJOS: FOSFOLÍPIDOS Y ESFINGOLÍPIDOS

Otras especies lipídicas a parte de los AGs y TG pueden estar implicados en la resistencia a la insulina, la inflamación y el desarrollo de la esteatosis hepática. En situaciones de NAFLD, el uso de las nuevas tecnologías de lipidómica ha permitido determinar cambios simultáneos entre las distintas especies lipídicas y la identificación de especies concretas que pueden tener un papel clave en la patogénesis y además pueden servir como marcadores de futuras intervenciones ⁹⁶⁻⁹⁸. Los fosfolípidos, junto con los glicolípidos y el colesterol, son unos de los principales componentes de las bicapas lipídicas de las membranas celulares y de las membranas de los diferentes orgánulos modulando su fluidez y flexibilidad. La síntesis de fosfolípidos requiere la combinación de un diacilglicérido con un alcohol. Tanto el diacilglicérido como el alcohol pueden activarse para dar lugar a los distintas especies de fosfolípidos: fosfatidilcolinas (PC),

fosfatidiletanolaminas (PE) y fosfatidilserinas (PS). Estudios recientes realizados en hígado de ratón muestran que tan solo un tratamiento de siete días con dieta grasa produce, entre otros lípidos analizados, un descenso de muchas de las especies de PC y lisofosfatidilcolinas (LPC) ⁹⁹. A los 14 días de dieta grasa cuando la resistencia hepática a la insulina se está instaurando, los descensos son aún mayores pero a los 21 días de dieta grasa los niveles de PCs, LPCs y acyl carnitinas suben notablemente respecto a los valores obtenidos a los 14 días. Estos cambios afectan fundamentalmente a las membranas mitocondriales produciendo una disminución del contenido de las proteínas mitocondriales de membrana que acaba afectando la función mitocondrial ⁹⁹. Otros estudios han mostrado también que existen cambios notables en la longitud de las cadenas de AGs que forman los fosfolípidos al pasar de una situación de NAFDL a NASH ¹⁰⁰. En un estudio realizado en humanos con NAFDL y NASH también mostró que los niveles de PCs disminuían ¹⁰¹. Todo ello indica que los esfingolípidos pueden también ejercer un papel importante en el desarrollo de la resistencia a la insulina, la esteatosis y el NASH.

Los esfingolípidos constituyen una familia de lípidos complejos que derivan de la esfingosina. Aunque los esfingolípidos se han considerado meros componentes estructurales de membranas biológicas, se ha observado que ciertas especies y en concreto las ceramidas tienen un papel dinámico en la señalización celular, el estrés celular y la muerte celular ^{102,103}. También se ha confirmado que tienen un papel mediador importante de la resistencia a la insulina y la obesidad ¹⁰⁴.

Las células generan ceramidas por dos vías diferentes (figura 4). La síntesis de novo que ocurre en el RE y se lleva a cabo por la condensación de serina con un acil-CoA saturado, en general palmitoil-CoA. Esta es la etapa limitante de la síntesis y está catalizada por la serina palmitoil transferasa (SPT); y va seguida de la acilación de la esfingosina con AG catalizada por la ceramida sintasa (CerS). La síntesis de ceramidas es dependiente, entre otros factores, de la disponibilidad de ácido palmítico y su activación a palmitoil-CoA; por lo tanto, la obesidad puede estar asociada a un exceso de producción de ceramidas. Además, las ceramidas pueden también generarse a partir de la hidrólisis de esfingomielina (SM) por esfingomielinasas ¹⁰⁵.

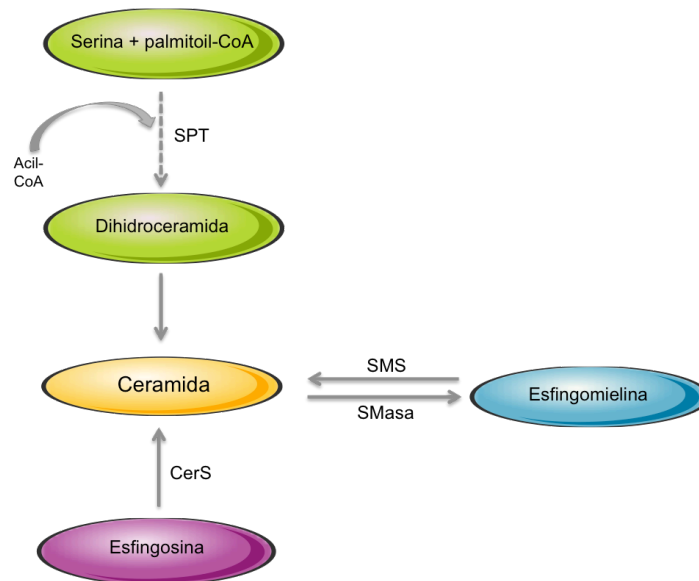


Figura 4: Esquema de la síntesis de las ceramidas.

Diversos estudios en células, modelos animales y en humanos sugieren que el hígado es el principal productor de ceramidas ^{104,106,107}. Además se ha observado que son exportadas al suero por las VLDL y LDL ya que el 80% de las ceramidas en suero van asociadas a estas lipoproteínas ¹⁰⁸.

El impacto de las ceramidas en la obesidad y NAFLD no ha sido bien descrito, pero sí se conoce que ratones deficientes en dihidroceramida sintasa, exhiben 60-80% de disminución del contenido de ceramida, estableciendo un papel clave de las ceramidas en la resistencia a la insulina ¹⁰⁹. También se ha observado que podrían tener un papel clave en el desarrollo de la inflamación, así se ha demostrado que citoquinas pro-inflamatorias como el TNF-alfa podrían inducir la síntesis de ceramidas y ambos contribuir a la formación de ROS, promoviendo la apoptosis y el reclutamiento células inflamatorias en hígado, aumentando así la inflamación hepática ^{110,111}.

Estudios *in vitro* indican que existe una correlación entre los AG saturados y el aumento del acúmulo de ceramidas. Estudios realizados con ratas alimentadas con dieta grasa enriquecidas en AG saturados mostraron un acúmulo de ceramidas hepáticas y un aumento de los niveles de SM. Esto también se ha confirmado en ratones obesos con esteatosis hepática cuyo contenido de ceramidas hepáticas estaba aumentado ¹¹¹.

Por otro lado, se ha visto que la pérdida de peso produce una disminución de la expresión de los genes relacionados con las ceramidas hepáticas en pacientes obesos con NAFLD, lo que se ha correlacionado con niveles disminuidos de ceramidas en suero. Además, se mostró que los pacientes obesos con DM2, comparados con controles sanos, habían aumentado los niveles de ceramidas en plasma y esto se correlacionaba con resistencia a insulina ¹¹². Estudios más recientes sugieren que ciertas especies de ceramidas como la ceramida C16:0 podrían ser las principales mediadoras del aumento de peso de la de intolerancia a la glucosa ^{113,114}. Además, estudios en humanos también han mostrado una correlación entre la disminución en la ceramida C14:0 y la mejora de la sensibilidad a la insulina ¹¹⁵. Todo ello sugiere que los niveles de ciertas ceramidas en suero podrían convertirse en un futuro próximo en biomarcadores del grado de gravedad de resistencia a la insulina y de NAFLD.

AUTOFAGIA

La autofagia es un proceso catabólico con funciones críticas en el mantenimiento de la homeostasis celular y tiene como finalidad preservar la viabilidad celular en condiciones de stress ¹¹⁶.

Existen 3 tipos de autofagia: macroautofagia, autofagia mediada por chaperonas y microautofagia. La autofagia mediada por chaperonas, está mediada por proteínas chaperonas específicas, lo que permite la translocación de ciertas proteínas hacia el lumen lisosomal para la interacción con el receptor de LAMP-2 (*Lysosome-associated membrane protein 2*) para su degradación. En la microautofagia, pequeños componentes celulares son liberados directamente al lisosoma, donde tendrá lugar su degradación. En la macroautofagia, llamada a partir de ahora autofagia, los componentes celulares que son degradados, que pueden ser macromoléculas u orgánulos enteros, son englobados por estructuras de doble membrana llamadas autofagosomas ¹¹⁷.

El origen del autofagosoma todavía no es bien conocido. Se ha hipotetizado que los autofagosomas pueden ser generados *de novo* a partir de moléculas precursoras pre-existentes, o formarse a partir del aislamiento de otras membranas intracelulares como las del RE ¹¹⁸.

Los autofagosomas, a su vez, se funden con los lisosomas formando los

autolisosomas, donde el material celular es degradado a través de la acción de las hidrolasas lisosomales. El proceso de degradación produce aminoácidos libres y macromoléculas, las cuales son devueltas al citosol para ser reutilizados ¹¹⁹.

Maquinaria molecular de la autofagia

La maquinaria molecular básica de la autofagia involucra la actividad de proteínas relacionadas a autofagia (ATG), las cuales están codificadas por los genes ATG ¹²⁰. Los genes ATG fueron inicialmente identificados en levaduras y son considerados marcadores específicos de la vía autofágica. La identificación de esas proteínas permitió la comprensión de la formación de los autofagosomas en nivel molecular.

El proceso de formación de los autofagosomas (figura 5) está dividido en las siguientes etapas: iniciación, donde ocurre el inicio de la formación de la membrana, alargamiento de la membrana y maduración del autofagosoma.

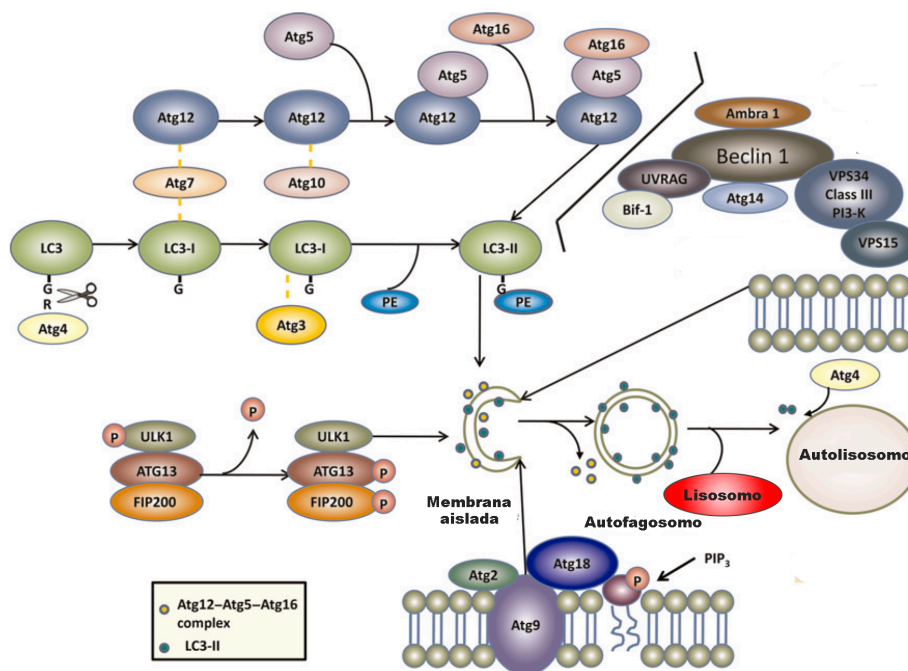


Figura 5: Maquinaria de la autofagia (Adaptado de Ding, Manley et al. 2011).

1. **Iniciación:** la fase inicial de la generación del autofagosoma en mamíferos es dependiente de un complejo estable de proteínas quinasa que contienen la proteína Ulk1 y diversas otras proteínas identificadas recientemente, como Atg 13 y FIP200. Atg 13 se une a Ulk1, o a su homólogo Ulk2, y media su interacción con FIP200. En condiciones limitadas de nutrientes, por ejemplo,

Atg13 y Ulk1/2 son desfosforiladas, lo que activa Ulk1/2 e induce la fosforilación de FIP200 iniciando la formación del autofagosoma ¹²¹. Este complejo, conocido como fagóforo, se transloca a una membrana aislada donde originará el autofagosoma.

Otra proteína importante para el proceso de iniciación es el de la proteína quinasa fosfatidilinositol-3-quinasa clase III (PI3KIII), que esta formando un complejo con la proteína beclina-1. El fosfatidilinositol-3-fosfato (PIP3), producido por esta quinasa es una molécula lipídica señalizadora que es crucial en las etapas iniciales de la nucleación del autofagosoma ^{121,122}. La beclina-1 es esencial para la actividad de PI3KIII y para el inicio del proceso autofágico, y está regulada negativamente por la interacción con proteínas antiapoptóticas como Bcl₂/Bcl-xL ¹²³.

2. Alargamiento: el alargamiento de la membrana del autofagosoma requiere dos reacciones. En la primera, Atg5 se conjuga con Atg12, las cuales se unen a Atg16L, formando un complejo multi-proteico grande que es reclutado hacia el fagóforo ¹²⁴. En la segunda reacción interviene la proteína MAP1-LCE (*protein microtubule-associated protein 1 light chain 3*), también conocida como LC3 ¹²⁵. En las células, LC3 se encuentra en dos isoformas, LC3I y LC3II. LC3 es sintetizada como una forma precursora, la cual sufre el corte en su extremidad carboxi terminal por la proteasa Atg4B ¹²⁶ resultando la isoforma citosólica LC3I. LC3I se conjuga a fosfatidiletanolamida en una reacción que implica Atg7 y Atg 3 para formar LC3II. LC3II se une a la membrana del fagóforo, proceso fundamental para la expansión de la membrana del autofagosoma. A diferencia del complejo Atg12-Atg5-ATG16L, LC3II permanece unida a las membranas interna y externa del autofagosoma hasta su completa formación. Durante la fusión con el lisosoma, la proteína LC3II presente en la membrana externa del autofagosoma es captada por Atg4 y reciclada. La porción de LC3II presente en la membrana interna del autofagosoma se degrada y no está presente en el lisosoma. La asociación específica de LC3II con la membrana del autofagosoma señala a esta proteína como un excelente marcador de inducción de la autofagia ¹²⁷.

En los últimos años se ha estudiado la selectividad de la vía autofágica en relación a los componentes degradados ¹²². Esta selectividad permite diversos tipos de regulación molecular dependiendo de adaptadores autofágicos. Un de

estos adaptadores es la proteína p62 (sequestosoma 1 o SQSTM1), un sustrato selectivo de la autofagia. La p62 tiene un dominio N-terminal que le hace capaz de producir auto-oligómeros y un dominio C-terminal capaz de interactuar con proteínas ubiquitinadas ¹²⁸. La p62 puede interactuar con la proteína LC3 a través de una región específica LRS (LC3- *recognition sequence*) también conocida como LIR (LC3-*interacting region*) ¹²⁸. Dicha interacción dirige la p62 hacia el autofagosoma para su formación y a la vez favorece el direccionamiento de los sustratos ubiquitinados para su degradación por el proceso de autofagia ¹²⁹. Por el hecho de ser selectivamente degradada en el autofagosoma, la p62 también es un excelente marcador para el estudio de la activación de la autofagia. En el momento que la vía autofágica está activa, es posible observar una correlación inversa entre los niveles de expresión de p62 y LC3II. Así pues cuando los niveles de p62 están reducidos, los niveles de LC3II están elevados.

Regulación de la autofagia

Varias vías de señalización parecen estar implicadas en la regulación de la autofagia en células de mamíferos. Las más relevantes se resumen a continuación.

Proteína mTor/PI3-K: mTOR (Proteína blanco de rapamicina en mamíferos/fosfatidilinositol 3-quinasa) es una serina/treonina quinasa implicada en muchos aspectos de la fisiología celular, incluyendo la transcripción, la traducción, el crecimiento celular y la organización del citoesqueleto. La inhibición de mTOR es un paso clave en la señalización de la activación de la autofagia. Así se ha observado que rapamicina que inhibe mTOR, activa significativamente la autofagia en hepatocitos de rata ¹³⁰. La activación de mTor depende de varias señales, incluyendo factores de crecimiento, insulina, nutrientes, la disponibilidad de energía, factores de stress celular, tales como la hipoxia, infección viral y ROS. En respuesta a factores de crecimiento, PI3K aumenta PI3P lo que activa Akt, que a su vez, activa mTOR, inhibiendo la autofagia.

Proteína Bcl2: pertenece a la familia de proteínas antiapoptóticas, como Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w y Mcl-1, y pueden inhibir la autofagia mediante la unión de Bcl-2 con Beclina-1 lo que evita la asociación de Beclina-1 con PI3KIII, inhibiendo así la formación de los autofagosomas ¹³¹.

La proteína quinasa AMPK (Proteína quinasa activada por AMP), es otra importante reguladora de la autofagia ¹³². AMPK es sensible al estado energético de la célula y se ve activada por el aumento de AMP. Un bajo estado de energía, reflejado por una alta proporción de AMP/ATP, activa AMPK. La activación de AMPK reduce la actividad de mTOR, dando lugar a la activación de la autofagia.

Macrolipofagia y NAFLD

Se ha establecido recientemente un nuevo papel de la autofagia en la regulación del metabolismo de los lípidos hepáticos ¹³³. Además de las lipasas citosólicas clásicas, la autofagia regula los niveles de lípidos intracelulares a través de un proceso llamado macrolipofagia (figura 6). Los LD se quedan atrapados dentro de los autofagosomas y son transportados hacia los lisosomas, donde serán degradados a AG. La capacidad de la autofagia para responder a los cambios en el suministro de nutrientes permite a la célula alterar el metabolismo de los LDs para satisfacer las demandas de energía. Esta vía alternativa de degradación lisosomal en hepatocitos explica su capacidad para movilizar rápidamente grandes cantidades de lípidos a pesar de las bajas cantidades de lipasas citosólicas si la comparamos con las de los adipocitos. En estados fisiológicos, la insulina es un inhibidor de la macrolipofagia y la lipólisis ¹³⁴.

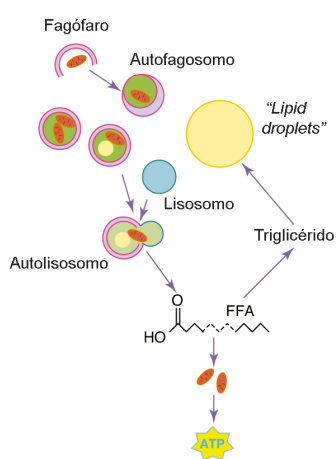


Figura 6: Esquema de la macrolipofagia (Adaptado de Dong and Czaja 2011).

Cambios fisiopatológicos en los que el proceso de autofagia se vea modificado, pueden alterar el metabolismo celular de lípidos y promover estados

de enfermedad. Por ejemplo, la inhibición de la autofagia puede estar involucrada en el desarrollo de la esteatosis hepática.

Ratones deficientes en *Atg7* específicamente en hepatocitos presentan un aumentado acúmulo de lípidos hepáticos ¹³³. Los ratones *ob/ob* y ratones con obesidad y resistencia a insulina inducidas por dieta, presentan un aumento sostenido de la disponibilidad de lípidos dando lugar a una disminución de la autofagia hepática ^{133,135,136}. Por lo tanto, la autofagia podría ser una diana celular para detectar anomalías en el metabolismo y acumulación de lípidos.

OXIDACIÓN DE LOS ÁCIDOS GRASOS

Los AGs son absorbidos por los tejidos y, una vez dentro de la célula, pueden oxidarse por el proceso de β -oxidación, proporcionando energía para la célula. Este proceso tiene lugar en la mitocondria, y para ello el ácido graso necesita estar internalizado. En primer lugar, los AGs son activados a acil-CoA por la acil-CoA sintasa. La molécula de acil-CoA puede entonces ser transferida a la mitocondria por un sistema compuesto por tres proteínas: CPT1 (Carnitina palmitoiltransferasa 1), CACT (carnitina acilcarnitina translocasa) y CPT2 (Carnitina palmitoiltransferasa 2).

La CPT1 es una proteína integral de la membrana localizada en la membrana externa de la mitocondria, mientras la CPT2 es una proteína periférica anclada en la parte interna de la membrana mitocondrial (McGarry & Brown, 1997a, Casals, JLR 2016). La capacidad de la enzima CPT1 para convertir acil-CoA en acilcarnitina y la catálisis inversa promovida por la enzima CPT2 en la matriz mitocondrial da lugar a una efectiva transferencia de moléculas de aciles-CoA de cadena larga (AGCL) hacia la matriz mitocondrial ¹³⁸. Debido a su localización en la membrana externa mitocondrial, la CPT1 es susceptible de regulación por malonil-CoA ¹³⁹. La principal función del malonil-CoA es regular la participación relativa entre carbohidratos y lípidos en el proceso de obtención de energía. La inhibición por malonil-CoA representa una de las maneras de regular, en condiciones fisiológicas, la actividad CPT1 y por lo tanto, la FAO ¹⁴⁰. Este tipo de regulación se tratará en el siguiente apartado.

Dentro de la mitocondria, los acil-CoAs de cadena larga se metabolizan por la vía catabólica de la β -oxidación, donde sufren pérdidas sucesivas de

unidades de dos átomos de carbono, promoviendo la formación de acetil-CoAs. El acetil-CoA proveniente de la β -oxidación puede entrar en el ciclo del ácido cítrico, para generar energía en forma de ATP, o formar cuerpos cetónicos en una serie de reacciones en las que la enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A sintasa HMG-CoA sintasa 2 es la enzima clave de la vía ¹⁴¹.

La metabolización del acetil-CoA por el ciclo de Krebs da lugar a la formación de transportadores de electrones reducidos (NADH y FADH₂), que luego se oxidan en la cadena respiratoria. Los electrones donados por las coenzimas FADH₂ y NADH a la cadena respiratoria genera un gradiente de protones a través de la membrana interna de la mitocondria que el enzima ATP sintasa utiliza para fosforilar ADP formando ATP. La formación de ATP disminuye cuando el gradiente de protones se disipa por las proteínas de desacoplamiento – UCPs (*uncoupling proteins*). La primera UCP descrita fue inicialmente llamada termogenina, y posteriormente denominada UCP1. La UCP1 está expresada abundantemente en tejido adiposo marrón y es responsable de la disipación del gradiente de protones generando calor en vez de ATP en este tejido, lo que confiere su alta capacidad termogénica ¹⁴². Otras proteínas estructuralmente homólogas a la UCP1 han sido identificadas como son la UCP2 y UCP3 y se encuentran presentes en otros tejidos ¹⁴³. La UCP2 y UCP3 parecen estar más ligadas al control celular del balance redox que a la producción de calor ¹⁴⁴.

SISTEMA CARNITINA PALMITOIL-TRANSFERASA

El transporte de AGs de cadena larga dentro de la mitocondria se lleva a cabo por el sistema CPT. La CPT1 está fuertemente regulada por su inhibidor fisiológico, el malonil-CoA, y por tanto es el paso más importante y limitante en el control de la FAO de cadena larga (figura 7). Alteraciones fisiológicas en las concentraciones de malonil-CoA se correlacionan inversamente con los cambios en la β -oxidación. Por ejemplo, durante situaciones de ayuno y de ejercicio físico disminuyen los niveles de malonil-CoA en los tejidos y aumenta la β -oxidación ¹⁴⁵. Una situación contraria es durante la alimentación con carbohidratos donde aumentan los niveles de malonil-CoA y disminuye la β -oxidación ¹⁴⁶.

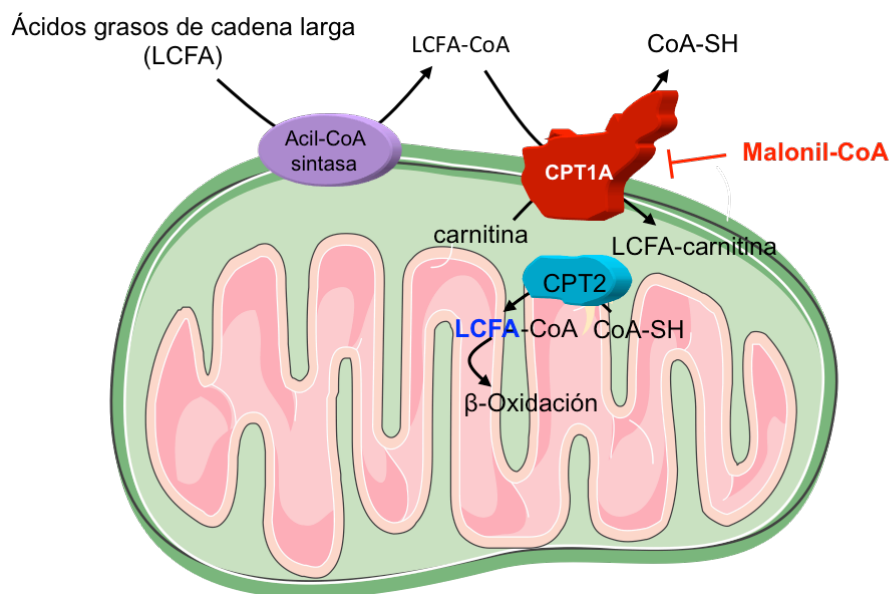


Figura 7: Regulación de la CPT1 por malonil-CoA.

Los mamíferos expresan tres isoformas de CPT1, la isoforma hepática (LCPT1 o CPT1A) ^{147,148}, la isoforma de músculo cardíaco y esquelético (MCPT1 o CPT1B) ^{149,150} y la CPT1C que se expresa principalmente en cerebro y testículos ¹⁵¹. Las tres isoformas son producto de tres genes diferentes y difieren en composición aminoacídica, en su localización subcelular, en su actividad y en sensibilidad al inhibidor fisiológico malonil-CoA. CPT1A está formada por 773 aminoácidos (88 kDa), CPT1B por 772 (88 kDa). CPT1A y CPT1B se encuentran en la membrana mitocondrial externa mientras que CPT1C se encuentra anclada en la membrana del ER ¹⁵². Las tres isoformas unen malonil-CoA pero el efecto inhibitor en su actividad sólo se ha demostrado para CPT1A y CPT1B ya que CPT1C apenas presenta actividad carnitina aciltransferasa.

Regulación a nivel transcripcional

En cuanto a la regulación a nivel de RNA, se ha descrito que cambios en el ratio glucagón / insulina provocan cambios en los niveles del mRNA de la CPT1, que además irían asociados con niveles elevados de AGs y disponibilidad reducida de glucosa (Park EA, 1995). Concentraciones elevadas de AGs inducen un rápido incremento de la expresión de CPT1A en el hígado ¹⁵³.

Se ha escrito que en los roedores durante la época de la lactancia aumentan los niveles de mRNA y la actividad CPT1A en el hígado. También bajo dietas ricas

en grasas se mantiene elevada la actividad CPT1A, y esto no se aprecia cuando se alimentan con dietas ricas en carbohidratos ¹⁵⁴. Además, también se ha demostrado que los niveles de mRNA y la actividad CPT1A aumentan en el hígado de ratas en ayunas y en ratas diabéticas dependientes de insulina ¹⁵⁵.

Regulación por malonil-CoA

El malonil-CoA es el inhibidor fisiológico de la CPT1, y como tal es su principal regulador. Los niveles celulares de malonil-CoA son determinantes en la regulación de CPT1, por tanto, el control de estos niveles serán también de vital importancia. La formación de malonil-CoA está catalizada por la acetil-CoA carboxilasa (ACC), de la que se ha descrito dos isoformas, ACC1 y ACC2. La primera se expresa en el citosol de las células y mayoritariamente en tejidos lipogénicos como el hígado y el tejido adiposo, mientras que la ACC2 es mitocondrial y se expresa principalmente en el corazón y el músculo esquelético ¹⁵⁶. Además, la ACC2 presenta una extensión en su extremo aminoterminal que le confiere la posibilidad de anclar en la membrana mitocondrial externa, posiblemente muy cerca de la CPT1 (Abu-Elheiga L, 2000). La actividad de ACC está sujeta a un control agudo mediante rápidas modificaciones covalentes (inactivación y activación por fosforilación y desfosforilación respectivamente), por una activación por citrato y por una inhibición por AGs ¹⁵⁷.

Además de la ACC, otra proteína que juega un papel importante en el control de los niveles de malonil-CoA, es la malonil-CoA descarboxilasa (MCD). Esta enzima descarboxila el malonil-CoA para producir acetil-CoA, reduciendo los niveles celulares de malonil-CoA. En cuanto las necesidades energéticas son elevadas, la ACC se encuentra inhibida y la MCD activada, por lo que el efecto neto es una bajada de los niveles de malonil-CoA y esto conlleva una activación de la FAO ¹⁵⁶.

Aparte de la regulación por malonil-CoA, se han descrito otros mecanismos de regulación de la CPT1 independientemente del malonil-CoA. En algunos estudios se ha sugerido que la CPT1 podría estar regulada por fosforilación ¹⁵⁸ o que la CPT1 interacciona con otras proteínas del citoesqueleto en la membrana mitocondrial externa ^{158,159}. Otros estudios aportan evidencias de una estimulación de CPT1 por la AMPK, mediante fosforilación de componentes del

citoesqueleto ¹⁵⁹. En estos estudios se propone que la proteína quinasa II dependiente de Ca²⁺/ calmodulina y posiblemente la AMPK juegan un papel central, no sólo activando la CPT1 sino también fosforilando e inactivando la ACC y por tanto refuerza la activación de la CPT1 mediante la bajada los niveles de malonil-CoA.

En un estudio de nuestro grupo ¹⁶⁰ se identificó la metionina 593 como el aminoácido de la CPT1A crítico para la sensibilidad al malonil-CoA. Este aminoácido está presente en todas las carnitina aciltransferasas inhibibles por malonil-CoA (CPT1A, CPT1B, y COT) de varios organismos y no está presente en las carnitina aciltransferasas no inhibibles por malonil-CoA (CPT2 y colina acetiltransferasa). La mutación de este aminoácido por su equivalente en la CPT2, una serina, mostró que la mutación por sí misma, M593S, provocaba una pérdida casi total de la sensibilidad a malonil-CoA cuando esta forma mutante se expresaba en levaduras. Es interesante destacar que este mutante presentó una eficiencia catalítica mayor que la forma no mutada por el sustrato palmitoil-CoA. Así pues, es probable que la presencia de una metionina en esta posición se haya conservado evolutivamente en las carnitina aciltransferasas inhibibles por malonil-CoA indicando su importancia en la sensibilidad a malonil-CoA.

La pérdida de sensibilidad al malonil-CoA de la forma mutada CPT1A ha sido estudiada en diferentes tipos celulares: en levaduras ¹⁶¹, en células β -pancreáticas ¹⁶², en células musculares de rata (Sebastián et al., 2007) y en hepatocitos de rata ¹⁶⁴. En todos estos trabajos se demuestra una mayor capacidad oxidativa de la forma mutada CPT1AM comparado con la isoforma salvaje de la CPT1A independientemente de los niveles de malonil-CoA presentes en los diferentes tejidos.

En estudios realizados en nuestro grupo ¹⁶⁵ han mostrado que la sobreexpresión con AAV-CPT1AM en animales con 10 semanas de edad, alimentados con dieta grasa durante 2 semanas, era capaz de prevenir la obesidad. En este estudio se observó que los ratones que expresaban CPT1AM mostraban un aumento de la FAO, lo que daba lugar a una mayor producción de CO₂, ATP y cuerpos cetónicos. Cabe destacar que el aumento de la FAO hepática no sólo redujo el contenido de triacilglicéridos en hígado, la inflamación, y los niveles de especies reactivas de oxígeno, si no que también afectó sistémicamente

disminuyendo el peso del tejido adiposo epididimal y la inflamación y mejoró la señalización de insulina en el hígado, tejido adiposo y músculo. El aumento de peso inducido por la obesidad, aumentó los niveles de glucosa en ayunas e insulina en sangre, y la expresión de genes de la vía gluconeogénica. Esos parámetros fueron restaurados a niveles normales 3 meses después del tratamiento con los AAV. Por lo tanto, los ratones que expresan CPT1AM estaban protegidos contra la obesidad inducida por una dieta rica en grasa en términos de peso, esteatosis hepática, diabetes y resistencia a la insulina. Además, se estudió la sobreexpresión de CPT1AM en los ratones *db/db*, obesos genéticamente, que también mostraron una reducción de los niveles de glucosa, insulina y esteatosis hepática.

Esto se vió corroborado por estudios posteriores realizados por el grupo de Prip-Buus ¹⁶⁶. En ellos la sobreexpresión de CPT1AM en ratones alimentados con una dieta rica en grasa y sacarosa aumentó la FAO hepática y mejoró la tolerancia a la glucosa y a la insulina. Estos mismos autores también observaron que la expresión de CPT1AM en los ratones *ob/ob* producía un aumento de la sensibilidad a la insulina. Sorprendentemente, la esteatosis hepática no se vio afectada en los animales que expresaban la CPT1AM probablemente debido a que el vector de expresión utilizado en el estudio fueron los adenovirus que permiten una expresión del gen de interés de periodos inferiores a un mes.

ESTRATEGIAS TERAPEUTICAS PARA EL TRATAMIENTO DE LA OBESIDAD

Cada vez más se están realizando grandes esfuerzos dirigidos hacia la prevención y reversión de la obesidad. La obesidad está asociada a un alto número de enfermedades que disminuye la calidad de vida de los pacientes y causan un gran impacto económico y social. Una de las primeras medidas y más ampliamente utilizadas para la reducción de peso a largo plazo es mediante la ingesta de dietas restringentes y el aumento de la actividad física. Pero desgraciadamente, sólo una pequeña porción de los enfermos intervenidos con una dieta restringida y un aumento de la actividad física consiguen mantener la pérdida de peso a largo plazo ¹⁶⁷.

Otra opción son los tratamientos farmacológicos. Todos los medicamentos que se encuentran en el mercado contra la obesidad van dirigidos a limitar el

consumo de energía. A pesar de los grandes esfuerzos realizados hasta el momento para combatir la obesidad, la lista de medicamentos retirados del mercado por razones de seguridad parece ser cada vez mayor: fenfluramina, dexfenfluramina, sibutramina y rimonabant. Actualmente, sólo el orlistat y la lorcaserina tienen una indicación clínica aprobada para el tratamiento de la obesidad. Las agencias del medicamento europea, EMA (European Medicines Agency), y estadounidense, FDA (Food and Drug Administration), han aprobado el uso del orlistat , y sólo la FDA, el uso de la lorcaserina ^{168,169}. La liraglutida, un fármaco anteriormente aprobado como antidiabético, ha sido aprobado por las dos instituciones como fármaco contra la obesidad ^{170,171}.

Por último, otra opción para el tratamiento de la obesidad es la cirugía bariátrica. Es considerada actualmente la medida más eficaz, especialmente en aquellos pacientes con obesidad mórbida con un elevado riesgo de sufrir problemas de salud asociados como enfermedad cardiovascular, diabetes e infarto, entre otros. En estos pacientes, un 5% de reducción en el peso está asociado con una reducción del 60% de los riesgos de desarrollar DM2. En intervenciones hechas a pacientes diabéticos, cerca del 85% experimentan mejoría de su diabetes, mientras que en el 77% de los casos la cirugía resuelve completamente la condición, permitiendo al paciente dejar su tratamiento antidiabético. Sin embargo, la cirugía no es una práctica definitiva, ya que entre el 10-15% de los casos fracasan desde el inicio, mientras que el 50% de los pacientes recuperan el peso a los 10 años después de la intervención. Además, los casos de éxito requieren igualmente modificaciones en los hábitos de los pacientes. Entre los factores que recomiendan la no utilización de la cirugía se encuentra el elevado riesgo de complicaciones postquirúrgicas. ¹⁷².

En resumen, las diferentes estrategias para combatir la obesidad actualmente se basan en: 1) La disminución de la sensación de hambre mediante fármacos que actúen en el SNC inhibiendo el apetito, o bien mediante productos sustitutivos o aumentando la sensación de saciedad. 2) reducción del aporte energético con productos sustitutivos con menos calorías, reduciendo la absorción de grasas, o facilitando su eliminación fisiológica y 3) incremento del consumo energético mediante ejercicio físico.

En los últimos años han habido avances muy interesantes sobre las

terapias génicas, abriendo todo un abanico de posibilidades a la hora de encontrar nuevos tratamientos para la obesidad.

Terapia génica por AAVs

Los AAV muestran gran habilidad para entrar en la célula, penetran en el núcleo satisfactoriamente, se expresan durante largos periodos de tiempo y generalmente no muestran toxicidad. Una de las características más importantes es la falta de patogénesis y la poca respuesta inmunológica que provocan ¹⁷³. Una limitación de la terapia génica con los AAV es la existencia de anticuerpos neutralizadores de los AAV en la población humana. A dosis muy bajas los anticuerpos neutralizadores pueden tener un gran impacto y reducir la eficiencia y eficacia de la transducción vírica *in vivo*. La infección depende del medio por donde se administran los virus, las barreras anatómicas y otros factores que faciliten el contacto de los anticuerpos con las cápsides de los virus ¹⁷⁴. Así, los AAV 8 y 9 son serotipos óptimos para transducir el hígado, mientras que el serotipo AAV 5 es muy eficaz en pulmón ¹⁷⁵.

En los últimos 10 años se ha producido un gran avance en el diseño y utilización de los AAVs como terapia génica¹⁷⁶ y se han utilizado en numerosos ensayos clínicos (<https://clinicaltrials.gov/>). Se ha estudiado posibles tratamientos contra enfermedades del sistema nervioso central ¹⁷⁷, distrofias musculares ¹⁷⁸, desórdenes retinales ¹⁷⁹ y el tratamiento para la hipercolesterolemia ¹⁸⁰ entre otros.

En nuestro trabajo se han utilizado como terapia génica para revertir el fenotipo obeso y la resistencia a la insulina mediante la expresión de la forma humana de la CPT1AM en el hígado de ratones.

Capítulo 2. OBJETIVOS

El objetivo general de esta Tesis Doctoral es estudiar el efecto de un aumento de la FAO a largo plazo en el hígado de ratones obesos inducidos por dieta grasa.

Para ello nos hemos planteado los siguientes objetivos:

- 1.** Analizar si la expresión a largo plazo de la isoforma permanentemente activa de CPT1A humana, hCPT1AM, mediada por los AAV9 en hígado de ratones obesos aumenta la FAO y es capaz de revertir un fenotipo obeso.
- 2.** Estudiar los mecanismos moleculares por los que la expresión de hCPT1AM en hígado de ratones obesos disminuye la esteatosis hepática.
- 3.** Analizar qué especies lipídicas en hígado y en suero pueden servir como biomarcadores de la reducción de la obesidad y de una mejora de la esteatosis hepática en ratones obesos que expresan hCPT1AM en hígado.

Capítulo 3. MATERIALES y MÉTODOS

1. ANIMALES

En este trabajo se han empleado ratones machos de la cepa C57BL/6J de 7 semanas de edad adquiridos de *Janvier Laboratories*, Francia. Los animales se mantuvieron a 20°C en un ciclo de 12 h de oscuridad y 12 h de luz, con libre acceso a agua y comida. Los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical, previa anestesia con isoflurano. Todos los protocolos han sido aprobados por el comité ético de experimentación animal de la Universidad de Barcelona con el número de procedimiento CEEA 13/0002 6975.

1.1 Dietas empleadas

Cuando los ratones tenían 8 semanas de edad fueron divididos en 2 grupos: un grupo alimentado con dieta control (NCD, *Normal Chow Diet*) (*International Products Supplies Limited*, TestDiet D8Y2, 10% kcal de grasa, 18,3% proteína y 71,4% carbohidratos) y el otro grupo alimentado con dieta grasa (HFD, *High Fat Diet*) (TestDiet D8Y1, 60% kcal de grasa, 18,3% proteína y 20,1% carbohidratos). Esta dieta se denomina DIO (*Diet Induced Obesity*) y su uso está ampliamente reportado por su capacidad de inducir obesidad y resistencia a la insulina en estos animales ¹⁸¹.

1.2 Determinación del peso e ingesta

Los animales se pesaron en una balanza de precisión en los períodos de tiempo indicados en cada caso. El cambio en el peso se calculó como la diferencia entre dos pesadas consecutivas en un intervalo de tiempo determinado.

Para calcular la ingesta de los ratones se pesó la cantidad de comida inicial en una balanza de precisión y se realizaron pesadas consecutivas de dicha comida en los intervalos de tiempo indicados en cada caso.

2. VIRUS ADENO-ASOCIADOS (AAVs)

La síntesis y producción de los AAVs se realizó en el Centre de Biotecnologia Animal i de Teràpia Gènica (CBATEG). Los AAVs obtenidos fueron del serotipo 9. El genoma vírico contenía el cDNA de la CPT1AM (forma de CPT1A insensible a malonil-CoA) de humano (GenBank Access. Nº. HGNC: 2328) o la GFP

flanqueada en el extremo 5' de una región promotora específica de hígado que contiene un elemento potenciador de la albumina humana unido al promotor específico de la antripsina-1 humana (EalbAATp) descrito por Kramer *et al* ¹⁸² y en el extremo 3' un elemento estabilizador transcripcional de marmota (WPRE, Access. No. AY468-486) ¹⁸³ y la señal de poliadenilación de la hormona del crecimiento bovina [bGH-poly(A)] (bases 2326-2533 GenBank Access. N^o. M57764) (figura 1). La región de expresión está limitada por dos secuencias repetidas terminales (ITRs) correspondientes al AAV2. Las preparaciones utilizadas para hacer el estudio tenían una titulación de $1,34 \times 10^{13}$ copias genómicas (cg)/mL del virus AAV9-GFP y $1,16 \times 10^{13}$ cg/mL del virus AAV9-hCPT1AM. La forma mutada se obtuvo por la mutación de metionina en el aminoácido 593. Dicha mutación causa insensibilidad en el enzima al inhibidor fisiológico malonil-CoA ¹⁶⁰

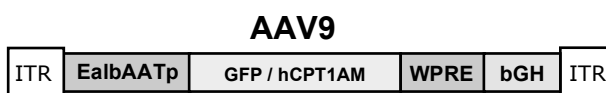


Figura 1. Diagrama del genoma de los virus adenoasociados AAV9. ITR: (*inverted terminal repeats*) del serotipo 2, EalbAATp: promotor específico de hígado, GFP/hCPT1AM genes de interés, WPRE: *woodchuck posttranscriptional regularoty element*, facilita el transporte del transcripto de RNA del núcleo al citoplasma y bGH: señal de poliadenilación del gen de la hormona de crecimiento bovina.

3. PROCEDIMIENTOS CON ANIMALES

3.1 Identificación

Para identificar cada uno de los ratones que formaban parte del experimento, un mínimo de una semana antes de empezar a trabajar con los ratones se procedió a la identificación (ID) por perforación de las orejas. Cada caja contenía cinco animales identificados como se muestra en la figura 2:




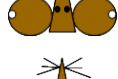
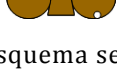
NÚMERO	ID
1	
2	
3	
4	
5	

Figura 2: Identificación de los ratones. En el esquema se muestra las orejas de cada ratón con el sistema de identificación por cada caja.

3.2 Administración de los AAVs

La administración de los AAVs descritos en el apartado 2 fue realizada mediante inyección por la vena de la cola de los ratones. Esta descrito que el 90% de los virus inyectados de esta manera quedan retenidos en el hígado ¹⁸⁴. La dosis inyectada fue desde $7,5 \times 10^{12}$ gc/kg hasta $7,5 \times 10^{10}$ gc/kg de peso corporal. Los AAVs fueron diluidos en una solución de sacarosa 5mM en PBS 1X pH 7,4 esterilizada bajo campana de flujo laminar con un filtro de $0,22 \mu\text{m}$ (Millex GP, SLGP033RB).

PBS 1X (phosphate buffer saline): 138mM NaCl; 8,1mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 3mM KCl; 1,5mM KH_2PO_4 .

Los animales se anestesiaron con isoflurano para minimizar cualquier tipo de estrés debido de la manipulación del animal. Después los animales fueron introducidos en potros donde quedan encajados y de esta manera se restringe el movimiento. Después se dilata la vena de la cola calentando la cola de los animales con una lámpara de infrarrojos (OSRAM SICCATHERM, 250w, E27/ES) durante 1 minuto (min) aproximadamente. Este procedimiento es necesario para una mejor visualización de la vena por donde serán inyectados los virus. Se introdujo suavemente una jeringa (Myjector, 29G x 12mm, BS-N1H2913) cargada con los virus y se inoculó suavemente la dosis pertinente.

3.3 Determinación de la glucosa y test de tolerancia a glucosa (GTT)

Los ratones se inmovilizan con una mano y con unas tijeras se hace un pequeño corte en la cola del ratón. Después se presiona la cola para la extracción de las gotas de sangre necesarias para la determinación de glucosa.

Las medidas de los niveles de la glucosa en sangre se realizaron utilizando un glucómetro (Contour®XT, Bayer, 83415283). Las medidas de glucemia se realizaron tras un ayuno de 6 o 16 h, según cada diseño experimental.

El test de la tolerancia a glucosa se realizó en los ratones tras un ayuno de 16 h. Se practicó una inyección intraperitoneal (i.p.) de glucosa del 20% (Glucosa 20%, Braun, 622985) a una concentración de 1,5g/kg de peso a cada ratón y se midió la glucemia 0, 15, 30, 60, 90 y 120 min después de la inyección.

3.4 Anestesia

Los animales fueron anestesiados mediante una inyección i.p. 10 μ L/10g de peso de ketamina (100mg/kg) (Imalgene 1000, Merial) y xilacina (10mg/kg) (Rompun 2%, Bayer). Se dejan transcurrir unos 20min para que la anestesia actúe correctamente. Antes de empezar el procedimiento se presionan las patas traseras del ratón con las uñas para comprobar la correcta administración y eficiencia de la anestesia.

3.5 Medición del consumo de oxígeno mediante calorimetría indirecta

La medición del consumo de oxígeno se midió usando un sistema de calorimetría indirecta (CLAMS, Columbus Instruments, Columbus, OH) donde el aire es aspirado a través de cámaras de calorimetría donde la tasa de flujo es controlada y medida con un controlador de flujo. El consumo de oxígeno (VO_2) y la producción de dióxido de carbono (VCO_2) se miden y son utilizados para calcular el gasto de energía (o la producción de calor en kilocalorías) y la relación de intercambio respiratorio (RER: VCO_2 / VO_2). Las cámaras de calorimetría están equipadas con sensores que permiten la medición de la actividad física, la ingesta de alimentos y la ingesta de agua. Todas las cámaras de calorimetría se encuentran a una temperatura y luz controlada. Para realizar el experimento se aclimató los ratones por 1 día en las jaulas y luego los datos se recogen durante 3

días. Los animales tenían libre acceso a comida y agua. Los datos han sido procesados con el software suministrado por el instrumento.

3.6 Termografía con cámara de infrarrojos

La termografía es un método que contribuye a la evaluación de temperatura de determinados tejidos. La técnica ofrece un mapa térmico del área de estudio y nos permite calcular el calor expedido por el tejido analizado. Se utilizó una cámara termográfica (FLIR, T420), que cuenta con una sensibilidad térmica de $0,04^{\circ}\text{C}$ y una resolución de imagen de $320 \times 240 \text{ pixels}$. Los animales fueron anestesiados como se ha descrito en el apartado 3.4, se abre el abdomen y se mueve todo el contenido intestinal hacia la derecha, dejando perfectamente visible el hígado. Se obtuvieron las imágenes en triplicado de cada animal, fijando la cámara en un soporte a 30cm de altura del animal. Posteriormente, se analizaron las imágenes de una región del hígado especificada en la imagen 3 con el software FLIR Tools suministrado por la cámara termográfica.

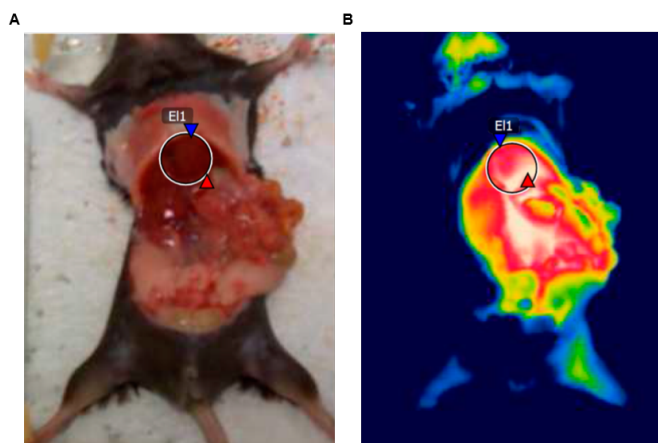


Figura 3: Zona de análisis de la temperatura en ratones. A) Imagen de la zona analizada. B) Imagen infrarroja de la zona analizada.

4. CULTIVOS PRIMARIOS

4.1 Hepatocitos de ratón

Los hepatocitos representan entre un 70-80% del total de células del hígado. Las principales funciones que desarrollan o en las que intervienen son: filtrado y almacenamiento de la sangre, metabolismo de los hidratos de carbono, proteínas, lípidos, hormonas y compuestos químicos extraños, de la formación de

la bilis y del almacenamiento de las vitaminas, el hierro y de la formación de factores de coagulación.

Los hepatocitos son células poliédricas con 1 o 2 núcleos esféricos (figura 3). Presentan un citoplasma acidófilo muy rico con orgánulos como ribosomas, ER, aparato de Golgi y mitocondrias. Además el citoplasma contiene múltiples inclusiones de glucógeno y grasa.

Aparte de los hepatocitos encontramos otros tipos de células como serían; las células de Kupffer, un tipo de macrófago, y otros cuerpos extraños provenientes de la sangre de las lagunas hepáticas y las células endoteliales típicas.

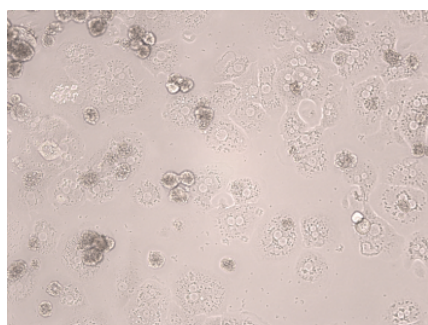


Figura 4. Hepatocitos primarios de ratón en medio de cultivo. Fotografía de hepatocitos 24 h después de ser obtenidos en nuestro laboratorio.

El aislamiento de los hepatocitos se hace mediante una digestión con colagenasa. En un primer paso se lava el hígado con una solución isotónica, en la cual se adiciona un agente quelante (EGTA) para atrapar el calcio y romper las uniones entre las células. En el siguiente paso el hígado se lava con una solución con colagenasa para separar los hepatocitos del parénquima del hígado. Mediante esta técnica se consigue una suspensión de hepatocitos, la cual puede ser sembrada en placas o en *flasks* para utilizar inmediatamente o para criopreservar por congelación ¹⁸⁵. Los hepatocitos en cultivo no proliferan y son extremadamente sensibles a los ciclos de congelación y descongelación, hay que añadir agentes crioprotectores, por eso se aconseja su utilización en fresco ¹⁸⁶.

4.2 Obtención de hepatocitos primarios de ratón

La obtención de cultivos primarios de hepatocitos mediante el método de perfusión de colagenasa por la vena porta se describió previamente por Moldéus

y col.¹⁸⁷. Se sigue el montaje tal como se indica en la figura 4. En un baño a 37°C se depositan la solución de lavado (HBSS + EGTA) y la solución de digestión (HBSS + colagenasa, que se añade en el último momento) que sirve para disgregar los hepatocitos. Ambas soluciones se especifican más adelante. Se comprueba la velocidad de la bomba de perfusión (5mL/min) (GILSON, Modelo MP Drive Unido, F155001). Se vigila en todo momento que no quede ninguna burbuja en todo el circuito del montaje. Se debe controlar que tanto los tubos (GILSON, F1825133), como los conectores (GILSON, F1179951) del montaje estén perfectamente limpios para evitar cualquier tipo de contaminación. A continuación se gasifican (O₂:CO₂) las soluciones durante 20 min antes de iniciar el procedimiento.

HBSS (*Hank's balanced salt solution*): 138mM NaCl; 50mM Hepes; 5,56mM glucosa; 5,4mM KCl; 0,338mM Na₂HPO₄·2H₂O; 0,44mM KH₂PO₄; 4,17mM NAHCO₃; pH 7,4 y se filtra con un filtro de 0,22µm (Millex GP, PES SLGP033RS).

Solución de lavado: HBSS + EGTA (preparar extemporáneamente): añadir 200µL de una solución de 0,5mM EGTA en 200mL de HBSS; pH 7,4.

Solución de digestión: HBSS + colagenasa (preparar extemporáneamente): añadir 8,3mL de CaCl₂ 60mM, después de gasificadas añadir 160U de colagenasa IV (Sigma, C5138). Ajustar el pH 7,4. Todas las soluciones deben estar filtradas y estériles para evitar contaminaciones.

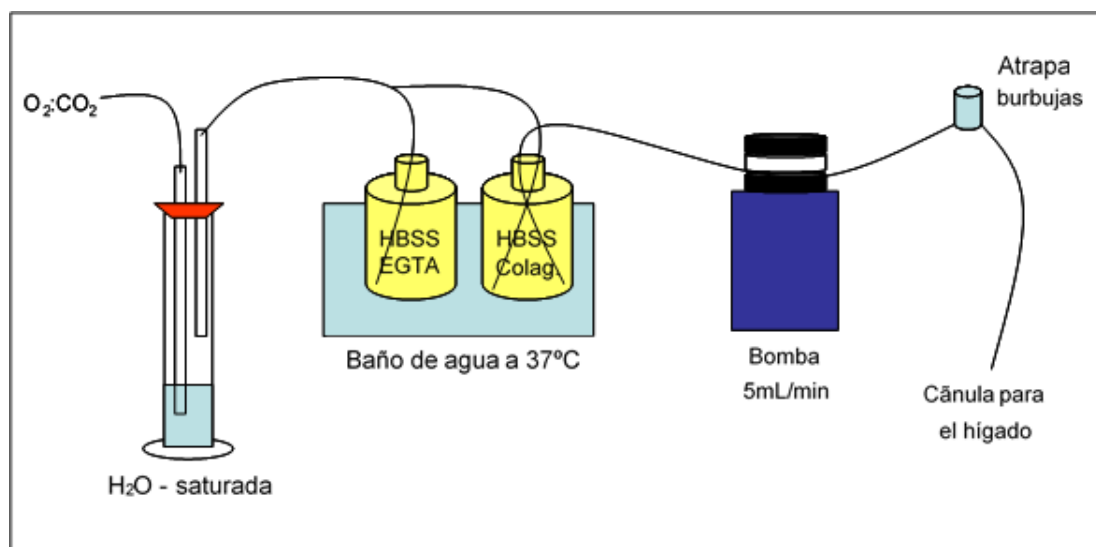


Figura 5. Esquema del sistema de perfusión de hepatocitos de ratón. En la figura se muestran las soluciones necesarias y la correcta conexión del sistema de perfusión. La gasificación de las soluciones es necesaria para la supervivencia de las células una vez sacrificado el animal (imagen tesis Josep Maria Orellana Gavaldà).

Se anestesió el animal como descrito en el apartado 3.4, luego se inmoviliza el ratón por las patas y se lava la piel con etanol al 70% para desinfectar la superficie y evitar posteriores contaminaciones. Se abre el abdomen y se mueve todo el contenido del vientre hacia la derecha, dejando perfectamente visible el hígado, la vena porta y la vena cava inferior. Se realiza una sutura (Lab. Aragón SA, seda trenada 2/0 #060), de alrededor de 12cm de largo. Se pone la sutura debajo de la vena porta. Se inserta el catéter (BD, 381212) en la vena porta y se inmoviliza con una sutura alrededor de la vena. Si el catéter no se llena de sangre, llenarlo con la solución de lavado para evitar la formación de burbujas. Se conecta la bomba peristáltica al catéter, se enciende y cuando se observa que el hígado empieza a estar pálido, significa que la perfusión se ha realizado correctamente y es el momento de cortar la vena cava inferior para lavar el hígado durante 5 min. A continuación, se añade la colagenasa a la solución de digestión utilizando un filtro de 0,22 μ m. Se detiene el flujo de la bomba y se cambia rápidamente el tubo de la solución de lavado por la solución de digestión. Se espera aproximadamente 7 min o hasta que el hígado adquiere una cierta viscosidad. En este momento se detiene la bomba, y por lo tanto el flujo, y se extrae el hígado con la máxima rapidez posible. En este punto es muy importante no seccionar el estómago o los intestinos para evitar futuras contaminaciones. A partir de este momento se trabaja en condiciones estériles bajo campana de flujo laminar.

Se deposita el hígado en una placa de Petri con solución HBSS+EGTA calentada previamente a 37°C y con la ayuda de dos pinzas se disgrega el hígado para obtener los hepatocitos separados. Se filtra la solución con un filtro de 250 μ m en un tubo de 50mL y a continuación se lleva a cabo una serie de lavados de los hepatocitos. Se adicionan 35mL de solución de lavado HBBS+EGTA y se centrifuga a 500xg durante 2 min a 24°C de temperatura. Se descarta el sobrenadante y se vuelve a lavar los hepatocitos añadiendo otros 35mL de la solución de lavado. Se centrifuga a 500xg durante 2 min a 24°C de temperatura y finalmente se resuspenden los hepatocitos con 10mL de medio de aislamiento (DMEM (Gibco, 11966), 10mM glucosa, 10% FBS (LABCLINICS SA, BC - 0005934), 100nM insulina (FW 36.46g/mol), 100nM dexametasona y estreptavidina-penicilina (100U/mL)).

Antes de sembrar los hepatocitos en placas se determina su viabilidad. Cuando se está aislando los hepatocitos de un hígado interesa obtener el máximo número de hepatocitos viables ya que a lo largo del proceso hay diferentes puntos claves (pH y temperatura de las soluciones empleadas) que harán que algunos hepatocitos se mueran. Es aconsejable trabajar con hepatocitos con una viabilidad superior al 80-85% para poder realizar experimentos de forma repetitiva y reproducible. Para comprobar la viabilidad de los hepatocitos se utiliza una solución *Trypan Blue* (SIGMA, T8154) que tiñe de color azul los hepatocitos muertos. Los hepatocitos que permanecen vivos quedan de color blanco. Se prepara la siguiente suspensión para determinar la viabilidad: 10µL suspensión de hepatocitos + 80µL solución HBSS/EGTA + 10µL *Trypan Blue*. De la suspensión obtenida se cogen 10µL y se depositan por el lateral de la cámara de Neubauer (figura 5) donde se cuentan los hepatocitos blancos (vivos) y azules (muertos) que hay en cada uno de los cuatro cuadrantes de 16 cuadrados.

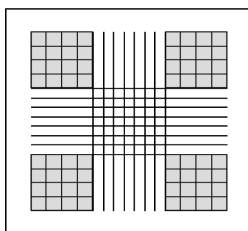


Figura 6. Cámara de Neubauer. La zona marcada en color gris es la zona donde se cuentan los hepatocitos.

$$\text{Viabilidad \%} = \frac{\text{Número de hepatocitos vivos} \times 100}{\text{Número total de hepatocitos}}$$

Para distribuir los hepatocitos en placas de cultivo sólo se tendrá en cuenta los hepatocitos vivos (Tabla 1).

$$\text{Contaje total de hepatocitos} = \frac{\text{Media de hepatocitos vivos} \times 10.000 \times 10}{\text{hepatocitos totales/mL}}$$

Placas	Volumen de medio	Hepatocitos
100mm	10mL	3,0x10 ⁶
6 pocillos	2mL	0,5x10 ⁶
Flask de 25cm ²	5mL	1,3x10 ⁶

Tabla 1. Distribución del número de hepatocitos por tipo de placa.

Finalmente se lleva a cabo el sembrado de los hepatocitos en los diferentes tipos de placas o en *flasks* de 25cm² pre tratadas con gelatina 0,1% (SIGMA, G9391). El día antes de obtener los hepatocitos se prepara las placas y/o *flasks* donde se sembrarán los hepatocitos con la gelatina que se calienta hasta unos 50°C para su correcta disolución.

4.3 Tratamientos en hepatocitos

4.3.1 Estimulación de la insulina

Para examinar la vía de señalización de la insulina en los hepatocitos de ratón, tras 16 h de la obtención de los hepatocitos se estimularon con 100nM de insulina (Humulina regular 100UI/mL, Lilly) durante 5 min. Después, las placas se congelaron en nitrógeno líquido para la posterior preparación de extractos de proteína que se utilizaron para analizar los eventos de fosforilación de las proteínas clave de la vía de señalización de la insulina a través de Western Blot (WB).

4.3.2 Flujo de la autofagia

La autofagia es un proceso muy dinámico, lo que hace difícil de interpretar el resultado en una situación estable. Por esa razón, el estudio de flujo de la autofagia requiere el uso de inductores y bloqueadores de la autofagia que ayudarán a interpretar los resultados.

Cloroquina (CQ): es un agente inhibidor de la autofagia. Se acumula en el interior de las partes ácidas de la célula, incluyendo los endosomas y los lisosomas. Esta acumulación conduce a la inhibición de las enzimas lisosomales que requieren un pH ácido, y evita la fusión de los endosomas y los lisosomas. CQ inhibe la autofagia, ya que eleva el pH lisosomal, que conduce a la inhibición tanto de fusión del autofagosoma con el lisosoma como la degradación de proteínas lisosomales. La inhibición de la autofagia en este nivel nos permite estudiar el flujo de autofagia basal al compararlo con un control. Cultivos primarios de hepatocitos de ratón fueron tratados durante 3 h con 50µM de CQ (Santa Cruz, sc-205629) tras 16 h de obtención.

Rapamicina (RP): es un inductor de la autofagia. La rapamicina es un inhibidor de mTOR, que es un importante regulador negativo de la autofagia. Inhibidores

directos de mTOR inducen la autofagia. Este tratamiento nos permite estudiar la capacidad de las células para activar la autofagia por la inhibición de mTOR. Los hepatocitos primarios de ratones fueron tratados durante 3 h con 2 μ M de RP (Santa Cruz, sc-3504A) tras 16 h de obtención.

Para estudiar el flujo de la autofagia, se obtuvieron extractos proteicos de los hepatocitos en cultivo tratados y se analizó por WB la degradación de las proteínas LC3BI, LC3BII y p62.

5. DETERMINACIONES EN SUERO

5.1 Obtención del suero

Para la obtención del suero se utilizaron tubos para la extracción de sangre capilar (Microvette®, Sarstedt, 20.1280). Se anestesió el animal como se ha descrito en el apartado 3.2. Previamente a la extracción de sangre se trató la jeringa (BD Plastipak, 301355) y la aguja (BD Microlance, 21G x 25mm, 301156) con una solución de heparina sódica 20UI/mL (Fibrilin, Laboratorios Rovi, 305159) y se introdujo en la vena cava inferior para coleccionar la sangre. Una vez obtenida la sangre los tubos se mantuvieron un mínimo de 30 min a temperatura ambiente (TA). A continuación, se centrifugaron durante 5 min a una velocidad de 10.000xg a una temperatura de 4°C. El sobrenadante se almacenó en alícuotas a -20°C para posteriores determinaciones de los metabolitos y las hormonas.

5.2 Insulina

Los niveles de insulina fueron determinados utilizando el kit *Mouse Ultrasensitive Insulin* ELISA (ALPCO, 80-INSMSU-E01). Estos ensayos, se basan en la utilización de placas de 96 pocillos cubiertas con un anticuerpo específico para detectar y capturar un antígeno de interés en una muestra. El antígeno inmovilizado es detectado con otro anticuerpo específico que a su vez es detectado por un tercer anticuerpo enlazado a un enzima capaz de generar un producto detectable, generalmente por un cambio en el color y la absorbancia, que se puede medir espectrofotométricamente. Para la determinación se siguieron las instrucciones provistas por cada casa comercial.

5.3 β -Hidroxiacetato (BHB)

Los niveles de BHB fueron determinados con el kit *β -Hydroxybutyrate (Ketone Body) Colorimetric Assay* (Cayman Chemical Company, 700190). El ensayo se basa en la oxidación de D-3-hidroxiacetato a acetato por la enzima 3-hidroxiacetato deshidrogenasa¹⁸⁸. Concomitante con la oxidación, el cofactor NAD⁺ es reducido a NADH. En presencia de diaforasa, NADH reacciona con el detector colorimétrico WST-1 produciendo formazan que debe leerse a una absorbancia 445-455nm. Se siguieron las instrucciones de la casa comercial para su determinación.

5.4 Colesterol total, HDL, TG, ALT y AST

Los niveles del colesterol total, HDL, TG, ALT y AST en suero fueron medidos en el del Centro de Investigación Cardiovascular CISC-ICCC en el Hospital San Pau en colaboración con la Dra. Concepción Llorente y mediante un autoanalizador Clima MC-15 (RAL, RA115000).

6. DETERMINACIÓN DE METABOLITOS EN HÍGADO

6.1 Triglicéridos (TG)

El primer paso para la determinación de los TG en el hígado de ratón consistió en la extracción de las grasas de dicho tejido. Posteriormente se utilizó un kit comercial para determinar el contenido de TG en el tejido.

Extracción de las grasas

Este protocolo se basa en la extracción de todas las grasas utilizando cloroformo. Se siguieron los pasos detallados a continuación:

1. Colocar aproximadamente 100mg de tejido congelado en un tubo *eppendorf* de 2mL.
2. Añadir 500 μ L de PBS 1X y romper mecánicamente el tejido utilizando el sistema Polytron (PT2100).
3. Guardar 100 μ L de homogenado para la valoración de la concentración de proteínas.
4. Transferir el resto del homogenado a tubos de vidrio y añadir 1,5mL de cloroformo. Mezclar vigorosamente y dejar toda la noche en agitación a TA.

5. Centrifugar 5min a 10.000xg Transferir el sobrenadante y la fase inferior (descartando la interfase) a un nuevo tubo de vidrio.
6. Añadir 500µL de NaCl 0,9%. Mezclar durante 1 min y centrifugar 5 min a 10.000xg.
7. Recuperar la fase inferior y evaporar el solvente bajo una atmósfera de nitrógeno.
8. Reconstituir el producto con 250µL de isopropanol.

Determinación del contenido de TG

Se realizó la determinación utilizando el kit *Serum Triglyceride Determination* (Sigma-Aldrich, TR0100-1KT). La base de la técnica es la hidrólisis de los TG, presentes en el tejido, a glicerol y FFA por acción del enzima lipoproteína lipasa (LPL). A continuación el glicerol es fosforilado por el enzima gliceroquinasa (GK), en presencia de ATP, formando glicerol-1-fosfato (G-1-P) y ADP. El G-1-P es oxidado por el enzima glicerol fosfato oxidasa (GPO) en dihidroxiacetona fosfato (DAP) y H₂O₂.

En presencia del enzima peroxidasa (POD), el fenol y la 4-aminoantipirina (4-AA) se condensan por acción del H₂O₂, formándose un producto de color rojo que es proporcional a la concentración de TG en la muestra. La determinación se llevó a cabo siguiendo el protocolo del kit.

6.2 Determinación del ATP

Para la determinación del ATP en el hígado se ha utilizado el kit de bioluminiscencia de la casa comercial Invitrogen (A22066). El kit se basa en la oxidación de la luciferina conjuntamente con el ATP para emitir luz. El método es extremadamente sensible. Los hígados congelados se homogenizaron con HClO₄ al 4% y se dejaron incubando durante 10 min. Se centrifugaron los homogenados a 10,000xg durante 10 min con el fin de extraer las proteínas que han precipitado debido al medio ácido. A continuación se neutralizan 300µL del sobrenadante con KHCO₃ 5M. Finalmente se utilizan 10µL para la cuantificación del ATP mezclados con 90µL de la solución de reacción proporcionada por el mismo kit. Las concentraciones de ATP se calcularon por extrapolación a partir de una curva

patrón y la luminiscencia se detectó mediante el aparato *Modulus Microplate* (Turner BioSystems).

6.3 Determinación de β -hidroxiburitato

Se procedió como descrito en el apartado 5.3.

6.4 Oil Red O

El contenido de TG ha sido analizado por la tinción de Oil Red O. Oil Red O (Sigma, O0625) es un lisocromo (colorante soluble en grasa) usado para tinciones de los TG y los lípidos neutros. Esta tinción fue realizada en hepatocitos obtenidos de hígado de ratón para determinar la cantidad de TG existente.

Solución stock de Oil Red O: se pesa 300mg de Oil Red O y se diluye en 100mL de isopropanol. Agitar la solución durante toda la noche en un recipiente protegido de la luz y tapado para evitar la evaporación del isopropanol. Esta solución se debe filtrar justo antes de preparar la solución de trabajo.

Solución de trabajo Oil Red O: 3 partes de la solución stock con 2 partes de agua destilada.

Los hepatocitos tras 16 h de su obtención fueron lavados dos veces con PBS 1X y fueron fijados con paraformaldeido al 10% durante 30 min a TA y se lavaron de nuevo con PBS 1X. Después, las células fueron permeabilizadas durante 5 min con isopropanol al 60% para facilitar la tinción de los lípidos. Se incubaron las células durante 15 min con la solución de trabajo. Después de varios lavados con agua destilada se retiraron los cubres de las placas y se fijaron con medio de montaje en los portaobjetos. Las vesículas de lípidos intracelulares teñidas con Oil Red O se identificaron por su color rojo brillante en el microscopio.

7. ANÁLISIS DE LIPIDÓMICA

Se determinó los esfingolípidos y fosfolípidos presentes en hígado y suero. Para las muestras de hígado, se pesó aproximadamente 30mg de tejido y se añadió 1mL del PBS 1X y se maceró utilizando un homogeneizador mecánico (Polytron) durante 1 min aproximadamente a máxima velocidad. Luego se sonica

durante 30 seg, por 3 períodos de 10 seg alternados, en hielo. Se cuantifica la cantidad de proteína por Bradford tal como se ha descrito en el apartado 8.3.

Las muestras de hígado y suero fueron preparadas tal como se ha descrito por ¹⁸⁹ y analizadas por UPLC y HPLC-MS. Las dos fases móviles fueron formiato de amonio 1mM en metanol (fase A) y formiato de amonio 2mM en H₂O (fase B), ambas fases con ácido fórmico 0,05mM. El siguiente gradiente fue programado: 0 min, 80% A; 3 min, 90 % A; 6 min, 90 % A; 15 min, 99 % A; 18 min, 99 % A; 20 min, 80 % A, y una tasa de flujo de 0,3mL min⁻¹.

8. OBTENCIÓN DE PROTEÍNAS Y CUANTIFICACIÓN POR EL MÉTODO DE BRADFORD

El método de extracción de proteínas varió en función de la fuente de extracción. En todos los casos se obtuvieron extractos totales de proteínas para análisis por WB.

8.1 Extracción de proteínas de tejido congelado

1. Se pesaron aproximadamente 30mg de tejido y se añadió 1mL del tampón de lisis de proteína con inhibidor de proteasas (*Complete*, Roche, 11697498001) y de fosfatasas (*PhosSTOP*, Roche, 04906837001), utilizando un homogeneizador mecánico (Polytron) durante 1 min aproximadamente a máxima velocidad.
2. Las muestras se dejaron en hielo y se mezclaron mediante ciclos de agitación en vórtex de 30 seg cada 3 min durante 10 min.
3. Se centrifugaron las muestras a máxima velocidad durante 10 min a 4°C.
4. En el sobrenadante se cuantificó la concentración de proteína mediante el método de Bradford (descrito en el apartado 8.3).

Tampón de lisis de proteína	
HEPES-NaCl Mix	40mL
10% DOC	2,5mL
20% Triton X-100	2,5mL
Glicerol	5mL
Inhibidor de proteasas	1 tableta

Tabla 2. Tampón de lisis de proteína. DOC 10% se prepara pesando 5g DOC en 50mL agua (se almacena a 4°C, protegido de la luz); 20% Triton X-100: 10mL triton X-100 en 40mL de agua; HEPES-NaCl mix: 30mM HEPES, pH 7.4, 150mM NaCl.

8.2 Extracción de proteínas a partir de hepatocitos

1. Los hepatocitos en cultivos fueron lavados 2 veces con PBS 1X y las placas mantenidas en hielo.
2. Se añadió 100µL de tampón de lisis de proteínas con inhibidores de proteasas.
3. Se recogieron los extractos lisados con la ayuda de una espátula y se depositaron en eppendorf de 1,5mL.
4. Las muestras se mantuvieron en hielo realizando los ciclos de homogenización de 30 seg en vórtex cada 3 min durante 10 min.
5. Se centrifugaron las muestras a máxima velocidad, durante 10 min a 4°C.
6. En el sobrenadante se cuantificó la concentración de proteína mediante el método de Bradford (descrito en el apartado 8.3).

8.3 Cuantificación de proteínas por el método de Bradford

Para la cuantificación de las proteínas se utilizó el método descrito por Bradford ¹⁹⁰ que se basa en el cambio producido en el espectro de absorción de algunos colorantes como consecuencia de su unión a moléculas proteicas. En el caso del reactivo de Bradford, el colorante azul de Coomassie se une de manera específica a las proteínas, virando de color cuando esto ocurre en una solución ácida. El reactivo contiene el colorante en un medio de metanol y ácido fosfórico y al unirse de manera covalente al enlace peptídico de las proteínas su máximo de absorción cambia de 465 a 595nm.

Para valorar la concentración de proteínas en nuestras muestras se siguió el protocolo detallado por la casa comercial proveedora de la solución de Bradford (*BioRad protein assay*, 500-0006). Como patrón se empleó albúmina sérica bovina (BSA) en un rango de 1-20 μ g/mL. En la mayoría de casos la curva estándar se realizó con 2, 5, 10, 15 y 20 μ g de BSA. La solución stock de BSA utilizada como patrón se preparó a una concentración de 1mg/mL con H₂O destilada y se almacenó a -20°C durante tiempos largos o a 4°C a corto plazo. La absorbancia de la curva patrón y las muestras se midió en un volumen total de 1mL a 595nm utilizando cubetas de plástico de 1cm de paso de luz. A cada muestra o patrón se añadió la proteína, 200 μ L de reactivo de Bradford 5X y la cantidad de H₂O destilada suficiente para completar 1mL. Uno de los patrones no lleva proteína y se utiliza como blanco. Una vez hecha la mezcla los tubos se agitan y se incuban durante 5 min a TA antes de leer la absorbancia en el espectrofotómetro. Las absorbancias leídas son proporcionales a la concentración de proteína.

Muestra	Volumen	Bradford 1/5
Blanco	-	1mL
2 μ g BSA	2 μ L	998 μ L
5 μ g BSA	5 μ L	995 μ L
10 μ g BSA	10 μ L	990 μ L
15 μ g BSA	15 μ L	985 μ L
20 μ g BSA	20 μ L	980 μ L
Muestra problema	2-10 μ L	c.s.p. 1mL

Tabla 3. Protocolo para la determinación de la concentración de proteína por el Método de Bradford. Volúmenes necesarios para la recta patrón de las muestras a analizar utilizando un patrón de 1 μ g/ μ L BSA.

9. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS ENRIQUECIDOS DE MITOCONDRIAS

Se obtuvieron extractos enriquecidos de mitocondrias para los análisis de WB y actividad enzimática. A continuación se detalla la obtención de mitocondrias de hígado, la obtención de mitocondrias de células en cultivo y la extracción de proteínas de hígado.

9.1 Extracción de mitocondrias de hígado

Todo el proceso se realizó a 4°C. El protocolo detallado en este apartado corresponde a la obtención de extractos enriquecidos en mitocondrias de hígado.

1. Para la obtención de mitocondrias de hígado de ratón se extrae el hígado y se homogeniza en 20 volúmenes de tampón de extracción, con inhibidor de proteasas, utilizando un homogeneizador mecánico (Polytron) durante 1 min aproximadamente a máxima velocidad.
2. Se centrifuga a 600xg durante 15 min.
3. Se recoge el sobrenadante y se centrifuga de nuevo a 12.000xg durante 20 min (el precipitado de esta centrifugación es rico en mitocondrias).
4. Se realizan un par de lavados, resuspendiendo el precipitado en 2mL de tampón de extracción, y se vuelve a centrifugar a 7000xg durante 10 min.
5. Finalmente, se resuspende el precipitado en 1mL de tampón de extracción (sin el inhibidor de proteasas). A continuación se cuantifica la cantidad de proteína por el método de Bradford (ver apartado 8.3).

El tampón de homogenización se prepara y se deja enfriando a 4°C. Los inhibidores de proteasas se añaden de manera extemporánea (1 tableta/50mL de tampón), justo antes de la utilización del tampón.

Tampón de homogenización	
Sacarosa	70mM
Manitol	220mM
Hepes	5mM
EDTA, pH 7,4	2mM

Tabla 4. Tampón de lisis de mitocondrias de tejido. Se prepara el día del experimento y se añade de manera extemporánea el inhibidor de proteasas.

9.2 Extracción de mitocondrias de hepatocitos primarios

Los cultivos primarios de hepatocitos de ratón fueron obtenidos como se ha citado en el apartado 4.2. Todo el proceso se realizó a 4°C. El protocolo detallado en este apartado corresponde a la obtención de extractos enriquecidos en mitocondrias de una placa de cultivo celular de 10 cm de diámetro.

1. Lavar las células con PBS 1X.
2. Recoger las células con la ayuda de un rascador en 2mL de PBS 1X.

3. Centrifugar a 1.200xg durante 5 min.
4. Resuspender las células precipitadas en 1mL de tampón de homogenización con inhibidores de proteasas previamente enfriado a 4°C.
5. Romper las células mecánicamente utilizando un homogeneizador de vidrio (Wheaton, 1mL Dounce Tissue Grinder, 257542).
6. Centrifugar el homogenizado durante 3 min a 2000xg a 4°C.
7. Centrifugar el sobrenadante obtenido a una velocidad de 16.000xg durante 30 min.
8. El precipitado obtenido corresponde a la fracción enriquecida en mitocondrias. Se resuspende en 25-75µL del tampón de homogenización.
9. Almacenar a -20°C.

El tampón se prepara tal como se ha descrito en la tabla 4.

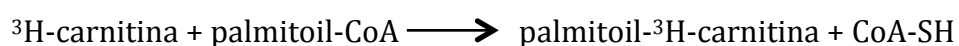
Tampón de homogenización	
Sacarosa	70mM
Manitol	210mM
Hepes	10mM
EDTA, pH 7,4	1mM

Tabla 5. Tampón de lisis de mitocondrias a partir de células. Se prepara el día del experimento y se añade de manera extemporánea los inhibidores de proteasas.

10. ENSAYO DE LA ACTIVIDAD CPT1

La actividad de la CPT1 se determina usando un método radiométrico previamente descrito en nuestro grupo ¹⁹¹. La actividad de la CPT1 se ensaya en fracciones enriquecidas en mitocondrias obtenidas tal como se ha descrito en el apartado 9.1. El ensayo se realiza siempre con estas fracciones sin congelar, para evitar la rotura de la mitocondrias y la aparición de la actividad CPT2 (localizada dentro de la mitocondria), que podría conducir a datos erróneos de la actividad de la CPT1.

Los sustratos para el ensayo de actividad son L-[*metil*-³H]carnitina hidrocloreuro (Perkin Elmer, NET1181250UC) y palmitoil-CoA (Sigma-Aldrich, P9716). La reacción se da en la siguiente dirección:



El proceso se basa en la formación de palmitoilcarnitina marcada radiactivamente que es soluble en un medio orgánico de butanol, mientras que el exceso de carnitina radiactiva que no ha reaccionado es soluble en agua. De esta forma, mediante una extracción con butanol saturado de agua podemos separar la palmitoilcarnitina.

El ATP permite la regeneración del palmitoil-CoA por las acil-CoA sintetetasas, a partir del palmitoil y del CoA formado por acción de las deacilasas (evitando así que la concentración del acil-CoA disminuya). Como agente reductor se utilizó el glutatión reducido y no tioles como el ditioneitol (DTT) o ditioeritrol (DTE), ya que éstos reducen la sensibilidad a malonil-CoA ¹⁹². La presencia de albúmina deslipidizada es necesaria para proteger a la mitocondria del efecto detergente de los AGs, sin embargo, su concentración no ha de ser superior al 0,1% con el fin de evitar un efecto de sigmoicidad en la cinética del enzima respecto al acil-CoA ¹⁹³. Finalmente, se añade KCl ya que se ha observado que aumenta la actividad del enzima ¹⁹⁴. El pH elegido para el ensayo es de 7,2, ya que se ha observado una dependencia de la actividad y de la sensibilidad a malonil-CoA al pH ^{195,196}. Este pH es el óptimo para favorecer ambas condiciones.

El procedimiento para el ensayo de actividad de la CPT1 se detalla a continuación. La actividad enzimática se ensaya a 30°C durante un tiempo nunca superior a 4 min, en un volumen final de 200µL.

Primero se prepara la mezcla de reacción en un tubo de 15mL y se mantiene en hielo. El GSH se disuelve en agua justo antes de usarlo. Cada muestra se ensaya por duplicado. La mezcla de reacción lleva los siguientes componentes por punto:

Mezcla de Reacción	
Tampón CPT1	4X
Palmitoil-CoA	1mM
ATP	80mM
BSA	30%
GSH	25mM
³ H carnitina	16mM
H ₂ O destilada c.s.p.	160µL

Tabla 6. Mezcla de reacción del ensayo CPT1A. La mezcla de reacción se prepara al momento.

En segundo lugar se prepara la mezcla de proteína. Las muestras se preparan en tubos de 1,5mL diluyendo la proteína en tampón CPT1 4X y ajustando a 40µL con agua destilada. El blanco contiene sólo agua destilada y tampón CPT1 4X

Mezcla de Proteína	
Proteína (suspensión de mitocondrias)	5-15µg
Tampón CPT1 4X	10µL
H ₂ O destilada c.s.p.	40µL

Tabla 7. Mezcla de proteína para el ensayo de CPT1A. La mezcla se prepara con mitocondrias recién obtenidas.

Una vez preparadas la mezcla de reacción y la mezcla de proteína el ensayo se inicia añadiendo 160µL de la mezcla de reacción en cada tubo de muestra de proteína. Las muestras se mezclan en vórtex y se ponen en un baño a 30°C durante exactamente 4 min. La reacción se para añadiendo 200µL de HCl 1,2M. Las muestras se mezclan de nuevo y en este punto se puede dejar el ensayo a TA o continuar procediendo con las extracciones con butanol. Para extraer el producto, palmitoil-³H-carnitina, se añaden 600µL de butanol saturado de agua, se mezcla en vórtex (45 seg) y se centrifuga a 16.000rpm 2 min para separar la fase acuosa de la fase orgánica. Se cogen 400µL de la fase orgánica superior y se añaden a otra serie de tubos que contienen 200µL de agua destilada. Las muestras se agitan en vórtex y centrifugan de nuevo, y se cogen 250µL de la fase superior y se ponen en un vial con 5mL de líquido de centelleo (Ecolite, ICN). El contador utilizado fue un *Liquid Scintillation Analyzer* (Packard, TRI-CARB 2100TR) ubicado en el servicio de radioisótopos de la Facultad de Farmacia de la Universitat de Barcelona.

Para calcular la actividad específica (A. E.) del enzima se aplicó la siguiente fórmula:

$$A. E. (\text{nmol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg proteína}^{-1}) = \frac{\text{cpm} \times 600}{R. E.} \times \text{mg prot.} \times \text{min} \times 250$$

Donde cpm son las cuentas por minuto, 600 es la cantidad añadida de *n*-butanol, R.E. la radioactividad específica de la carnitina (~3000 c.p.m./nmol), mg prot son miligramos de muestra proteica ensayada, min es el tiempo de incubación del

ensayo, expresado en minutos (generalmente 4 min) y 250 el volumen de fase orgánica cogido para la lectura.

El tampón CPT1 4X se prepara de la siguiente forma y se mantiene a 4°C.

Tampón CPT1 4X	
Tris-HCl pH 7,2	420mM
KCN	8mM
KCl	60mM
MgCl ₂	16mM

Tabla 8. Tampón CPT1A 4X para ensayo de actividad. El stock se prepara a 4X y se diluye a 1x en la mezcla de reacción.

Los valores de actividad se dan como medias \pm desviación estándar para al menos tres ensayos independientes con diferentes preparaciones proteicas.

Stock ³H-carnitina 16mM: Para CPT1A se prepara un stock a 16mM: se disuelven 6,6mg de *L*-carnitina en 1964,6 μ L de etanol 95%:5% H₂O destilada (1:1). Añadir 125 μ L de L-[*metil*-³H] carnitina hidrocloreuro (~80Ci/mmol). Almacenar a -80°C. Evitar ciclos de congelación/descongelación.

10.1 Ensayo de actividad de la CPT1 en presencia de inhibidores

El malonil-CoA es un inhibidor reversible de la actividad CPT1. El stock de malonil-CoA (Sigma, M-4263) a 10mM se prepara en una solución de acetato sódico a 1mM pH 5,9 y se guarda a -20°C. Para los ensayos de inhibición por malonil-CoA, la concentración se fija a 100 μ M. Se añade el inhibidor a la muestra proteica ajustando el volumen final para 40 μ L. Se mezclan en vórtex las muestras y se preincuban 1 min y 30 segundos antes de la adición de la mezcla de reacción, ya que se ha observado que esta preincubación aumenta el nivel de inhibición¹⁹⁷. Se agita en vórtex el tubo antes de ponerlo en el baño a 30°C para el ensayo. Después se procede de la misma manera que la descrita anteriormente.

11. ENSAYO DE OXIDACIÓN DE LOS ÁCIDOS GRASOS

Para la evaluación del metabolismo de los AGs se ha empleado oleato marcado con ¹⁴C. La oxidación de oleato está controlada por la CPT1. Los ensayos de oxidación se realizan sobre células en cultivo y en ambos casos se procede de

manera análoga. La oxidación de los AGs se determina cuantificando la producción de $^{14}\text{CO}_2$ y la de los metabolitos ácidos solubles (ASP) que son principalmente intermediarios del ciclo de Krebs, acetil-CoA y palmitoilcarnitina¹⁹⁸.

Para la oxidación del oleato se han utilizado el método en *flasks* de 25cm². Este método ha sido descrito por Roduit *et al*¹⁹⁹ y utiliza *flasks* de 25cm² en los cuales el CO₂ se atrapa en un papel mojado con KOH 0,1N. Este método representa una mejora en términos de difusión o escape de CO₂ pero supone un mayor gasto de células, virus y demás reactivos usados en el experimento. La reacción se para inyectando ácido perclórico en el *flask*. Esto tiene dos consecuencias: en primer lugar detiene la oxidación al matar las células, y en segundo lugar acidifica el medio provocando la evaporación del bicarbonato radiactivo disuelto en el medio en forma de CO₂. El hecho de añadir ácido perclórico inhabilita las muestras para la determinación de proteína por el método de Bradford. Por este motivo es necesario preparar un punto extra por condición en el cual no se llevará a cabo la oxidación para realizar la determinación de proteína. Una vez parada la reacción, el sistema aún cerrado, se deja toda la noche para permitir a todo el CO₂ ser captado por el papel Whatman.

El procedimiento es el siguiente: tras la obtención de los hepatocitos de los ratones previamente tratados con los AAV-GFP y AAV-hCPT1AM como ha sido descrito en el apartado 4.2, las células se siembran en *flasks* de 25cm² y se dejan en el incubador toda la noche. Antes de empezar el experimento las células se lavan con 3mL de KRBH 0,1% BSA libre de AGs y luego se incuban 30 min con 2mL de KRBH 1% BSA libre de AGs. Transcurrido este tiempo se lavan de nuevo con 3mL de KRBH 0,1% BSA. Después, se añaden 2mL de la mezcla de reacción por *flask*. La mezcla de reacción se prepara el mismo día del ensayo y contiene KRBH con 25mM glucosa en presencia de 8mM carnitina más 3mM [1-14C] oleato unido a 1% BSA. Los blancos son *flasks* sin células. Las cantidades de cada componente por *flask* son:

Mezcla de reacción	
KRBH	1,6mL
[1- ¹⁴ C]oleato 3mM	200μL
25mM glucosa + 8mM carnitina	200μL

Tabla 9. Mezcla de la reacción para el ensayo de la oxidación de los ácidos grasos. La mezcla se prepara al momento de realizar el ensayo.

Después de poner la mezcla de reacción en cada *flask* se sellan con un tapón de goma (tamaño 14,5, Fisher, 14-126BB) que lleva un tubo de PVC de 3cm de largo (I.D. 4,7 mm, Fisher, 14-169-7B) que contiene en su interior un trozo de 2x2cm de papel Whatman mojado en KOH 0,1N. Un extremo del tubo de PVC se envuelve en *parafilm* sin cubrir el lumen de manera que el tubo quede firmemente sujeto al tapón de goma. Los *flasks* se incuban durante 3 h en un incubador sin CO₂ a 37°C. El montaje del sistema de oxidación se detalla en la figura 10.

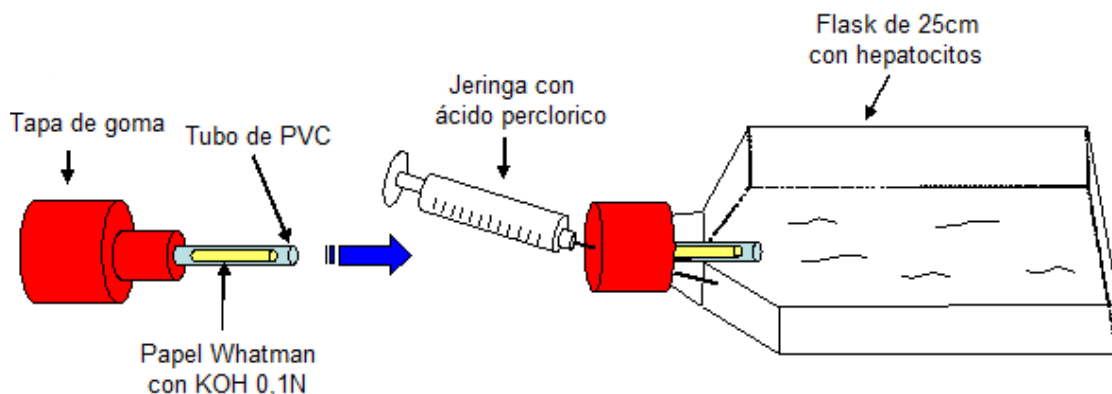


Figura 7. Sistema de oxidación en flasks de 25cm². La mezcla de oxidación de oleato se añade a cada *flask* que contienen los hepatocitos adheridos. El sistema se cierra con un tapón de goma que dispone de un tubo de PVC que lleva en su interior un papel Whatman húmedo con KOH. Los *flasks* se incuban a 37°C durante 3 h (imagen tesis Josep Maria Orellana Gavaldà).

Después de la incubación a 37°C, la reacción se para inyectando, con una jeringa a través del tapón de goma, 200μL de ácido perclórico al 40% (p/v). Se mezcla bien y se deja toda la noche a TA para que el CO₂ se capte en el papel Whatman. Al día siguiente se cogen los papeles, dejando secar un momento, y se cuentan en 5mL de líquido de centelleo. Las células utilizadas para cuantificar la proteína, con la finalidad de normalizar el ensayo, se lavan con PBS 1X y se

recogen en 500 μ L de tampón de lisis para determinar la concentración de proteína por el método de Bradford.

Los resultados se expresan de la siguiente manera:

$$\text{nmol oleato} \times \text{mg}^{-1}\text{prot} \times \text{h}^{-1} = (\text{cpm} - \text{cpm blanco}) \times 500 / (\text{cpm totales} \times \text{mg prot} \times \text{h})$$

Donde 500 son los nmoles de oleato por *flask*, las cpm totales son las cuentas resultantes de contar 200 μ L del oleato radiactivo que se pone por *flask* y h es el tiempo de incubación en horas.

11.1 Oxidación de oleato a ASP

La oxidación de oleato a CO₂ refleja la oxidación total de la molécula de ácido graso, pero también hay moléculas de ácido graso que no han sido totalmente oxidadas y quedan productos intermediarios ácidos, o productos solubles ácidos (ASP). La medición de estos productos se realiza de siguiente manera: el ácido perclórico añadido para detener la reacción precipita el exceso de oleato radiactivo unido a BSA, dejando los ASP en solución. Así se centrifuga 1mL del medio de incubación a 16.000rpm durante 10 min y se cuentan 800 μ L del sobrenadante.

Los resultados se expresan de la siguiente manera:

$$\text{nmol oleato} \times \text{mg}^{-1}\text{prot} \times \text{h}^{-1} = (\text{cpm} - \text{cpm blanco}) \times 500 \times (2.200/800) / (\text{cpm totales} \times \text{mg prot} \times \text{h}).$$

Donde 500 son los nmoles de oleato por punto en cada caso, las cpm totales son las cuentas resultantes de contar 200 μ L del oleato radiactivo que se pone por punto en cada caso, 2.200/800 es el factor de dilución en cada caso y h es el tiempo de incubación en horas.

[1-¹⁴C] oleato 3mM unido a 1% BSA

Para preparar el oleato radiactivo unido a BSA se procede de la siguiente manera:

1. Disolver 4,567mg de oleato sódico en 500 μ L de NaOH 0,1N y calentarlo a 70-80°C hasta que la solución sea transparente.
2. Añadir a esta mezcla el [1-¹⁴C] oleato (Perkin Elmer, NEC317050UC).
3. Añadir esta solución (1mL) gota a gota a la solución de 1% BSA (0,5g de BSA disuelto en 4,5mL de NaCl 0,9% a 35-40°C en baño maría) y mantener

en agitación durante 5 min. Filtrar con un filtro 0,45 μ M en campana de células, hacer alícuotas de 1mL y almacenar a -20°C.

12. CONSUMO DE OXÍGENO

Los estudios de consumo de oxígeno se realizaron en colaboración con el laboratorio del Dr. Antonio Zorzano, del Instituto de Investigaciones en Biomedicina – Barcelona. Se utilizó un oxímetro Oxygraph 2K (OROBOROS INSTRUMENTS, Innsbruck, Austria). La respiración fue evaluada en mitocondrias aisladas de hígado de ratón. Se calculó la tasa de oxígeno mediante el software del equipo (DatLab), expresándose en pmol de O₂/s x mg. Todas las medidas se han realizado en triplicado.

La suspensión de las mitocondrias (0,5mg) se introdujo en la cámara del aparato en un volumen de 2mL de MiRO5 (EGTA 0,5mM; MgCl₂.6H₂O 3mM; taurine 20mM; KH₂PO₄ 10mM; HEPES 20mM; BSA 1 g/L, K-lactobionate 60mM; sacarosa 110mM; pH 7,1) donde se había añadido previamente malato (2mM) y glutamato (10mM), y fueron mantenidas en agitación a 37°C. Tras cerrar la cámara del respirómetro y estabilizarse la señal recogida por el mismo, se añadieron diferentes sustratos e inhibidores en el siguiente orden: ADP (2,5mM), citocromo C (10 μ M), succinato (10mM), FCCP (carbonilcianida-p-trifluorometoxifenilhidrazona – concentración óptima para el flujo máximo), rotenona (5 μ M) y antimicina A (2,5 μ M). La oxidación del glutamato por parte de las mitocondrias es un indicador de la actividad del Complejo I. El malato facilita la entrada de estos sustratos al interior de la mitocondria. Tras la adición de ADP, comienza la síntesis de ATP por parte de la ATP sintasa. Si las mitocondrias se encuentran en buen estado, el valor de la respiración en este punto debe ser similar al observado al añadir citocromo c al medio. Con la adición de rotenona queda inhibido el Complejo I al bloquearse la transferencia de electrones entre la flavina y la ubiquinona. El succinato es oxidado por el Complejo II hasta la adición de antimicina A, que bloquea la transferencia de electrones entre el citocromo *b* y el citocromo *c*₁, inhibiéndose el Complejo III.

13. ANALISIS DE NIVELES DE PROTEÍNA POR WESTERN BLOT

La técnica de inmunodetección de proteínas con anticuerpos fue descrita por Burnette ²⁰⁰. Esta técnica permite detectar una proteína concreta entre una muestra de proteínas que han sido separadas por electroforesis y posteriormente transferidas a una membrana sintética mediante la aplicación de un campo eléctrico. La detección se basa en la obtención de un anticuerpo que se una de manera más específica posible a la proteína de interés. La técnica de inmunodetección, conocida como WB, incluye las siguientes etapas:

13.1 Separación electroforética en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Esta técnica permite separar las proteínas según su masa molecular a medida que éstas migran a través de una matriz de poliacrilamida.

El la separación electroforética de proteínas se utilizaron dos tipos de geles simultáneamente. El gel superior, o apilador, contiene 5% de acrilamida y un pH menor que el inferior. Esto permite a las proteínas avanzar más rápidamente que en gel inferior, o separador, que contiene 8% de acrilamida, acumulándose así en la frontera entre ambos geles y favoreciendo la migración de las proteínas en bandas finas que incrementan la resolución de la técnica.

La composición de los geles apilador y separador se muestra en la siguiente tabla:

	Gel separador	Gel apilador
H ₂ O destilada	5,9mL	3,0mL
Acrilamida/bisacrilamida 40%	2mL	0,5mL
Tris-HCl 1,87M pH 8,8	2mL	-
Tris-HCl 1,25M pH 6,8	-	0,4mL
SDS 10%	100μL	40μL
Persulfato amónico 10%	66,6μL	27,2μL
TEMED	10μL	8μL

Tabla 10. Gel separador y gel apilador. Volúmenes necesarios para la preparación de los geles del 8% que se utilizarán para la electroforesis. Los volúmenes de acrilamida/bisacrilamida y de agua pueden cambiar en caso de preparar geles con mayor o menor porcentaje de acrilamida.

En ambos casos se mezclaron primero todos los componentes excepto el persulfato amónico y el TEMED (Bio-Rad, 161-0800), que son los agentes polimerizantes y se añadieron justo antes de preparar el gel. Se utilizó acrilamida/bisacrilamida 40% (Bio-Rad, 161-0146). El persulfato amónico se preparó al 10% con H₂O destilada de manera extemporánea. Para la preparación de los geles se utilizaron los sistemas Mini-PROTEAN® II y CRITERION®, ambos de Bio-Rad.

Se prepara el gel separador y se añade la mezcla entre los cristales del aparato de electroforesis previamente lavados con etanol. Para ayudar a la formación de un frente homogéneo puede añadirse una pequeña cantidad de isopropanol. Cuando el gel separador se ha polimerizado, se quita el isopropanol y se añade el gel apilador y el peine adecuado.

Preparación de la muestra proteica:

Las muestras proteicas se prepararon para la electroforesis añadiéndoles tampón de carga para proteína 4X, hasta una concentración de 1X. Este tampón contiene SDS y β-mercaptoetanol. El primero es un detergente aniónico que desnaturaliza las proteínas, enmascarando su carga y consiguiendo que migren de manera proporcional a su masa molecular. El β-mercaptoetanol actúa como agente reductor de los puentes disulfuro, permitiendo que las proteínas que forman dímeros monomericen. La mezcla de proteínas y tampón de carga se calentó a 95°C durante 5 min. Después se centrifugan brevemente y se ponen en hielo hasta ser cargadas en el gel. Tras este paso las muestras están listas para someterse a una electroforesis aunque también pueden almacenarse a -20°C.

Tampón de carga para proteínas 4X	
Tris-HCl 1,25M pH 6,8	5mL
SDS	2g
β-mercaptoetanol	5mL
Glicerol 87%	11,6mL
Azul de bromofenol	10mg
Agua c.s.p	50mL

Tabla 11. Tampón de carga para proteínas 4x. Este tampón se almacena en alícuotas de 1mL a -20°C.

13.2 Electroforesis:

Para iniciar la electroforesis el gel se montó en la cámara correspondiente, que se llenó con tampón de electroforesis 1X hasta cubrir los pocillos del gel. Se quita el peine y se cargan las muestras y el marcador (ECL Rainbow Marker, GE Healthcare, RPN800E) de electroforesis en el gel y a continuación se aplicó una corriente eléctrica de 25 miliamperios (mA) durante el tiempo necesario para la separación de las proteínas. El marcador de peso molecular, al estar pre-teñido, permite visualizar la correcta separación de las proteínas y ayuda a la identificación de las bandas por el peso molecular. La electroforesis se para cuando el azul de bromofenol del tampón de carga está a punto de salirse del gel.

Tampón de electroforesis 10x	
Tris-HCl pH 8,8	25mM
Glicina	192mM
SDS	0,1%

Tabla 12. Tampón de electroforesis 10x. Este tampón se prepara 10 veces concentrado y se guarda a TA. En el momento de utilizarlo se lleva a concentración 1X.

13.3 Transferencia

Una vez terminada la electroforesis, las proteínas del gel separador fueron transferidas a una membrana de PVDF (HyBond-P, GE Healthcare, RPN303F), previamente activada en metanol y equilibrada en tampón de transferencia 1X. Se siguió el protocolo de los aparatos *Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell* (Bio-Rad, 162-0174) o *Criterion® Blotter With Wire Electrodes* (Bio-Rad, 170-4071), en función del sistema utilizado para la electroforesis.

Primero se separa el gel apilador del gel separador y éste último se utiliza para la transferencia. En el montaje de la transferencia se siguió el siguiente orden (desde el polo negativo al positivo): una esponja, 2 papeles Whatman, el gel separador, la membrana activada y equilibrada, 2 papeles Whatman y otra esponja. Todos estos componentes, montados en el correspondiente *sandwich*, se sumergieron en la cubeta llena de tampón de transferencia 1X. Para evitar un sobrecalentamiento del sistema durante el proceso de electrotransferencia, se colocó en la cubeta un *cassette* con H₂O destilada congelada. Durante el montaje se evitó la formación de burbujas.

La transferencia se realizó a 4°C durante 1 h a 250mA. Una vez terminada, la membrana se lavó con PBS-T (descrito a continuación) durante 5 min en agitación.

Tampón de transferencia 10X	
Tris pH 8,5	20mM
Glicina	150mM
Metanol	20%

Tabla 13. Tampón de transferencia 10X. Se prepara 10 veces concentrado y sin metanol. En el momento de usar se diluye hasta 1X y se añade el metanol.

PBS-T: Tween 0,1% en PBS 1X. Diluimos 1mL de Tween 20 en 1L de PBS 1X. Se guarda a TA.

13.4 Bloqueo de la membrana

Los sitios de unión inespecífica en la membrana fueron bloqueados por inmersión de la misma en una solución con un 5% de leche desnatada o BSA en PBS-T. La membrana se dejó sumergida en la solución de bloqueo durante 1 h en un agitador orbital a TA. En algunos casos la membrana se dejó bloqueando toda la noche a 4°C.

Tras el bloqueo la membrana se lavó secuencialmente con PBS-T de la siguiente manera: un primero lavado de 15 min y dos lavados de 5 min en el agitador orbital.

13.5 Unión al anticuerpo primario

El anticuerpo primario utilizado para la detección de la proteína CPT1A es un anticuerpo policlonal que fue producido en nuestro grupo por inyección en conejos de un péptido sintético y es específico contra los aminoácidos 317-430 de la CPT1 de hígado de rata.

La membrana se incubó en agitación toda la noche a 4°C, o 2 h a TA, con la solución de bloqueo con el anticuerpo primario a una dilución de 1:6.000. Tras la incubación con el anticuerpo primario la membrana se lavó de la misma manera que tras el bloqueo.

13.6 Unión al anticuerpo secundario

La membrana se incubó a TA con el anticuerpo secundario anti- conejo (*Goat anti-rabbit*, IgG-HRP, GE Healthcare, RPN4301) en una dilución 1:10.000 en agitación durante 1 h en una solución de bloqueo. Transcurrido el tiempo de incubación se realizaron los lavados de la misma manera que en casos anteriores. Este anticuerpo reconoce al anticuerpo primario, obtenido de conejo, y se une a él. Cuando a la membrana unida al anticuerpo secundario se le añade el sustrato ECL, el enzima peroxidasa actúa sobre él produciendo luz, que puede ser captada por el lector ImageQuant LAS 4000 mini (GE Healthcare, 28-9558-13).

Los anticuerpos primarios, así como los secundarios, y su dilución están descritos a continuación en las tablas 14 y 15, respectivamente:

Anticuerpo primario	Anticuerpo secundario	Dilución	Líquido dilución	Casa comercial/ Código
CPT1A	Anti-conejo	1:6.000	5% leche PBS-T	Producción lab
LC3B	Anti-conejo	1:1000	5% BSA PBS-T	Cell signaling/2775
SQSTM/p62	Anti-conejo	1:1000	5% BSA PBS-T	Cell signaling/5114S
PLIN2	Anti-pollo	1:200	5% leche PBS-T	Abcam/Ab37516
PLIN5	Anti-cobaia	1:2000	5% leche PBS-T	Abcam/Ab192749
ATGL	Anti-conejo	1:1000	5% leche PBS-T	Cell signaling/2138S
LDLr	Anti-conejo	1:1500	5% leche PBS-T	Abcam/Ab52818
LRP1	Anti-conejo	1:7000	5% leche PBS-T	Abcam/Ab92544
VLDLr	Anti-ratón	1:1500	5% leche PBS-T	Santa Cruz/sc-18824
TIM44	Anti-ratón	1:5000	5% leche PBS-T	BD Bioscience/612582
pAkt (Ser473)	Anti-ratón	1:1000	5% BSA PBS-T	Cell signaling/4051S
Akt	Anti-conejo	1:1000	5% leche PBS-T	Cell signaling/9272S
FAS	Anti-conejo	1:1000	5% leche PBS-T	Santa Cruz/sc-20140
UCP2	Anti-cabra	1:1000	5% BSA PBS-T	Cell signaling/89326
pHSL (Ser660)	Anti-conejo	1:1000	5% BSA PBS-T	Cell signaling/8334
HSL	Anti-conejo	1:1000	5% BSA PBS-T	Cell signaling/8334
HMGs2	Anti-conejo	1:6000	5% leche PBS-T	Producción lab

Tabla 14. Anticuerpos primarios utilizados en WB. Datos de los anticuerpos primarios utilizados en los WB.

Anticuerpo secundario	Dilución	Líquido dilución	Casa comercial/ Código
Anti-conejo	1:10.000	5% leche PBST	GE Gealthcare/NA934V
Anti-ratón	1:10.000	5% leche PBST	GE Gealthcare/NA931V
Anti-pollo	1:10.000	5% leche PBST	Abcam/ab97135
Anti-cobaya	1:10.000	5% leche PBST	Abcam/ab97155
Anti-cabra	1:10.000	5% leche PBST	Santa Cruz/sc-2020
Anti- β -Actina	1:50.000	PBST	Sigma Aldrich/A3854

Tabla 15. Anticuerpos secundarios utilizados para el WB. Datos de los anticuerpos secundarios utilizados en los WB.

13.7 Detección

La membrana se incubó durante 5 min con una mezcla 1:1 de los sustratos A y B del kit *Amersham™ ECL Select Western Blotting Detection Reagent* (GE Healthcare, RPN2235). Transcurrido este tiempo se eliminó el exceso de sustrato ECL y la membrana se puso en contacto con ImageQuant. El tiempo de exposición dependió del anticuerpo utilizado y la señal obtenida, pero al tratarse de un sustrato ECL muy potente nunca fue mayor que 3 min, con intervalos de 10 segundos a cada exposición.

14. MÉTODOS DE TRABAJO CON RNA

14.1 Extracción de RNA de tejidos

Para la obtención de RNA de tejidos de ratón se utilizaron kits comerciales. En todos los casos se siguieron las instrucciones provistas por el fabricante. Para la obtención de RNA de hígado se utilizó el kit *Illustra MiniRNA Spin* (GE Healthcare, 25-0500-71) y para la obtención de RNA de tejidos adiposos (tejido adiposo epididimal, tejido adiposo inguinal y tejido adiposo marrón) el kit *RNeasy® Lipid Tissue Mini* (QIAGEN, 74804).

Para la obtención de RNA a partir de tejido, el tejido congelado fue pulverizado en nitrógeno líquido (30-70mg) y fueron homogenizados con el tampón de lisis suministrado por el kit utilizando el sistema Polytron. Una vez

homogenizado el tejido, se siguieron las instrucciones provistas por la casa comercial.

La utilización de estos kits para la extracción de RNA asegura una eliminación eficiente del DNA contaminante en la muestra. Sin embargo, para evitar amplificaciones de DNA contaminante en experimentos posteriores, se realizó un tratamiento con DNAsa I libre de RNAsas (suministradas por cada kit) al RNA que queda adherido a la columna de sílice durante la extracción. El enzima DNAsa es una endonucleasa inespecífica que degrada DNA de cadena simple y doble, asegurando una muestra de RNA libre de DNA contaminante. El tratamiento con DNAsa I se hizo siguiendo las instrucciones facilitadas por el proveedor.

14.2 Valoración de la concentración del RNA

El RNA se cuantificó espectrofotométricamente utilizando un *NanoDrop*® (ND-1000). Este aparato permite la cuantificación del RNA utilizando únicamente 1µL de muestra. La absorbancia a 260nm permite calcular la concentración de RNA de la muestra. Una DO de 1 corresponde a aproximadamente 40 mg/mL de RNA. La relación entre las lecturas a 260 y 280 nm (DO_{260}/DO_{280}) nos sirvió para estimar la pureza del RNA en nuestra muestra, considerando óptimo un valor 260/280 de aproximadamente 2.

14.3 RT (REVERSE TRANSCRIPTASE)-PCR

La *RT-PCR* es un tipo de PCR que utiliza como molde una mezcla de DNAs complementarios a los RNAs que se expresan en las células. Este tipo de DNAs reciben el nombre de cDNAs y su obtención a partir de RNAs es la base de la técnica de *RT-PCR*.

Esta técnica consta de dos etapas. En la primera el enzima transcriptasa inversa sintetiza cDNA a partir de RNA de cadena simple. En la segunda etapa, el cDNA obtenido es amplificado por PCR. El cDNA fue obtenido utilizando en kit *Transcriptor First Strand cDNA Synthesis* (Roche, 04379012001) a partir de 400ng de RNA. Todos los reactivos necesarios para la síntesis de cDNA se suministran junto a la transcriptasa inversa (transcriptor®) en el mismo kit y se siguieron las instrucciones facilitadas por el fabricante.

14.4 PCR cuantitativa en tiempo real (*qRT-PCR*)

La *qRT-PCR* es una variante de la PCR que permite amplificar y simultáneamente cuantificar el producto de la amplificación. Esta técnica fue descrita por Higuchi y colaboradores ²⁰¹ que inicialmente la denominaron *Kinetic PCR*. La reacción de *qRT-PCR* es básicamente igual a una PCR convencional, sin embargo a la mezcla de reacción se le añade un fluoróforo y se utiliza un termociclador especial, capaz de excitar dicho fluoróforo y detectar la fluorescencia emitida por él. Esto permite medir la tasa de generación del producto de DNA después de cada ciclo de amplificación, motivo por el que recibe el nombre de PCR en tiempo real.

GEN	FOR	REV
ABCA1	GCAGATCAAGCATCCCAACT	CCAGAGAATGTTTCATTGT
ACC1	TGGATCCGCTTACAGAGAGACT	GCCGGAGCATCTCATTTCG
ACC2:	CCAGTCTTCCGTGCCTTTGTAC	CTCATCCCTCGCTCTGAACG
ATGL	TGACCATCTGCCTTCCAGA	TGTGGTGGCGCAAGACA
ATG7	CCGGTGGCTTCTACTGTTA	AAGGCAGCGTTGATGACC
β-actina:	ATGCTCCCCGGGCTGTAT	CATGGAGTCCTTCTGACCCAT
DGAT2:	GCACAGAGGCCACAGAAGTG	CCCTCAACACAGGCATCG
G6Pase:	AGGAAGGATGGAGGAAGGAA	TGGAACCAGATGGGAAAGAG
GLUT2	CTATGACGTCAATGGCACAGA	AGAGCAGTGCAGACACTGCA
HSL	GCGCTGGAGGAGTGTTTTT	CGCTCTCCAGTTGAACCAAG
LC3B	CCAGGTTGCCTGCAGAGG	AACACCAGACCTGCTTGGG
MGL	TGAGAAAGGCTTTAAGAACTGGG	GACCACCTGTGTGATGTGGG
MTP:	GTGGAGGAATCCTGATGGTGA	TGATCTTGGTGTACTTTTGCCC
PDK4:	TTTCTCGTCTCTACGCCAAG	GATACACCAGTCATCAGCTTCG
PEPCK:	GTCAACACCGACCTCCCTTA	CCCTGCCTGTTCTCTGTGC
p62	GAAGCTGCCCTATACCCACA	TGGGAGAGGGACTCAATCAG
PLIN2	GAGTCCCCTGTGTTGAGCA	CCAGGACAGTCTGGCATGT
PLIN5	TGTGTGTGTGTGACTACCTGTGC	GGCAAGATCATTCACTGTGG
SCD1:	TTCTTGCGATACACTCTGGTGC	CGGGATTGAATGTTCTTGTGCGT

Tabla 16. Secuencias de los cebadores. Se muestran las secuencias “forward” y “reverse” en dirección 5'- 3' de los cebadores utilizados para la PCR a tiempo real. *h*=human

Se utilizó el kit *SYBR Green PCR Master Mix Reagent* (Life Technologies, 4360706) y el instrumento *LightCycler® 480* (ROCHE) utilizando 2,5 ng/μL de cDNA por muestra.

14.5 Análisis de los datos

La cuantificación de la expresión génica utilizando *qRT-PCR* puede hacerse de dos maneras, en términos absolutos o relativos. En el primer caso, la cuantificación se expresa en valor absoluto y se basa en la obtención de una curva de calibrado con diferentes concentraciones de DNA conocidas. Durante esta Tesis se ha realizado únicamente el segundo tipo de análisis, cuantificación relativa, que se basa en la comparación entre el nivel de expresión de un gen problema y un gen normalizador o de referencia, que mantiene una expresión estable en todas las muestras. El gen de referencia elegido en todos los experimentos fue el gen de la β -actina, que mantiene una expresión ubicua y constitutiva en nuestro modelo de estudio.

Para la realización de los análisis de cuantificación relativa se utilizó el *software E-Method*, incluido en el termociclador *LightCycler® 480* (Roche).

15. ANÁLISIS HISTOLÓGICOS

El objetivo del estudio histológico fue analizar la morfología y anatomía microscópica del hígado. Para ello se realizaron tinciones con hematoxilina-eosina. Esta tinción se basa en la utilización del colorante hematoxilina, que al ser básico tiñe estructuras ácidas (núcleo) en tonos azules, y el colorante eosina, que tiñe componentes básicos del tejido (citoplasma y glóbulos rojos) en color rosa. Esta es una de las técnicas más utilizadas en histología y permite visualizar diferencias morfológicas y anatómicas en la mayoría de tejidos.

El procesamiento del tejido y la tinción de los cortes con hematoxilina-eosina (H-E) se realizaron en el Servicio de Anatomía Patológica (SAP) del Hospital Clínic de Barcelona. Las imágenes de las muestras procesadas se tomaron con el microscopio Leica CTR4000 del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Farmacia (UB).

El primer paso consistió en la disección de pequeños fragmentos de tejido que fueron sumergidos en una solución de formalina 10% (Sigma, HT5014) durante 24 horas. Estos fragmentos fueron procesados por el personal del SAP utilizando un procedimiento que incluyó los pasos de deshidratación de las muestras y las tinciones.

16. MÉTODOS BIOINFORMÁTICOS

Durante la realización de esta Tesis Doctoral se utilizaron diferentes bases de datos y herramientas bioinformáticas disponibles *online*. A continuación se detallan las más utilizadas:

Universal ProbeLibrary: Programa de Roche que permite diseñar ensayos de qPCR en tiempo real en cuestión de segundos y analizar más de cinco millones de transcripciones de prácticamente cualquier organismo secuenciado. www.lifescience.roche.com/shop/en/us/overviews/brand/universal-probe-library

NCBI: *National Centre for Biotechnology Information*. Portal estadounidense que agrupa bases de datos de proteínas y nucleótidos y herramientas bioinformáticas para el alineamiento de secuencias. Es de acceso público. www.ncbi.nlm.nih.gov.

ENSEMBL: Base de datos utilizada para la obtención de secuencias de DNA. Pertenece al EBI. www.ensembl.org/index.html.

BLAST: Programa de búsqueda de alineamiento local básico (BLAST) (Altschul, Madden *et al.*, 1997) utilizado para la búsqueda de homologías entre secuencias. Este programa compara secuencias de nucleótidos o proteínas con secuencias presentes en la base de datos y calcula las equivalencias estadísticamente significativas. www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/.

17. MÉTODOS ESTADÍSTICOS

Los datos se expresan como la media \pm SEM. La comparación de los resultados se realizó utilizando el test estadístico de la *t-Student* y ANOVA. Para todos los análisis estadísticos y representación de las gráficas se utilizaron los programas Excel de *Microsoft* y *GraphPad Prism 6*.

Capítulo 4. RESULTADOS

En estudios previos, nuestro grupo había clonado el cDNA de la CPT1A humana y el de la forma mutante, hCPT1AM, en el plásmido PYES para poder expresar ambas proteínas en levaduras y poder analizar así su sensibilidad al malonil-CoA. Con dichos estudios se observó que la forma hCPT1AM era insensible al malonil-CoA²⁰². El cDNA de la hCPT1AM fue el utilizado para la obtención de los AAV-hCPT1AM utilizados en este trabajo.

1. EFECTO DE LA SOBREEXPRESIÓN DE hCPT1AM EN HÍGADO DE RATONES ALIMENTADOS CON DIETA NORMAL

En experimentos previos de nuestro grupo¹⁶⁵ vimos que la sobreexpresión de AAV-CPT1AM de rata era capaz de evitar que los animales tratados con dieta grasa se volvieran obesos y resistentes a insulina. En este trabajo hicimos una primera prueba utilizando la misma dosis del AAV en dieta control para comprobar la capacidad infectiva de estos nuevos virus con la forma humana antes de utilizarlo en animales obesos que conllevarían un tiempo y coste más elevado. Para ello se inyectaron por la vena de la cola (como descrito en el apartado 3.2 de materiales y métodos) los AAV-GFP y los AAV-hCPT1AM con una carga vírica de $7,5 \times 10^{12}$ gc/kg a ratones de 8 semanas de edad de unos 20g de peso aproximadamente y alimentados con dieta control (figura 1). Después de 5 semanas de la administración de los virus se analizaron los niveles de proteína y actividad de la CPT1A en el hígado de los animales tratados después de un ayuno durante toda la noche (16 h)

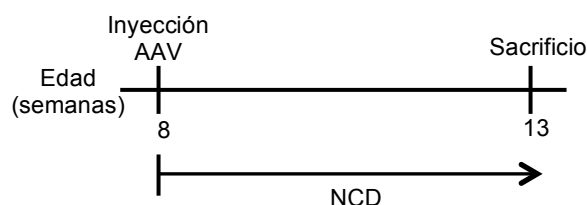


Figura 1. Diagrama del diseño experimental realizado con ratones C57BL/6. Se indica la edad de la administración de AAV-GFP y AAV-hCPT1AM y del sacrificio de los animales. NCD: *Normal Chow Diet*.

1.1 Análisis de los niveles de la proteína CPT1A

Tras 5 semanas de inyección de los AAVs se analizó los niveles de proteína de CPT1A sobreexpresadas en fracciones enriquecidas con mitocondrias de hígado mediante WB (figura 2A). Para la detección y posterior cuantificación se emplearon anticuerpos contra la CPT1A de rata que reconocen la isoforma humana previamente obtenidos en nuestro laboratorio.

Como se observa en la figura 2B los niveles de proteína CPT1A aumentan 2,35 veces respecto a los niveles de los animales tratados con el virus AAV-GFP.

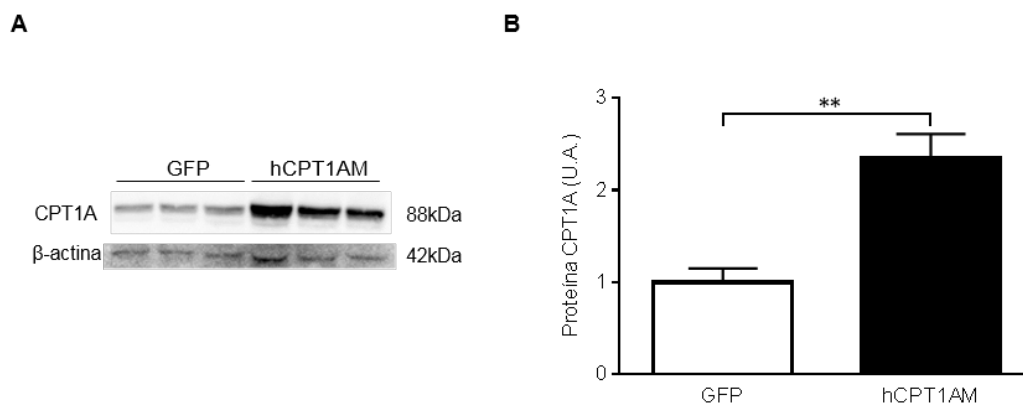


Figura 2. Análisis de los niveles de proteína de CPT1A por WB. A) WB representativo de fracciones enriquecidas con mitocondrias (20ug) de hígado de ratones infectados con el virus AAV-GFP y AAV-hCPT1AM. **B)** Cuantificación (U.A.) del WB. n=6. **P \leq 0,01. Se normaliza tomando el valor de 1 en los animales infectados con los virus AAV-GFP.

Se examinó el peso de los animales 5 semanas después de infectados con los virus AAV-GFP y AAV-hCPT1AM. Como se observa en la figura 3 no se observaron cambios significativos en el peso de los animales después de la administración del virus.

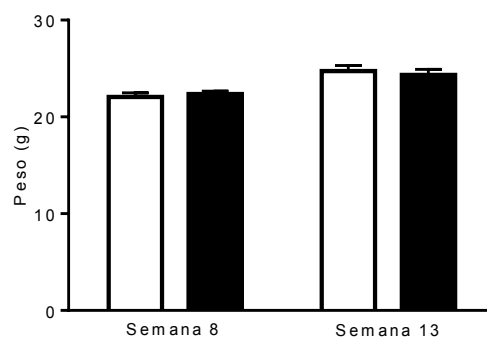


Figura 3. Análisis del peso de los ratones. Los ratones fueron pesados antes de la inyección de los AAVs y en el día del sacrificio.

1.2 Análisis de los niveles de la actividad de CPT1

Una vez comprobado el incremento de mRNA y proteína, se verificó si ello conducía a un incremento de la actividad de CPT1. Para esto, mediante el método radiométrico descrito en el apartado 10 de materiales y métodos, se determinaron la actividad CPT1 de extractos enriquecidos de mitocondrias obtenidos del hígado de los animales tratados con los AAVs.

Tal como muestra la figura 4 la actividad CPT1 aumentó 1,4 veces en los ratones tratados con los virus AAV-hCPT1AM respecto a los ratones tratados con el virus AAV-GFP.

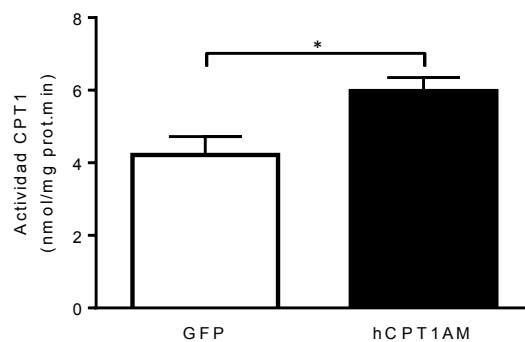


Figura 4. Análisis de los niveles de la actividad de CPT1. Actividad CPT1 (nmol/mg prot.min) en fracciones mitocondriales (20ug) de hígado de ratones infectados con los virus AAV-GFP y AAV-hCPT1AM. n=6. *P≤0,05.

2. EFECTO DE LA SOBREEXPRESIÓN DE hCPT1AM EN HÍGADO DE RATONES ALIMENTADOS CON DIETA GRASA Y DIETA CONTROL

Se ha descrito que animales alimentados con una dieta rica en grasa durante un tiempo aproximado de 12 semanas presentan desordenes metabólicos y acaban desarrollando hiperglucemia, hiperinsulinemia y obesidad. Después de comprobar la efectividad de los virus nos propusimos mirar si una sobreexpresión en hígado de la forma humana insensible al malonil-CoA de CPT1A (hCPT1AM) en animales tratados con dieta grasa sería capaz de revertir este fenotipo, para ello se realizó el siguiente experimento.

Se partió de 2 grupos de 20 ratones, un grupo de 20 ratones se alimentaron con una dieta control NCD (*Normal Chow Diet*) (*International Products Supplies Limited*, TestDiet D8Y2, 10% kcal de grasa, 18,3% proteína y 71,4% carbohidratos) y el otro grupo de 20 ratones se alimentaron con una dieta

grasa HFD (*High Fat Diet*) (TestDiet D8Y1, 60% kcal de grasa, 18,3% proteína y 20,1% carbohidratos). Dentro de cada grupo se separaron los animales en grupos de 10 ratones, que fueron tratados con el virus AAV-GFP como grupo control y el otro grupo de 10 ratones, que fueron tratados con el virus AAV9-hCPT1AM. Las dietas se administraron a partir de la semana 8 de edad y los virus se inyectaron a la semana 16 de edad (figura 5). Los virus se inyectaron en una dosis correspondiente a $7,5 \times 10^{12}$ gc/kg. Durante todo el experimento se siguieron administrando a cada grupo su dieta correspondiente, y se sacrificaron los animales 9 semanas después de la administración vírica, que corresponde a la semana 25 de edad y se obtuvieron los extractos mitocondriales del hígado, el suero y varios tejidos para su posterior análisis.

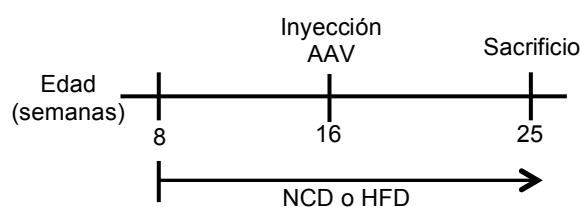


Figura 5. Diagrama del diseño experimental con ratones C57BL/6 obesos. Se especifica la edad de comienzo y administración de la dieta correspondiente (NCD: *Normal Chow Diet*. HFD: *High Fat Diet*), la edad de inyección de los virus AAV-GFP y AAV-hCPT1AM por la vena de la cola y la edad de sacrificio de los animales.

2.1 Desarrollo del fenotipo obeso

Antes de administrar los AAVs correspondientes a cada grupo de animales comprobamos que la dieta DIO había desarrollado un fenotipo obeso y diabético. Para ello, se midió el peso y la glucosa antes de poner los animales a dieta y después de 7 semanas de dieta se midió la glucosa y la insulina. El peso se midió cada semana.

En la figura 6A y B se muestra las medidas de peso y glucosa realizadas a las 8 y 15 semanas de edad cuando los animales tenían 0 y 7 semanas de dieta. Se observa un aumento, en los animales alimentados con dieta grasa, de 20,62% y 16,26% veces en el peso y glucosa, respectivamente, comparado con los animales que ingerían dieta control. En la figura 6C se ve un aumento de 2,34 veces en los niveles de insulina de los animales tratados con dieta grasa respecto a los de dieta control. La insulina ha sido medida en suero tal y como se ha descrito en el

apartado 6.1 de materiales y métodos cuando los animales tenían 15 semanas de edad y 7 de dieta.

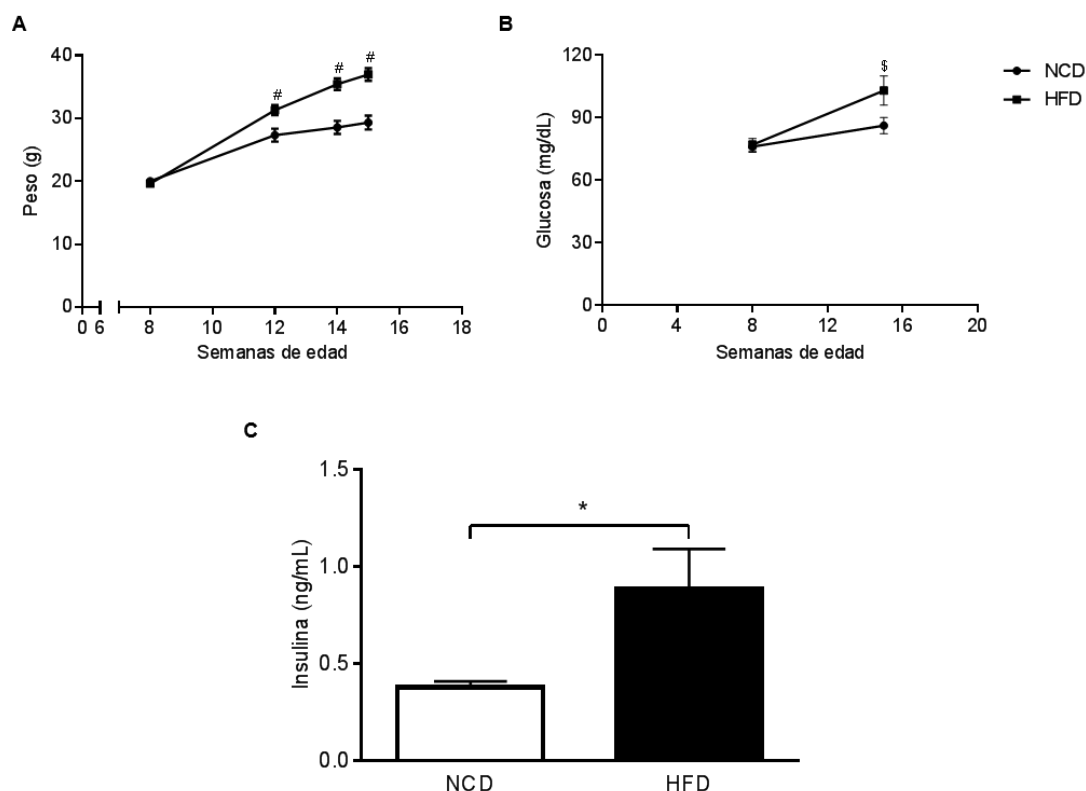


Figura 6. Análisis del peso y de los niveles de glucosa e insulina. A) Peso de los animales a las 8, 12, 14 y 15 semanas de edad. **B)** Niveles de glucosa en suero (mg/dL) a las 8 y 15 semanas de edad. **C)** Niveles de insulina en suero (ng/mL) a las 15 semanas de edad y 7 semanas de dieta. n=20. *P≤0,05. \$P≤0,01. #P≤0,001. NCD: Normal Chow Diet. HFD: High Fat Diet.

Tras confirmar el fenotipo obeso, con 8 semanas de dieta se dividieron los animales en 4 grupos, los cuales fueron inyectados con los virus correspondientes, y se monitorizó el peso de los animales cada semana:

- 1) Grupo dieta control: NCD-GFP
- 2) Grupo dieta control: NCD-hCPT1AM
- 3) Grupo dieta grasa: HFD-GFP
- 4) Grupo dieta grasa: HFD-hCPT1AM

2.2 Test de tolerancia a glucosa (GTT)

Tras 5 semanas de la infección vírica se realizó un test de tolerancia a glucosa (GTT) para comprobar la respuesta de los animales tratados frente a un aumento de glucosa en sangre mediante la administración de una solución de

glucosa 1,5g/kg intraperitoneal (i.p.) en ayunas. En el GTT (figura 7A) se observa que, entre los animales que ingerían dieta control no existen diferencias significativas.

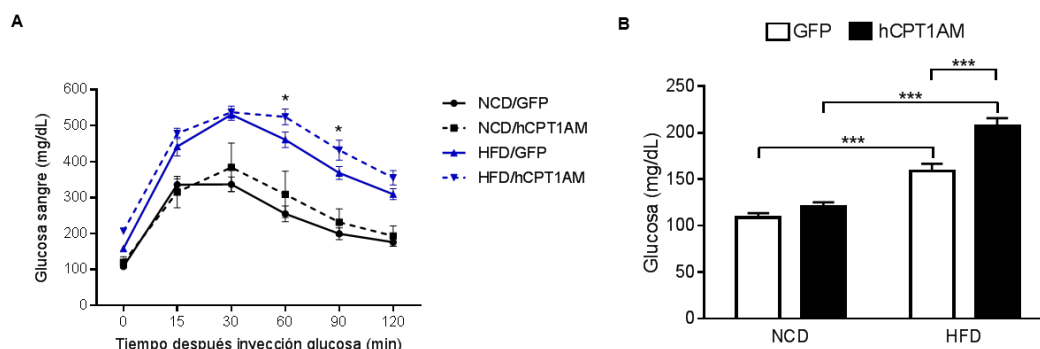


Figura 7. Test de tolerancia a la glucosa (GTT). A) En animales en ayuno durante 16 h se administró 1,5g/kg de glucosa i.p. y se analizaron los niveles de glucosa en sangre a los 15, 30, 60, 90 y 120 min. B) Niveles de glucosa a tiempo cero. n=6-10. *P<0,05. ***P<0,001. NCD: *Normal Chow Diet* y HFD: *High Fat Diet*.

Cuando se analizan los datos del GTT en los animales alimentados con dieta grasa contrariamente a lo esperado, se observa que los animales del grupo HFD-hCPT1AM muestran unos niveles de glucosa en sangre significativamente más elevados a los 60 y 90 min después de la inyección de glucosa i.p., comparado con los animales HFD-GFP. En la figura 7B se observa también que los niveles de glucosa a tiempo cero presentan un incremento significativo de 1,3 veces en los animales HFD-hCPT1AM respecto a los animales HFD-GFP. Este resultado sugiere que la sobreexpresión de hCPT1AM en los animales con dieta grasa produce, contrariamente al efecto deseado un aumento de glucosa.

A la vez se evaluaron los niveles séricos de insulina y se observó, tal como muestra la figura 8, que los animales HFD-hCPT1AM presentaban un aumento significativo de 1,86 veces en los niveles de insulina comparados con los animales HFD-GFP. En este caso también el resultado fue totalmente inesperado. Sugiriendo que la sobreexpresión de CPT1A no producía ningún beneficio.

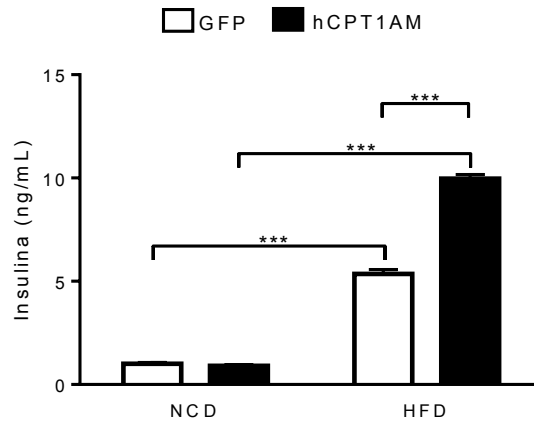


Figura 8. Análisis de los niveles de insulina en suero. Niveles de insulina en suero de animales ayunados 16 h tras 5 semanas de inyección de los AAV. n=6-10. ***P≤0,001. NCD: *Normal Chow Diet* y HFD: *High Fat Diet*.

2.3 Medición del consumo de oxígeno mediante calorimetría indirecta

Cuando los animales llevaban 7 semanas tras la inyección de los AAVs se realizó un ensayo en cajas metabólicas para verificar el consumo de oxígeno de estos animales. Las pruebas fueron realizadas solamente a animales tratados con dieta control (NCD-GFP y NCD-hCPT1AM), porque los animales tratados con dieta grasa habían perdido mucho peso durante el experimento en las cajas metabólicas debido a que no pudieron tener acceso libre a la comida por problemas de tamaño.

Como observamos en la figura 9A y B los animales consumen la misma cantidad de oxígeno. Los demás datos analizados como el gasto energético, relación de CO₂ producido/O₂ consumido y tasa de actividad no mostraron cambios significativos.

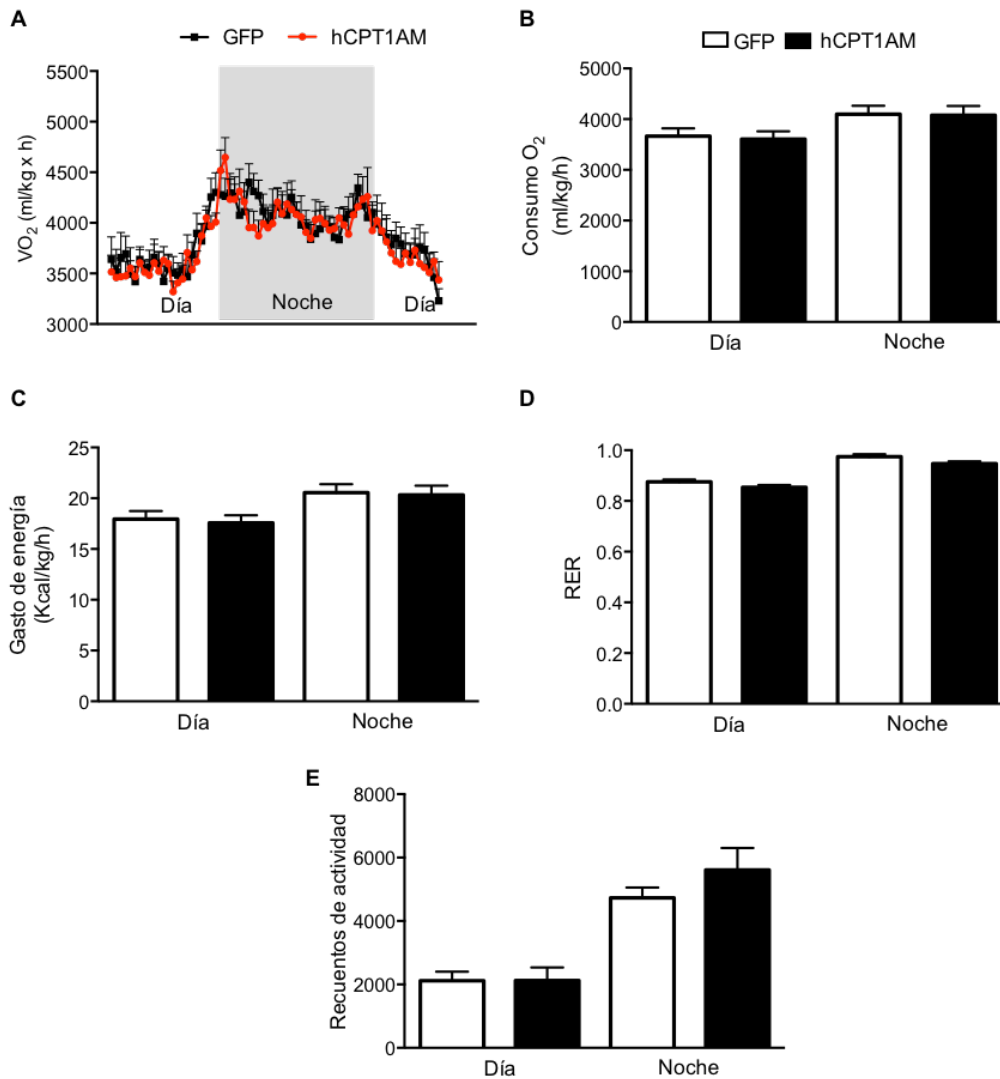


Figura 9: Consumo de oxígeno y gasto energético. A y B) consumo de oxígeno por los ratones alimentados con dieta control y tratados con virus GFP y hCPT1AM. **C)** Gasto de energía. **D)** Relación entre la cantidad de CO₂ producido y O₂ consumido (RER). **E)** Recuentos de actividad de los animales. n=6.

Se analizó también la tasa de oxidación de la glucosa durante la fase diurna y la fase nocturna (figura 10A y B) y no se observaron diferencias entre los grupos. Tampoco se observaron cambios en la oxidación de lípidos (figura 10C y D). Solo se observó un aumento de 1,34 veces en la suma de la oxidación de lípidos durante la fase diurna en los animales tratados con hCPT1AM (figura 10E). La suma de oxidación diurna de glucosa no se vio alterada.

Estos datos sugieren que hay una tendencia a oxidar menos glucosa y más lípidos en la fase diurna en los que sobreexpresan hCPT1AM, pero este suave aumento no afecta al consumo de oxígeno, ni al gasto energético.

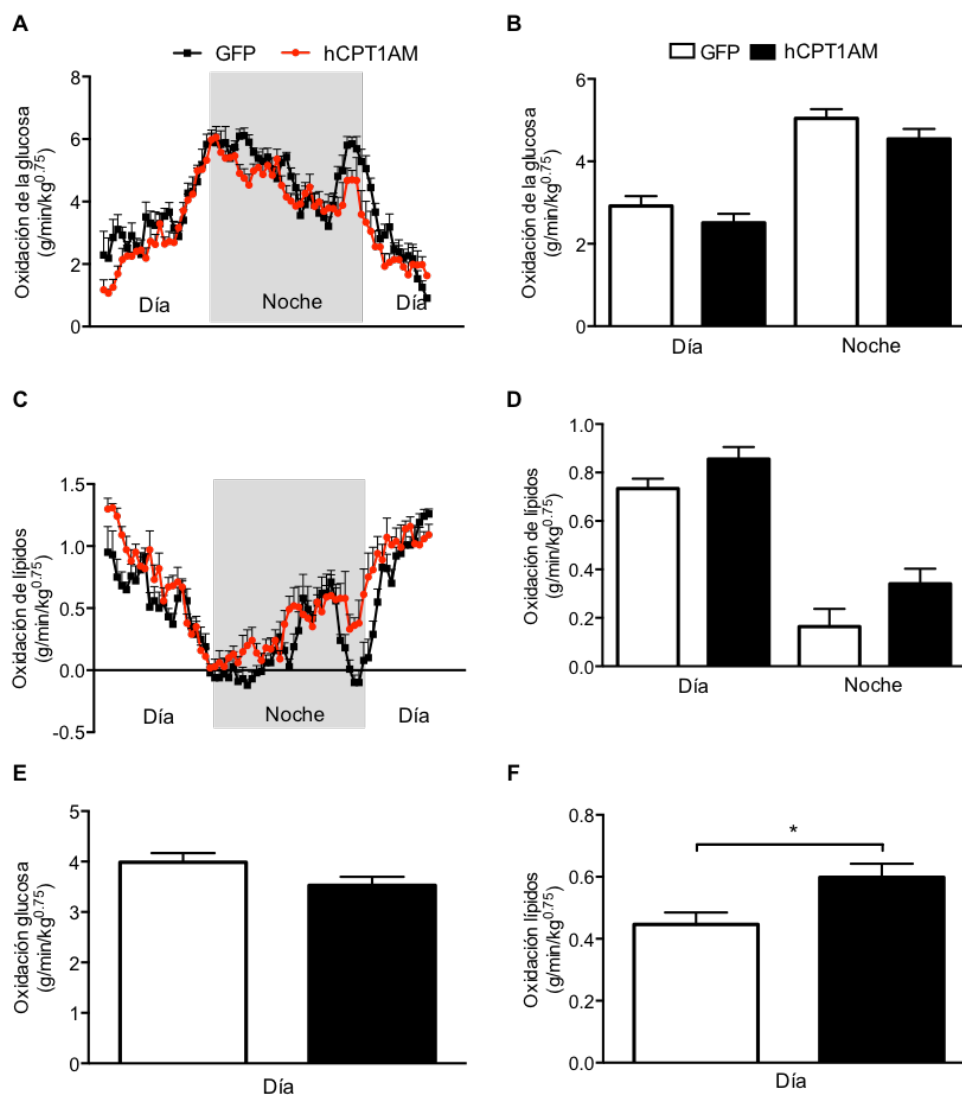


Figura 10: Oxidación de glucosa y lípidos. A y B) Oxidación de glucosa en los ratones alimentados con dieta control y tratados con virus GFP y hCPT1AM. **C y D)** Oxidación de lípidos en los ratones alimentados con dieta control y tratados con virus GFP y hCPT1AM. **E)** Suma de la oxidación de la glucosa diurna. **F)** Suma de la oxidación de lípidos diurna. n=6. *P<0,05.

2.4 Efecto de la sobreexpresión de hCPT1AM en el peso y la glucosa

Se examinó la evolución del peso de los ratones infectados con los virus AAV- GFP y AAV-hCPT1AM hasta las 23 semanas de edad, lo que corresponde a 7 semanas después de la administración de los virus. Tal y como se observa en la figura 11 no se observaron cambios ni en los grupos tratados con dieta grasa ni en los grupos con dieta control. El análisis de glucosa se llevó a cabo tras 6 h de ayuno justo antes del sacrificio de los animales tras 9 semanas de la administración de los virus. Los animales alimentados con dieta control y tratados con los AAV-hCPT1AM presentan un incremento de 1,23 veces en los niveles de

glucosa respecto a los animales NCD-GFP. Sin embargo no se observaron diferencias significativas entre los dos grupos GFP y hCPT1AM alimentados con dieta grasa.

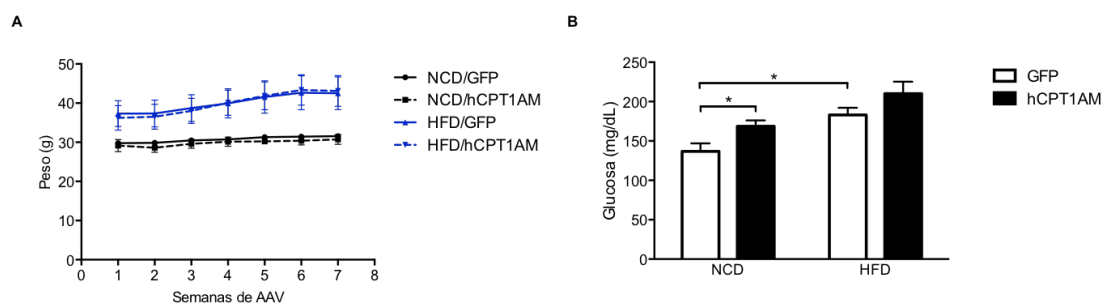


Figura 11. Análisis del incremento de peso y glucosa en los ratones que sobreexpresan la hCPT1AM y GFP. A) Los ratones han sido pesados una vez por semana después de la inyección de los virus. **B)** Niveles de glucosa en suero con 6 hs de ayuno. n=6-8. * $P \leq 0,05$. NCD: *Normal Chow Diet* y HFD: *High Fat Diet*.

2.5 Análisis de los niveles de proteína y actividad de CPT1

Tras el sacrificio se analizó los niveles de proteína y la actividad CPT1 del hígado. Se analizaron por WB (figura 12A) y se cuantificaron (figura 12B) los niveles de sobreexpresión de proteína CPT1A en los ratones tratados con el virus AAV-hCPT1AM tanto en los grupos alimentados con dieta control como los grupos alimentados con dieta grasa. Los resultados obtenidos muestran que tanto en los animales con dieta control como en los animales con dieta grasa los niveles de proteína aumentan respecto a los de sus controles GFP en 2,18 y 6,22 veces respectivamente.

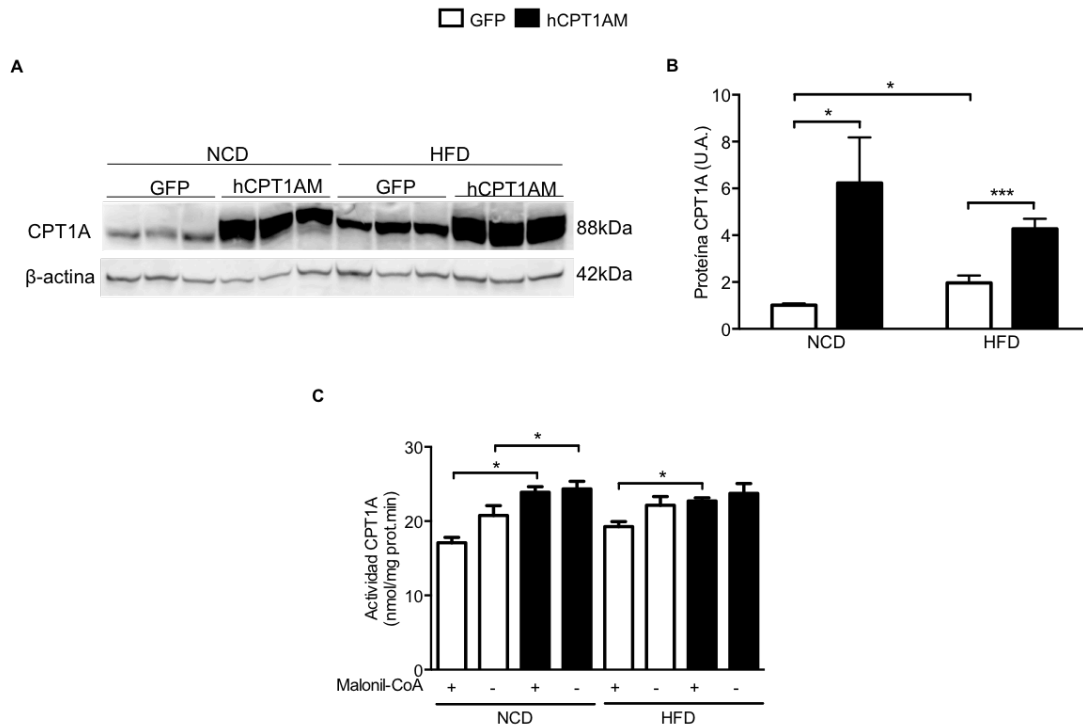


Figura 12. Análisis de los niveles de proteína y actividad CPT1. **A)** WB representativo de las fracciones enriquecidas con mitocondrias (8 μ g) de hígado de ratones infectados con el virus AAV-GFP y AAV-hCPT1AM y alimentados con dieta control y dieta grasa. **B)** Cuantificación (U.A.) del WB. **C)** Actividad CPT1 expresada en actividad específica en las fracciones enriquecidas con mitocondrias de hígado (20 μ g) tratadas con una concentración de 100 μ M de malonil-CoA. El ensayo se realizó por duplicado. n=6-8. *P \leq 0,05. ***P \leq 0,001. NCD: *Normal Chow Diet* y HFD: *High Fat Diet*. Se normaliza tomando el valor de 1 en los animales infectados con los virus AAV-GFP y alimentados con la dieta control.

A continuación se analizaron los niveles de actividad CPT1 en fracciones enriquecidas de mitocondrias obtenidas de hígado de los ratones tratados. En estudios previos de nuestro grupo se había demostrado que la actividad de la isoforma CPT1AM no se inhibe por malonil-CoA en diferentes tipos celulares¹⁶⁰. Para evaluar si los ratones infectados con los virus que contenían la isoforma mutada de hCPT1A (hCPT1AM) era también insensible al malonil-CoA, se analizó la capacidad de inhibición del malonil-CoA sobre la actividad CPT1.

Tal como se observa en la figura 12C la actividad CPT1 de los grupos alimentados con dieta control aumenta 1,4 veces entre los extractos mitocondriales incubados con malonil-CoA que provienen de los animales NCD-hCPT1AM y los que provienen de los animales NCD-GFP. También se observa un incremento de 1,17 veces en la actividad CPT1 en los animales con dieta grasa

tratados con AAV-hCPT1AM y sus respectivos controles GFP. Como era de esperar no se observan cambios de actividad CPT1 en presencia o ausencia de malonil-CoA en los extractos mitocondriales de los animales que sobreexpresan hCPT1AM ya sean alimentados con dieta grasa como con dieta control, indicando que la isoforma hCPT1AM es insensible a los niveles de malonil-CoA celular y por tanto permanentemente activa.

2.6 Análisis de los niveles de oxidación de los ácidos grasos

Se analizó los niveles de oxidación de los AGs en cultivos primarios de hepatocitos obtenidos de los ratones tratados con AAV-GFP y AAV-hCPT1AM con dieta control y con dieta grasa. El oleato fue el sustrato utilizado para analizar la oxidación a CO₂ y la formación de compuestos ácidos solubles (ASP) tal como se ha descrito en el apartado 11 de materiales y métodos.

Los hepatocitos de los animales alimentados con dieta grasa y tratados con los virus AAV-GFP muestran un incremento significativo de 1,89 veces en los niveles de CO₂ respecto a los hepatocitos de los animales tratados con los virus AAV-GFP y alimentados con dieta control (figura 13A). Los hepatocitos de los animales tratados con los virus AAV-hCPT1AM y alimentados con dieta grasa muestran un aumento de 1,93 veces en los niveles de CO₂ respecto a los hepatocitos de los animales tratados con el virus AAV-GFP y alimentados con dieta grasa (figura 13A). No pudimos obtener datos de los hepatocitos del grupo NCD-hCPT1AM debido a su deterioro posterior a su obtención. A continuación se analizó la formación de ASPs. En los hepatocitos de los animales alimentados con dieta grasa y tratados con los virus AAV-hCPT1AM se detectó un aumento de 1,71 veces respecto a los hepatocitos de los animales que expresan la GFP (figura 13B). La formación de ASPs en los animales tratados con AAV-GFP y alimentados con dieta grasa se encuentra incrementada 2,3 veces respecto a los hepatocitos alimentados con dieta control (figura 13B).

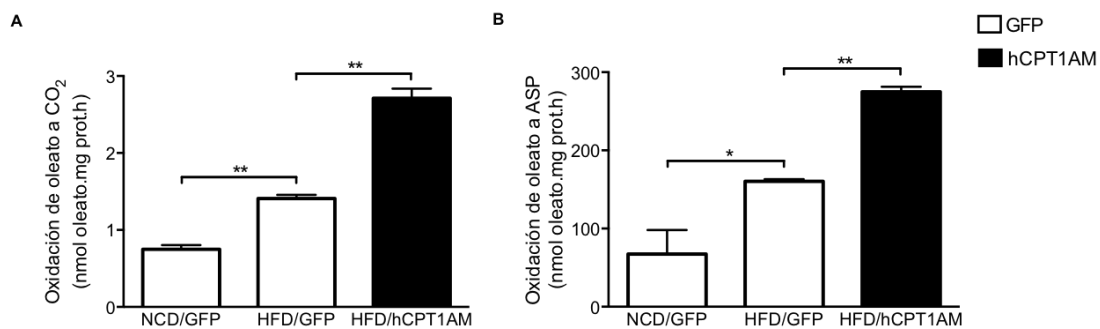


Figura 13. Análisis de los niveles de oxidación del oleato en cultivos primarios de hepatocitos que sobreexpresan hCPT1AM y GFP. A) Ensayo de oxidación de oleato a CO₂. **B)** Ensayo de oxidación de oleato a ASP. n=3. El ensayo se ha realizado por triplicado. *P≤0,05. **P≤0,001. NCD: *Normal Chow Diet* y HFD: *High Fat Diet*.

En conjunto los resultados mostraron un aumento importante en los niveles de proteína hCPT1AM acompañados de un aumento de FAO en el hígado de los ratones control y obesos. Pero, contrariamente a lo esperado, también se observó un aumento de los niveles de glucosa en sangre y de insulina especialmente en los animales con dieta grasa. Ello nos llevó a pensar que quizás la dosis utilizada no fuera la apropiada para la reversión de la obesidad.

3. ANÁLISIS DE DOSIS DE AAVS

Se partió de 30 animales que fueron tratados con una dieta control y una dieta grasa hasta presentar el fenotipo obeso conforme se ha descrito en el apartado 2 de este capítulo. En la figura 14 se muestra un esquema del diseño experimental.

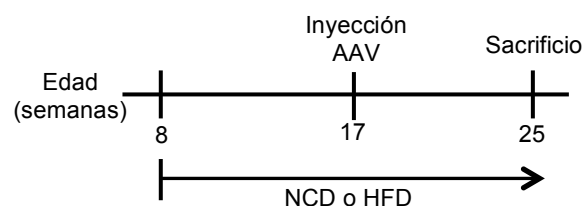


Figura 14. Diagrama del diseño experimental con ratones C57BL/6 control y obesos. Se especifica la edad en semanas de comienzo y administración de la dieta correspondiente (NCD: *Normal Chow Diet*. HFD: *High Fat Diet*), la edad de inyección de los virus AAV-GFP y AAV-hCPT1AM por la vena de la cola y la edad de sacrificio de los animales.

Tras 8 semanas de dieta y 17 semanas de edad comprobamos el fenotipo obeso y observamos que los animales tratados con dieta grasa presentaban un

incremento significativo del peso de 1,23 veces respecto los animales tratados con dieta control (Figura 15A). En la figura 15B verificamos que los animales tratados con la dieta grasa presentaban un incremento en los niveles de glucosa de 1,6 veces respecto a los animales tratados con la dieta control.

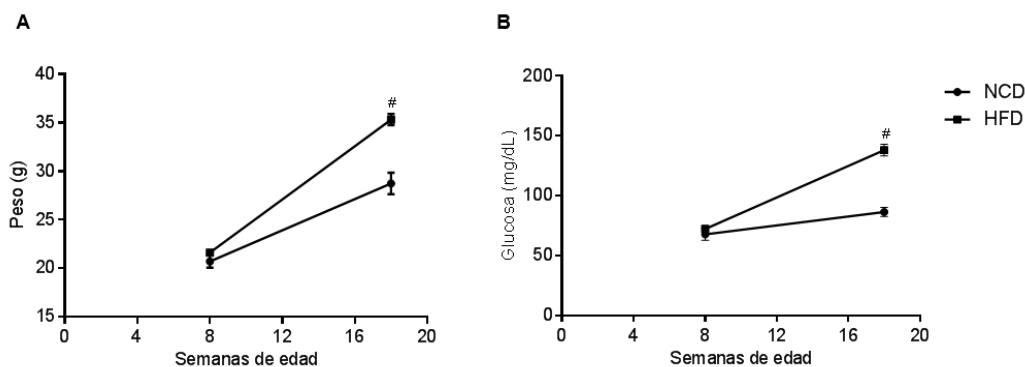


Figura 15. Análisis del peso y glucosa. A) Análisis del peso de los animales tratados con dieta control y grasa. Peso a las 8 y 17 semanas de dieta. **B)** Glucosa en sangre de los animales tratados con dieta control y grasa. Glucosa a las 8 y 17 semanas de dieta. n=30. *P≤0,05. \$P≤0,01. #P≤0,001. NCD: *Normal Chow Diet* y HFD: *High Fat Diet*.

A la semana 10 de la dieta se inyectaron 4 dosis distintas de AAVs:

- 1) Grupo dieta NCD con AAV-GFP $1,5 \times 10^{12}$ gc/kg de peso
- 2) Grupo dieta HFD con AAV-GFP $1,5 \times 10^{12}$ gc/kg de peso
- 3) Grupo dieta HFD con AAV-hCPT1AM $1,5 \times 10^{12}$ gc/kg de peso =D1
- 4) Grupo dieta HFD con AAV-hCPT1AM $7,5 \times 10^{11}$ gc/kg de peso =D2
- 5) Grupo dieta HFD con AAV-hCPT1AM $1,5 \times 10^{11}$ gc/kg de peso =D3
- 6) Grupo dieta HFD con AAV-hCPT1AM $7,5 \times 10^{10}$ gc/kg de peso =D4

3.1 Test de tolerancia a la glucosa (GTT)

Tras 4 semanas de la infección vírica se realizó un test de tolerancia a la glucosa (GTT) para comprobar la respuesta de los animales tratados a un aumento de glucosa en sangre mediante la administración de una solución de glucosa 1,5g/kg i.p. en ayunas. Sólo se observó una pequeña mejora no significativa en los animales tratados con la dosis HFD-hCPT1AM $1,5 \times 10^{12}$ gc/kg respecto a los animales tratados con HFD-GFP $1,5 \times 10^{12}$ gc/kg (figura 16).

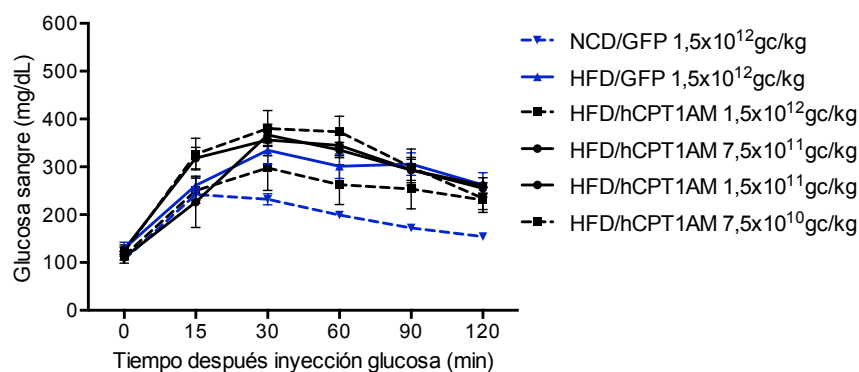


Figura 16. Test de tolerancia a glucosa (GTT). A) En animales en ayuno durante 16 h se administró 1,5g/kg de glucosa i.p. y se analizaron los niveles de glucosa en sangre a los 15, 30, 60, 90 y 120 min. n=5. NCD: *Normal Chow Diet* y HFD: *High Fat Diet*.

Tras 8 semanas con la administración vírica y 18 semanas de dieta se sacrificaron los animales para analizar los efectos de las distintas dosis administradas.

3.2 Análisis de la sobreexpresión en los niveles de proteína CPT1A

Para comprobar cuál de las dosis era capaz de expresar proteína hCPT1AM se analizaron por WB las fracciones mitocondriales obtenidas de los hígados (figura 17A).

La cuantificación de los niveles de proteína muestra en la figura 17B, donde observamos que los niveles de proteína CPT1A aumentan 1,72 y 1,80 veces en los animales tratados con la dosis D1 y D2, respectivamente, y alimentados con dieta grasa. También se observa un aumento de la proteína endógena de 1,97 veces en los animales tratados con los virus HFD-GFP 1,5x10¹²gc/kg con respecto a los animales NCD/GFP 1,5x10¹²gc/kg.

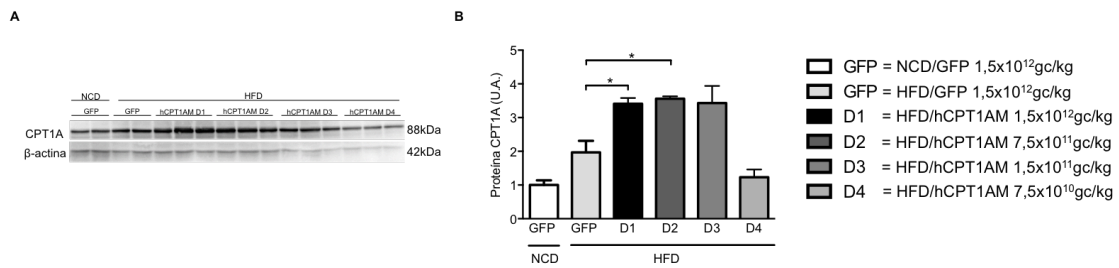


Figura 17. Análisis de los niveles de mRNA y proteína CPT1A. A) WB representativo de fracciones enriquecidas con mitocondrias (20ug) de hígado de ratones infectados con el virus AAV-GFP y distintas dosis de AAV-hCPT1AM y alimentados con dieta control y dieta grasa. **B)** Cuantificación (U.A.) del WB. n=5. *** $P \leq 0,001$. NCD: *Normal Chow Diet* y HFD: *High Fat Diet*. Se normaliza tomando el valor de 1 en los animales infectados con los virus AAV-GFP y alimentados con la dieta control.

3.3 Análisis histológico del efecto de la sobreexpresión de hCPT1AM en hígado

Con el propósito de determinar cuál de las dosis era la más efectiva en disminuir los niveles de grasa en el hígado se realizaron cortes histológicos de los hígados tras 8 semanas después de haber inyectado los virus y con 18 semanas ingiriendo la dieta correspondiente y se tiñeron con Hematoxilina-Eosina.

Como se aprecia en la figura 18B los animales con dieta grasa tratados con el virus AAV-GFP muestran claramente una esteatosis severa con una alta acumulación de grasas respecto a los animales con dieta control y tratados con el mismo virus (figura 18A).

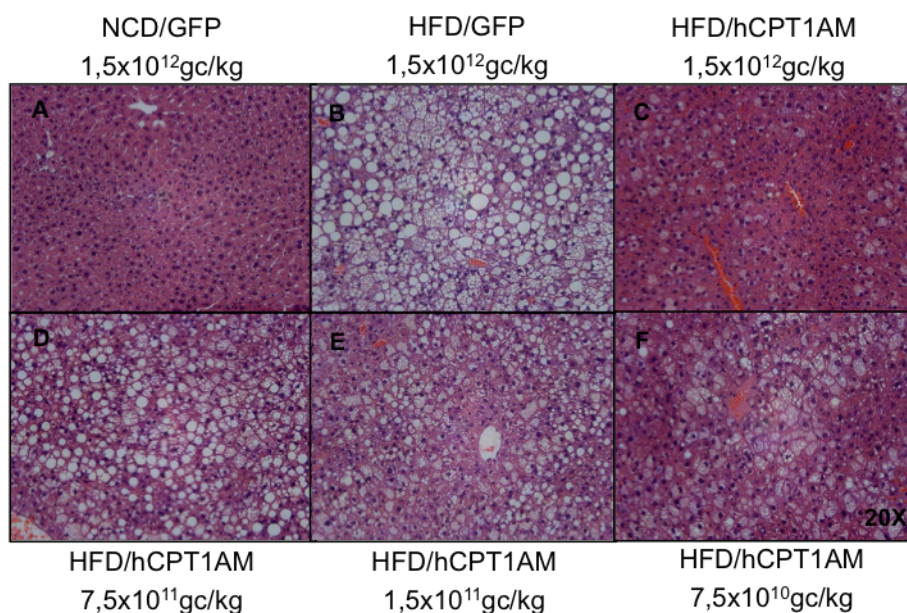


Figura 18. Análisis histológicos del hígado. Imágenes representativas de preparaciones histológicas del hígado de los ratones teñidos con Hematoxilina-Eosina. **A)** Ratones alimentados con la dieta control y tratados con 7,5,x10¹¹gc/kg de los virus AAV-GFP. **B-F)** Ratones alimentados con dieta grasa y tratados **B)** con 1,5,x10¹²gc/kg de los virus AAV-GFP. **C)** con 1,5x10¹²gc/kg de los virus AAV-hCPT1AM. **D)** con 7,5,x10¹¹gc/kg de los virus AAV-hCPT1AM. **E)** con 1,5x10¹¹gc/kg de los virus AAV-hCPT1AM. **F)** con 7,5x10¹⁰gc/kg de los virus AAV-hCPT1AM. NCD: *Normal Chow Diet* y HFD: *High Fat Diet*.

Los ratones con la dieta grasa que sobreexpresan la dosis de virus AAV9-hCPT1AM de 1,5x10¹²gc/kg presentan una mejora significativa respecto a su grupo HFD-GFP tal y como se puede ver en la figura (figura 18C), el hígado de estos animales muestra una disminución considerable de la acumulación de grasas y del número de vacuolas. Las otras dosis analizadas no parecen tener un efecto tan claro de reversión de la esteatosis.

3.4 Análisis de los parámetros de glucosa, insulina y peso

Con el objetivo de intentar encontrar una dosis adecuada que pudiera promover la β -oxidación de una manera controlada y que pudiera ser beneficiosa, hemos analizado la glucosa, la insulina y el peso de los animales tratados con AAVs.

Como se observa en la figura 19A la glucosa sérica aumenta 1,28 veces como era de esperar en los animales con dieta grasa y tratados con la dosis

1,5x10¹²gc/kg de los virus AAV-GFP comparado con los animales con dieta control y tratados con la misma dosis de AAVs. En los animales tratados con la dosis D1 (1,5x10¹²gc/kg) disminuyen los niveles de glucosa en suero en 1,18 veces comparado con la dosis D2 (1,5x10¹²gc/kg). También se observó una disminución de los niveles de glucosa de 1,28 veces en los animales tratados con la dosis más baja D4 (7,5x10¹⁰gc/kg) respecto a su control GFP.

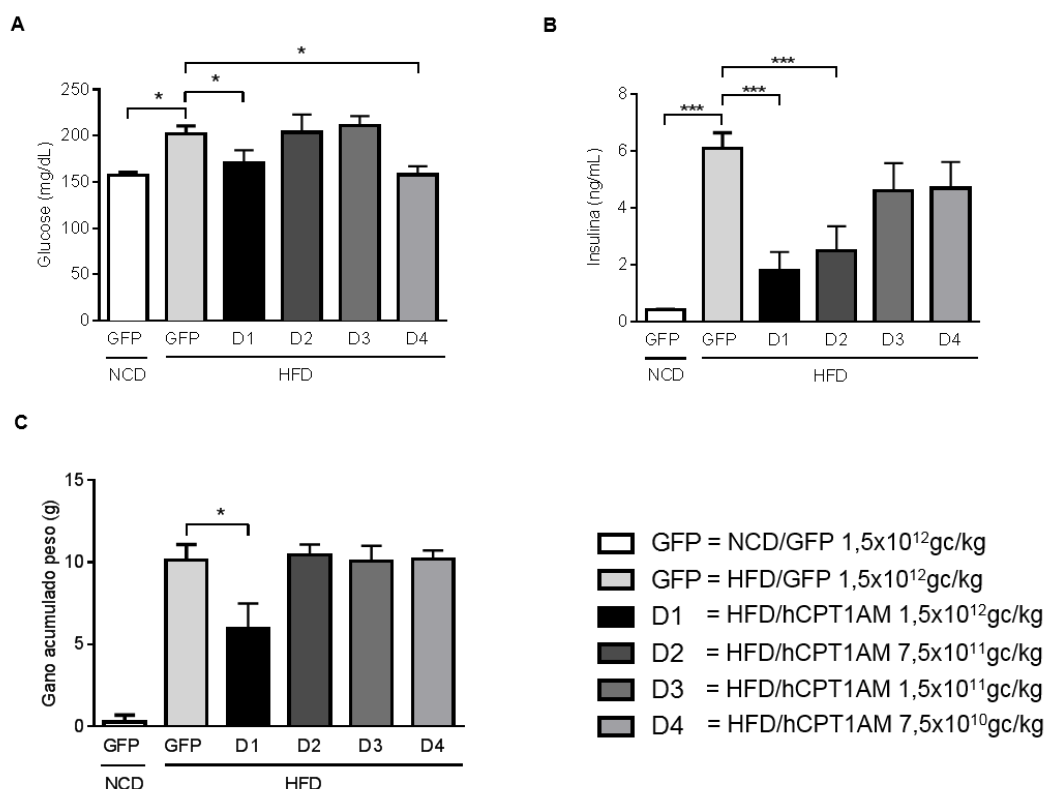


Figura 19. Análisis de los niveles de glucosa e insulina en suero y el peso. A) Niveles de glucosa en suero de los animales ayunados 6 h con 8 semanas de inyección de los AAV. **B)** Niveles de insulina en suero de los animales ayunados 6 h con 8 semanas de inyección de los AAV. **C)** Ganancia acumulada de peso al final del experimento. *P≤0,05. ***P≤0,001. NCD: *Normal Chow Diet* y HFD: *High Fat Diet*.

El análisis de los niveles de insulina en suero mostró que la hiperinsulinemia producida por la dieta grasa, aumentó 14,18 veces en los niveles séricos de insulina y disminuyó en 3,4 veces y 2,44 veces con las dosis D1 y D2, respectivamente figura 19B. También se observó una disminución de 1,7 veces en el peso de los animales alimentados con dieta grasa y tratados con la dosis D1 comparado con sus controles tratados con dieta grasa (figura 19C).

Basándonos en los datos obtenidos, los próximos experimentos se realizaron con una dosis de virus de $1,5 \times 10^{12} \text{gc/kg}$.

4. EFECTO DE LA SOBREENPRESIÓN DE hCPT1AM EN HÍGADO DE RATONES ALIMENTADOS CON DIETA GRASA Y DIETA CONTROL

Como hemos visto en el apartado 3, la dosis de $1,5 \times 10^{12} \text{gc/kg}$ fue capaz de disminuir la glucosa, la resistencia a insulina, así como disminuir el peso y mejorar la esteatosis en hígados tratados con las distintas dosis. En este experimento se estudió el efecto de la sobreexpresión de la dosis de AAVs elegida de $1,5 \times 10^{12} \text{gc/kg}$ en ratones alimentados con una dieta grasa y dieta control. En este experimento se partieron de 60 animales que fueron tratados con una dieta control (30 animales) y dieta grasa (30 animales). El cronograma del experimento esta descrito en la figura 20.

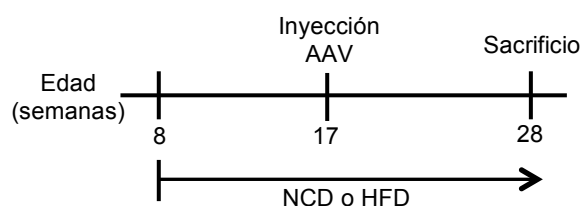


Figura 20. Diagrama del diseño del experimento con ratones C57BL/6 obesos. Se especifica la edad de comienzo y administración de la dieta correspondiente (NCD: *Normal Chow Diet*. HFD: *High Fat Diet*), la edad de inyección de los virus AAV-GFP y AAV-hCPT1AM por la vena de la cola y la edad de sacrificio de los animales.

Tras 8 semanas de dieta comprobamos el fenotipo obeso y resistente a la insulina a través de la medida del peso y del análisis en suero de la glucosa e insulina en animales ayunados 16h (figura 21).

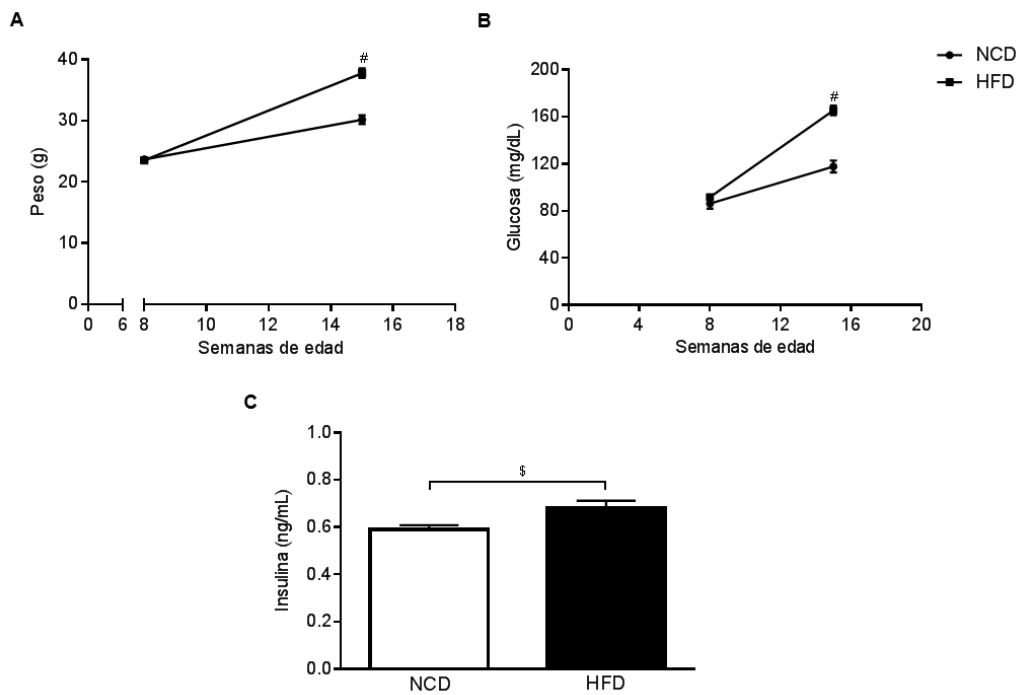


Figura 21. Análisis del peso, glucosa e insulina. A) Peso de los animales con 8 semanas de dieta grasa y control y 16 semanas de edad. **B)** Análisis de la glucosa en suero de los animales con ayuno de 16 h. **C)** Análisis de la insulina en suero con 16 h de ayuno. n=30. \$P≤0,01. #P≤0,001. NCD: Normal Chow Diet y HFD: High Fat Diet.

Se observó que los animales que ingerían dieta grasa presentaban un aumento de 1,25 veces en el peso (figura 21A), 1,40 veces en la glucosa (figura 21B) y 1,15 veces en los niveles de insulina (figura 21C), comparados con el grupo que ingería dieta control.

Después de confirmar el fenotipo obeso de estos animales, los dividimos en 4 grupos los cuales fueron inyectados con los virus correspondientes, en la cantidad adecuada a su peso y se monitorizó su peso cada semana. Los grupos fueron:

- 1) NCD-GFP
- 2) NCD-hCPT1AM
- 3) HFD-GFP
- 4) HFD-hCPT1AM

4.1 Test de tolerancia a la glucosa (GTT)

Tras 7 semanas de la infección vírica se realizó un GTT para comprobar la respuesta de los animales tratados frente a un aumento de la glucosa en la sangre mediante la administración de una solución de glucosa 1,5g/kg i.p. en ayunas. Los

resultados muestran que entre los animales que ingerían la dieta grasa el grupo HFD-hCPT1AM presentaba unos niveles de glucosa en sangre disminuidos a los 30, 60 y 90 min después de la inyección de glucosa i.p. respecto al grupo HFD-GFP (figura 22A). No se observaron cambios entre los animales alimentados con dieta control.

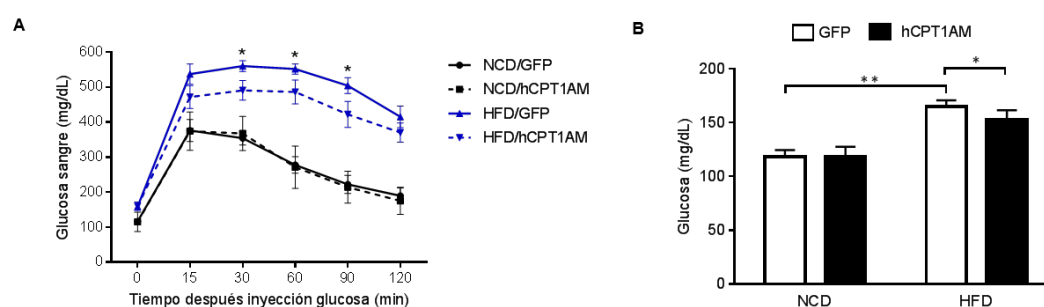


Figura 22. Test de tolerancia a la glucosa (GTT). A) En animales en ayuno durante 16 h se administró 1,5g/kg de glucosa i.p. y se analizaron los niveles de glucosa en sangre a los 15, 30, 60, 90 y 120 min. B) Niveles de glucosa a tiempo cero. n=6-10. *P≤0,05. **P≤0,01. NCD: *Normal Chow Diet* y HFD: *High Fat Diet*.

En la figura 22B se muestran los niveles de glucosa a tiempo cero. Se observa un incremento de 28,21% en los animales HFD-GFP comparado con los animales NCD-GFP. También se observa que los niveles de glucosa disminuyen 22,41% en los animales HFD-hCPT1AM respecto al grupo HFD-GFP. Todo ello indicaba que los animales con dieta grasa tratados con los AAV9-hCPT1AM mejoraban su fenotipo con respecto a sus controles GFP.

4.2 Efecto de la sobreexpresión de hCPT1AM en los niveles de glucosa, insulina y peso en el sacrificio

Transcurridas 11 semanas desde la inyección de los AAVs, los animales fueron sacrificados tras un ayuno de 6 h. Se extrajo la sangre y tejidos que fueron posteriormente analizados.

Para ver qué efecto producía la sobreexpresión de la dosis elegida de AAV en estos animales, hemos verificado los niveles de la glucosa e insulina en el suero. En la figura 23A se puede observar un incremento de 1,38 veces de la glucosa en los animales tratados con AAV-GFP y alimentados con dieta grasa comparado con el grupo GFP que ingerían dieta control. Los animales que tenían

sobreexpresada la hCPT1AM y que estaban alimentados con dieta grasa presentan una disminución de 1,20 veces en los niveles de la glucosa comparado con el grupo HFD-GFP.

La figura 23B muestra que los animales tratados con el AAV-hCPT1AM alimentados con la dieta grasa muestran una disminución de 4,02 veces en los niveles de insulina en el suero comparado con su grupo HFD-GFP. Los animales tratados con AAV-GFP mostraron unos niveles de insulina aumentados en 6,31 veces comparado con su grupo GFP alimentado con dieta control.

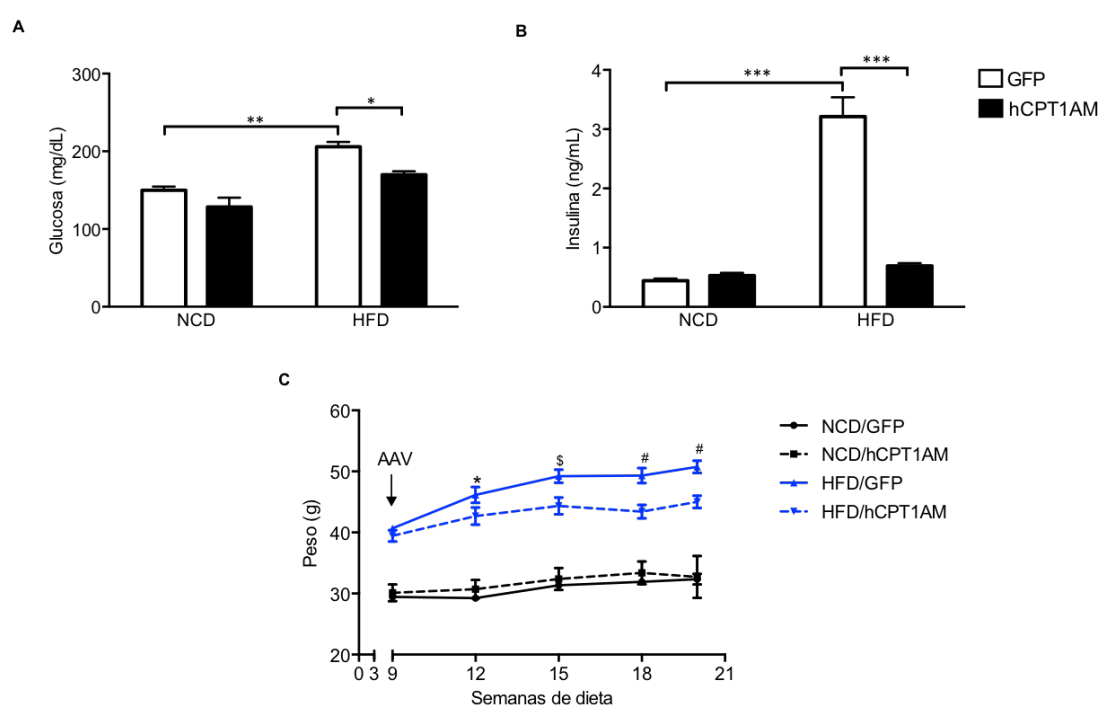


Figura 23. Análisis del efecto de la sobreexpresión de hCPT1AM en los niveles séricos de glucosa, insulina y peso. A) Niveles de glucosa en suero de los animales ayunados 6 h con 11 semanas de inyección de los AAV. **B)** Niveles de insulina en suero de los animales ayunados 6 h con 11 semanas de inyección de los AAV. **C)** Los ratones han sido pesados una vez a cada 1-2 semanas después de la inyección de los virus. n=6-8. *P≤0,05. **P≤0,01. ***P≤0,001. \$P≤0,01. #P≤0,001 respecto a los animales tratados con el virus AAV-GFP y alimentados con dieta grasa. NCD: *Normal Chow Diet* y HFD: *High Fat Diet*.

Se examinó la evolución del peso de los ratones infectados con los virus AAV- GFP y AAV-hCPT1AM hasta las 28 semanas de edad que corresponde a 11 semanas después de la administración de los virus y 20 semanas de dieta. Tal y como se observa en la figura 23C los ratones con dieta grasa que sobreexpresan la

hCPT1AM muestran una pérdida de peso significativa a partir de la semana 3 de inyección de los virus, disminuyendo en un 12% respecto al grupo HFD-GFP.

4.3 Análisis de la capacidad infectiva de los AAVs, de los niveles de proteína y actividad de CPT1.

En primer lugar se analizó la capacidad infectiva de los AAVs. Para ello se obtuvieron hepatocitos en cultivo primario de hígado de ratón tal y como se ha descrito en el apartado 4.1 de materiales y métodos. Se cuantificó la eficiencia de infección de los AAV9-GFP tanto en ratones con dieta control como con dieta grasa. El resultado fue de 87% y 80%, respectivamente.

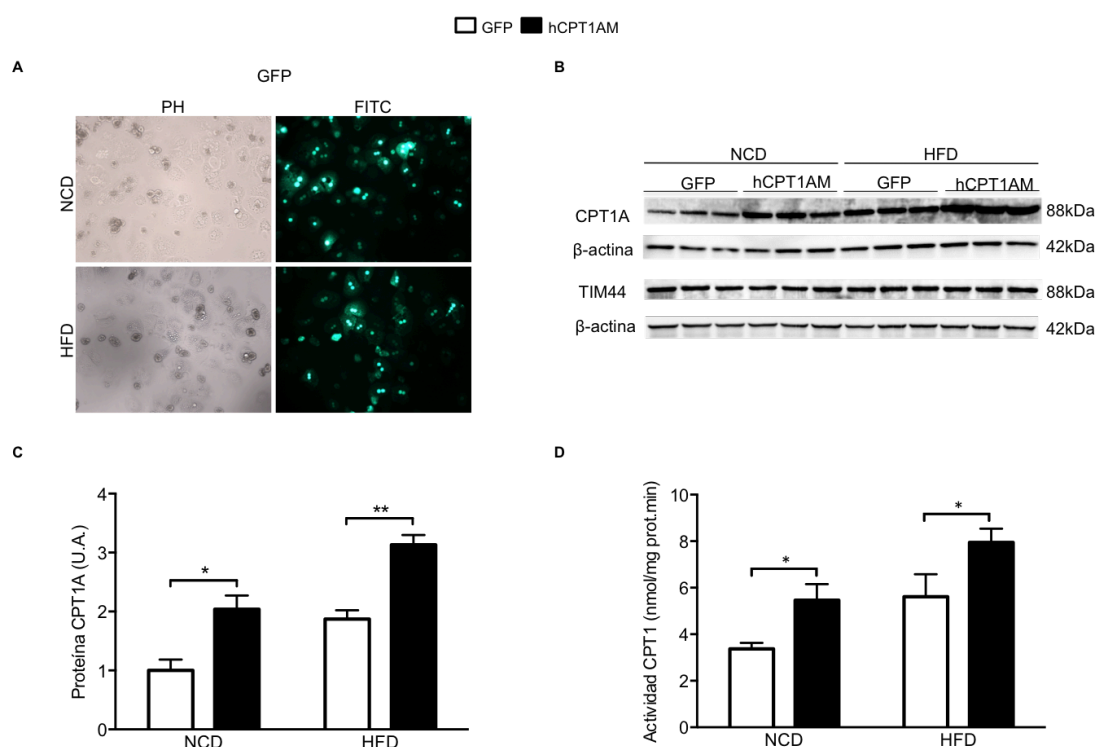


Figura 24. Análisis de los cambios de mRNA, proteína y actividad CPT1A en hígado de ratón.

A) Imagen de los hepatocitos infectados con el AAV-GFP tras 11 semanas de la inyección. Imagen representativa de 3 animales. **B)** WB representativo de fracciones enriquecidas con mitocondrias (8ug) de hígado de ratones infectados con el virus AAV-GFP y AAV-hCPT1AM y alimentados con dieta control y dieta grasa. **C)** Cuantificación (U.A.) del WB. **D)** Actividad CPT1 expresada en actividad específica en fracciones enriquecidas con mitocondrias de hígado (12μg) tratadas con una concentración de 100μM de malonil-CoA. El ensayo se realizó por duplicado para cada muestra. n=6-10. *P≤0,05. **P≤0,01. ***P≤0,001. NCD: *Normal Chow Diet* y HFD: *High Fat Diet*. Se normaliza tomando el valor de 1 de los animales infectados con los virus AAV-GFP y alimentados con la dieta control (NCD-GFP).

Se cuantificaron los niveles de proteína CPT1A sobreexpresada en los ratones tratados con el virus AAV-hCPT1AM tanto en el grupo alimentado con dieta control como el grupo alimentado con la dieta grasa (figura 25B). Los resultados obtenidos muestran que los animales tratados con dieta grasa sobreexpresan 1,67 veces más la proteína CPT1A en los ratones tratados con el virus AAV-hCPT1AM y 2,04 veces más cuando están alimentados con dieta control. Se analizó también la proteína TIM44 (*Translocase of the mitochondrial inner membrane*) como marcador de contenido mitocondrial y se observó que los animales tratados con AAV-hCPT1AM no presentan cambios comparados con el grupo AAV-GFP (figura 25B). Lo que indicaba que la sobreexpresión de hCPT1AM no influye en el número de mitocondrias.

Una vez comprobado el incremento en los niveles de proteína se analizó la actividad de la CPT1A. Para esto utilizamos fracciones enriquecidas con mitocondrias del hígado de los animales que llevaban 11 semanas con los virus y 20 semanas de dieta.

Como se observa en la figura 24D la actividad CPT1 de los grupos alimentados con dieta control y tratados con AAV-hCPT1AM se encuentra incrementada en 1,62 veces comparada con la actividad de su control GFP. En los animales alimentados con dieta grasa y tratados con AAV-hCPT1AM la actividad aumentó 1,42 veces respecto el grupo HFD-GFP.

Los resultados obtenidos muestran que los virus AAV-hCPT1AM son capaces de aumentar los niveles de proteína y actividad de CPT1A tanto en los animales tratados con dieta control como en los animales tratados con dieta grasa.

4.4 Ensayo de oxidación de ácidos grasos (FAO)

El ensayo de FAO fue realizado como se ha descrito en el apartado 11 de materiales y métodos. El oleato fue el sustrato utilizado para analizar la oxidación total, la oxidación a CO₂ y los compuestos ácidos solubles (ASP). Este ensayo se realizó en hepatocitos obtenidos de hígados de ratón, como descrito en el apartado 4.1 de materiales y métodos. Los hepatocitos de los animales alimentados con dieta grasa y tratados con los virus AAV-GFP muestran un incremento de 1,18 veces en los niveles de oxidación a CO₂ respecto a los hepatocitos de los animales alimentados con dieta control (figura 25A). No se

observaron cambios entre los animales con dieta grasa. Sin embargo sí que se pudieron observar un aumento de 1,33 veces en los niveles de ASPs de los animales con dieta grasa y tratados con AAV-hCPT1AM respecto a sus controles GFP (figura 25B). También se observó un aumento de 1,14 veces en los animales con dieta control y tratados con AAV-hCPT1AM.

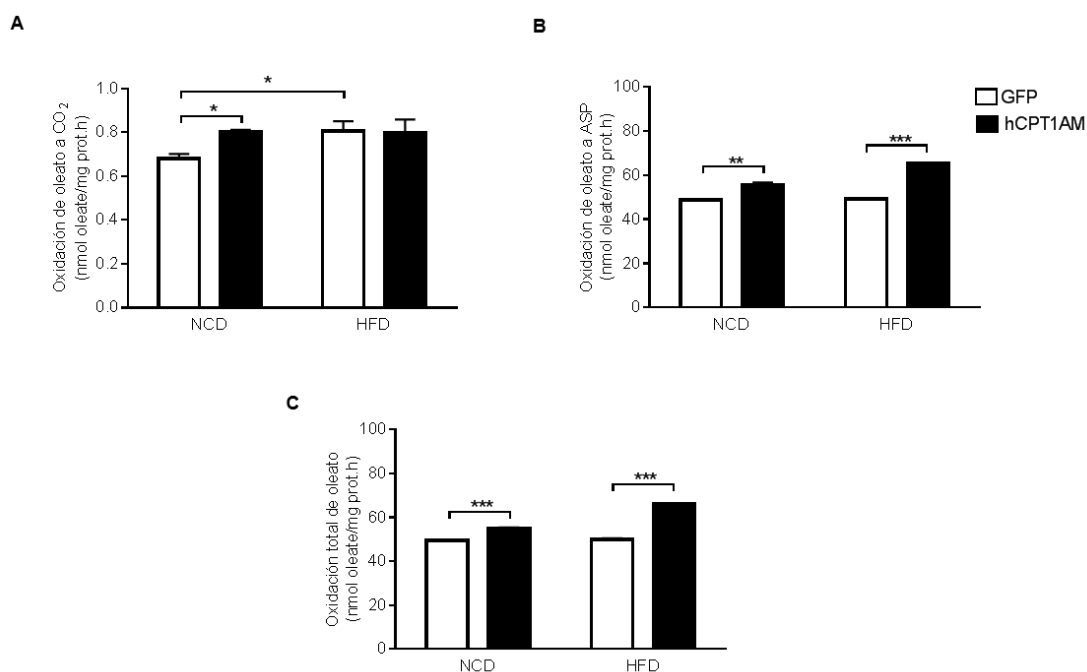


Figura 25. Análisis de los niveles de oxidación del oleato en cultivos primarios de hepatocitos que sobreexpresan hCPT1AM y GFP. A) Niveles de CO₂ formado por oxidación de oleato en hepatocitos de animales tratados con dieta grasa y control. **B)** Niveles de ASP formados por oxidación de oleato. **C)** Cuantificación de la oxidación total de oleato..n=3. El ensayo se ha realizado por triplicado por cada ratón utilizado. *P≤0,05. **P≤0,01. ***P≤0,001. NCD: *Normal Chow Diet* y HFD: *High Fat Diet*.

El análisis de los niveles de oxidación total mostró un incremento de 1,32 veces con dieta grasa y 1,12 veces con dieta control entre los animales tratados con el AAV-hCPT1AM y sus respectivos controles tratados con AAV-GFP (figura 25C). Todo ello indica que los ratones que sobreexpresan la hCPT1AM son capaces de oxidar más AGs en cualquiera de las dos condiciones de dieta.

4.5 Estudio de la capacidad respiratoria mitocondrial

Teniendo en cuenta que los ratones que sobreexpresan la hCPT1AM eran capaces de llevar a cabo una mayor FAO quisimos analizar si eso repercutía en

una mejora de la capacidad respiratoria máxima en estos tejidos. Estos análisis se llevaron a cabo en colaboración con el Dr. David Sebastián del grupo del Dr. Zorzano del Instituto de Recerca Biomédica (IRB) de Barcelona.

Los resultados de la capacidad respiratoria mitocondrial se obtuvieron a partir de mitocondrias de hígado recién obtenidas de animales con 10 semanas de AAVs y 19 semanas de dieta. El método utilizado está descrito en el apartado 12 de materiales y métodos. Como se observa en la figura 26A en los distintos grupos analizados no se observaron cambios en el consumo de oxígeno. Sin embargo sí que se observó una disminución en la relación del control respiratorio de 1,54 veces en los animales tratados con AAV-GFP y alimentados con dieta grasa respecto a su control con dieta control (figura 26B), indicando un empeoramiento en la capacidad respiratoria máxima en los animales con dieta grasa. También observamos una tendencia, aunque no significativa, en la restauración de los valores de un animal control en los animales con dieta grasa que sobreexpresan la hCPT1AM.

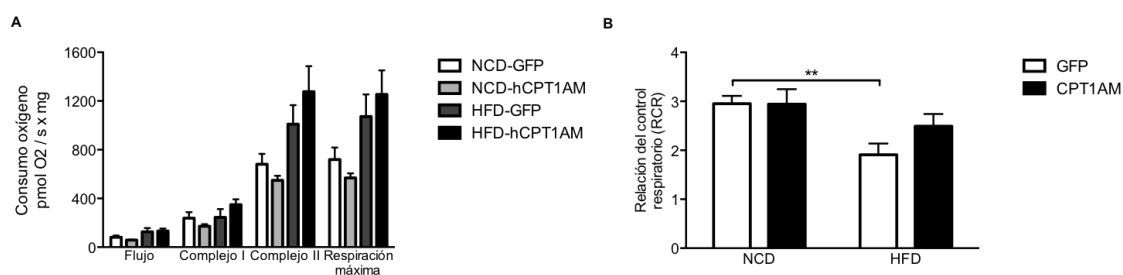


Figura 26. Análisis de la capacidad respiratoria mitocondrial. A) Cuantificación del consumo de oxígeno. **B)** Cuantificación de la relación del control respiratorio (RCR). n=4. Las medidas se realizaron por triplicado. **P≤ 0,01. NCD: *Normal Chow Diet* y HFD: *High Fat Diet*.

4.6 Estudio histológico y macroscópico del hígado

Con el fin de corroborar que una β -oxidación aumentada de los AGs en el hígado era capaz de revertir la obesidad o la esteatosis hepática analizamos el peso de los hígados y realizamos un reportaje gráfico del estado de los hígados en el momento del sacrificio. Estos análisis se llevaron a cabo después de 11 semanas de la inyección de los virus y 20 semanas de dieta. Hemos observado que los hígados de los animales tratados con el AAV-hCPT1AM y alimentados con dieta grasa han mejorado notablemente su esteatosis y además presentan un peso más reducido (figura 27A). Esto viene apoyado por el análisis del peso de los hígados

cuyo aumento de 2,18 veces inducido por la dieta grasa disminuyó en un 73% en los animales con dieta grasa tratados con AAV-hCPT1AM respecto a sus controles GFP (figura 27B).

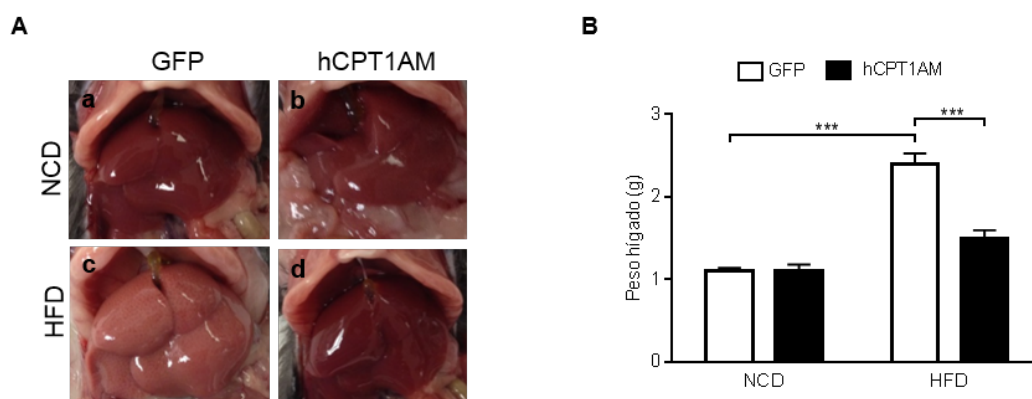


Figura 27. Análisis macroscópico y peso del hígado. A) Imagen representativa de hígados de animales tratados con AAV-GFP (a) y AAV-hCPT1AM (b), alimentados con dieta control. Imagen (c) representativa de hígados de animales tratados con AAV-GFP y (d) imagen representativa de hígados tratados con hCPT1AM, alimentados con dieta grasa. Muestras tomadas a las 11 semanas de virus que corresponde a 20 semanas de dieta y 28 de edad. **B)** Análisis del peso de los hígados en el día del sacrificio. n=6. ***P≤ 0,05. NCD: *Normal Chow Diet* y HFD: *High Fat Diet*. Se normaliza tomando el valor de 1 en los animales infectados con los virus AAV-GFP y alimentados con la dieta control.

En el análisis histológico con hemocilina de los hígados en la figura 28C se aprecia que los animales con dieta grasa tratados con el virus AAV-GFP muestran claramente una esteatosis severa con alta acumulación de grasas respecto a los animales con dieta control y tratados con el mismo virus (figura 28A). Los ratones con dieta grasa que sobreexpresan la hCPT1AM muestran una mejora significativa respecto a su grupo GFP tal y como se puede ver en la figura (figura 28D). El hígado de estos animales muestra una disminución considerable de la acumulación de grasas y del número de vacuolas. Además, los ratones que sobreexpresan la hCPT1AM alimentados con dieta control (figura 28B) no presentan cambios significativos en la histología de los hígados respecto a los animales infectados con el virus AAV-GFP (figura 28A).

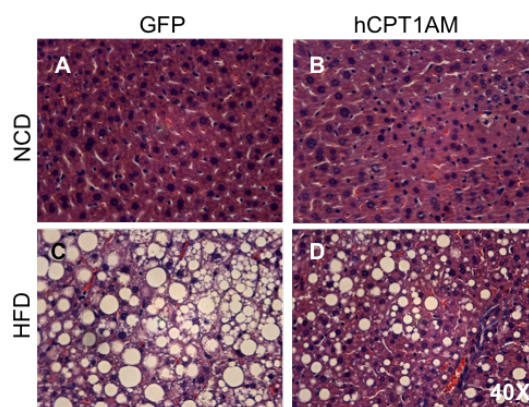


Figura 28. Análisis histológico del hígado. Imágenes representativas de preparaciones histológicas del hígado. Tinción con Hematoxilina-Eosina. **A y B)** Ratones alimentados con la dieta control y tratados con los virus AAV-GFP, AAV-hCPT1AM, respectivamente. **C y D)** Ratones alimentados con dieta grasa y tratados con los virus AAV-GFP y AAV-hCPT1AM, respectivamente. Muestras tomadas a las 28 semanas de edad que corresponde a 11 semanas después del tratamiento con los virus, donde los animales tenían 20 semanas de dieta n=6-8. NCD: *Normal Chow Diet* y HFD: *High Fat Diet*.

4.7 Contenido de TG en el hígado

Después del análisis de las histologías queríamos confirmar el descenso de grasa en los hígados tratados con AAV-hCPT1AM de los animales alimentados con dieta grasa mediante la determinación de los niveles de TG en hígado.

Tal y como se muestra en la figura 29A los niveles de TG en los hígados de los ratones con dieta grasa tratados con el virus AAV-GFP son 21,81 veces más altos que los niveles de los animales GFP alimentados con dieta control. Por otra parte, en los grupos de animales con dieta grasa, los que sobreexpresan la hCPT1AM tienen unos niveles de TG reducidos en un 38,75% respecto a los animales GFP. Esta disminución de los niveles de lípidos intracelulares se confirmó también en la cuantificación de la tinción de lípidos neutros por la técnica del Oil Red O descrita en el apartado 6.5 de materiales y métodos (figura 29B y C). Se observa una disminución significativa de 2,17 veces en la cantidad de lípidos en los hepatocitos tratados con HFD-hCPT1AM respecto a los animales tratados con HFD-GFP.

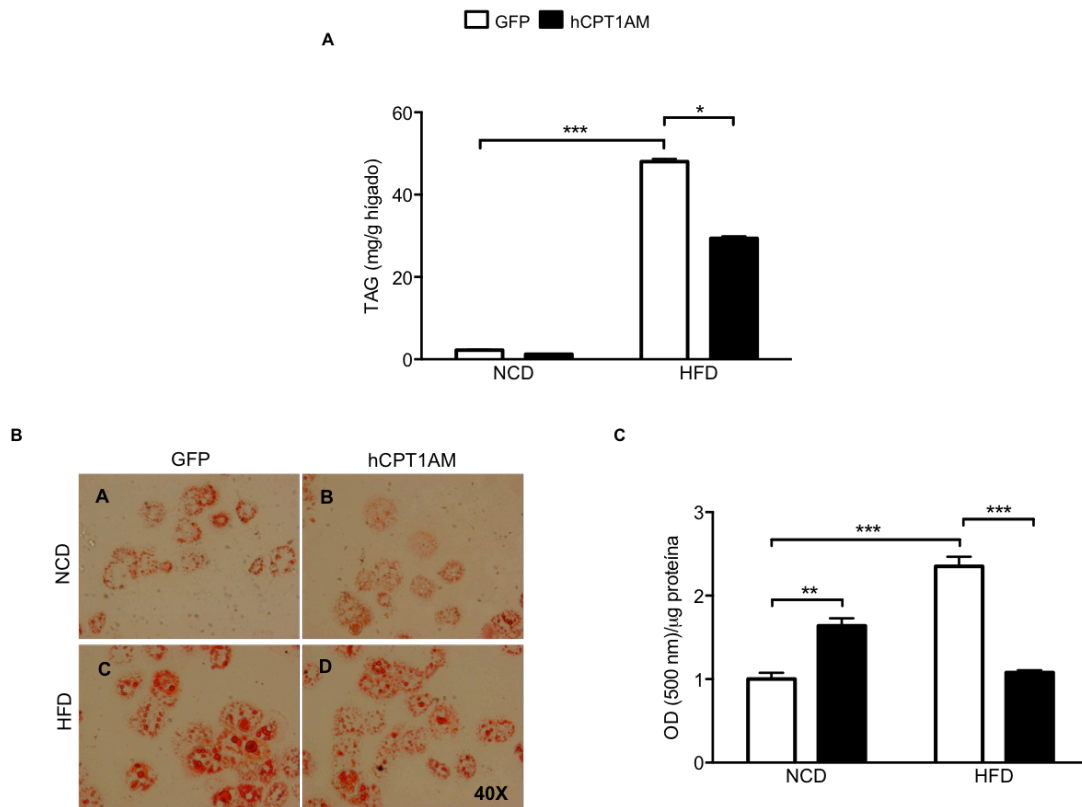


Figura 29. Análisis de los niveles de TG en hígado. A) Niveles de TG en hígado de animales alimentados con dieta control y dieta grasa inyectados con los virus AAV-GFP y AAV-hCPT1AM a las 28 semanas de edad. **B)** Imagen de los hepatocitos con la tinción de Oil Red O. Imagen representativa de 2 experimentos independientes. **C)** Cuantificación del Oil Red O de 2 experimentos independientes. n=2 y por triplicado. * $P \leq 0,05$. ** $P \leq 0,01$. *** $P \leq 0,001$. NCD: *Normal Chow Diet* y HFD: *High Fat Diet*. Se normaliza tomando el valor de 1 en los animales infectados con los virus AAV-GFP y alimentados con la dieta control.

En la figura 29C podemos observar mediante la extracción y cuantificación por espectrofotometría de la imagen 29B donde se observa una disminución de 2,17 veces en la cantidad de lípidos en los hepatocitos tratados con HFD-hCPT1AM cuando comparados con los animales tratados con HFD-GFP y alimentados con dieta grasa.

4.8 Estudio de los niveles de s cuerpos cetónicos

Se ha descrito que una oxidación aumentada de AGs en el hígado va acompañada de un aumento en la producción de los cuerpos cetónicos para eliminar los excedentes de acetil-CoA mitocondrial ²⁰³. Se analizaron los niveles de proteína de la HMGS2 (figura 31A), que es la enzima mitocondrial clave de la

formación de cuerpos cetónicos y por otro lado se cuantificó la concentración de cuerpos cetónicos presentes en el hígado y en el suero de los animales que sobreexpresan la hCPT1AM y GFP alimentados con dieta control y con dieta grasa.

En el caso de la dieta control se observa un aumento significativo de 1,54 veces más de proteína HMGS2 en el grupo tratado con el virus AAV-hCPT1AM respecto a su grupo control. En el caso de la dieta grasa se observa un incremento significativo de 1,71 veces de proteína HMGS2 en el grupo tratado con el virus AAV-hCPT1AM respecto su grupo control (figura 30B).

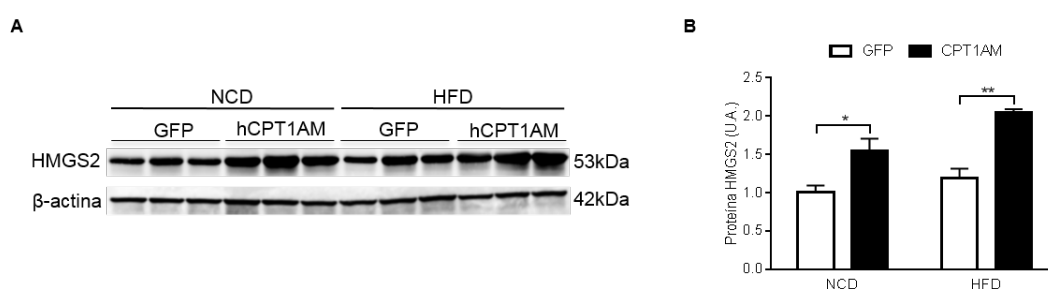


Figura 30. Análisis de los niveles de proteína HMGS2 por WB. A) WB representativo de los niveles de proteína de HMGS2 en fracciones enriquecidas con mitocondrias de hígado (30ug) a las 11 semanas tras la inyección de virus. Se ha utilizado como normalizador la β -actina (42kDa). B) Cuantificación del WB. n=6. * $P \leq 0,05$. ** $P \leq 0,01$. NCD: *Normal Chow Diet* y HFD: *High Fat Diet*. Se normaliza tomando el valor de 1 en los animales infectados con los virus AAV- GFP y alimentados con la dieta control.

A continuación se analizó la concentración del β -hidroxibutirato-CoA (BHB) en el hígado y suero (figura 31) mediante la extracción y posterior cuantificación por un kit comercial (descrito en el apartado 5.3 de materiales y métodos). Los análisis se realizaron con muestras extraídas en el momento del sacrificio a las 11 semanas después de la administración de los virus y en ayunas de 6 h.

Como nos muestra la figura 31A, los niveles de BHB en hígado de los animales tratados con hCPT1AM y alimentados con dieta grasa se encuentran significativamente aumentados en 8,40% comparados con los animales tratados con el virus AAV-GFP. En los ratones alimentados con dieta control no se observaron cambios.

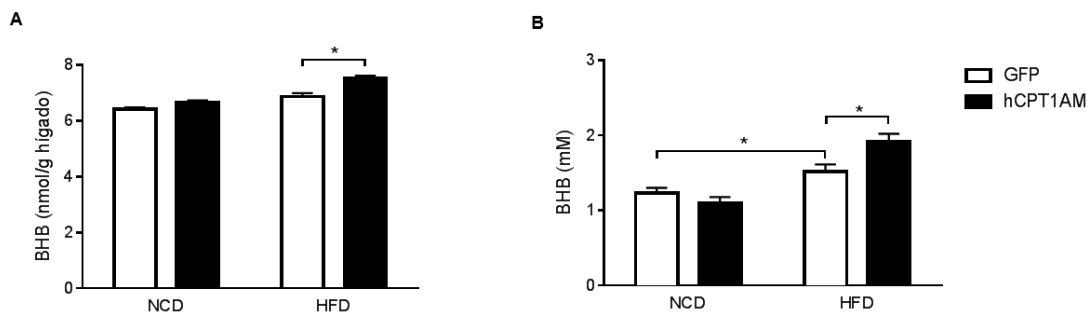


Figura 31. Análisis de los niveles de β -hidroxibutirato-CoA en hígado y suero. A) Concentración de β -hidroxibutirato-CoA en hígado. **B)** Niveles de cuerpos cetónicos en suero de ratones con 11 semanas de AAV y 28 semanas de edad. n=6. *P<0,05. NCD: *Normal Chow Diet* y HFD: *High Fat Diet*.

A continuación se analizó la presencia de cuerpos cetónicos en el suero. Los animales con dieta grasa y tratados con los virus GFP presentan un aumento de 18,8% en los niveles de BHB comparados con los animales alimentados con dieta control y tratados con GFP. Los animales que sobreexpresan la hCPT1AM muestran un incremento significativo de 20,8% en los niveles de cuerpos cetónicos respecto a su grupo control HFD-GFP (figura 31B).

Estos resultados se correlacionan directamente con un aumento de la actividad CPT1 (figura 24D) y una mayor capacidad de oxidación total de oleato en hepatocitos (figura 25C) observados en los animales que sobreexpresan la hCPT1AM.

4.9 Efecto en la producción de ATP en el hígado

En la última fase de la β -oxidación, los transportadores de electrones (NADH y FADH₂) producidos durante la oxidación de los AGs y durante el ciclo del ácido cítrico para la oxidación del acetil-CoA, donarán los electrones a la cadena respiratoria mitocondrial, donde estos electrones se transportarán hacia el oxígeno con la fosforilación concomitante del ADP en ATP. Así pues, se midió en hígado cuáles eran los niveles de ATP formados en los animales que sobreexpresan la hCPT1AM (figura 32) como se ha descrito en el apartado 6.3 de materiales y métodos.

La sobreexpresión de la hCPT1AM produce un aumento significativo en la concentración del ATP de 1,8 veces en los animales alimentados con dieta grasa. En los animales tratados con dieta control no hemos observado cambios.

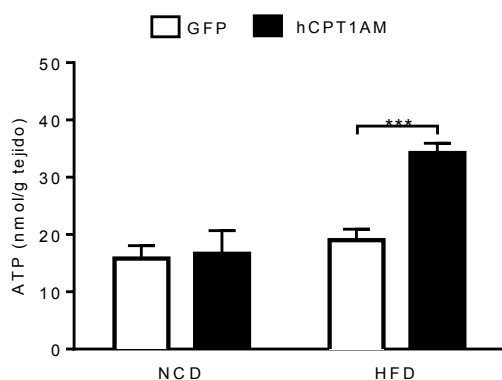


Figura 32. Análisis de los niveles de ATP en el hígado. Concentración de ATP en extractos totales de hígados cuantificado con el kit luminiscente de Invitrogen a las 28 semanas de edad que corresponde a 11 semanas después de la administración vírica. n=6. ***P<0,001. NCD: *Normal Chow Diet* y HFD: *High Fat Diet*.

4.10 Análisis a través de termografía por radiación infrarroja

Otra forma de eliminación de energía por parte del hígado tras una sobreexpresión de hCPT1AM sería aumentando la capacidad termogénica de este tejido aumentando su temperatura. Para confirmar este hecho se evaluó mediante las imágenes infrarrojas de la temperatura de superficie hepática mediante una cámara termográfica. Las imágenes fueron captadas en tiempo real, tras abrir el animal, antes del sacrificio.

Con este análisis observamos un aumento significativo de 2,72% de las temperaturas medidas en los animales tratados con AAV-hCPT1AM y alimentados con dieta grasa comparadas a su grupo GFP (figura 33). No se observaron cambios en los animales alimentados con dieta control.

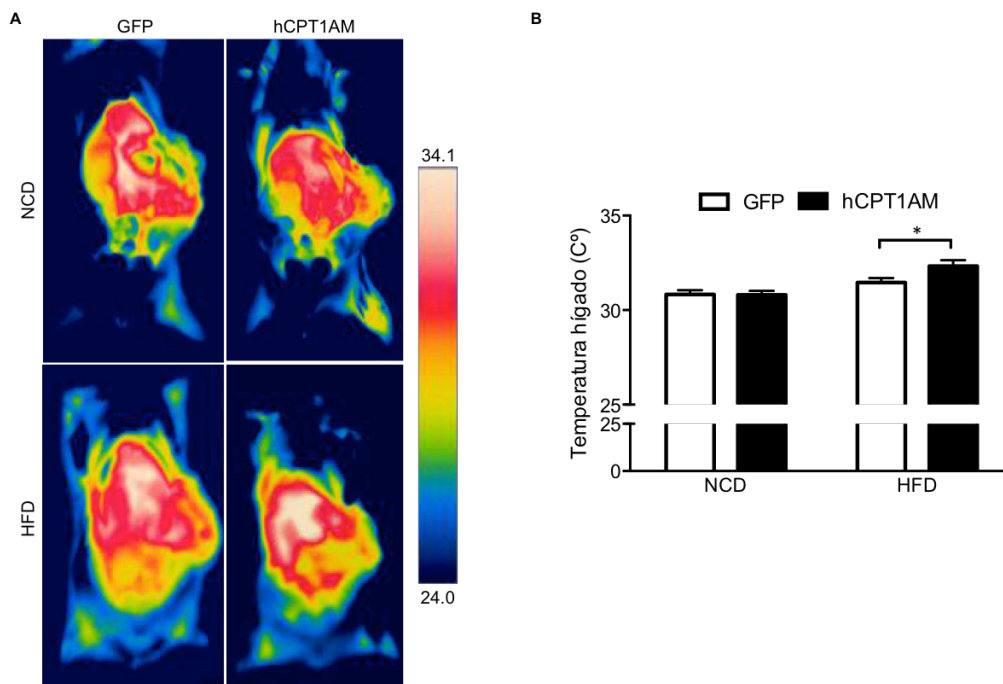


Figura 33. Termograma de imagen infrarroja y cuantificación. A) Imágenes de termografía infrarroja en tiempo real de los hígados de ratones tratados con 11 semanas de virus. A la derecha se muestra la escala de colores de temperatura. **B)** Media de las temperaturas obtenidas en el ensayo. n=6-8. *P<0,05. NCD: *Normal Chow Diet* y HFD: *High Fat Diet*.

Tras observar los cambios de la temperatura de los hígados se analizó la expresión de la proteína desacopladora 2 (UCP2). Los niveles de UCP2 en los animales tratados con el AAV-hCPT1AM aumentaron 3,06 veces en los animales alimentados con dieta grasa comparado con el grupo tratado con AVV-GFP (figura 34).

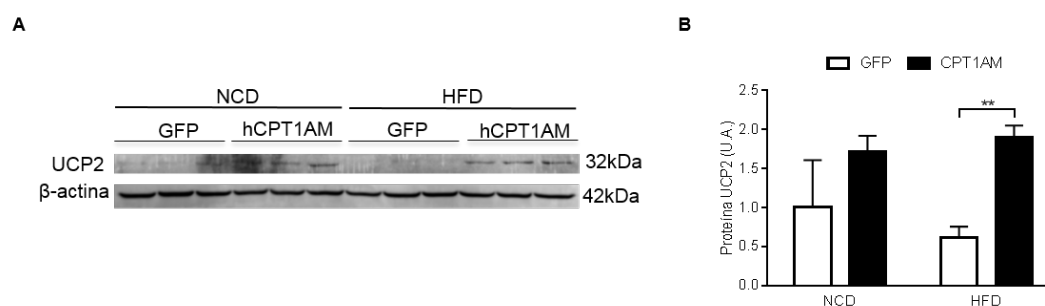


Figura 34. Análisis de los niveles de proteína UCP2 por WB. A) WB representativo de los niveles de UCP2 en proteína total de hígado (60ug) a las 11 semanas de virus y se ha utilizado como normalizador la β -actina (42kDa). **B)** Cuantificación del WB. n=6. **P \leq 0,01. NCD: *Normal Chow Diet* y HFD: *High Fat Diet*. Valores normalizados donde los animales infectados con los AAV-GFP toman el valor de 1.

4.11 Mejora de los parámetros séricos y daño hepático

Se analizaron en suero de los niveles de las lipoproteínas que transportan el colesterol en sangre, los TG y las enzimas relacionadas con daño hepático (Tabla 1).

	NCD		HFD	
	GFP	hCPT1AM	GFP	hCPT1AM
CHOL Total (mg/dL)	105,0 ± 7,6	107,8 ± 9,1	205,2 ± 6,5 ^{\$}	180,2 ± 7,4 [*]
TG (mg/dL)	39,8 ± 3,0	42,2 ± 7,1	42,8 ± 1,3	38,8 ± 1,7
LDL (mg/dL)	29,8 ± 4,7	33,7 ± 4,3	117,2 ± 6,4 ^{\$}	89,3 ± 6,3 [*]
HDL (mg/dL)	67,1 ± 2,97	65,6 ± 4,5	79,4 ± 0,9	82,6 ± 1,7
ALT (U/L)	8,3 ± 1,7	4,2 ± 1,7	109,2 ± 22,5 ^{\$}	34,0 ± 5,7 ^{**}
AST(U/L)	35,2 ± 5,3	27,3 ± 2,2	110,4 ± 18,3 [#]	67,2 ± 8,4 [*]

Tabla 1. Análisis de metabolitos y enzimas en suero. Niveles de colesterol total (CHOL), triglicéridos (TG), lipoproteína de baja densidad (LDL), lipoproteína de alta densidad (HDL), alanina aminotransferasa (ALT) y aspartato amonitransferasa (AST). Medidas en suero ± SEM en animales con 11 semanas de AAVs y 20 semanas de dieta. n=5-6 *P≤0,05 comparado con AAV-GFP con la misma dieta. **P≤0,01 comparado con AAV-GFP dieta grasa. \$P≤0,001 comparado con AAV-GFP dieta control. #P≤0,01 comparado con AAV-GFP dieta control. NCD: *Normal Chow Diet* y HFD: *High Fat Diet*.

Los animales alimentados con dieta grasa presentan un aumento de 1,95 veces de los niveles de colesterol total inducido por la dieta que sin embargo se ve disminuido en un 12,18% en los animales que sobreexpresan la hCPT1AM. Observamos también un aumento de 3,92 veces en los niveles de LDL inducidos por la dieta grasa y que disminuían en 1,31 veces en los animales tratados con AAV-hCPT1AM. Ello indica que con la sobreexpresión de hCPT1AM hemos sido capaces de mejorar el perfil lipídico de estos animales. Es importante decir que el valor de LDL se obtuvo a través de la formula $LDL = \text{Colesterol total} - HDL - (TG/5)$. En los niveles de HDL no se observan cambios significativos. En los niveles de TG no hemos observado cambios.

Se realizó también un análisis de los niveles de transaminasas, enzimas indicadoras del daño hepático. Ambas mostraron resultados parecidos. ALT y AST mostraron incrementos de sus niveles de 13,13 y 3,12, respectivamente, inducidos por la dieta grasa. Dichos niveles se redujeron notablemente en los

animales con dieta grasa que sobreexpresaban la hCPT1AM indicando una mejora notable en el daño hepático causado por la dieta grasa.

4.12 Efecto de la expresión de la hCPT1AM en la lipólisis

La observación de que disminuían los lípidos intracelulares en los animales con dieta grasa que sobreexpresaban la hCPT1AM nos llevó a preguntarnos si en dichos animales podían estar estimulados los procesos lipolíticos. Así pues analizamos la expresión génica de las proteínas ligadas a los LD y también involucradas en el proceso lipolítico: PLIN2, PLIN, ATGL y HSL.

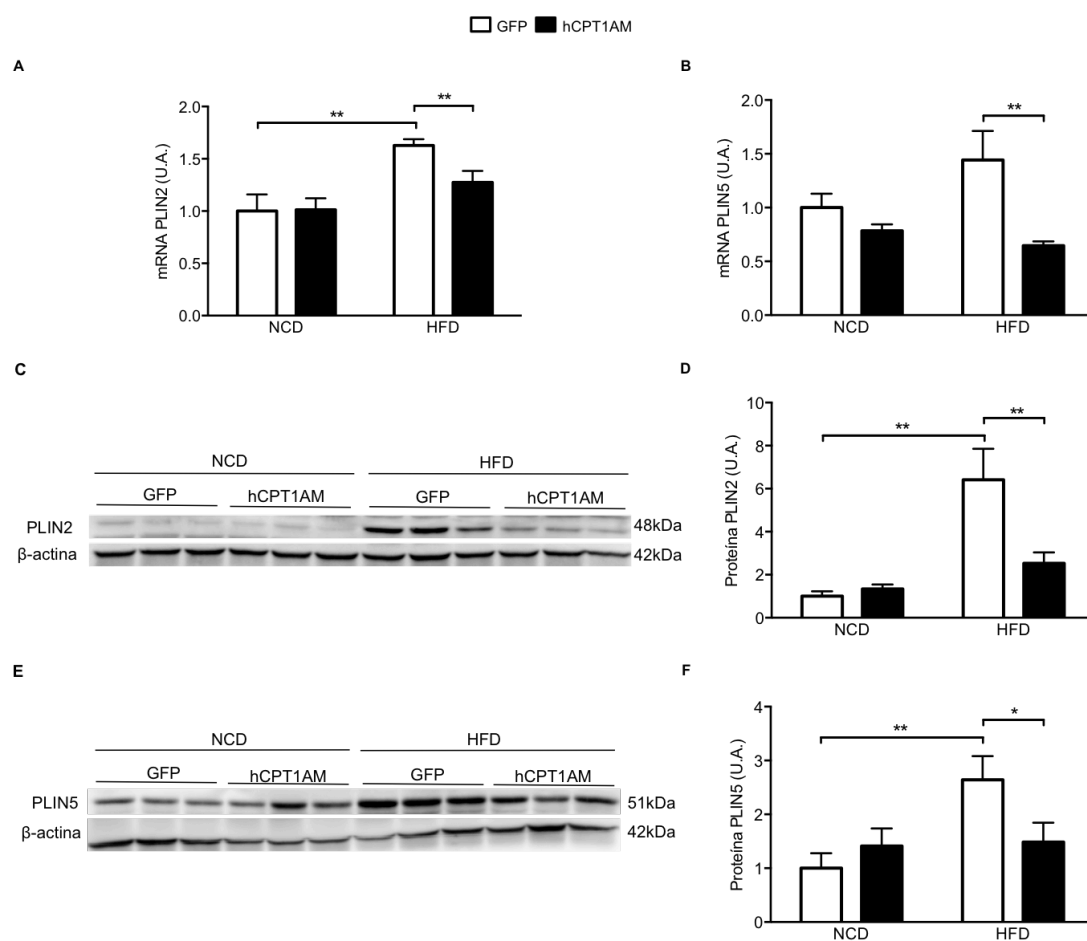


Figura 35. Análisis de los niveles de mRNA y proteína de PLIN2 y PLIN5. Cambios en los niveles de mRNA **A)** de PLIN2. **B)** de PLIN5. **C)** Niveles de PLIN2 en extractos proteicos totales (40µg) de hígado. **D)** Cuantificación del WB de PLIN2 utilizando como normalizador la β-actina. **E)** Niveles de PLIN5 en extractos proteicos totales (40µg) de hígado. **F)** Cuantificación del WB de PLIN5 utilizando como normalizador la β-actina. n=6. *P≤0,05. **P≤0,01. NCD: *Normal Chow Diet* y HFD: *High Fat Diet*. Se normaliza tomando el valor de 1 en los animales infectados con los virus AAV-GFP y alimentados con la dieta control.

En la figura 35 C y D se observa que el aumento de 6,54 veces de los niveles de proteína de PLIN2 inducidos por la dieta grasa están fuertemente reducidos en los animales que sobreexpresan la hCPT1AM. Estos resultados están de acuerdo con los niveles de mRNA de PLIN2 analizados (figura 35A).

En la figura 35E y F se observa también una fuerte reducción de los niveles de proteína de PLIN5 en los animales tratados con AAV-hCPT1AM respecto a la que presentan los animales HFD-GFP. Estos resultados concuerdan con los niveles de mRNAs analizados de PLIN5 (figura 35B).

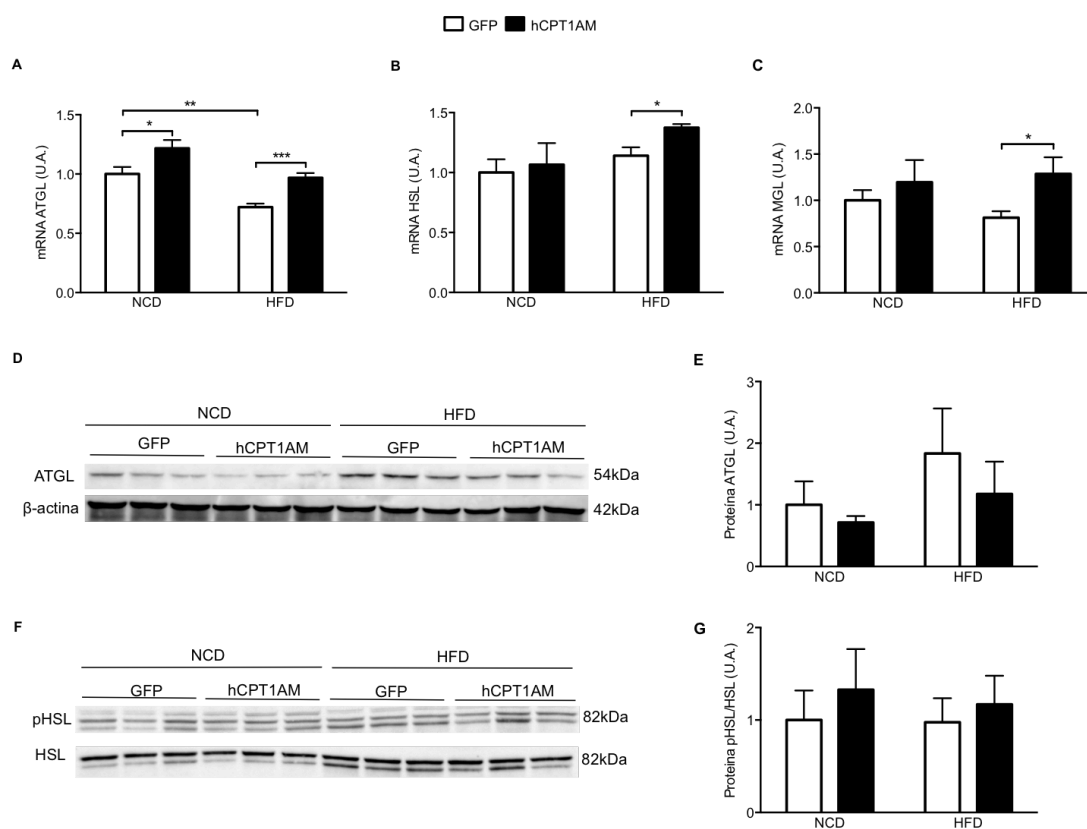


Figura 36. Análisis de los niveles de distintas lipasas involucradas en el proceso de lipolisis.

Cambios en los niveles de mRNA: **A)** de ATGL. **B)** de HSL. **C)** de MGL. **D)** WB representativo de los niveles de proteína de ATGL en extractos proteicos totales (40ug) de hígado. **E)** Cuantificación del WB de ATGL utilizando como normalizador la β -actina. **F)** WB representativo de los niveles de proteína pHSL. **G)** Cuantificación del WB de pHSL utilizando como normalizador la HSL total. Muestras analizadas en hígado a las 11 semanas de inyección de los virus en ratones alimentados con dieta grasa y control. n=6. *P<0,05. **P<0,01. NCD: *Normal Chow Diet* y HFD: *High Fat Diet*. Se normaliza tomando el valor de 1 en los animales infectados con los virus AAV-GFP y alimentados con la dieta control.

También se analizaron los niveles de mRNA y proteína de las lipasas implicadas en el proceso de la lipólisis: ATGL, HSL y MGL. En la figura 36 se observan una restauración de los niveles de mRNA de los genes ATGL, HSL y MGL con aumentos de 1,34 , 1,39 y 1,58 veces en los animales tratados con AAV-hCPT1AM y alimentados con dieta grasa respecto a sus controles HFD-GFP. A nivel de proteína no se observaron variaciones en los niveles de ATGL ni HSL (figura 36D y E).

En conjunto todos estos resultados indican que la sobreexpresión de la hCPT1AM es capaz de reactivar el proceso lipolítico reprimido por acción de la dieta grasa.

4.13 Efecto de la expresión de hCPT1AM en el proceso de autofagia

Esta descrito que la autofagia regula el metabolismo lipídico hepático ¹³³. Dado que la lipólisis estaba restaurada en parte en los ratones con dieta grasa y que sobreexpresaban hCPT1AM quisimos saber si el proceso de autofagia también podía estar implicado en la disminución de los lípidos hepáticos en esos ratones. La autofagia es un proceso complejo y dinámico que comprende la generación de dobles membranas autofágicas, la fusión de autofagosomas con lisosomas y la degradación de los contenidos de carga. La autofagia puede controlarse mediante la expresión de LC3BI, que durante la autofagia transloca del citosol a las membranas de los autofagosomas por lipidación de la forma citosólica LC3BI resultante en la forma LC3BII unidas a la membrana.

En este apartado se analizaron los marcadores de autofagia a tiempo final en hígado de los ratones en el momento del sacrificio y el flujo en hepatocitos. Analizamos por WB la expresión de las proteínas LC3I, LC3II y p62, así como los niveles de mRNA.

Analizamos a través de RT-PCR la expresión de mRNA en el hígado de estos animales. Como muestra la figura 37A, los niveles de LC3 están 1,29 veces aumentados en los animales tratados con el AAV-hCPT1AM y alimentados con dieta grasa comparados con el control HFD-GFP. Los niveles de p62 (figura 37B) no muestran diferencias en los animales alimentados con dieta grasa. La ATG7 (Proteína relacionada con autofagia 7), una proteína involucrada en la formación de LC3II, se muestra aumentada en 1,28 veces en los animales tratados con AAV-

hCPT1AM cuando comparados con su control HFD-GFP (figura 37C). En el análisis de los extractos totales de hígado de LC3BII (figura 37D) mostraron un aumento de 3,5 veces en ratones tratados con AAV-hCPT1AM en comparación con ratones AAV-GFP alimentados con dieta grasa (figura 37E). El acumulo de LC3BII puede resultar de la inducción de la autofagia o reflejar un fracaso de degradación autolisosomal. Para discernir entre ambos procesos se analizaron los niveles de proteína p62, una proteína que se deteriora al final del proceso de autofagia y sirve para confirmar el destino del acumulo de LC3II. El aumento de LC3II fue paralela a la disminución en 2,11 veces de los niveles de p62 en los animales tratados con AAV-hCPT1AM comparados con el control AAV-GFP alimentados con dieta grasa (figura 37E y F). Todo ello indica que el proceso de autofagia está llegando al final.

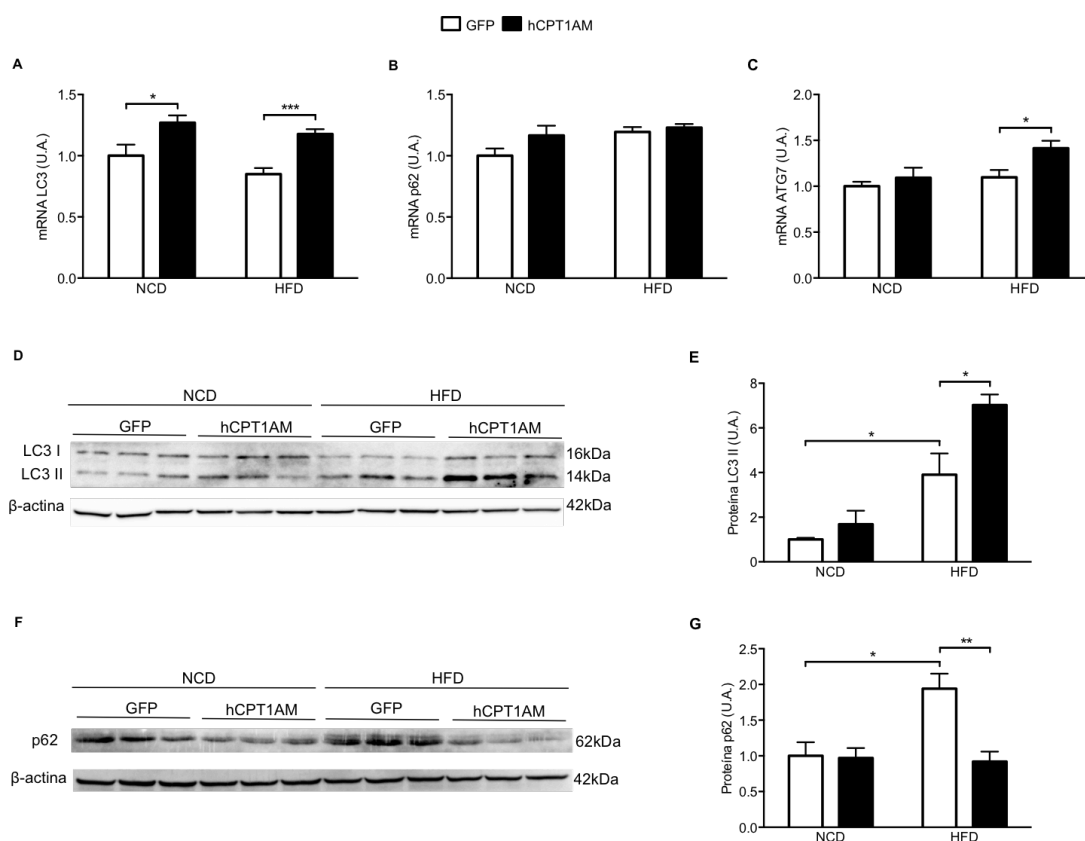


Figura 37. Análisis de la autofagia hepática. Cambios en los niveles de mRNA: **A)** de LC3. **B)** de p62. **C)** de ATG7. **D)** Niveles de LC3I, LC3II en extractos totales (40µg) de hígado. **E)** Cuantificación del WB de LC3I y LC3II utilizando como normalizador la β-actina. **F)** Niveles de p62 en extractos totales (40µg) de hígado. **G)** Cuantificación del WB de p62 utilizando como normalizador la β-actina. Muestras de animales tratados con 11 semanas de AAV. n=6. *P≤0,05. **P≤0,01. ***P≤0,001. NCD: *Normal Chow Diet* y HFD: *High Fat Diet*. Se normaliza tomando el valor de 1 en los animales infectados con los virus AAV-GFP y alimentados con la dieta control.

Para estudiar el flujo de autofagia se utilizaron cultivos primarios de hepatocitos obtenidos de los animales tratados con los virus. Los hepatocitos fueron tratados con un inhibidor de la autofagia (cloroquina - CQ) como se ha descrito en el apartado 4.3.2 de materiales y métodos.

Primero se analizó la influencia de la CQ en hepatocitos y se observó que los hepatocitos tratados con CQ y con el AAV-hCPT1AM presentan un aumento del acumulo de LC3II de 1,92 veces comparado con los hepatocitos de los animales tratados con GFP y alimentados con dieta grasa (figura 38A y B). La acumulación de LC3II puede ser resultado de la inducción de la autofagia o reflejar un fracaso de la degradación autolisosomal. La observación de menores niveles de p62 en los animales tratados con HFD-hCPT1AM es sugestiva de inducción de la autofagia.

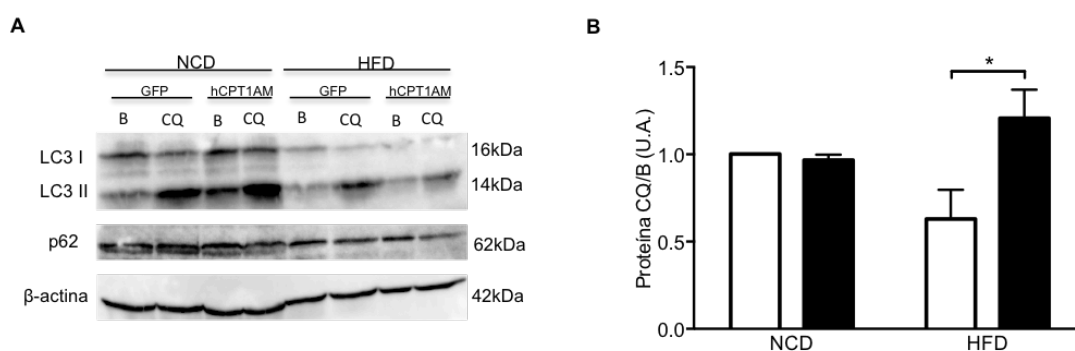


Figura 38. Análisis por WB del flujo de autofagia en hepatocitos de ratón. A) Niveles de proteína LC3 I, LC3II y p62 analizados por WB a partir de extractos proteicos totales (40ug) de hepatocitos tratados con 50 μ M de cloroquina por 3 h. **B)** Cuantificación de los niveles de proteína del WB. Niveles de degradación basal calculados dividiendo los niveles de LC3II del blanco de su respectiva cloroquina. Imagen representativa de 3 experimentos. B= blanco, CQ= cloroquina, NCD: *Normal Chow Diet* y HFD: *High Fat Diet*.

4.14 Análisis de la síntesis de lípidos

Una de las principales consecuencias que se asocian a la obesidad es la acumulación ectópica de grasas. Una dieta rica en grasas produce toda una serie de cambios en el metabolismo lipídico y por ello se han estudiado varias vías del metabolismo lipídico como la síntesis de AGs, síntesis de TG.

Se han estudiado los cambios en los niveles de mRNA de los genes acetil-CoA carboxilasa 1 (ACC1) y 2 (ACC2) que catalizan la formación del malonil-CoA que es el precursor para la formación de AGs y a su vez inhibidor fisiológico de la CPT1. La ACC1 es citosólica y está directamente involucrada en la síntesis de AGs

(McGarry, 1997). ACC2 es mitocondrial y está más involucrada en la inhibición de la oxidación- β mitocondrial (Postic C, 2008). Tal y como se observa en la figura 39A y B los niveles de mRNA de ACC1 y ACC2 están disminuidos en 3,51 y 2,90 veces respectivamente por efecto de la dieta grasa y en el caso de ACC1 el tratamiento con AAV-hCPT1AM causa una mayor represión disminuyendo 1,60 veces los niveles de mensajeros, cosa que no se observa con ACC2. A continuación se analizaron por WB los niveles de proteína de sintasa de AGs (FAS) en extracto totales de hígado (figura 39E y F). Se observó que la dieta grasa produce una disminución de 2,94 veces de los niveles de proteína respecto al grupo control. La sobreexpresión de hCPT1AM revierte en parte el efecto de la dieta grasa dando lugar a un aumento de 2 veces de los niveles de proteína. Todo ello indicaría que la síntesis de *nov*o de los AGs estaría disminuida con una dieta grasa y que con la sobreexpresión de hCPT1AM se sigue manteniendo dicho efecto.

Por otro lado se han estudiado los niveles de mRNA de la desaturasa esteroil-CoA 1 (SCD1) y la diacilglicerol-aciltransferasa 2 (DGAT2) como indicadores de la esterificación y la formación de TG. La SCD1 cataliza la desaturación de los AGs saturados y es la enzima responsable de la síntesis de nuevo los AGs monoinsaturados, mientras que la DGAT2 cataliza el último paso para la síntesis de los TG. Los niveles de mRNA de ambos genes están reprimidos por efecto de la dieta grasa en 4,44 veces para SCD1 y 2,22 veces para DGAT2 (figuras 39C y D). Dicha represión se ve completamente revertida para DGAT2 cuando los animales con dieta grasa tienen sobreexpresada la hCPT1AM indicando una normalización en almacenamiento de los AGs en hígado. En el caso de la SCD1 dicha reversión fue mucho menor.

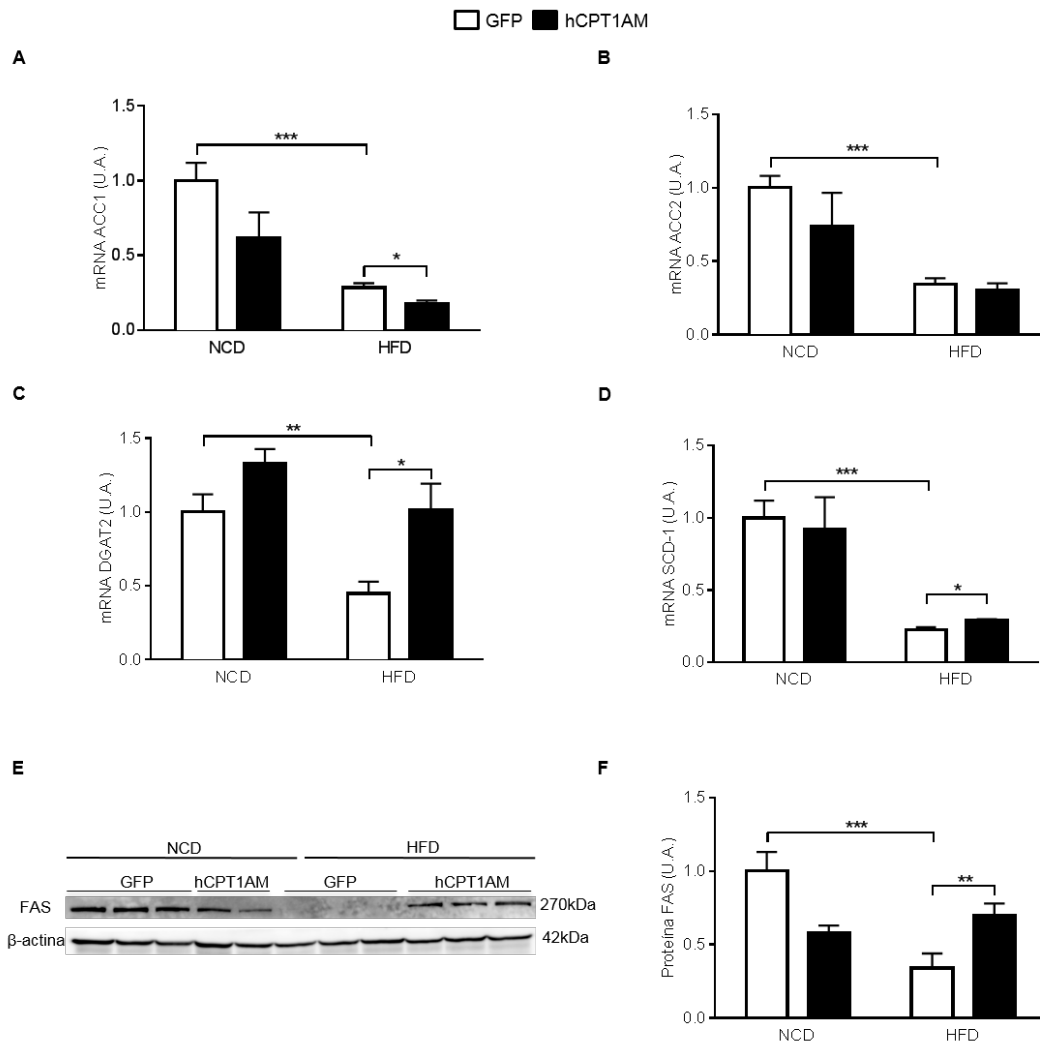


Figura 39. Análisis de diferentes genes implicados en el metabolismo lipídico. Se determinaron los niveles de expresión de mRNA de **A)** ACC1, **B)** ACC2, **C)** DGAT2 y **D)** SCD1. **E)** WB representativo de los niveles de FAS en extractos totales (20µg) de hígado. **F)** Cuantificación del WB de FAS utilizando como normalizador la β-actina. n=6. *P≤0,05. **P≤0,01. ***P≤0,001. NCD: *Normal Chow Diet* y HFD: *High Fat Diet*. Se normaliza tomando el valor de 1 en los animales infectados con los virus AAV-GFP y alimentados con la dieta control.

4.15 Análisis lipídico de hígado y suero

Con el fin de buscar biomarcadores no invasivos útiles como indicadores de una mejora de la obesidad se han analizado por ESI-MS y en colaboración con el grupo de las Dras. Fina Casas y Gema Fabrias (CSIC-Barcelona) 235 especies lipídicas correspondientes a TG (39), DAG (25), esfingolípidos (60), fosfolípidos (67) y CE (38).

En hígado, tal como era de esperar, hemos observado una disminución significativa de los TG totales (figura 40A), así como una disminución en la mayoría de las especies estudiadas (figura 40B y C). No se muestran las especies que no mostraron cambios.

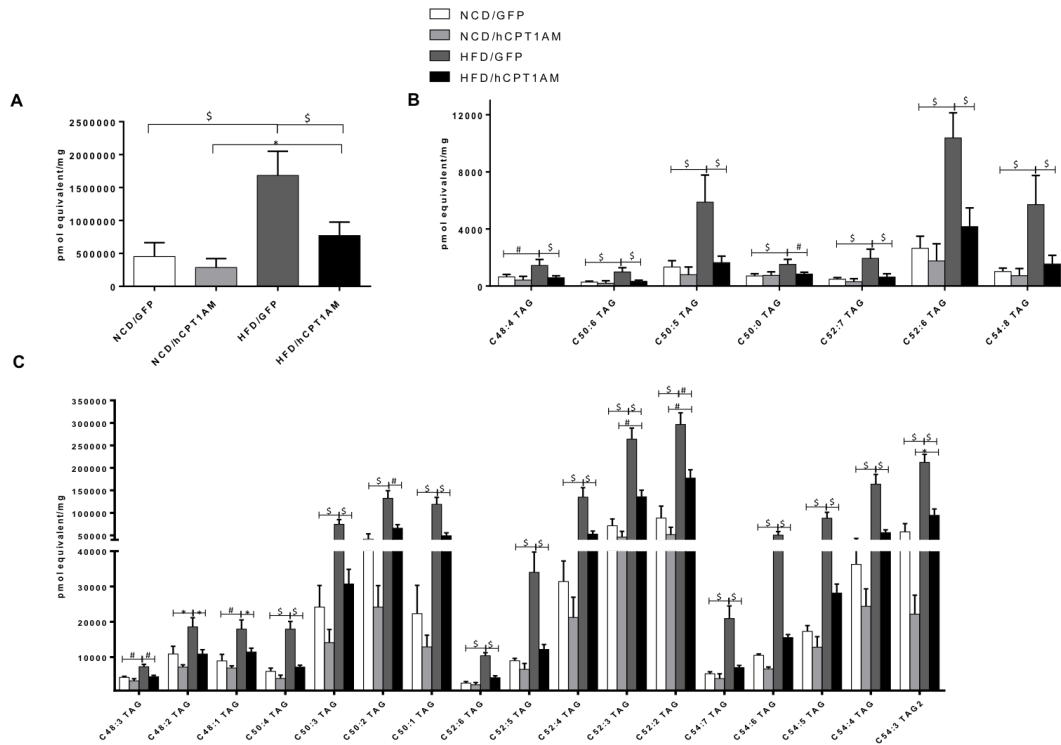


Figura 40. Análisis de TG en hígado. A) Concentración total de las 39 especies de TG analizadas. B) Análisis de las concentraciones de las especies de TG poco abundantes en hígado. C) Análisis de las concentraciones de las especies de TG más abundantes en hígado. n=4-6. *P<0,05. #P<0,01. \$P<0,001. NCD: *Normal Chow Diet* y HFD: *High Fat Diet*.

En cambio en suero, los animales tratados con HFD-hCPT1AM no disminuyen sus niveles de TG totales (figura 41A), lo que está de acuerdo con los valores obtenidos en suero (tabla 1). Sin embargo se observa una reducción en los ratones obesos tratados con AAV-hCPT1AM de las especies con contenido en AGs de mayor longitud de cadena como 50:1, 54:5, 54:4 e 54:3 (figura 41B) y que podrían servir como biomarcadores.

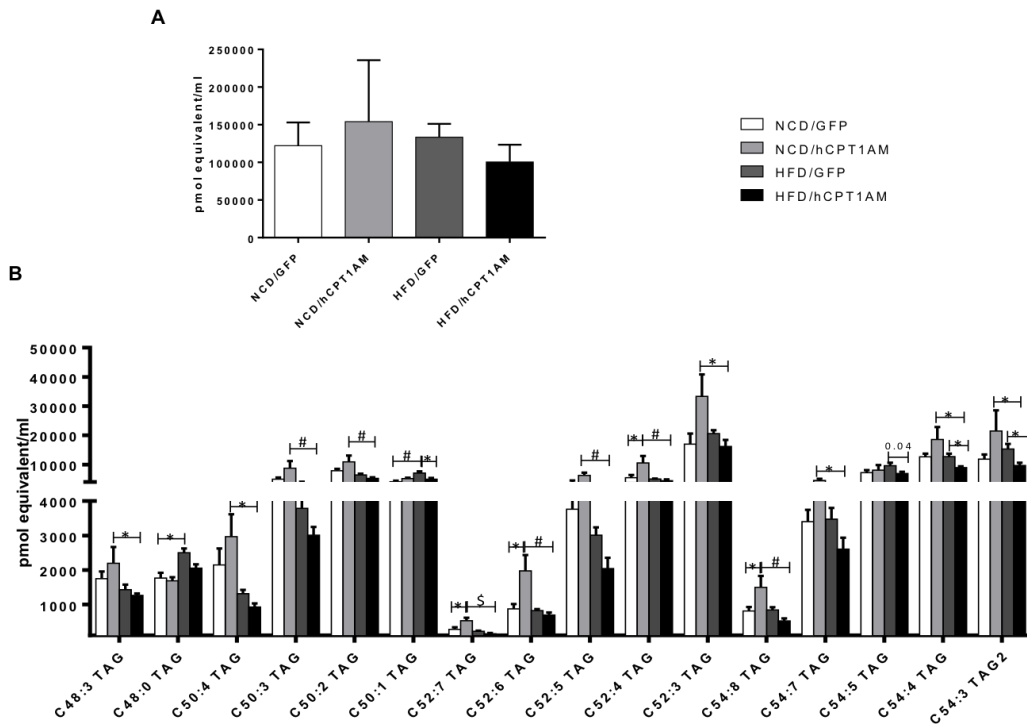


Figura 41. Análisis de TG en suero. A) Concentración total de las 39 especies de TG analizadas. **B)** Análisis de las concentraciones de las especies de TG más abundantes en suero. n=4-6. *P≤0,05. #P≤0,01. \$P≤0,001. NCD: *Normal Chow Diet* y HFD: *High Fat Diet*.

En cuanto a los niveles de DAG hemos observado que en hígado de los ratones obesos tratados con AAV-hCPT1AM se produce una disminución masiva de todas las especies que también repercute en su computo total (figura 42C y D). En cambio en suero no se observa dicha reducción (figura 42A y B).

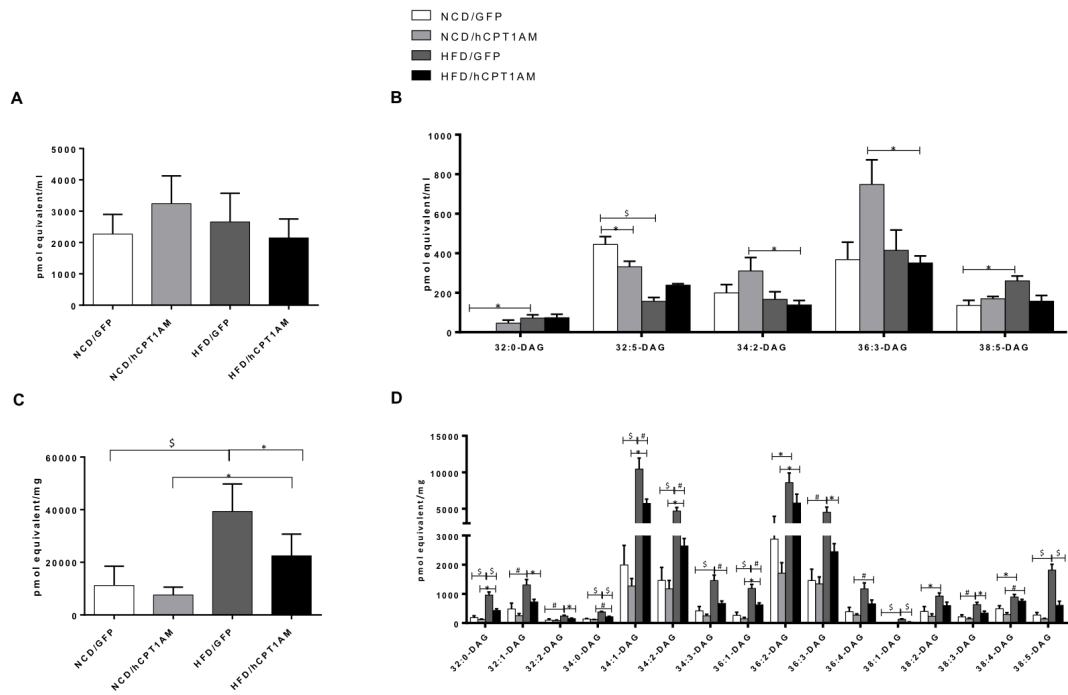


Figura 42. Análisis de DAG en suero y hígado. A) Concentración total de las 25 especies de DAG analizadas en suero. **B)** Análisis de las concentraciones de las especies de DAG más abundantes en suero. **C)** Concentración total de las 25 especies de DAG analizadas en hígado. **D)** Análisis de las concentraciones de las especies de DAG más abundantes en hígado. n=4-6. *P≤0,05. #P≤0,01. \$P≤0,001. NCD: Normal Chow Diet y HFD: High Fat Diet.

El análisis de fosfolípidos se llevó a cabo para las especies de fosfatidilcolinas (PC), lisofosfatidilcolinas (LPC) y plasmalógenos. Sólo se han representado aquellas especies que presentaban algún tipo de cambio en alguno de los 4 grupos de ratones analizados.

En hígado se ha observado que las especies de menor peso molecular y con cadenas de AGs mas cortas disminuyen con la dieta grasa mientras que las especies con cadenas de AGs más largas aumentan con la dieta grasa. La especie 38:3 es la única que disminuye en los ratones obesos tratados con AAV-hCPT1AM respecto a sus controles (figura 43C).

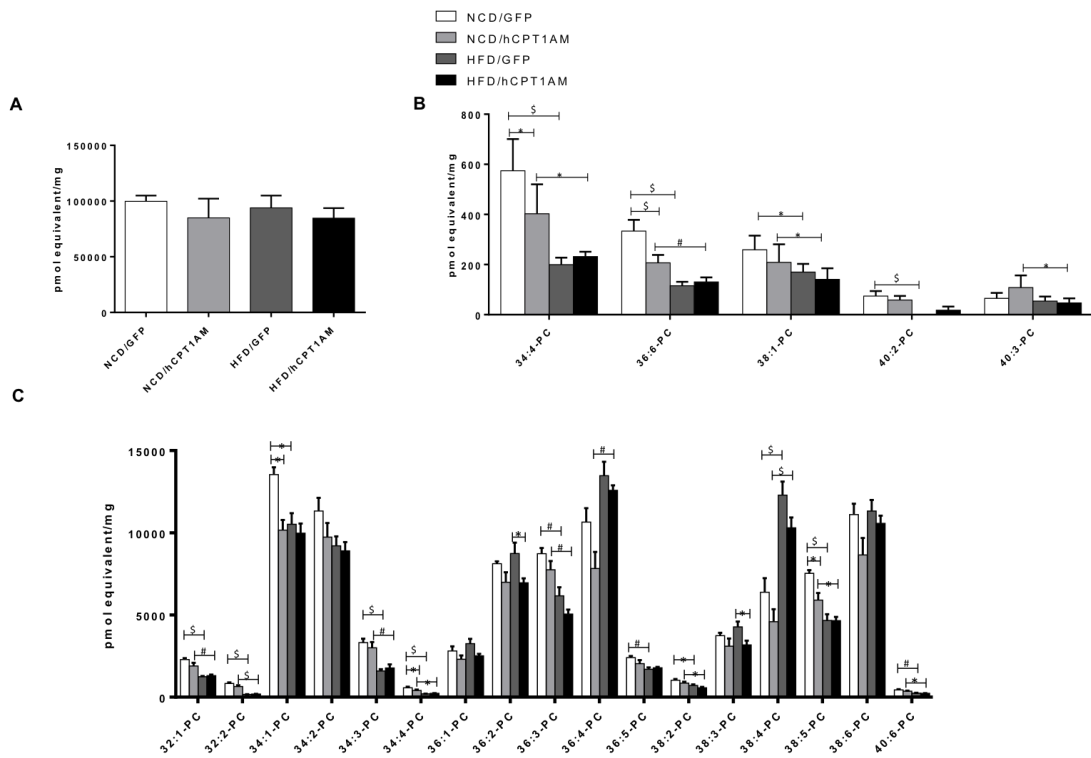


Figura 43. Análisis de fosfatidilcolinas en hígado. A) Valores totales de fosfatidilcolinas en hígado. **B)** Fracciones de fosfatidilcolinas en hígado. **C)** Fracciones de fosfatidilcolinas en hígado. n=4-6. *P≤0,05. #P≤0,01. \$P≤0,001. NCD: *Normal Chow Diet* y HFD: *High Fat Diet*.

En suero se observa una disminución de algunas de las especies más abundantes como 32:0 36:3 y 38:3 (figura 44). Es interesante destacar que la especie 38:3 disminuye tanto en hígado como en suero siendo esta una buena candidata a ser considerada un futuro biomarcador.

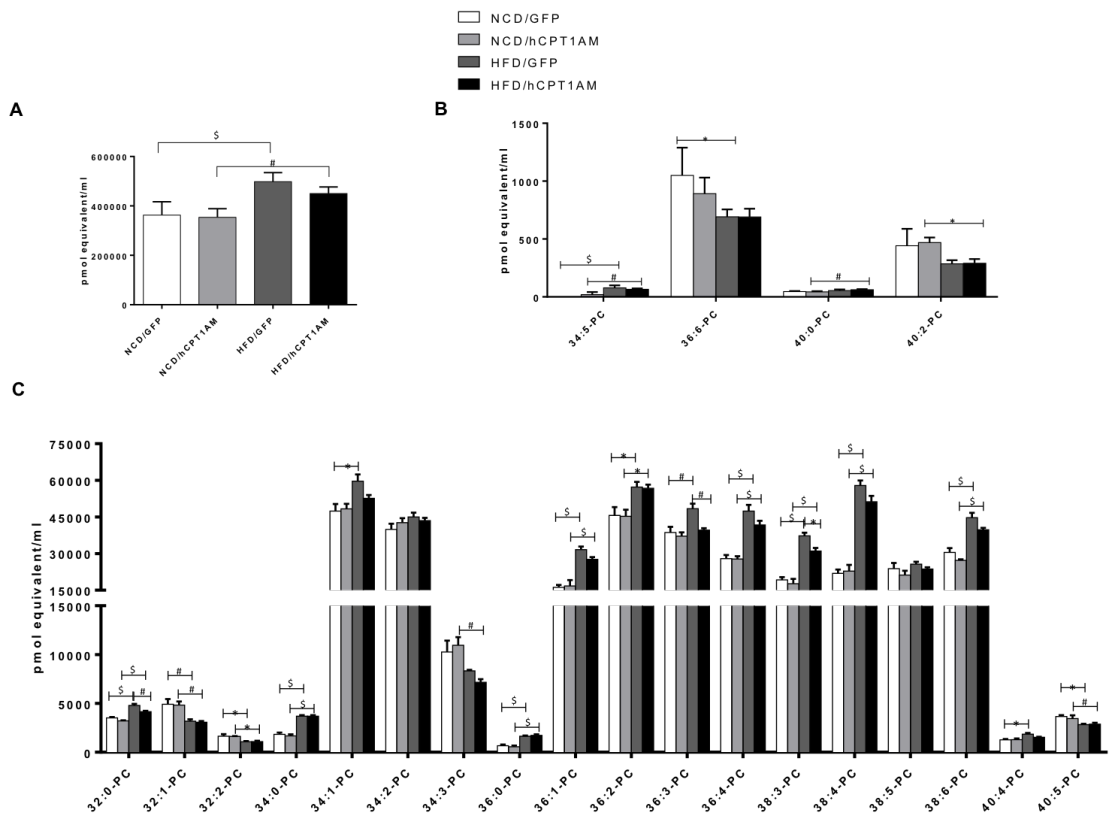


Figura 44. Análisis de fosfatidilcolinas en suero. A) Valores totales de fosfatidilcolinas en suero. **B)** Fracciones de fosfatidilcolinas en suero. **C)** Fracciones de fosfatidilcolinas en suero. n=4-6. *P<0,05. #P<0,01. \$P<0,001. NCD: *Normal Chow Diet* y HFD: *High Fat Diet*.

El análisis de las especies de LPCs en hígado mostró un aumento con dieta grasa de dos de las especies 16:0 y 18:0 que fueron revertidos en los ratones que expresan hCPT1AM (figura 45C y D). En cambio en suero estos cambios no se observan (figura 45A y B).

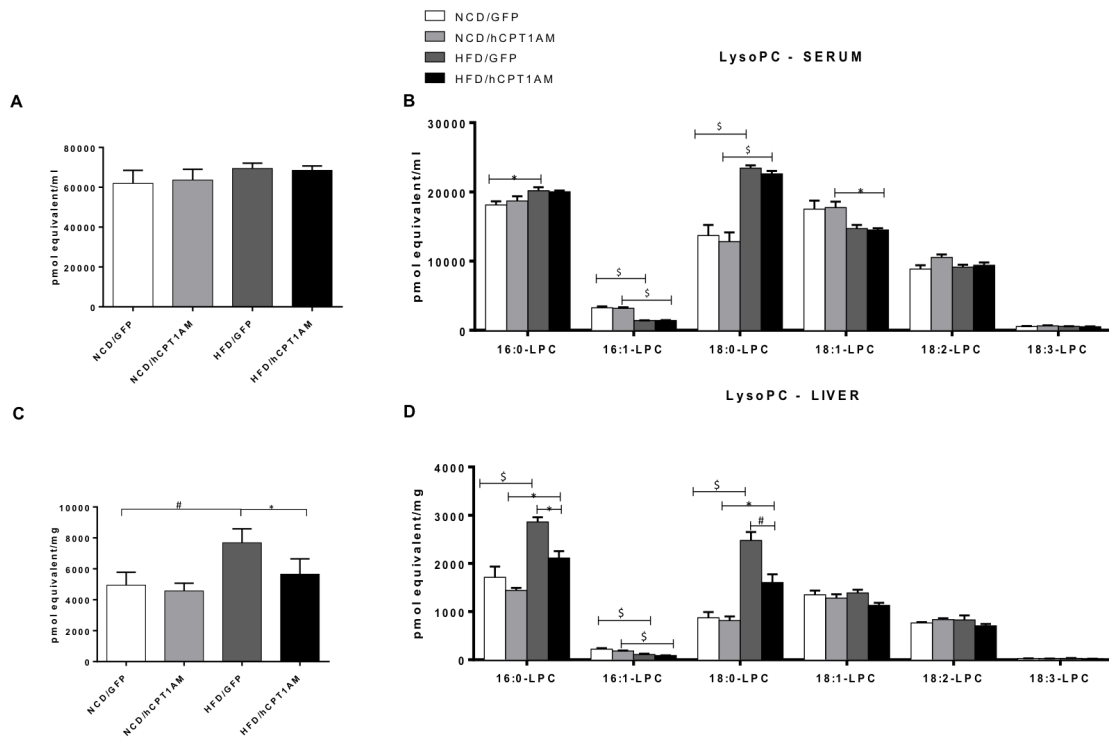


Figura 45. Análisis de lisofosfatidilcolinas en suero y hígado. A) Valores totales de lisofosfatidilcolinas en suero. **B)** Fracciones de lisofosfatidilcolinas en suero. **C)** Valores totales de lisofosfatidilcolinas en hígado. **D)** Fracciones de lisofosfatidilcolinas en hígado. n=4-6. *P≤0,05. #P≤0,01. \$P≤0,001. NCD: *Normal Chow Diet* y HFD: *High Fat Diet*.

En el análisis de los esfingolípidos pudimos observar tal como está descrito que con la dieta grasa se produce el aumento de ceramidas con respecto a los ratones con dieta control. Cabe destacar que en hígado las especies 16:0, 18:0, 20:0, 22:0, 22:1 y 24:2 mostraron una disminución en los ratones obesos tratados con AAV-CPT1AM respecto a sus controles (figura 46). En suero también mejoraron las especies de Cer 18:0, 20:0, 22:1 and 24:2, pudiéndose considerar todas ellas posibles biomarcadores en un futuro (figura 47).

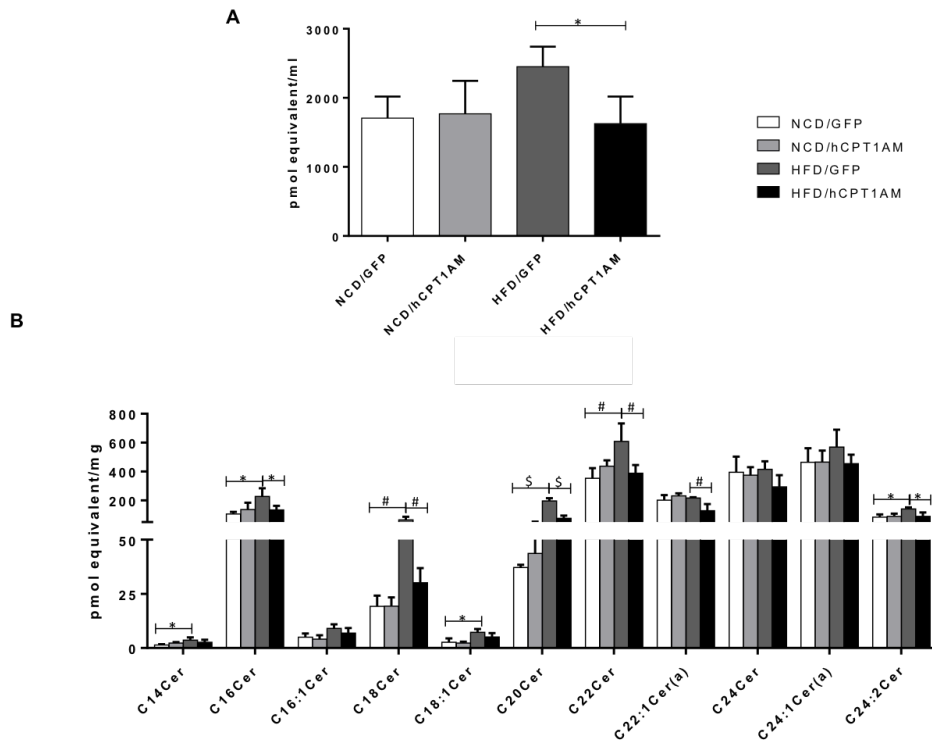


Figura 46. Análisis de las ceramidas en hígado. A) Valores totales de ceramidas en hígado. **B)** Fracciones de ceramidas en hígado. n=4-6. *P≤0,05. #P≤0,01. \$P≤0,001. NCD: *Normal Chow Diet* y HFD: *High Fat Diet*.

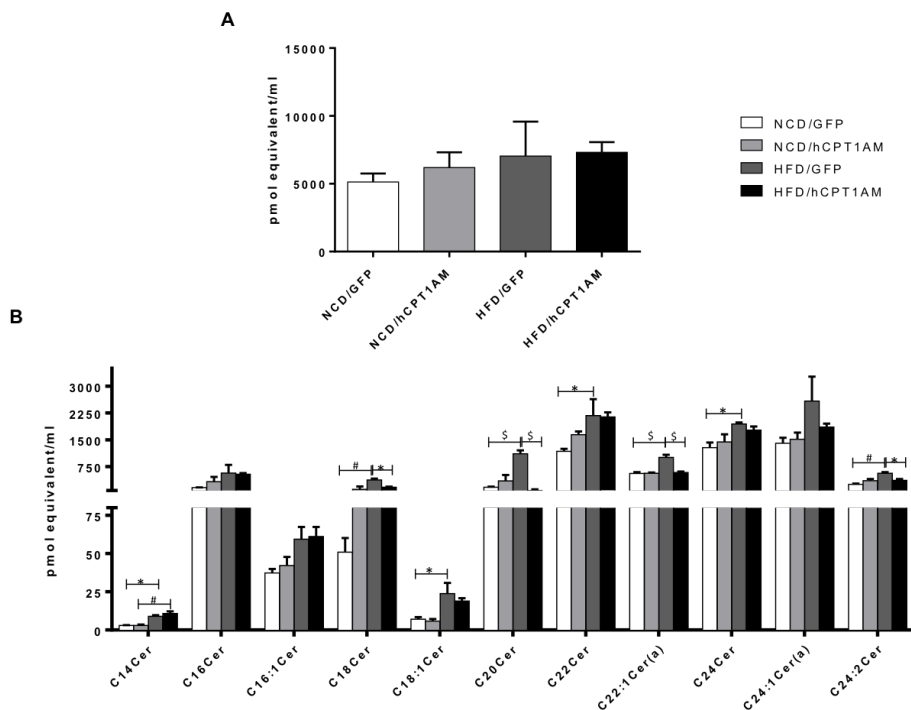


Figura 47. Análisis de las ceramidas en suero. A) Valores totales de ceramidas en suero. **B)** Fracciones de ceramidas en suero. n=4-6. *P≤0,05. #P≤0,01. \$P≤0,001. NCD: *Normal Chow Diet* y HFD: *High Fat Diet*.

El análisis de las dihidroceramidas (DHCer) en hígado (figura 48C y D) no se observaron cambios significativos en las DHCer totales, solamente en la DHCer 22:0 se observó una reducción en los ratones obesos tratados con AAV-hCPT1A con respecto a los ratones obesos control. En suero (figura 48A y B) las especies 20:0 y 24:0 se muestran disminuidas en los animales obesos tratados con hCPT1AM respecto a los ratones obesos control.

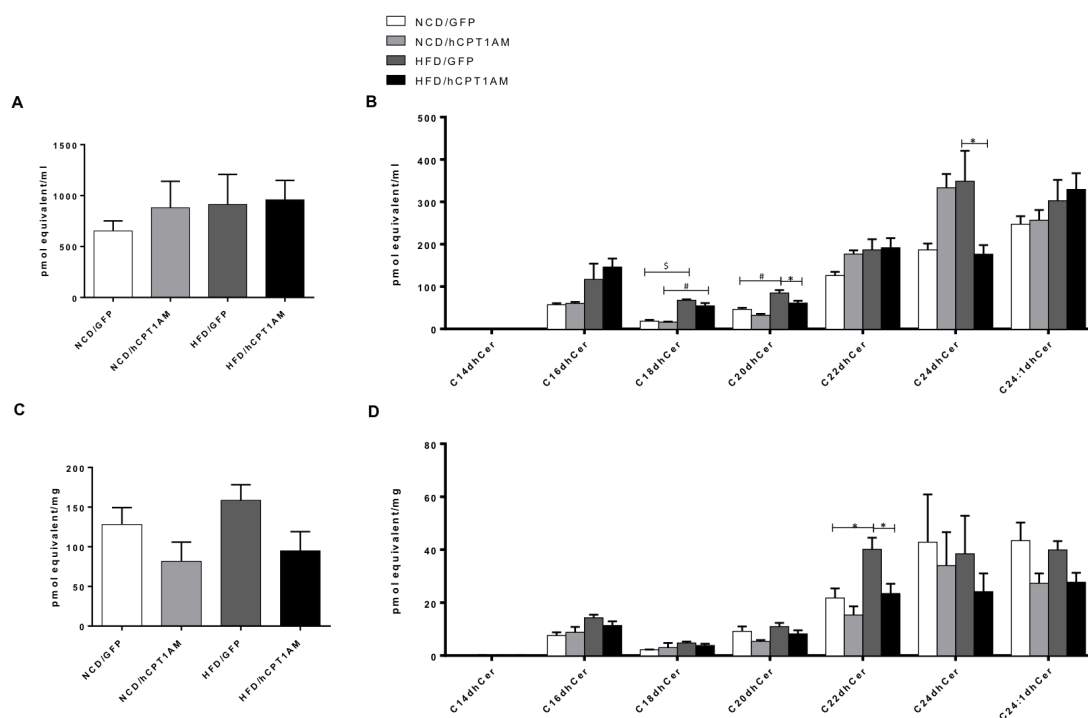


Figura 48. Análisis de dihidroceramidas en suero y hígado. **A)** Valores totales de dihidroceramidas en suero. **B)** Fracciones de dihidroceramidas en suero. **C)** Valores totales de dihidroceramidas en hígado. **D)** Fracciones de dihidroceramidas en hígado. n=4-6. * $P \leq 0,05$. # $P \leq 0,01$. \$ $P \leq 0,001$. NCD: *Normal Chow Diet* y HFD: *High Fat Diet*.

En el análisis de las esfingomielinas no hemos observado cambios significativos en las esfingomielinas totales en suero ni en hígado (figura 49A y C). En cuanto a las especies hemos observado que la esfingomielina 20:0 estaría disminuida tanto en hígado como en suero de los ratones obesos tratados con AAV-CPT1AM respecto a los ratones obesos control que la tienen aumentada debido a la dieta grasa (figura 49B y C).

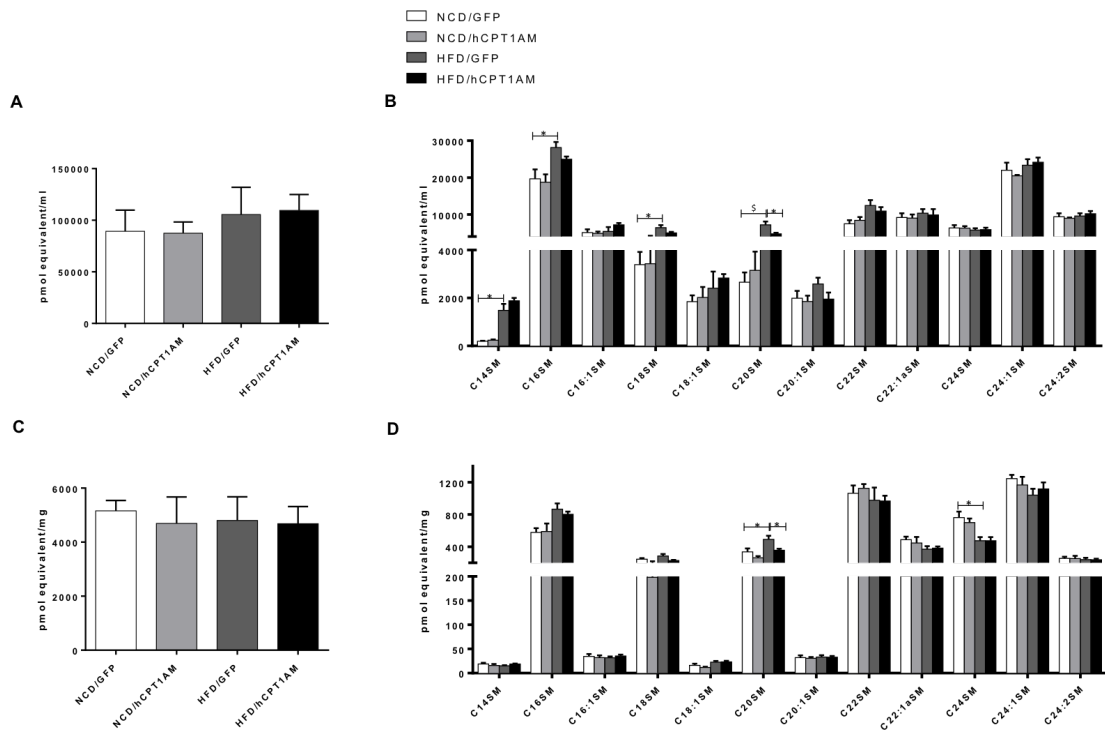


Figura 49. Análisis de esfingomielinas en suero y hígado. A) Valores totales de esfingomielinas en suero. **B)** Fracciones de esfingomielinas en suero. **C)** Valores totales de esfingomielinas en hígado. **D)** Fracciones de esfingomielinas en hígado. n=4-6. * $P \leq 0,05$. # $P \leq 0,01$. \$ $P \leq 0,001$. NCD: *Normal Chow Diet* y HFD: *High Fat Diet*.

4.16 Estudio del metabolismo del colesterol

El hígado es un órgano clave implicado en la regulación del metabolismo del colesterol y adquiere el colesterol proveniente de la síntesis *de novo* y de todas las clases de lipoproteínas plasmáticas⁶¹. El análisis de la síntesis *de novo* se llevó a cabo mediante la medición de los niveles de mensajeros del enzima clave de la vía la HMG-CoA reductasa. No se observó ningún cambio en los niveles de mensajeros de este enzima en ninguno de los cuatro grupos de animales (datos no mostrados) indicando que no había cambios en al síntesis *de novo*.

Dado que los niveles de colesterol total y de colesterol unido a LDLs en sangre estaban disminuidos en los ratones obesos tratados con AAV-hCPT1AM respecto a los ratones obesos control (Tabla1) se procedió al análisis de los receptores de las lipoproteínas plasmáticas: de LDLr (receptor de lipoproteína de baja densidad), VLDLr (receptor de proteína de muy baja densidad) y LRP1 (proteína relacionada con el receptor de lipoproteína de baja densidad 1) para determinar la causa de la mejora de los niveles de colesterol. Este estudio se llevó

a cabo en colaboración con el grupo de la Dra. Vicenta Llorente-Cortés (Institut Català de Ciències Cardiovasculars (ICCC), Hospital Santa Creu i Sant Pau, Barcelona). En la figura 50A y B se observa que el aumento inducido por la dieta grasa de los niveles de LDLr se revierte en los animales con sobreexpresión de hCPT1AM. No se observan cambios significativos en los niveles de VLDLr y LRP1. Esto sugiere que restablecemos el metabolismo del colesterol en los animales tratados con HFD-hCPT1AM.

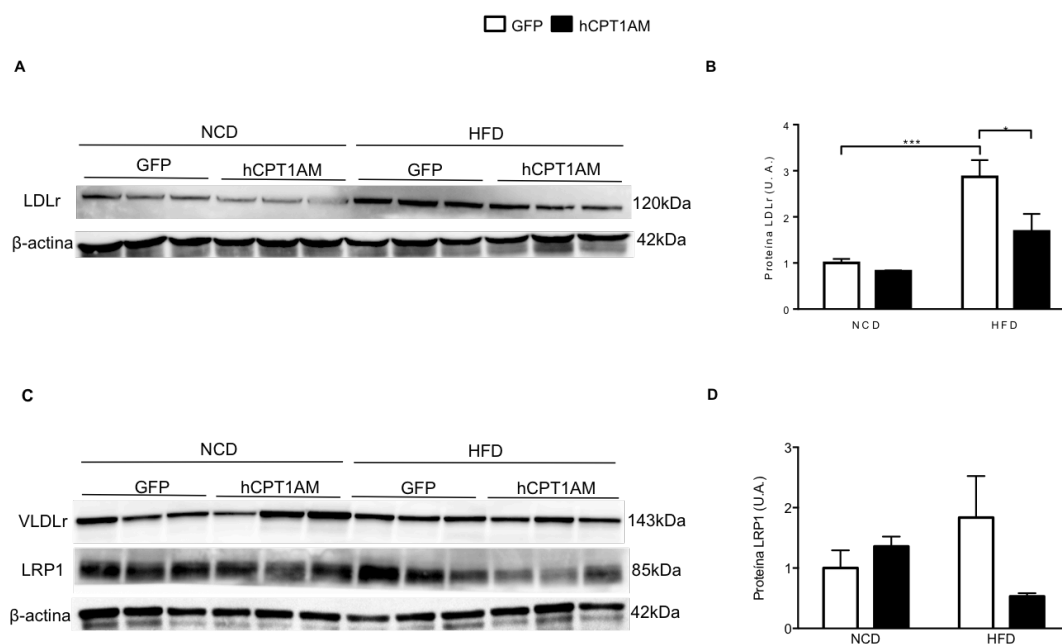


Figura 50. Análisis por WB de los niveles de proteína de los receptores de LDL, VLDL y LRP1 en hígado. **A)** Niveles de LDLr en extractos proteicos totales (40 μ g) de hígado. **B)** Cuantificación del WB de LDLr utilizando como normalizador la β -actina. **C)** Niveles de VLDLr y LRP1 en extractos proteicos totales (40 μ g) de hígado. **D)** Cuantificación del WB de LRP1 utilizando como normalizador la β -actina. n=6. *P \leq 0,05. **P \leq 0,01. NCD: *Normal Chow Diet* y HFD: *High Fat Diet*. Se normaliza tomando el valor de 1 en los animales infectados con los virus AAV-GFP y alimentados con la dieta control.

También analizamos la exportación en el hígado de TG y colesterol. El exceso de lípidos se puede acumular en el hígado en forma de TG y colesterol o se exportan ambos a la sangre en forma de VLDL. Para evaluar la exportación de VLDL por parte del hígado se analizaron los niveles de mRNA de la proteína de transporte de TG microsomal (MTP), proteína necesaria para la formación y secreción de la ApoB. Tal y como se muestra en la figura 51A los niveles de mRNA de la MTP de los animales que expresan la GFP alimentados con dieta grasa se

encuentran 1,53 veces disminuidos respecto al grupo de animales con dieta control. Sin embargo la sobreexpresión de hCPT1AM no revierte esos efectos. En cambio sí que se observó una reversión de los efectos de la dieta grasa en los niveles de mRNAs de los transportadores ABC, que son una familia de proteínas integrales de membrana que transportan activamente una variedad de pequeñas moléculas a través de la membrana de las células, al sobreexpresar la hCPT1AM. Así se observa en la figura 51B y C. Los niveles de mRNAs disminuidos en 1,59, 1,88 y para ABCA1 y ABCG5 en los animales con dieta grasa se recuperaron prácticamente en los animales que sobreexpresaban la hCPT1AM. Los animales tratados con AVV-hCPT1AM presentan un incremento de 1,87 veces en los niveles de ABCG8 comparados con el grupo GFP alimentado con dieta grasa. En los animales tratados con AAV-GFP no se observaron diferencias entre las dietas (figura 51D).

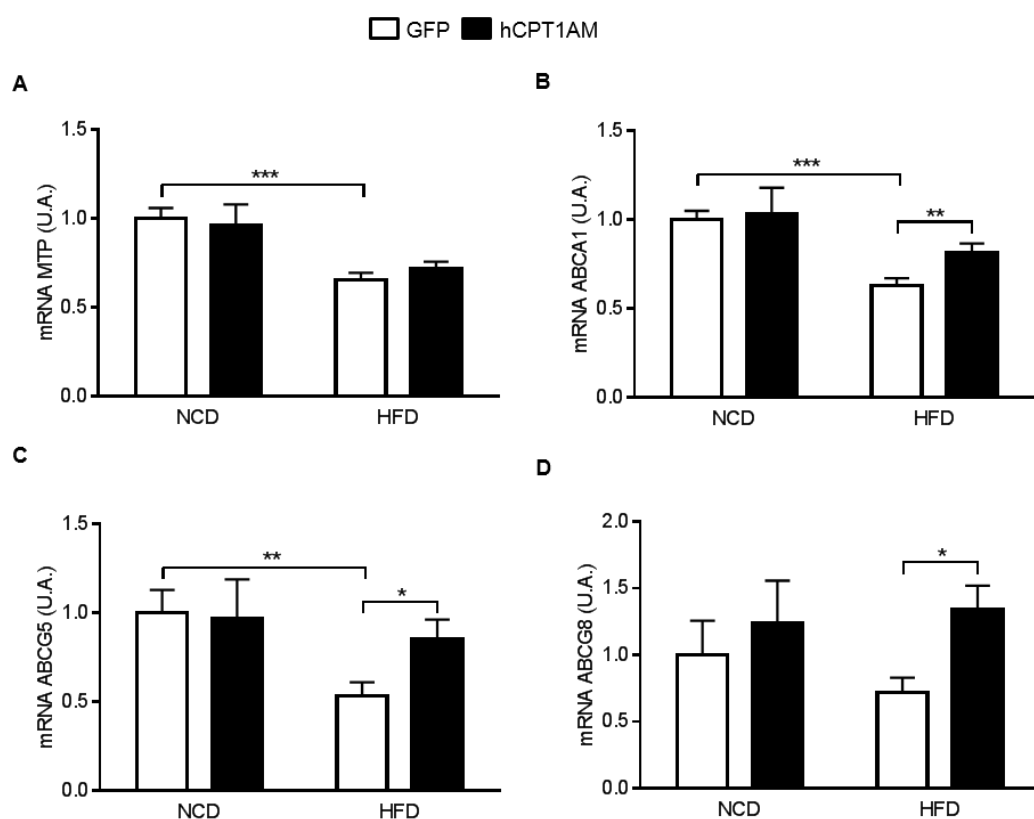


Figura 51. Análisis por PCR a tiempo real de la alteración de diferentes genes implicados en el flujo del colesterol. Se determinaron los niveles de mRNA de **A) MTP, B) ABCA1, C) ABCG5 y D) ABCG8.** n=6. *P≤0,05. **P≤0,01. ***P≤0,001. NCD: *Normal Chow Diet* y HFD: *High Fat Diet*. Se normaliza tomando el valor de 1 en los animales infectados con los virus AAV-GFP y alimentados con la dieta control.

Los estudios de lipidómica sobre las 38 especies de CE en hígado y en suero mostraron un aumento en su conjunto en los ratones obesos control y con una tendencia aunque no significativa a disminuir en los ratones obesos tratados con AAV-hCPT1A. De las 38 especies analizadas se muestran en las figuras 52 y 53 solo aquellas especies que presentaron algún tipo de cambio entre los 4 grupos. Ninguna de ellas disminuyó de forma significativa en los ratones obesos tratados con AAV-hCPT1A respecto a sus controles obesos.

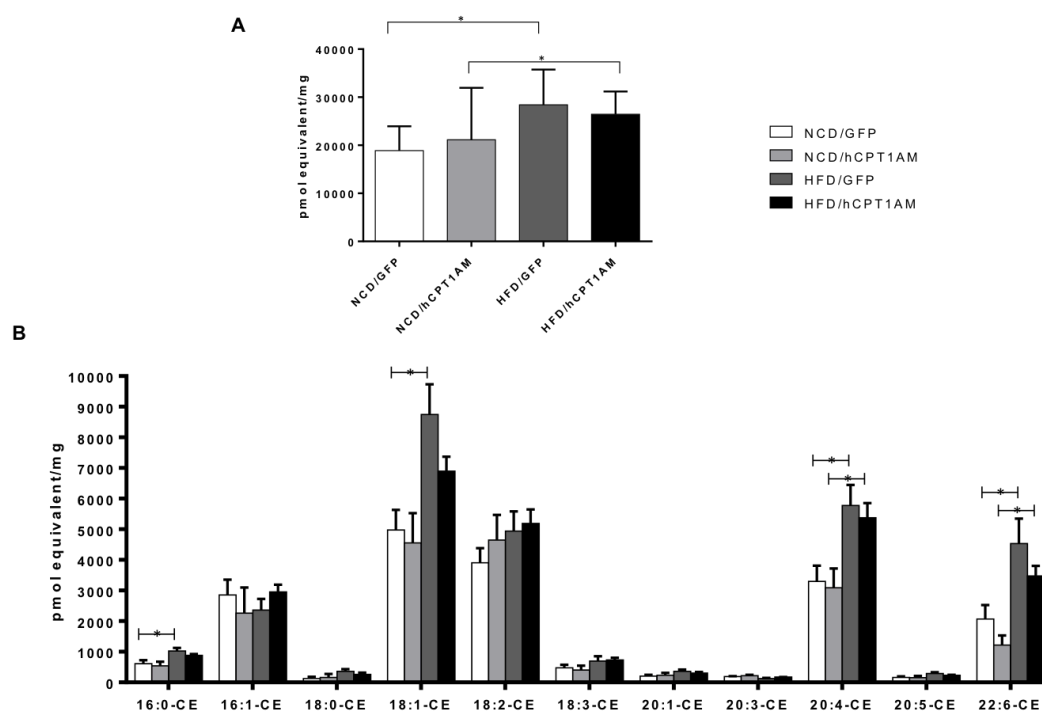


Figura 52. Análisis de los CE en hígado. A) Concentración total de las 38 especies de CE analizadas. B) Análisis de las concentraciones de las especies de CE más abundantes en hígado. n=4-6. *P≤0,05. #P≤0,01. \$P≤0,001. NCD: *Normal Chow Diet* y HFD: *High Fat Diet*.

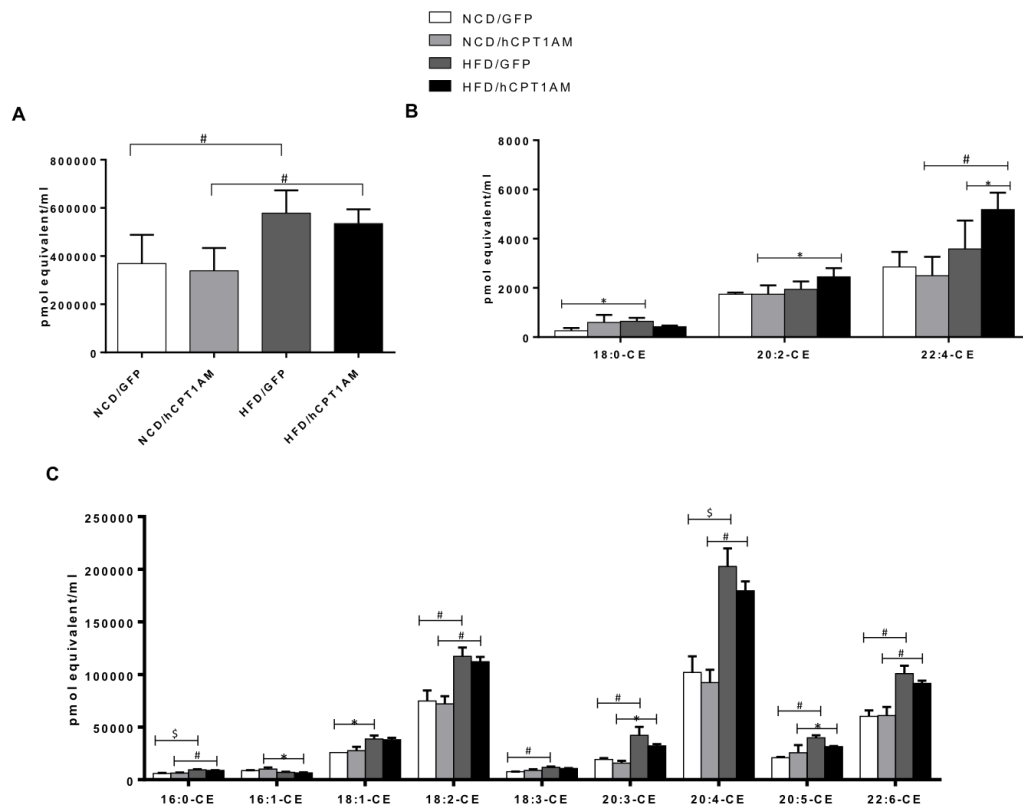


Figura 53. Análisis de los CE en suero. A) Concentración total de las 38 especies de CE analizadas. B) Análisis de las concentraciones de las especies de CE poco abundantes en hígado. C) Análisis de las concentraciones de las especies de CE más abundantes en hígado. n=4-6. *P≤0,05. #P≤0,01. \$P≤0,001. NCD: *Normal Chow Diet* y HFD: *High Fat Diet*.

4.17 Resistencia hepática a la insulina y metabolismo de la glucosa

La obesidad y el sobrepeso se caracterizan por una acumulación ectópica del exceso de las grasas y además son un factor de riesgo que promueven el desarrollo de la resistencia a la insulina y la DM2. Esta acumulación de las grasas en las células produce una alteración o pérdida de la señalización de la insulina en los diferentes tejidos afectados. Para ello se evaluó cuál era el efecto del aumento de la β -oxidación en el hígado sobre la señalización de la insulina en este tejido (figura 54).

Se analizó mediante WB (figura 54A) la Akt total y la Akt fosforilada (pAkt) como indicador de la sensibilidad a la insulina en los hepatocitos obtenidos tal como se ha descrito anteriormente y tratados con 100nM de insulina. Los resultados muestran que una ingesta diaria de la dieta grasa a lo largo de 18 semanas en el grupo HFD-GFP reduce los niveles de pAkt estimulados por insulina en 5,63 veces respecto a los animales alimentados con la dieta control NCD-GFP.

La sobreexpresión de hCPT1AM en los animales con dieta grasa revierte en parte dicha inhibición. No se observaron cambios en los niveles de fosforilación de Akt estimulada por insulina en los hepatocitos provenientes de animales con dieta control tratados con ambos tipos de virus.

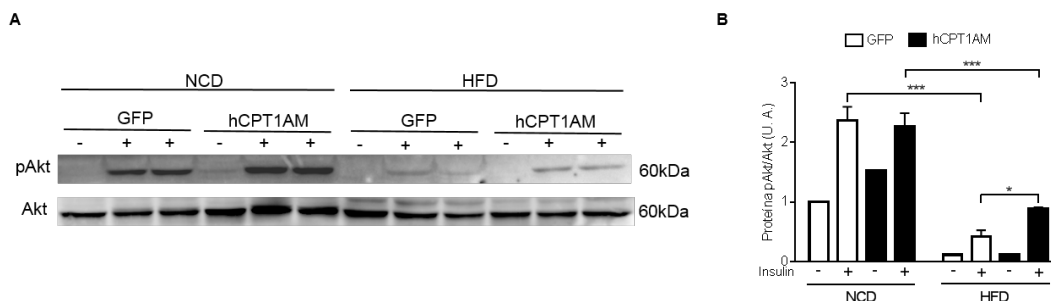


Figura 54. Análisis de los niveles de proteína Akt y Akt fosforilada (pAkt) en hepatocitos. A) WB representativo de los niveles de Akt y pAkt en extractos totales (40µg) de proteína de hepatocitos tratados con 100nM de insulina. **B)** Cuantificación del WB de pAkt utilizando como normalizador la cantidad de la Akt total. Muestras tomadas a las 26 semanas de edad que corresponde a 9 semanas después del tratamiento con los virus. n=3. *P≤0,05. ***P≤0,001. NCD: *Normal Chow Diet* y HFD: *High Fat Diet*. Se normaliza tomando el valor de 1 en los animales infectados con los virus AAV-GFP y alimentados con la dieta control.

De estos resultados se puede concluir que la sobreexpresión de la hCPT1AM en el hígado de ratones es capaz de revertir parcialmente la resistencia a la insulina inducida por la ingesta diaria de grasas a largo plazo.

Está descrito que la ingesta periódica de una dieta grasa en ratones es capaz de alterar el metabolismo de la glucosa presentando un aumento de las vías gluconeogénicas y glucolíticas. Para evaluar el estado de estas vías se determinó y cuantificó los niveles de mRNA por PCR a tiempo real de varios genes como la glucosa-6-fosfatasa (G6P) y la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK) que son claves en las rutas de la gluconeogénesis, así como la piruvato quinasa deshidrogenasa 4 (PDK4) que es indicativo del estado de la vía glucolítica. Estos estudios se llevaron a cabo en el sacrificio y con un ayuno de 6h.

En la figura 55 se observa como la dieta grasa produce un descenso de 3,18 veces los niveles de mRNA de la G6P (Figura 55A). En cuanto al otro enzima clave de la ruta gluconeogénica, la PEPCK, se observa también una disminución de 4,63 veces de sus niveles de mRNA en los animales alimentados con dieta grasa respecto a los de dieta control. En los animales tratados con AAV-hCPT1AM se

observó un aumento de 2,59 veces de los niveles de mRNA respecto a sus controles HFD-GFP (figura 55B) indicando una activación de la vía gluconeogénica reprimida con la dieta grasa. A continuación se analizaron los niveles de mRNA de la PDK-4 como indicador de la actividad de la vía glucolítica. Si bien en este caso no se observó un cambio significativo en los niveles de mRNA inducidos por dieta grasa sí que se observó una disminución de 1,69 veces de los niveles de mRNA en los animales tratados con hCPT1AM con respecto a sus controles HFD-GFP (figura 55C).

Seguidamente se analizaron los niveles de mRNA del GLUT2 que es el transportador de glucosa mayoritario presente en el hígado, como indicador de la captación de glucosa por parte del hígado (55D). En este caso se observa una disminución significativa de 1,54 veces en los niveles de mRNA de GLUT2 en los animales con HFD-GFP cuando comparados con el grupo NCD-GFP. Se observa una tendencia de reversión no significativa en los animales tratados con HFD-hCPT1AM cuando comparados con su grupo control. Todos estos resultados sugieren que la gluconeogénesis hepática esta disminuida a las 6h después de la ingesta en los animales con dieta grasa.

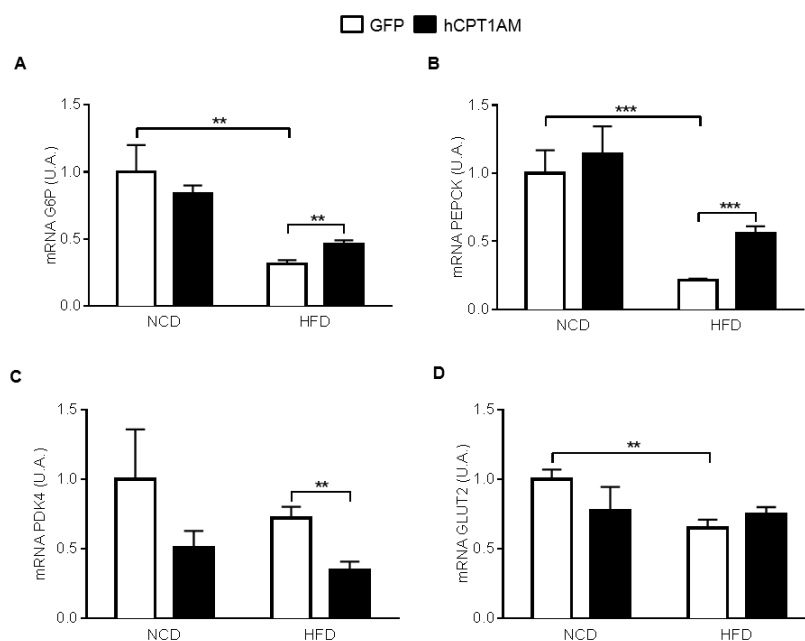


Figura 55. Análisis por PCR a tiempo real de la alteración de diferentes genes implicados en el metabolismo de la glucosa. Se determinaron los niveles de mRNA de **A) G6P B) PEPCK C) PDK4 y D) GLUT2**. n=6. **P<0,01. ***P<0,001. NCD: *Normal Chow Diet* y HFD: *High Fat Diet*. Se normaliza tomando el valor de 1 en los animales infectados con los virus AAV-GFP y alimentados con la dieta control.

Capítulo 5. DISCUSIÓN

La obesidad es una enfermedad con una incidencia cada vez mayor en las sociedades industrializadas. A pesar de tratarse de una patología multifactorial, el consumo masivo de alimentos calóricos y el sedentarismo son dos factores clave en su aparición. Por este motivo, entender los procesos fisiológicos y la regulación de la homeostasis energética es esencial en el desarrollo de terapias, no solo para el tratamiento, sino para la prevención de la obesidad y los trastornos asociados.

Existen claras evidencias de que una buena estrategia para tratar la obesidad y la DM2 es incrementar farmacológicamente o mediante terapia génica la FAO. En nuestro grupo hemos comprobado que un incremento de la FAO mejora la resistencia a la insulina mediante la reducción de los niveles de lípidos intracelulares en el hígado ¹⁶⁵. En cambio, el aumento de la FAO en el músculo se ha asociado a una resistencia a la insulina en el músculo esquelético ^{204,205} por saturación de la mitocondria producida por una FAO incompleta ²⁰⁶.

Los resultados presentados en este trabajo demuestran que el aumento del flujo de AGs en las mitocondrias de hígado mediante una sobreexpresión crónica de la enzima clave de la β -oxidación, la CPT1A, es capaz de revertir la obesidad y la resistencia a la insulina inducida por la obesidad. Los efectos beneficiosos de la transferencia génica de la hCPT1AM presentada en esta tesis se basan en tres factores: 1) el uso de virus adenoasociados para la expresión de genes a largo plazo, 2) escoger el hígado como órgano diana para la reversión de la obesidad y 3) sobreexpresar la isoforma humana mutada de la CPT1A (hCPT1AM), la cual es insensible a su inhibidor fisiológico el malonil-CoA, como posible terapia en humanos.

El hígado es el órgano clave para la regulación de la homeostasis energética de todo el organismo. Controla y regula el metabolismo y la homeostasis de grasas y de la glucosa. Además, es un órgano sensible a la insulina y alteraciones en la cascada de señalización de la insulina conllevan al desarrollo de resistencia a la insulina y a graves consecuencias para el balance energético y en el metabolismo en general ^{207,208}. Así pues, por su papel crucial en el control del metabolismo se convierte en un órgano apropiado y clave como posible diana para el tratamiento y/o terapia génica para combatir la obesidad y problemas asociados con la resistencia a la insulina.

Otra de las claves del éxito de este estudio es el uso de los virus adenoasociados (AAV). Los AAVs son una muy buena herramienta como terapia génica para la expresión de genes durante largos periodos de tiempo. Sus ventajas se basan fundamentalmente en dos aspectos, por un lado, la capacidad que muestran a la hora de expresar los genes insertados en el genoma de los virus a largo plazo y por otra parte, la respuesta prácticamente nula por parte del sistema inmunitario del organismo que infectan ^{209,210}. En los últimos 10 años se ha producido una explosión de la utilización de los AAVs como terapia génica (clinicaltrials.gov). Ya se han utilizado en ensayos clínicos para estudiar posibles tratamientos contra enfermedades del sistema nervioso central ¹⁷⁷, distrofias musculares ¹⁷⁸, desórdenes retinales ¹⁷⁹ y el tratamiento para la hipercolesterolemia ¹⁸⁰.

Otro punto fundamental para la realización de esta tesis es la utilización de la forma humana mutada de CPT1A, hCPT1AM. Tal y como hemos observado en este trabajo y en un trabajo previo de máster realizado en nuestro grupo ²⁰², la forma humana de la CPT1AM, al igual que la de rata es insensible a su inhibidor fisiológico, el malonil-CoA. El malonil-CoA se obtiene principalmente de la glucosa y es el primer intermediario en la síntesis de AGs. El hecho de que la presencia de malonil-CoA no module la actividad de la hCPT1AM es clave para mantener un transporte desregulado de AGs hacia la mitocondria para su posterior oxidación. Esto es importante en una situación como la obesidad donde además de los altos niveles de lípidos también hay altos niveles de glucosa, y por tanto de malonil-CoA.

1. Análisis de la capacidad de AAV9 de transducir la expresión de la isoforma CPT1AM humana en hígado de ratones obesos

En nuestro grupo ya se había demostrado en estudios previos que la sobreexpresión de CPT1A de rata, utilizando como vector viral adenovirus, podía aumentar la actividad CPT1 hasta 9 veces en células β -pancreáticas ¹⁶² y hasta 6 veces en células musculares ¹⁶³. En 2008, Stefanovic-Racic M y col. ²¹¹ observaron en hepatocitos en cultivo un aumento de actividad CPT1 de 3 veces respecto al control, 24 horas después de haberlos infectado con adenovirus. En ratas, estos mismos autores, obtenían un aumento de actividad CPT1 de 2 veces respecto al

control 5 días después de la administración de los adenovirus. Posteriormente Akkaoui y col. ²¹² observaron en hepatocitos de rata un aumento de actividad CPT1 de 4,5 veces cuando sobreexpresaban CPT1A y de 1,6 veces cuando sobreexpresaban CPT1AM tras la infección de los hepatocitos con adenovirus. En los últimos estudios realizados por nuestro grupo ¹⁶⁵ en ratones obesos, el nivel de proteína de CPT1, obtenida con la utilización del vector viral AAV serotipo 1 que dirigía la expresión de CPT1A o CPT1AM de rata, aumentó para ambas isoformas 3 veces y la actividad 1,5 y 1,8 veces respectivamente con respecto a los ratones alimentados con dieta control. Resultados similares fueron obtenidos en un estudio realizado por Monsénego y col. ²¹³ en ratones obesos que expresaban CPT1AM de rata mediante adenovirus. Todos estos resultados parecen indicar que los niveles de proteína y actividad dependen en gran medida de la especie de roedor, del tipo celular o tejido, de la eficiencia de transducción del vector utilizado y también de si el animal ha sido alimentado con dieta grasa.

En el presente estudio se eligió la utilización de la forma humana de la CPT1A con el fin de dirigir nuestros esfuerzos hacia una posible terapia génica para el tratamiento de la obesidad. En ningún estudio hasta este momento se había utilizado la isoforma humana de CPT1A y cabía la posibilidad de rechazo o falta de actividad de dicha isoforma en ratón. Nuestros resultados muestran que una dosis de virus de $7,5 \times 10^{12}$ gc/kg similar a la utilizada en el estudio anterior de Orellana-Gavaldá y col. ¹⁶⁵ producía un aumento en los niveles de proteína de 6,2 veces en el hígado de los ratones con dieta control y de 2,2 veces en los ratones obesos respecto a sus respectivos controles. Este importante aumento de los niveles de proteína indicaba una mayor eficiencia de transducción de los AAV con serotipo 9 utilizados en el presente estudio y que resultó ser de un 80%, respecto a la que presentaba el AAV de serotipo 1 (eficiencia de transducción del 30%) utilizado en el estudio anterior ¹⁶⁵. Sorprendentemente, los niveles tan altos de proteína hCPT1AM no se correspondieron con los de actividad CPT1 esperados. La menor actividad CPT1 podía ser debida a una expresión exagerada de la proteína para el número de mitocondrias y a una reducción del espacio disponible en la membrana exterior de las mitocondrias, donde la CPT1 necesita un correcto anclaje para un adecuado funcionamiento. También podría ser que la isoforma humana de CPT1AM fuera menos activa que la de rata. A pesar de esta falta de

actividad de CPT1 medida en mitocondrias aisladas de los hígados de los distintos grupos de animales sí que se observó un aumento de la capacidad oxidativa de oleato en cultivos primarios de hepatocitos aislados de los ratones que expresaban hCPT1AM respecto a sus controles. A pesar del incremento de FAO, no se observó ninguna mejora del fenotipo obeso. Al contrario de lo esperado, los niveles de glucosa e insulina en sangre tras 14h de ayuno aumentaron notablemente en los ratones obesos tratados con hCPT1AM. Todo ello nos hizo pensar en un posible efecto de sobre dosis.

La búsqueda de la dosis adecuada para la reversión de la obesidad nos llevó a analizar 5 dosis todas ellas menores de la ensayada inicialmente. De las 5 dosis de AAV9-hCPT1AM analizadas la dosis de $1,5 \times 10^{12}$ gc/kg, 5 veces inferior a la primera dosis ensayada que fue de $7,5 \times 10^{12}$ gc/kg fue la más efectiva. Dicha dosis produjo una reversión de los parámetros séricos de glucosa e insulina, una pérdida de peso y una disminución de la esteatosis hepática en los ratones obesos tras 8 semanas de tratamiento. A partir de ahí los nuevos experimentos se diseñaron administrando la dosis elegida.

La expresión de la isoforma hCPT1AM con la dosis de $1,5 \times 10^{12}$ gc/kg en los animales alimentados con dieta grasa, aumentó los niveles de proteína y de actividad en un 67 y 42%, respectivamente, respecto a los ratones obesos control. En cuanto a la capacidad de FAO medida en cultivos primarios de hepatocitos, no se observó un aumento significativo en los niveles de CO_2 detectados, en cambio sí se aprecia un aumento significativo en los niveles de ASPs. En los niveles de oxidación total de oleato hemos observado que la sobreexpresión de hCPT1AM aumenta significativamente los niveles en ambos grupos. Es posible que por la dificultad de la técnica no se acabe de ver un aumento significativo en los niveles de CO_2 pero la existencia de un aumento significativo de los ASPs, especies solubles no oxidadas totalmente, formadas por intermediarios del ciclo de Krebs, acetil-CoA y acil-carnitina nos corrobora este aumento del flujo de acil-CoA hacia el interior de la mitocondria. Además, el aumento de los niveles de cuerpos cetónicos y de formación de ATP, productos derivados de un mayor flujo de entrada de AGs a la mitocondria, en el hígado de los animales que expresan hCPT1AM confirma también la aumentada actividad del enzima.

2. El aumento de la FAO en el hígado mejora el fenotipo obeso

2.1 Peso

Uno de los principales éxitos de nuestra terapia es que los ratones obesos tratados con el virus AAV-hCPT1AM muestran una menor ganancia de peso debida al consumo de dieta grasa a partir de 3 semanas de tratamiento con los AAV-hCPT1AM y que persiste hasta la finalización del experimento. Estos resultados mejoran los resultados obtenidos anteriormente por nuestro grupo ¹⁶⁵ en los que no se pudo obtener una reversión del fenotipo obeso, pero si una prevención. También mejora los obtenidos por otros grupos como Monsénégo y col. ²¹⁴ que al utilizar como vectores víricos los adenovirus para la expresión de CPT1AM de rata no les permitió realizar experimentos a largo plazo y ver su efecto en el peso. Nuestros resultados concuerdan con otras aproximaciones en las que se actúa sobre otros genes en las que se promueve la FAO ²¹⁵ o la disipación de energía ²¹⁶. En el primer estudio realizado por el grupo de Newgard et al. ²¹⁵, obtuvieron una reducción significativa de peso del 11% en sólo 5 días de tratamiento de ratas alimentadas con dieta grasa. Estas ratas fueron tratadas con Ad que sobreexpresaban la MCD. La MCD metaboliza el malonil-CoA produciendo así un aumento de la FAO en hígado. A pesar del éxito del tratamiento los autores no realizan determinaciones a largo plazo. Otra estrategia alternativa basada en la disipación de energía fue la llevada a cabo Ishigaki Y y col. ²¹⁶. Estos autores sobreexpresan UCP1 en hígado mediante adenovirus, esto dió lugar a una reducción significativa en el peso de los ratones tratados en un 12% durante los 12 primeros días de tratamiento, sin embargo esta reducción no se mantuvo en los 15 días que duró el experimento.

La reducción en el peso de los animales que sobreexpresan la hCPT1AM tras ingerir durante 16 semanas una dieta rica en grasas tiene un efecto directo sobre el metabolismo de estos animales, ya que muestran niveles séricos de insulina y de glucosa substancialmente menores que los ratones obesos control y también una notable mejora en el GTT. De esta manera, nuestros resultados mejoran los presentados por Stefanovic-Racic y col.²¹¹ en el que se inyectaban Ad-CPT1A en ratas alimentadas con dieta grasa durante 1 semana y los presentados por Savage DB y col. ²¹⁷, en el que aumentan indirectamente la FAO inhibiendo la

ACC1y la ACC2 en ratas alimentadas con dieta grasa, en ambos no obtienen cambios significativos ni en los niveles de glucosa ni en los niveles de insulina. Finalmente, respecto al trabajo de Ishigaki Y y col.²¹⁶ los ratones alimentados con dieta grasa y que sobreexpresan UCP1 no muestran cambios en los niveles de insulina y sí una mejora en el GTT, aunque sólo 7 días después de la administración vírica pero no a los 14 días, lo cual indica una mejora transitoria. Por tanto, la sobreexpresión de hCPT1AM mediante virus adenoasociados es una buena herramienta para la reducción del peso a largo plazo.

2.2 Normalización de la señalización de la insulina en hígado

La acumulación lipídica en el hígado se ha asociado comúnmente con la inducción de la resistencia a la insulina pero queda por discernir si dicha acumulación de grasas es la causa o la consecuencia de la resistencia a la insulina o de ambas. Son múltiples los trabajos y revisiones donde se ha descrito como la acumulación de DAG induce la resistencia a la insulina mediante la activación de las distintas isoformas de PKC (δ and ϵ) que alteran el normal funcionamiento del receptor de la insulina ^{10,156,208,218}. Las ceramidas son lípidos bioactivos que también se han visto implicados en la resistencia a la insulina ^{109,219,220}.

Además, se ha descrito que la pérdida de sensibilidad a la insulina inducida por AGs es producida a través de la inhibición de la actividad de la Akt ²²¹, proteína clave en la acción de la insulina sobre el transporte de la glucosa y la síntesis de glucógeno. Otros estudios en cambio, han demostrado que la resistencia a la insulina asociada a la acumulación lipídica en el hígado no estaría provocada por la acumulación de AGs o por TG ^{222,223}. Más recientemente estudios en roedores y en humanos ponen en tela de juicio que las ceramidas estén implicadas en la resistencia hepática de la insulina ^{224,225}.

En nuestro estudio observamos una recuperación de la Akt fosforilada en el hígado, indicando una mejora de la cascada de señalización de la insulina en este tejido debido a la sobreexpresión de la hCPT1AM. Una de las explicaciones de por qué mejora la sensibilidad a la insulina en nuestros animales puede estar en la disminución en los niveles de TG del hígado y también, en una disminución de los niveles de intermediarios lipídicos como DAG y ceramidas u otras especies lipídicas tal y como se puede observar en nuestro estudio de lipidómica y en el

estudio histológico del hígado donde se aprecia una reducción severa en el contenido lipídico del hígado en los animales tratados con los virus AAV-hCPT1AM.

En los trabajos de Stefanovic-Racic M y col.²¹¹ en ratas o el de Akkaoui M y col.¹⁶⁴ hecho en hepatocitos mediante el aumento de la expresión de CPT1A y/o CPT1AM no se describen evidencias claras de la mejora de la sensibilidad a la insulina probablemente debido a que la duración del estudio fue demasiado corta. En el estudio de Savage DB y col.²¹⁷ la actividad de la Akt en el hígado se ve aumentada al doble en los animales alimentados con dieta grasa tratados con el inhibidor de ACC1 y de ACC2 comparado con los animales control, sugiriendo una mejora de la resistencia a la insulina debido al aumento de la FAO en el hígado. También en el trabajo presentado por An J y col.²¹⁵ con la sobreexpresión de la MCD en hígado se muestra una mejora de la fosforilación de la Akt en el hígado y músculo debido al aumento de la FAO. En este trabajo, también se sugiere la idea del uso de enzimas involucradas en el metabolismo lipídico y del hígado como posibles tratamientos antidiabéticos. En el trabajo de Monsénégo y col.¹⁶⁶ la sobreexpresión de CPT1AM de rata también produjo una restauración de la señalización de la insulina, así como una disminución de los niveles de ceramidas, DAG y FFA en hígado, sin embargo no se observó ningún cambio a nivel histológico.

Un resultado curioso del trabajo de Ishigaki Y y col.²¹⁶ con la sobreexpresión de UCP1 es que a pesar de realizar una terapia génica dirigida en el hígado, sólo muestra una mejora en la sensibilidad a la insulina por parte del músculo, pero no aporta datos sobre la sensibilidad a la insulina en el hígado. Este resultado sin embargo, nos sugiere que una terapia dirigida al hígado presenta un efecto indirecto en el músculo. Aunque no lo hemos estudiado en el presente trabajo tesis sí que se estudió en el trabajo anterior del grupo de Orellana-Gavaldà y col.¹⁶⁵ con resultados positivos.

2.3 Mejora del metabolismo de la glucosa en ratones obesos debido al aumento de la β -oxidación

Tres son las vías claves a la hora de analizar el metabolismo hepático de la glucosa: 1) la producción de glucosa, 2) la captación de glucosa y 3) la oxidación de la glucosa hacia piruvato.

Nuestros resultados muestran una normalización de los niveles séricos de glucosa tras 6 horas de ayuno en los ratones obesos que expresan hCPT1AM en hígado respecto a los ratones obesos control. A pesar de ello cuando analizamos la expresión de genes implicados en la formación hepática de la glucosa como G6Pasa y PEPCK éstos presentaban un patrón contrario a lo descrito en la literatura ²⁹. En estados patológicos como la DM2 o en condiciones de ingesta continuada de dietas ricas en grasas, la vía de la gluconeogénesis se ve activada en el hígado, aumentando los niveles de glucosa en sangre ^{226,227}. La disminución de los niveles de mensajeros de G6Pasa y de PEPCK observada en los ratones obesos control de nuestro experimento podría ser debido a que estos fueron determinados tras 6 horas de ayuno y no tras un ayuno más prolongado como en la mayoría de estudios. Se ha descrito que la producción hepática de glucosa tras un ayuno de 4h vendría principalmente a partir de la degradación de glucógeno, aunque eso varía según la cepa de ratón utilizada ²²⁸. Teniendo en cuenta que en nuestro caso los ratones están alimentados con una dieta grasa, es posible que los genes de G6Pasa y PEPCK se mantengan reprimidos las primeras 6h de ayuno debido a la presencia aún de glucógeno y nutrientes.

Por lo que se refiere a los niveles de mRNA del transportador de glucosa GLUT2 indicador de la captación de glucosa, se observó una disminución en los animales obesos control pero que no fue revertido en los ratones que expresan hCPT1AM en hígado.

Para analizar la vía glucolítica nos centramos en el complejo de la piruvato deshidrogenasa (PDC) que une la degradación de la glucosa con el ciclo de Krebs (TCA) mediante la descarboxilación del piruvato. Un inhibidor del complejo de la PDC es la PDK, que cuando está aumentada reduce la oxidación del piruvato por la PDC. En el hígado la supresión de la oxidación del piruvato facilita la utilización del piruvato disponible como precursor para la gluconeogénesis, mientras que la

función de la FAO es abastecer de ATP la gluconeogénesis. Se ha descrito que la supresión del complejo PDC es un desorden metabólico presente en la diabetes como consecuencia de una mala adaptación del organismo ³². Este hecho concuerda con nuestros resultados, que debido a la ingesta de dieta grasa en los animales tratados con los virus AAV-GFP presentan niveles elevados de mensajeros PDK4, que conduciría a una reducción de la oxidación de piruvato procedente de glucosa, priorizando la utilización del piruvato para la síntesis de glucosa y favoreciendo la FAO y aminoácidos.

2.4 El aumento de la FAO en el hígado disminuye la esteatosis hepática y mejora el metabolismo lipídico

En condiciones fisiológicas la concentración de TG en hígado es baja ya que la función principal de este órgano no es el acúmulo de grasas, más bien este órgano es el encargado del flujo de TG y AGs hacia la sangre en respuesta al ayuno y la ingesta. En situaciones de exceso de energía se produce una acumulación hepática en exceso de TG y de otras especies lipídicas tóxicas que son los principales causantes de la esteatosis hepática y la inflamación ^{25,229}. Tal y como hemos observado en nuestros resultados, una reducción en los niveles lipídicos en el hígado mediante la movilización de los AGs a través de un aumento de FAO puede ser una buena estrategia para la reversión de los desórdenes metabólicos provocados por una acumulación hepática de lípidos.

Nuestros resultados van en la misma dirección que los presentados por Stefanovic-Racic y col. ²¹¹ en el que se inyectaban Ad-CPT1A en ratas alimentadas con dieta grasa durante 1 semana y al cabo de 6 días analizaban el contenido de TG del hígado. En este trabajo observan una disminución de los niveles de TG de 4 veces respecto a los animales tratados con el virus Ad- β -gal como grupo control. En el estudio realizado por Savage DB y col. ²¹⁷ en ratas alimentadas con dieta grasa en las que aumentan indirectamente la FAO inhibiendo la ACC1y la ACC2, también presentan una disminución de TG en el hígado de unas 2 veces y esto supone una reducción significativa de 1,3 veces en los niveles hepáticos de DAG. En el trabajo de An J et al. ²¹⁵, el cual administran adenovirus para sobreexpresar la MCD en ratas alimentadas con dieta grasa, produciendo un aumento de la FAO mediante la disminución en los niveles de malonil-CoA, muestran una reducción

de TG en el hígado semejantes al del trabajo de Savage DB y col. ²¹⁷. También en el trabajo presentado por Ishigaki Y y col. ²¹⁶ el cual aumenta la energía disipada en el hígado de ratones mediante la sobreexpresión de la UCP1 sólo se aprecia una reducción del 40% en el contenido los TG en hígado. En este mismo sentido son de destacar los recientes trabajos en modelos de ratas obesas en los que el uso de productos desacoplantes mitocondriales como NEN (la sal de etanolamina de niclosamida), fármaco utilizado como antihelmintico ²³⁰ o el uso de derivados del 2,4 dinitrofenol de liberación controlada (CRMP) producen una disminución de los niveles de TG, DAG y de la esteatosis hepática. En cambio en el estudio realizado por Monsénego y col. ¹⁶⁶ con ratones alimentados con dieta grasa durante 20 semanas no se observaron cambios en la esteatosis hepática tras la sobreexpresión de la CPT1AM de rata probablemente debido a que este estudio se llevó a cabo 3 semanas después de la infección con adenovirus, tiempo insuficiente para visualizar una reducción masiva de de los lípidos acumulados en el hígado. En nuestro estudio, realizado con un tratamiento a más largo plazo tras 11 semanas de dieta grasa, la disminución en los niveles de TG ha sido similar al del estudio de Ishigaki Y y col. ²¹⁶ o de los agentes desacoplantes mitocondriales obteniendo una disminución de 38,75% de los niveles de TG respecto a los ratones obesos control. Además esta reducción lipídica es evidente tanto en el estudio histológico del hígado como en la valoración del contenido lipídico detectado por técnica del *Oil Red* en los cultivos de hepatocitos de los ratones tratados con hCPT1AM. Todo ello indica que una FAO permanentemente aumentada revierte masivamente la acumulación hepática de TG, DAG y otras especies lipídicas bioactivas tal como se ha observado en nuestro estudio de lipidómica reduciendo notablemente la esteatosis hepática y el peso del hígado en un 73% y de una normalización de los enzimas marcadores de daño hepático como son las transaminasas.

Curiosamente, los animales de nuestro experimento, tratados con dieta control y que expresan la hCPT1AM no muestran diferencias significativas en los niveles de TG en el hígado respecto a los niveles de los animales GFP control. Este dato es muy interesante y de especial relevancia, ya que en estos animales que expresan la hCPT1AM a pesar de presentar una mayor FAO, no presentan aumento de los cuerpos cetónicos en el suero y más formación de ATP en el

hígado, y tampoco muestran cambios significativos en el peso. Este hecho apoya la idea de que un aumento de la FAO en un estado no patológico y con ingesta de dieta control, no causaría ningún desorden metabólico importante en el organismo, al menos durante las 11 semanas de expresión de hCPT1AM en el que se llevó a cabo el estudio.

2.5 El aumento de β -oxidación de ácidos grasos activa la lipólisis y la autofagia y la disipación de energía en ratones obesos

Los procesos celulares y vías metabólicas implicados en la disminución de la esteatosis hepática de los ratones obesos que expresan la hCPT1AM son: 1) activación de la lipólisis y la autofagia, 2) el direccionamiento del exceso de acetil-CoA producido por la β -oxidación hacia la formación de cuerpos cetónicos 3) aumento de la producción de ATP y la disipación de energía mediante un aumento de la temperatura.

2.5.1 Lipólisis

Las PLIN2 y PLIN5 son los dos miembros de la familia de PLINs asociadas a los LDs y que recientemente se les ha atribuido un papel clave en la regulación de la lipólisis hepática de los TG de las gotas lipídicas. Ambas proteínas están aumentadas en hígado en ratones alimentados con dieta grasa impidiendo la acción de las lipasas en LDs y favoreciendo el acúmulo de lípidos en los LDs y así evitando el efecto lipotóxico de las especies lipídicas como DAG, ceramidas y otros derivados lipídicos ^{55,231,232}. El efecto antilipolítico de la PLIN5 se lleva a cabo por la interacción con las lipasas ATGL y HSL ²³³. La PLIN5 recluta el factor CGI-58 (comparative gene identification) necesario para la acción lipolítica de la ATGL en el LD ^{54,58}. En ratones con una delección en PLIN5 en hígado muestran un aumento de la lipólisis ⁵⁵. Una disminución en los niveles de mensajeros y proteína sobretodo en el caso de la PLIN5 serían por tanto indicativos de una mayor lipólisis. Nuestros resultados muestran que los ratones obesos que expresan hCPT1AM han disminuido los niveles de mRNA y de proteína de ambas PLIN2 y 5 indicando que un aumento en el flujo de los AGs hacia la mitocondria promovido por la acción de la hCPT1AM es capaz de activar la lipólisis y producir una reducción importante de LDs.

Estudios en roedores han mostrado que tres lipasas estarían implicadas en la lipólisis: ATGL, HSP y MGL, siendo ATGL la implicada mayoritariamente en el primer paso en la hidrólisis de lípidos neutros como los TG. En hígado la sobreexpresión de ATGL ^{57,234,235} produce una disminución del contenido en TG y un aumento de FAO. Esto está de acuerdo con los resultados obtenidos en nuestros estudios en los que observamos un aumento de los niveles de mensajeros de ATGL y HSL en los animales obesos y tratados con hCPT1AM, a pesar de ello no pudimos observar los mismos cambios a nivel de proteína debido a la gran variabilidad entre los ratones analizados. Los mismos resultados fueron obtenidos al analizar los niveles de mensajeros de la MGL. En conjunto, todo ello sugiere que la lipólisis estaría más activa en los animales obesos que expresan hCPT1AM respecto a los animales obesos control.

2.5.2 Autofagia

La autofagia es un proceso celular que cada vez parece adquirir más importancia en la eliminación de los depósitos hepáticos de lípidos ²³⁶. Recientemente Alexaki A. et al ²³⁷ han mostrado una asociación entre una deficiente autofagia y la acumulación de especies lipídicas bioactivas como los esfingolípidos y sus derivados, las ceramidas, conocidos efectores de la toxicidad celular. Además también se ha demostrado en modelos genéticos de obesidad o en los inducidos por una dieta grasa que la inhibición de la autofagia va acompañada de un aumento de la inflamación ^{238,239}. Nuestros resultados muestran un acúmulo de los niveles de proteína LC3 II y una disminución de los niveles de p62 indicando una autofagia aumentada en los ratones obesos que expresan hCPT1AM respecto a sus controles obesos. Estos resultados además se confirmaron al analizar estos mismos parámetros en hepatocitos en cultivo obtenidos de ratones obesos control que expresaban GFP y ratones obesos que expresaban hCPT1AM y en presencia de un inhibidor de la autofagia, la cloroquina. Todo ello sugiere que la autofagia sería un proceso implicado también en la movilización de los depósitos lipídicos y en la eliminación de la esteatosis hepática observada en los ratones obesos que sobreexpresan hCPT1AM y alimentados con dieta grasa.

2.5.3 Destinos del acetil-CoA

El aumento permanente de flujo de AGs hacia el interior de la mitocondria causado por una mayor actividad CPT1 conlleva un aumento de los niveles de acetil-CoA intramitocondrial que puede tener varios destinos y que ayudaran en parte al hígado a desprenderse del surplus de energía producida por su metabolismo: 1) formación de cuerpos cetónicos 2) degradación por el ciclo de Krebs y formación de ATP o disipación de la energía por desacoplamiento de la cadena de transporte electrónico y 3) exportación de la mitocondria y formación de AGs.

Nuestros resultados muestran una activación de la vía cetogénica en los ratones obesos tratados con AAV-hCPT1AM respecto a los ratones obesos control tratados con AAV-GFP. Los ratones obesos que expresan hCPT1A presentan aumentados los niveles de cuerpos cetónicos tanto en hígado como en suero. Estos resultados vienen corroborados por un mayor aumento de expresión hepática del enzima regulador de la vía, la HMG-CoA sintasa mitocondrial ¹⁴¹. Estos resultados van en la misma dirección que los obtenidos en estudios anteriores tanto por nuestro grupo ²⁴⁰ como de otros ²¹⁴. La exportación de cuerpos cetónicos hacia otros tejidos o bien su eliminación en orina y respiración es una de las formas de eliminación del hígado de unidades sobrantes de carbono.

Otro de los destinos del acetil-CoA es su oxidación total para la producción de ATP. Los ratones obesos que expresan hCPT1AM, debido a una mayor β -oxidación muestran, tal como cabía esperar, un aumento de los niveles de ATP. Curiosamente este aumento no se observa en los ratones con dieta control que expresan hCPT1AM. Ello puede ser debido a que una dieta grasa conlleva un exceso de nutrientes que pueden ser oxidados cosa que no ocurriría con una dieta control. Por otro lado, también hemos observado por termografía infrarroja un aumento de la temperatura de los hígados de los ratones alimentados con dieta grasa que expresan hCPT1AM y que va acompañado de un aumento de los niveles de proteína de UCP2. Todo ello indicaría que parte de la energía producida por la oxidación del acetil-CoA se disiparía en forma de calor.

2.6 El aumento de β -oxidación de ácidos grasos normaliza la lipogénesis hepática *de novo* en ratones obesos

En la lipogénesis *de novo* están implicadas varias vías metabólicas: 1) la glucólisis, productora de acetil-CoA para su posterior conversión a malonil-CoA, sustrato de la síntesis de AGs, a través de los enzimas ACC1 y 2, 2) la biosíntesis de AGs catalizada por la FAS y seguida de su insaturación por la SCD-1 y 3) la formación de TG cuyo marcador es la DGAT2. Nuestros resultados muestran una disminución importante en los niveles de mensajeros de estos genes en los ratones obesos indicando una disminución en la lipogénesis *de novo* debido en parte al gran aporte de grasa proveniente de la dieta. Esto se puede explicar porque en diferentes situaciones metabólicas el contenido de grasa hepático que proviene de la síntesis lipogénica *de novo* es de sólo el 5 % de la grasa total ⁴⁶. Estos resultados concuerdan con algunos de los estudios en los que se ha observado también una disminución del flujo lipogénico en modelos de roedores obesos e insulinoresistentes inducidos por dieta grasa ^{156,241-243}. A pesar de ello existe cierta controversia ya que otros autores o bien no han observado cambios ²⁴⁴ o bien han observado un aumento ²⁴⁵. En humanos en cambio hay mucho más consenso y en pacientes con NAFLD la lipogénesis *de novo* contribuye en un aumento de entre 3 y 5 veces en el contenido hepático de TG respecto a individuos sanos ^{246,247}. Aunque algunos estudios apuntan a un cambio en el flujo lipogénico dependiendo del momento y del estado nutricional del individuo ²⁴⁸.

En cuanto a los ratones obesos que expresan la hCPT1A se ve una disminución de la expresión de los genes ACC1 y 2, FAS, SCD1 y DAGT respecto a los ratones obesos control indicando una normalización de la lipogénesis en estos animales que aún siguen tomando dieta grasa.

2.7 Efecto de un aumento de la β -oxidación en el metabolismo del colesterol

Una importante vía de movilización de lípidos del hígado es la exportación de TG, derivados lipídicos y colesterol mediante la formación y secreción de VLDLs. Las VLDLs están por tanto implicadas tanto en el metabolismo de TG como en el metabolismo del colesterol. En estados patológicos como NAFLD y DM2 el proceso de exportación de VLDL-TG está aumentado respondiendo probablemente a un efecto compensatorio a la acumulación

intracelular de TG. En pacientes con NAFLD se ha observado que hay un aumento en el número de partículas de VLDL respecto a los individuos sanos y además éstas presentan un mayor contenido en TG que las de los individuos sanos⁸⁹. Apo B100 y MTP son las proteínas claves en la formación de VLDLs. Una sobreexpresión de MTP en hígado da lugar a un aumento en la producción hepática de VLDLs y al contrario, su deficiencia produce la disminución de VLDLs y esteatosis hepática^{249,250}. Curiosamente, nuestros resultados muestran una disminución de los niveles de mensajeros de MTP en los animales obesos indicando una menor exportación de TG y otros derivados lipídicos y esta disminución no parece revertirse en los ratones obesos que expresan hCPT1AM. Estos datos concuerdan con los niveles de TG en suero, los cuales no varían independientemente de si los ratones expresan o no la hCPT1AM. Una posible explicación podría ser la hora del sacrificio de los animales tras haberlos sometido a 6 horas de ayuno.

Hemos observado que los niveles aumentados de colesterol en sangre de los ratones obesos alimentados con dieta grasa disminuyen en los ratones obesos que expresan hCPT1AM. Los mecanismos que regulan la homeostasis del colesterol son muy complejos y recientemente han sido ampliamente revisados por Arguello y col.²⁵¹. El contenido de colesterol en el hígado viene regulado por diferentes vías: 1) la síntesis *de novo* y 2) la captación a través de las distintas clases de lipoproteínas plasmáticas, 3) la excreción a través de VLDL o por unión ABCA1 en las HDL nacientes 4) la excreción y captación biliar (ABCG5/8) y proteína NPC1L1 y 5) la síntesis de bilis. Nuestros resultados muestran que no existen cambios en la síntesis *de novo*, pero sí una disminución de los niveles del LDLr indicando una menor captación de colesterol a través de las LDLs que a su vez el nivel de colesterol ligado a ellas se encuentran disminuidos en suero de los ratones obesos que expresan hCPT1AM. Por otro lado, las HDLs que reduce el exceso de colesterol de los tejidos, están levemente elevadas en suero de estos animales. Su función depende en parte de su contenido de apo-A1, su principal apolipoproteína. Esta apolipoproteína facilita la salida del exceso de fosfolípidos y colesterol intracelular a través de mecanismos específicos que requieren consumo de energía, a través de los transportadores ABCA1, G5 y G8. Se ha descrito que la disminución de estos transportadores daría lugar a una reducción

de la eliminación de colesterol, a una acumulación de lípidos y al desarrollo de NAFLD en modelos de obesidad inducida por dieta ^{80,91}. Los niveles de mensajeros de estas proteínas están completamente restaurados en los animales tratados con hCPT1AM y alimentados con dieta grasa.

2.8 Efecto de un aumento de la β -oxidación en las especies lipídicas de hígado y suero

En el hígado se producen múltiples cambios en el metabolismo lipídico en estados patológicos como el NAFLD y NASH. Recientemente existe un gran interés en conocer qué especies lipídicas pueden estar implicadas en las alteraciones que dan lugar a procesos inflamatorios, de estrés de ER y resistencia a la insulina asociados con la obesidad, NAFLD y NASH. Varios son los estudios que han analizado las distintas especies de DAG, colesterol, fosfolípidos, esfingolípidos ^{100,101,252,253}. Otros han ido más allá analizando incluso los cambios lipídicos específicos asociados a la membrana mitocondrial que preceden la resistencia a la insulina⁹⁹. Más recientemente se ha analizado incluso las oscilaciones temporales de los contenidos de distintas especies lipídicas en distintos orgánulos ²⁵⁴. Todo ello aporta luz a la compleja regulación del metabolismo lipídico. A pesar de ello pocos son los estudios que hayan analizado los cambios de especies lipídicas en situaciones en que se produce una intervención para una mejora de la obesidad y de la esteatosis hepática. Especies que podrían ser indicativas de las vías más importantes a tratar y a su vez servir como biomarcadores. En un estudio realizado por Shon y col. ²⁵⁵ en que ratones obesos inducidos por dieta grasa eran tratados con un compuesto K-enriquecido con gingenosidos muestran que las especies de TG en suero con un número total de carbonos (>50) serían indicativas de una menor obesidad. Esto está de acuerdo con nuestros resultados ya que hemos observado que fundamentalmente las especies de TG con AGs de cadenas más largas e insaturadas como C50:1, C54:3, C54:4, C54:5 mostraron reducciones significativas en suero en los ratones obesos que expresan hCPT1AM en hígado. Nuestros resultados no muestran cambios en los niveles de las especies de DAG en suero. Sin embargo, sí que observamos una masiva disminución de prácticamente todas las especies analizadas de TG y DAG en hígado de los ratones obesos que expresan hCPT1AM respecto a sus controles obesos. Esto estaría de

acuerdo con numerosos estudios recientemente revisados por Samuel y Shulman²⁰⁸ que indican que las distintas especies de DAG más que los TG serían las responsables de la lipotoxicidad y estarían implicadas en los mecanismos de resistencia a la insulina a través de la activación de varias isoformas de PKC. Por tanto una masiva disminución de DAG comportaría una mejora en la señalización de la insulina tal como ocurre en nuestro estudio.

En cuanto a los otros lípidos neutros como los CE, si bien observamos un aumento en hígado y también en suero de algunas de las especies analizadas en los ratones obesos, solo hemos podido detectar con la expresión de hCPT1AM una tendencia a disminuir pero sin ser significativa en las especies más abundantes. Aunque cada vez más estudios muestran que sería el FC el verdadero implicado en la patogénesis de la esteatosis hepática. Esta actuaría a través de mecanismos que incluyen disfunción mitocondrial, aumento de la producción de ROS e inducción de estrés de RE y apoptosis además de activar procesos inflamatorios²⁵¹.

Otros agentes considerados lipotóxicos son los esfingolípidos y entre ellos cabe destacar las ceramidas como promotores de estrés de ER y resistencia a la insulina¹¹¹. Nuestro estudio ha mostrado una reducción significativa de algunas especies de ceramidas como C16:0, C18:0, C20:0, C22:0, C22:1 y C24:2 en el hígado de los ratones obesos tratados con hCPT1AM. Esto implicaría una mejora de los mecanismos de apoptosis propiciados por las especies de ceramidas C16 y C18 y una reducción en la resistencia a la insulina por las especies de ceramidas C24²⁵⁶. En suero las especies disminuidas son las de largas cadenas C22 y C24 indicando que podrían tener un papel clave en la reducción en la resistencia a la insulina en otros órganos distintos del hígado y que no se han analizado en este estudio. Las dihidroceramidas de estas mismas longitudes de cadenas carbonadas son también las que han presentado reducciones significativas en suero y en hígado indicando su posible intervención en los mecanismos de resistencia a la insulina, aunque deberían llevarse a cabo nuevos estudios dirigidos a analizar las vías metabólicas de estas especies para ver qué grado de implicación tienen en el proceso de la insulinoresistencia.

Los fosfolípidos son otros de los componentes lipídicos que recientemente se han estudiado como posibles implicados en la en la patogénesis de la esteatosis

hepática y su progresión a NASH ²⁵⁷. Nuestros resultados muestran un aumento con la dieta grasa de algunas especies de LPC y PC en los ratones obesos pero lo que cabe destacar de nuestros resultados es que la especie C38:3 muestra una reducción significativa tanto en hígado como en suero, lo que podría servir como futuro marcador de la patogénesis de la esteatosis hepática y de la obesidad.

En este trabajo presentamos una estrategia eficiente para revertir el fenotipo obeso, disminuir la acumulación lipídica en el hígado y mejorar la esteatosis hepática y la resistencia a la insulina asociada a la obesidad. Esto se ha conseguido gracias al uso de virus adenoasociados, capaces de incrementar crónicamente y a largo plazo la FAO mediante la expresión de la hCPT1AM, forma insensible al malonil-CoA.

Capítulo 6. CONCLUSIONES

1. La expresión de la forma humana de CPT1AM mediada por AAV9 específicamente en el hígado de ratones obesos inyectados por la vena de la cola, nos ha permitido obtener un aumento del 42% de la actividad CPT1 y un aumento de la FAO del 32%.
2. Los ratones obesos que expresan la hCPT1AM en hígado muestran una menor ganancia de peso que los animales obesos control. La administración de los AAV-hCPT1AM no provoca cambios en los pesos de los ratones alimentados con dieta control.
3. La expresión de hCPT1AM en hígado de ratones alimentados con dieta grasa normaliza los niveles de glucosa e insulina en sangre y mejora la señalización de la insulina en hígado.
4. El aumento de FAO en hígado causado por la expresión de hCPT1AM conlleva a un aumento en la producción de ATP, la disipación de energía y la producción de cuerpos cetónicos en hígado de los ratones tratados con dieta grasa.
5. Los ratones alimentados con dieta grasa que expresan la hCPT1AM mejoran la esteatosis hepática respecto a los ratones obesos control. Esto se ve avalado por el estudio de lipidómica que muestra una disminución masiva en muchas de las especies de TG y DAG.
6. El estudio de lipidómica ha permitido identificar en suero las especies de TGs con un contenido en AGs de mayor longitud de cadena como 50:1, 54:5, 54:4 e 54:3 y la especie de fosfatidilcolina 38:3 como posibles biomarcadores de la mejora de la esteatosis hepática.
7. Los procesos celulares de lipólisis y autofagia aumentan en hígado de ratones obesos tratados con hCPT1AM, lo que sugiere que pueden ser mecanismos implicados en la mejora de la esteatosis hepática en estos animales.

Capítulo 7. BIBLIOGRAFÍA

1. Ahima RS. Digging deeper into obesity. *J Clin Invest*. 2011;121(6):2076-2079. doi:10.1172/JCI58719.
2. WHO | Obesity and overweight. *WHO*. 2015; Fact sheet (Updated January 2015).
3. World Health Organization. Fact sheet: obesity and overweight. Internet: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>
4. Kahn SE, Hull RL, Utzschneider KM. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature*. 2006;444(7121):840-846. doi:10.1038/nature05482.
5. Fabbrini E, Sullivan S, Klein S. Obesity and nonalcoholic fatty liver disease: biochemical, metabolic, and clinical implications. *Hepatology*. 2010;51(2):679-689. doi:10.1002/hep.23280.
6. Cusi K. Role of obesity and lipotoxicity in the development of nonalcoholic steatohepatitis: pathophysiology and clinical implications. *Gastroenterology*. 2012;142(4):711-725.e6. doi:10.1053/j.gastro.2012.02.003.
7. Van Gaal LF, Mertens IL, De Block CE. Mechanisms linking obesity with cardiovascular disease. *Nature*. 2006;444(7121):875-880. doi:10.1038/nature05487.
8. Sun B, Karin M. Obesity, inflammation, and liver cancer. *J Hepatol*. 2012;56(3):704-713. doi:10.1016/j.jhep.2011.09.020.
9. Szendroedi J, Phielix E, Roden M. The role of mitochondria in insulin resistance and type 2 diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol*. 2011;8(2):92-103. doi:10.1038/nrendo.2011.138.
10. Samuel VT, Shulman GI. Mechanisms for insulin resistance: common threads and missing links. *Cell*. 2012;148(5):852-871. doi:10.1016/j.cell.2012.02.017.
11. Alberti KG, Gray DP. The care of diabetes. *Diabet Med*. 1998;15 Suppl 3:S3-S4. doi:10.1002/(SICI)1096-9136(1998120)15:4+<S3::AID-DIA749>3.0.CO;2-S.
12. Stumvoll M, Goldstein BJ, van Haeften TW. Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy. *Lancet (London, England)*. 2005;365(9467):1333-1346. doi:10.1016/S0140-6736(05)61032-X.
13. Nadler ST, Stoehr JP, Schueler KL, Tanimoto G, Yandell BS, Attie AD. The expression of adipogenic genes is decreased in obesity and diabetes mellitus.

- Proc Natl Acad Sci USA.* 2000;97(21):11371-11376.doi:10.1073/pnas.97.21.11371.
14. Boden G, Shulman GI. Free fatty acids in obesity and type 2 diabetes: defining their role in the development of insulin resistance and beta-cell dysfunction. *Eur J Clin Invest.* 2002; 32 Suppl 3:14-23. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12028371>. Accessed July 21, 2016.
 15. Kraegen EW, Cooney GJ. Free fatty acids and skeletal muscle insulin resistance. *Curr Opin Lipidol.* 2008;19(3):235-241. doi:10.1097/01.mol.0000319118.44995.9a.
 16. Zhang D, Liu Z-X, Choi CS, et al. Mitochondrial dysfunction due to long-chain Acyl-CoA dehydrogenase deficiency causes hepatic steatosis and hepatic insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(43):17075-17080. doi:10.1073/pnas.0707060104.
 17. Rebuffé-Scrive M, Surwit R, Feinglos M, et al. Regional fat distribution and metabolism in a new mouse model () of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Metabolism.* 1993;42(11):1405-1409. doi:10.1016/0026-0495(93)90190-Y.
 18. Carey VJ, Walters EE, Colditz GA, et al. Body fat distribution and risk of non-insulin-dependent diabetes mellitus in women. The Nurses' Health Study. *Am J Epidemiol.* 1997;145(7):614-619. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9098178>. Accessed July 21, 2016.
 19. Patti ME, Kahn CR. The insulin receptor--a critical link in glucose homeostasis and insulin action. *J Basic Clin Physiol Pharmacol.* 1998;9(2-4):89-109. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10212828>. Accessed March 25, 2016.
 20. Gonzalez E, McGraw TE. Insulin signaling diverges into Akt-dependent and -independent signals to regulate the recruitment/docking and the fusion of GLUT4 vesicles to the plasma membrane. *Mol Biol Cell.* 2006;17(10):4484-4493. doi:10.1091/mbc.E06-07-0585.
 21. van Dam EM, Govers R, James DE. Akt activation is required at a late stage of insulin-induced GLUT4 translocation to the plasma membrane. *Mol Endocrinol.* 2005;19(4):1067-1077. doi:10.1210/me.2004-0413.
 22. Bouzakri K, Zachrisson A, Al-Khalili L, et al. siRNA-based gene silencing reveals

- specialized roles of IRS-1/Akt2 and IRS-2/Akt1 in glucose and lipid metabolism in human skeletal muscle. *Cell Metab.* 2006;4(1):89-96. doi:10.1016/j.cmet.2006.04.008.
23. Velez M, Kohli S, Sabbah HN. Animal models of insulin resistance and heart failure. *Heart Fail Rev.* 2014;19(1):1-13. doi:10.1007/s10741-013-9387-6.
 24. Vacca M, Allison M, Griffin JL, Vidal-Puig A. Fatty Acid and Glucose Sensors in Hepatic Lipid Metabolism: Implications in NAFLD. *Semin Liver Dis.* 2015;35(3):250-261. doi:10.1055/s-0035-1562945.
 25. Fabbrini E, Magkos F. Hepatic Steatosis as a Marker of Metabolic Dysfunction. *Nutrients.* 2015;7(6):4995-5019. doi:10.3390/nu7064995.
 26. Jones JG. Hepatic glucose and lipid metabolism. *Diabetologia.* 2016;59(6):1098-1103. doi:10.1007/s00125-016-3940-5.
 27. Zhang F, Xu X, Zhang Y, Zhou B, He Z, Zhai Q. Gene expression profile analysis of type 2 diabetic mouse liver. *PLoS One.* 2013;8(3):e57766. doi:10.1371/journal.pone.0057766.
 28. Rui L. Energy metabolism in the liver. *Compr Physiol.* 2014;4(1):177-197. doi:10.1002/cphy.c130024.
 29. Matsuzaki H, Daitoku H, Hatta M, Tanaka K, Fukamizu A. Insulin-induced phosphorylation of FKHR (Foxo1) targets to proteasomal degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(20):11285-11290. doi:10.1073/pnas.1934283100.
 30. Michael MD, Kulkarni RN, Postic C, et al. Loss of Insulin Signaling in Hepatocytes Leads to Severe Insulin Resistance and Progressive Hepatic Dysfunction. *Mol Cell.* 2000;6(1):87-97. doi:10.1016/S1097-2765(05)00015-8.
 31. Kim JK, Michael MD, Previs SF, et al. Redistribution of substrates to adipose tissue promotes obesity in mice with selective insulin resistance in muscle. *J Clin Invest.* 2000;105(12):1791-1797. doi:10.1172/JCI8305.
 32. Sugden MC, Holness MJ. Mechanisms underlying regulation of the expression and activities of the mammalian pyruvate dehydrogenase kinases. *Arch Physiol Biochem.* 2006;112(3):139-149. doi:10.1080/13813450600935263.
 33. Roche TE, Hiromasa Y. Pyruvate dehydrogenase kinase regulatory mechanisms and inhibition in treating diabetes, heart ischemia, and cancer. *Cell Mol Life Sci.* 2007;64(7-8):830-849. doi:10.1007/s00018-007-6380-z.

34. Dunning BE, Gerich JE. The role of alpha-cell dysregulation in fasting and postprandial hyperglycemia in type 2 diabetes and therapeutic implications. *Endocr Rev.* 2007;28(3):253-283. doi:10.1210/er.2006-0026.
35. Bugianesi E, Gastaldelli A, Vanni E, et al. Insulin resistance in non-diabetic patients with non-alcoholic fatty liver disease: sites and mechanisms. *Diabetologia.* 2005;48(4):634-642. doi:10.1007/s00125-005-1682-x.
36. Jin ES, Szuszkiewicz-Garcia M, Browning JD, Baxter JD, Abate N, Malloy CR. Influence of liver triglycerides on suppression of glucose production by insulin in men. *J Clin Endocrinol Metab.* 2015;100(1):235-243. doi:10.1210/jc.2014-2404.
37. Spassiani NA, Kuk JL. Exercise and the fatty liver. *Appl Physiol Nutr Metab = Physiol Appl Nutr métabolisme.* 2008;33(4):802-807. doi:10.1139/H08-059.
38. Zammit VA. Role of insulin in hepatic fatty acid partitioning: emerging concepts. *Biochem J.* 1996;314 (Pt 1):1-14. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1217010&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Accessed January 24, 2016.
39. Gibbons GF. Assembly and secretion of hepatic very-low-density lipoprotein. *Biochem J.* 1990;268(1):1-13. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1131384&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Accessed January 24, 2016.
40. Abu-Elheiga L, Jayakumar A, Baldini A, Chirala SS, Wakil SJ. Human acetyl-CoA carboxylase: characterization, molecular cloning, and evidence for two isoforms. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92(9):4011-4015. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=42092&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Accessed January 23, 2016.
41. Smith S. The animal fatty acid synthase: one gene, one polypeptide, seven enzymes. *FASEB J.* 1994;8(15):1248-1259. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8001737>. Accessed December 14, 2015.
42. Kawano Y, Cohen DE. Mechanisms of hepatic triglyceride accumulation in non-alcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol.* 2013;48(4):434-441. doi:10.1007/s00535-013-0758-5.
43. Hasty AH, Shimano H, Yahagi N, et al. Sterol regulatory element-binding

- protein-1 is regulated by glucose at the transcriptional level. *J Biol Chem.* 2000;275(40):31069-31077. doi:10.1074/jbc.M003335200.
44. Dentin R, Benhamed F, Hainault I, et al. Liver-specific inhibition of ChREBP improves hepatic steatosis and insulin resistance in ob/ob mice. *Diabetes.* 2006;55(8):2159-2170. doi:10.2337/db06-0200.
 45. Chen G, Liang G, Ou J, Goldstein JL, Brown MS. Central role for liver X receptor in insulin-mediated activation of Srebp-1c transcription and stimulation of fatty acid synthesis in liver. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(31):11245-11250. doi:10.1073/pnas.0404297101.
 46. Ntambi JM, Miyazaki M, Stoehr JP, et al. Loss of stearyl-CoA desaturase-1 function protects mice against adiposity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(17):11482-11486. doi:10.1073/pnas.132384699.
 47. Zammit VA, Buckett LK, Turnbull A V., Wure H, Proven A. Diacylglycerol acyltransferases: Potential roles as pharmacological targets. *Pharmacol Ther.* 2008;118(3):295-302. doi:10.1016/j.pharmthera.2008.03.010.
 48. Smith SJ, Cases S, Jensen DR, et al. Obesity resistance and multiple mechanisms of triglyceride synthesis in mice lacking Dgat. *Nat Genet.* 2000;25(1):87-90. doi:10.1038/75651.
 49. Stone SJ, Myers HM, Watkins SM, et al. Lipopenia and skin barrier abnormalities in DGAT2-deficient mice. *J Biol Chem.* 2004;279(12):11767-11776. doi:10.1074/jbc.M311000200.
 50. Olofsson S-O, Boström P, Andersson L, Rutberg M, Perman J, Borén J. Lipid droplets as dynamic organelles connecting storage and efflux of lipids. *Biochim Biophys Acta.* 2009;1791(6):448-458. doi:10.1016/j.bbalip.2008.08.001.
 51. Okumura T. Role of lipid droplet proteins in liver steatosis. *J Physiol Biochem.* 2011;67(4):629-636. doi:10.1007/s13105-011-0110-6.
 52. Straub BK, Stoeffel P, Heid H, Zimbelmann R, Schirmacher P. Differential pattern of lipid droplet-associated proteins and de novo perilipin expression in hepatocyte steatogenesis. *Hepatology.* 2008;47(6):1936-1946. doi:10.1002/hep.22268.
 53. Wang H, Bell M, Sreenivasan U, et al. Unique regulation of adipose triglyceride lipase (ATGL) by perilipin 5, a lipid droplet-associated protein. *J Biol Chem.*

- 2011;286(18):15707-15715. doi:10.1074/jbc.M110.207779.
54. Granneman JG, Moore H-PH, Mottillo EP, Zhu Z, Zhou L. Interactions of perilipin-5 (Plin5) with adipose triglyceride lipase. *J Biol Chem.* 2011;286(7):5126-5135. doi:10.1074/jbc.M110.180711.
 55. Wang C, Zhao Y, Gao X, et al. Perilipin 5 improves hepatic lipotoxicity by inhibiting lipolysis. *Hepatology.* 2015;61(3):870-882. doi:10.1002/hep.27409.
 56. Wang H, Sreenivasan U, Sreenevasan U, et al. Perilipin 5, a lipid droplet-associated protein, provides physical and metabolic linkage to mitochondria. *J Lipid Res.* 2011;52(12):2159-2168. doi:10.1194/jlr.M017939.
 57. Ong KT, Mashek MT, Bu SY, Greenberg AS, Mashek DG. Adipose triglyceride lipase is a major hepatic lipase that regulates triacylglycerol turnover and fatty acid signaling and partitioning. *Hepatology.* 2011;53(1):116-126. doi:10.1002/hep.24006.
 58. Granneman JG, Moore H-PH, Mottillo EP, Zhu Z. Functional interactions between Mldp (LSDP5) and Abhd5 in the control of intracellular lipid accumulation. *J Biol Chem.* 2009;284(5):3049-3057. doi:10.1074/jbc.M808251200.
 59. Yeaman SJ, Smith GM, Jepson CA, Wood SL, Emmison N. The multifunctional role of hormone-sensitive lipase in lipid metabolism. *Adv Enzyme Regul.* 1994;34:355-370. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7942281>. Accessed October 17, 2016.
 60. Brown MS, Goldstein JL. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science.* 1986;232(4746):34-47. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3513311>. Accessed July 22, 2015.
 61. Cohen DE. Lipoprotein Metabolism and Cholesterol Balance. In: *The Liver.* Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd; 2009:271-285. doi:10.1002/9780470747919.ch19.
 62. Mardones P, Quiñones V, Amigo L, et al. Hepatic cholesterol and bile acid metabolism and intestinal cholesterol absorption in scavenger receptor class B type I-deficient mice. *J Lipid Res.* 2001;42.
 63. Min H-K, Kapoor A, Fuchs M, et al. Increased hepatic synthesis and dysregulation of cholesterol metabolism is associated with the severity of

- nonalcoholic fatty liver disease. *Cell Metab.* 2012;15(5):665-674. doi:10.1016/j.cmet.2012.04.004.
64. Cortes VA, Busso D, Maiz A, Arteaga A, Nervi F RA. Physiological and pathological implications of cholesterol. *Front Biosci (Landmark Ed).* 2014;19(1):416-428.
 65. Mesmin B, Antonny B, Drin G. Insights into the mechanisms of sterol transport between organelles. *Cell Mol Life Sci.* 2013;70(18):3405-3421. doi:10.1007/s00018-012-1247-3.
 66. Zanlungo S, Rigotti A. Determinants of transhepatic cholesterol flux and their relevance for gallstone formation. *Liver Int.* 2009;29(3):323-330. doi:10.1111/j.1478-3231.2009.01972.x.
 67. Ji A, Wroblewski JM, Cai L, de Beer MC, Webb NR, van der Westhuyzen DR. Nascent HDL formation in hepatocytes and role of ABCA1, ABCG1, and SR-BI. *J Lipid Res.* 2012;53(3):446-455. doi:10.1194/jlr.M017079.
 68. Luu W, Sharpe LJ, Gelissen IC, Brown AJ. The role of signalling in cellular cholesterol homeostasis. *IUBMB Life.* 2013;65(8):675-684. doi:10.1002/IUB.1182.
 69. Kalaany NY, Mangelsdorf DJ. LXRS AND FXR: The Yin and Yang of Cholesterol and Fat Metabolism. <http://dx.doi.org/101146/annurev.physiol68033104152158>. 2006.
 70. Anderson R, Foster DW, Wilson JD, et al. Joe Goldstein and Mike Brown: from cholesterol homeostasis to new paradigms in membrane biology. *Trends Cell Biol.* 2003;13(10):534-539. doi:10.1016/j.tcb.2003.08.007.
 71. Caballero F, Fernández A, De Lacy AM, et al. Enhanced free cholesterol, SREBP-2 and StAR expression in human NASH. *J Hepatol.* 2009;50(4):789-796. doi:10.1016/j.jhep.2008.12.016.
 72. Parks DJ, Blanchard SG, Bledsoe RK, et al. Bile acids: natural ligands for an orphan nuclear receptor. *Science.* 1999;284(5418):1365-1368. doi:10.1126/science.284.5418.1365.
 73. Makishima M, Okamoto AY, Repa JJ, et al. Identification of a nuclear receptor for bile acids. *Science.* 1999;284(5418):1362-1365. doi:10.1126/science.284.5418.1362.

74. Goodwin B, Jones SA, Price RR, et al. A Regulatory Cascade of the Nuclear Receptors FXR, SHP-1, and LRH-1 Represses Bile Acid Biosynthesis. *Mol Cell*. 2000;6(3):517-526. doi:10.1016/S1097-2765(00)00051-4.
75. Xu J-Y. Recent insights into farnesoid X receptor in non-alcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol*. 2014;20(37):13493. doi:10.3748/wjg.v20.i37.13493.
76. Chiang JYL, Kimmel R, Weinberger C, Stroup D. Farnesoid X Receptor Responds to Bile Acids and Represses Cholesterol 7alpha -Hydroxylase Gene (CYP7A1) Transcription. *J Biol Chem*. 2000;275(15):10918-10924. doi:10.1074/jbc.275.15.10918.
77. Fuchs M, Ivandic B, Müller O, et al. Biliary cholesterol hypersecretion in gallstone-susceptible mice is associated with hepatic up-regulation of the high-density lipoprotein receptor SRBI. *Hepatology*. 2001;33(6):1451-1459. doi:10.1053/jhep.2001.24373.
78. Zhao B, Song J, Ghosh S. Hepatic overexpression of cholesteryl ester hydrolase enhances cholesterol elimination and in vivo reverse cholesterol transport. *J Lipid Res*. 2008;49(10):2212-2217. doi:10.1194/jlr.M800277-JLR200.
79. Lu K, Lee M-H, Hazard S, et al. Two Genes That Map to the STSL Locus Cause Sitosterolemia: Genomic Structure and Spectrum of Mutations Involving Sterolin-1 and Sterolin-2, Encoded by ABCG5 and ABCG8, Respectively. *Am J Hum Genet*. 2001;69(2):278-290. doi:10.1086/321294.
80. Su K, Sabeva NS, Liu J, et al. The ABCG5 ABCG8 sterol transporter opposes the development of fatty liver disease and loss of glycemic control independently of phytosterol accumulation. *J Biol Chem*. 2012;287(34):28564-28575. doi:10.1074/jbc.M112.360081.
81. Simonen P, Kotronen A, Hallikainen M, et al. Cholesterol synthesis is increased and absorption decreased in non-alcoholic fatty liver disease independent of obesity. *J Hepatol*. 2011;54(1):153-159. doi:10.1016/j.jhep.2010.05.037.
82. Beg ZH, Stonik JA, Brewer HB, et al. Modulation of the enzymic activity of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase by multiple kinase systems involving reversible phosphorylation: A review. *Metabolism*. 1987;36(9):900-917. doi:10.1016/0026-0495(87)90101-6.

83. Beg, Z.H., Stonik, J.A., Brewer Jr. HB. Phosphorylation of hepatic 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase and modulation of its enzymic activity by calcium-activated and phospholipid-dependent protein kinase. *J Biol Chem.* 1985;260(3):1682-1687.
84. K. Fon Tacer DR. Nonalcoholic fatty liver disease: Focus on lipoprotein and lipid deregulation. *J Lipids.* 2011;2011:783976.
85. Musso G, Gambino R, Cassader M. Recent insights into hepatic lipid metabolism in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Prog Lipid Res.* 2009;48(1):1-26. doi:10.1016/j.plipres.2008.08.001.
86. Corey KE, Chalasani N, Browning JD, et al. Management of dyslipidemia as a cardiovascular risk factor in individuals with nonalcoholic fatty liver disease. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2014;12(7):1077-1084; quiz e59-e60. doi:10.1016/j.cgh.2013.08.014.
87. Cohen DE, Fisher EA. Lipoprotein metabolism, dyslipidemia, and nonalcoholic fatty liver disease. *Semin Liver Dis.* 2013;33(4):380-388. doi:10.1055/s-0033-1358519.
88. Siddiqui MS, Fuchs M, Idowu MO, et al. Severity of nonalcoholic fatty liver disease and progression to cirrhosis are associated with atherogenic lipoprotein profile. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2015;13(5):1000-1008.e3. doi:10.1016/j.cgh.2014.10.008.
89. Fabbrini E, Mohammed BS, Magkos F, et al. Alterations in adipose tissue and hepatic lipid kinetics in obese men and women with nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology.* 2008;134(2):424-431. doi:10.1053/j.gastro.2007.11.038.
90. Van Rooyen DM, Larter CZ, Haigh WG, et al. Hepatic Free Cholesterol Accumulates in Obese, Diabetic Mice and Causes Nonalcoholic Steatohepatitis. *Gastroenterology.* 2011;141(4):1393-1403.e5. doi:10.1053/j.gastro.2011.06.040.
91. Yang Y, Jiang Y, Wang Y, An W. Suppression of ABCA1 by unsaturated fatty acids leads to lipid accumulation in HepG2 cells. *Biochimie.* 2010;92(8):958-963. doi:10.1016/j.biochi.2010.04.002.
92. Ma D, Liu W, Wang Y. ApoA-I or ABCA1 expression suppresses fatty acid

- synthesis by reducing 27-hydroxycholesterol levels. *Biochimie*. 2014;103:101-108. doi:10.1016/j.biochi.2014.04.010.
93. Pizarro M, Balasubramanian N, Solís N, et al. Bile secretory function in the obese Zucker rat: evidence of cholestasis and altered canalicular transport function. *Gut*. 2004;53(12):1837-1843. doi:10.1136/gut.2003.037689.
94. Tran KQ, Graewin SJ, Swartz-Basile DA, et al. Leptin-resistant obese mice have paradoxically low biliary cholesterol saturation. *Surgery*. 2003;134(2):372-377. doi:10.1067/msy.2003.234.
95. Su K, Sabeva NS, Wang Y, et al. Acceleration of Biliary Cholesterol Secretion Restores Glycemic Control and Alleviates Hypertriglyceridemia in Obese db/db Mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2014;34(1):26-33. doi:10.1161/ATVBAHA.113.302355.
96. Neuschwander-Tetri BA. Hepatic lipotoxicity and the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis: the central role of nontriglyceride fatty acid metabolites. *Hepatology*. 2010;52(2):774-788. doi:10.1002/hep.23719.
97. Grzelczyk A, Gendaszewska-Darmach E. Novel bioactive glycerol-based lysophospholipids: New data – New insight into their function. *Biochimie*. 2013;95(4):667-679. doi:10.1016/j.biochi.2012.10.009.
98. Puri P, Wiest MM, Cheung O, et al. The plasma lipidomic signature of nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*. 2009;50(6):1827-1838. doi:10.1002/hep.23229.
99. Kahle M, Schäfer A, Seelig A, et al. High fat diet-induced modifications in membrane lipid and mitochondrial-membrane protein signatures precede the development of hepatic insulin resistance in mice. *Mol Metab*. 2014;4(1):39-50. doi:10.1016/j.molmet.2014.11.004.
100. Saito K, Uebanso T, Maekawa K, et al. Characterization of hepatic lipid profiles in a mouse model with nonalcoholic steatohepatitis and subsequent fibrosis. *Sci Rep*. 2015;5:12466. doi:10.1038/srep12466.
101. Puri P, Baillie RA, Wiest MM, et al. A lipidomic analysis of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2007;46(4):1081-1090. doi:10.1002/hep.21763.
102. Marí M, Fernández-Checa JC. Sphingolipid signalling and liver diseases. *Liver Int*. 2007;27(4):440-450. doi:10.1111/j.1478-3231.2007.01475.x.

103. Morales A, Lee H, Goñi FM, Kolesnick R, Fernandez-Checa JC. Sphingolipids and cell death. *Apoptosis*. 2007;12(5):923-939. doi:10.1007/s10495-007-0721-0.
104. Holland WL, Summers SA. Sphingolipids, insulin resistance, and metabolic disease: new insights from in vivo manipulation of sphingolipid metabolism. *Endocr Rev*. 2008;29(4):381-402. doi:10.1210/er.2007-0025.
105. Alkhoury N, Dixon LJ, Feldstein AE. Lipotoxicity in nonalcoholic fatty liver disease: not all lipids are created equal. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*. 2009;3(4):445-451. doi:10.1586/egh.09.32.
106. Llacuna L, Marí M, Garcia-Ruiz C, Fernandez-Checa JC, Morales A. Critical role of acidic sphingomyelinase in murine hepatic ischemia-reperfusion injury. *Hepatology*. 2006;44(3):561-572. doi:10.1002/hep.21285.
107. Novgorodov SA, Wu BX, Gudz TI, et al. Novel pathway of ceramide production in mitochondria: thioesterase and neutral ceramidase produce ceramide from sphingosine and acyl-CoA. *J Biol Chem*. 2011;286(28):25352-25362. doi:10.1074/jbc.M110.214866.
108. Lightle S, Tosheva R, Lee A, et al. Elevation of ceramide in serum lipoproteins during acute phase response in humans and mice: role of serine–palmitoyl transferase. *Arch Biochem Biophys*. 2003;419(2):120-128. doi:10.1016/j.abb.2003.08.031.
109. Holland WL, Brozinick JT, Wang L-P, et al. Inhibition of ceramide synthesis ameliorates glucocorticoid-, saturated-fat-, and obesity-induced insulin resistance. *Cell Metab*. 2007;5(3):167-179. doi:10.1016/j.cmet.2007.01.002.
110. Schwabe RF, Brenner DA. Mechanisms of Liver Injury. I. TNF-alpha-induced liver injury: role of IKK, JNK, and ROS pathways. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2006;290(4):G583-G589. doi:10.1152/ajpgi.00422.2005.
111. Pagadala M, Kasumov T, McCullough AJ, Zein NN, Kirwan JP. Role of ceramides in nonalcoholic fatty liver disease. *Trends Endocrinol Metab*. 2012;23(8):365-371. doi:10.1016/j.tem.2012.04.005.
112. Haus JM, Kashyap SR, Kasumov T, et al. Plasma ceramides are elevated in obese subjects with type 2 diabetes and correlate with the severity of insulin resistance. *Diabetes*. 2009;58(2):337-343. doi:10.2337/db08-1228.
113. Turpin SM, Nicholls HT, Willmes DM, et al. Obesity-induced CerS6-dependent

- C16:0 ceramide production promotes weight gain and glucose intolerance. *Cell Metab.* 2014;20(4):678-686. doi:10.1016/j.cmet.2014.08.002.
114. Raichur S, Wang ST, Chan PW, et al. CerS2 haploinsufficiency inhibits β -oxidation and confers susceptibility to diet-induced steatohepatitis and insulin resistance. *Cell Metab.* 2014;20(4):687-695. doi:10.1016/j.cmet.2014.09.015.
 115. Kasumov T, Solomon TPJ, Hwang C, et al. Improved insulin sensitivity after exercise training is linked to reduced plasma C14:0 ceramide in obesity and type 2 diabetes. *Obesity (Silver Spring)*. 2015;23(7):1414-1421. doi:10.1002/oby.21117.
 116. Yang L, Li P, Fu S, Calay ES, Hotamisligil GS. Defective hepatic autophagy in obesity promotes ER stress and causes insulin resistance. *Cell Metab.* 2010;11(6):467-478. doi:10.1016/j.cmet.2010.04.005.
 117. Boya P, Reggiori F, Codogno P. Emerging regulation and functions of autophagy. *Nat Cell Biol.* 2013;15(7):713-720. doi:10.1038/ncb2788.
 118. Tooze SA, Yoshimori T. The origin of the autophagosomal membrane. *Nat Cell Biol.* 2010;12(9):831-835. doi:10.1038/ncb0910-831.
 119. Kung C-P, Budina A, Balaburski G, Bergenstock MK, Murphy M. Autophagy in tumor suppression and cancer therapy. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 2011;21(1):71-100. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21967333>. Accessed July 22, 2016.
 120. Yang Z, Klionsky DJ. Mammalian autophagy: core molecular machinery and signaling regulation. *Curr Opin Cell Biol.* 2010;22(2):124-131. doi:10.1016/j.ceb.2009.11.014.
 121. Ravikumar B, Sarkar S, Davies JE, et al. Regulation of mammalian autophagy in physiology and pathophysiology. *Physiol Rev.* 2010;90(4):1383-1435. doi:10.1152/physrev.00030.2009.
 122. Alers S, Löffler AS, Wesselborg S, Stork B. Role of AMPK-mTOR-Ulk1/2 in the regulation of autophagy: cross talk, shortcuts, and feedbacks. *Mol Cell Biol.* 2012;32(1):2-11. doi:10.1128/MCB.06159-11.
 123. Decuypere J-P, Parys JB, Bultynck G. Regulation of the autophagic bcl-2/beclin 1 interaction. *Cells.* 2012;1(3):284-312. doi:10.3390/cells1030284.
 124. Li L, Chen Y, Gibson SB. Starvation-induced autophagy is regulated by

- mitochondrial reactive oxygen species leading to AMPK activation. *Cell Signal*. 2013;25(1):50-65. doi:10.1016/j.cellsig.2012.09.020.
125. Mizushima N. Autophagy: process and function. *Genes Dev*. 2007;21(22):2861-2873. doi:10.1101/gad.1599207.
126. Hemelaar J, Lelyveld VS, Kessler BM, Ploegh HL. A single protease, Apg4B, is specific for the autophagy-related ubiquitin-like proteins GATE-16, MAP1-LC3, GABARAP, and Apg8L. *J Biol Chem*. 2003;278(51):51841-51850. doi:10.1074/jbc.M308762200.
127. Mizushima N, Yoshimori T, Levine B, et al. Methods in mammalian autophagy research. *Cell*. 2010;140(3):313-326. doi:10.1016/j.cell.2010.01.028.
128. Johansen T, Lamark T. Selective autophagy mediated by autophagic adapter proteins. *Autophagy*. 2011;7(3):279-296. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21189453>. Accessed July 22, 2016.
129. Moscat J, Diaz-Meco MT, Duran A, et al. p62 at the Crossroads of Autophagy, Apoptosis, and Cancer. *Cell*. 2004;137(6):1001-1004. doi:10.1016/j.cell.2009.05.023.
130. Ding W-X, Manley S, Ni H-M. The emerging role of autophagy in alcoholic liver disease. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2011;236(5):546-556. doi:10.1258/ebm.2011.010360.
131. Erlich S, Mizrachy L, Segev O, et al. Differential interactions between Beclin 1 and Bcl-2 family members. *Autophagy*. 2007;3(6):561-568. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17643073>. Accessed July 24, 2016.
132. Kim J, Kundu M, Viollet B, Guan K-L. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat Cell Biol*. 2011;13(2):132-141. doi:10.1038/ncb2152.
133. Singh R, Kaushik S, Wang Y, et al. Autophagy regulates lipid metabolism. *Nature*. 2009;458(7242):1131-1135. doi:10.1038/nature07976.
134. Rautou P-E, Mansouri A, Lebrec D, Durand F, Valla D, Moreau R. Autophagy in liver diseases. *J Hepatol*. 2010;53(6):1123-1134. doi:10.1016/j.jhep.2010.07.006.
135. Liu H-Y, Han J, Cao SY, et al. Hepatic autophagy is suppressed in the presence of insulin resistance and hyperinsulinemia: inhibition of FoxO1-dependent

- expression of key autophagy genes by insulin. *J Biol Chem.* 2009;284(45):31484-31492. doi:10.1074/jbc.M109.033936.
136. Yang L, Li P, Fu S, et al. NIH Public Access. *Cell Metab.* 2010;11(6):467-478. doi:10.1016/j.cmet.2010.04.005.Defective.
137. McGarry JD, Brown NF. The mitochondrial carnitine palmitoyltransferase system. From concept to molecular analysis. *Eur J Biochem.* 1997;244(1):1-14. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9063439>. Accessed July 24, 2016.
138. Zammit VA, Corstorphine CG, Gray SR. Changes in the ability of malonyl-CoA to inhibit carnitine palmitoyltransferase I activity and to bind to rat liver mitochondria during incubation in vitro. Differences in binding at 0 degree C and 37 degrees C with a fixed concentration of malonyl-CoA. *Biochem J.* 1984;222(2):335-342. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6477517>. Accessed July 24, 2016.
139. Witters LA, Watts TD, Daniels DL, Evans JL. Insulin stimulates the dephosphorylation and activation of acetyl-CoA carboxylase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988;85(15):5473-5477. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=281779&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Accessed December 26, 2015.
140. McGarry JD, Brown NF. The mitochondrial carnitine palmitoyltransferase system. From concept to molecular analysis. *Eur J Biochem.* 1997;244(1):1-14. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9063439>. Accessed June 23, 2015.
141. Hegardt FG. Mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase : a control enzyme in ketogenesis. *Biochem J.* 1999;338:569-582.
142. Gimeno RE, Dembski M, Weng X, et al. Cloning and characterization of an uncoupling protein homolog: a potential molecular mediator of human thermogenesis. *Diabetes.* 1997;46(5):900-906. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9133562>. Accessed January 23, 2016.
143. Fleury C, Neverova M, Collins S, et al. Uncoupling protein-2: a novel gene linked to obesity and hyperinsulinemia. *Nat Genet.* 1997;15(3):269-272. doi:10.1038/ng0397-269.
144. Laskowski KR, Russell RR. Uncoupling proteins in heart failure. *Curr Heart Fail Rep.* 2008;5(2):75-79.

- <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2692351&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Accessed January 23, 2016.
145. Chien D, Dean D, Saha AK, Flatt JP, Ruderman NB. Malonyl-CoA content and fatty acid oxidation in rat muscle and liver in vivo. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2000;279(2):E259-E265. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10913024>. Accessed July 22, 2016.
 146. Saha AK, Vavvas D, Kurowski TG, et al. Malonyl-CoA regulation in skeletal muscle: its link to cell citrate and the glucose-fatty acid cycle. *Am J Physiol.* 1997;272(4 Pt 1):E641-E648. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9142886>. Accessed July 22, 2016.
 147. Britton CH, Schultz RA, Zhang B, Esser V, Foster DW, McGarry JD. Human liver mitochondrial carnitine palmitoyltransferase I: characterization of its cDNA and chromosomal localization and partial analysis of the gene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92(6):1984-1988. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7892212>. Accessed July 23, 2016.
 148. Esser V, Britton CH, Weis BC, Foster DW, McGarry JD. Cloning, sequencing, and expression of a cDNA encoding rat liver carnitine palmitoyltransferase I. Direct evidence that a single polypeptide is involved in inhibitor interaction and catalytic function. *J Biol Chem.* 1993;268(8):5817-5822. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8449948>. Accessed July 24, 2016.
 149. Yamazaki N, Shinohara Y, Shima A, Terada H. High expression of a novel carnitine palmitoyltransferase I like protein in rat brown adipose tissue and heart: isolation and characterization of its cDNA clone. *FEBS Lett.* 1995;363(1-2):41-45. doi:10.1016/0014-5793(95)00277-G.
 150. Yamazaki N, Shinohara Y, Shima A, Yamanaka Y, Terada H. Isolation and characterization of cDNA and genomic clones encoding human muscle type carnitine palmitoyltransferase I. *Biochim Biophys Acta - Gene Struct Expr.* 1996;1307(2):157-161. doi:10.1016/0167-4781(96)00069-3.
 151. Price NT, Jackson VN, van der Leij FR, et al. Cloning and expression of the liver and muscle isoforms of ovine carnitine palmitoyltransferase 1: residues within the N-terminus of the muscle isoform influence the kinetic properties of the enzyme. *Biochem J.* 2003;372(Pt 3):871-879. doi:10.1042/BJ20030086.

152. Sierra AY, Gratacós E, Carrasco P, et al. CPT1c is localized in endoplasmic reticulum of neurons and has carnitine palmitoyltransferase activity. *J Biol Chem*. 2008;283(11):6878-6885. doi:10.1074/jbc.M707965200.
153. Chatelain F, Kohl C, Esser V, McGarry JD, Girard J, Pegorier JP. Cyclic AMP and fatty acids increase carnitine palmitoyltransferase I gene transcription in cultured fetal rat hepatocytes. *Eur J Biochem*. 1996;235(3):789-798. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8654430>. Accessed July 23, 2016.
154. Thumelin S, Esser V, Charvy D, et al. Expression of liver carnitine palmitoyltransferase I and 11 genes during development in the rat. *Biochem J*. 1994;300:563-587.
155. Park EA, Mynatt RL, Cook GA, Kashfi K. Insulin regulates enzyme activity, malonyl-CoA sensitivity and mRNA abundance of hepatic carnitine palmitoyltransferase-I. *Biochem J*. 1995;310 (Pt 3):853-858.
156. Catherine Postic and Jean Girard. Contribution of de novo fatty acid synthesis to hepatic steatosis and insulin resistance: lessons from genetically engineered mice. *J Clin Invest*. 2008;118:829-838. doi:10.1172/JCI34275.
157. ALLRED J, Reilly KE. Short-term regulation of acetyl CoA carboxylase in tissues of higher animals. *Prog Lipid Res*. 1996;35(4):371-385. doi:10.1016/S0163-7827(96)00010-0.
158. Guzmán M, Azzolin IR, Moulin CC, Perry ML. Pre- and postnatal protein undernutrition increases hepatic carnitine palmitoyltransferase I activity and decreases enzyme sensitivity to inhibitors in the suckling rat. *Horm Metab Res = Horm und Stoffwechselforsch = Horm métabolisme*. 1992;24(10):471-473. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1464412>. Accessed July 23, 2016.
159. Velasco G, Geelen MJ, Gómez del Pulgar T, Guzmán M. Malonyl-CoA-independent acute control of hepatic carnitine palmitoyltransferase I activity. Role of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II and cytoskeletal components. *J Biol Chem*. 1998;273(34):21497-21504. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9705278>. Accessed July 23, 2016.
160. Morillas M, Gómez-Puertas P, Bentebibel A, et al. Identification of conserved amino acid residues in rat liver carnitine palmitoyltransferase I critical for malonyl-CoA inhibition. Mutation of methionine 593 abolishes malonyl-CoA

- inhibition. *J Biol Chem.* 2003;278(11):9058-9063. doi:10.1074/jbc.M209999200.
161. Morillas M, Gómez-Puertas P, Bentebibel A, et al. Identification of conserved amino acid residues in rat liver carnitine palmitoyltransferase I critical for malonyl-CoA inhibition. Mutation of methionine 593 abolishes malonyl-CoA inhibition. *J Biol Chem.* 2003;278(11):9058-9063. doi:10.1074/jbc.M209999200.
 162. Herrero L, Rubí B, Sebastián D, et al. Alteration of the malonyl-CoA/carnitine palmitoyltransferase I interaction in the beta-cell impairs glucose-induced insulin secretion. *Diabetes.* 2005;54(2):462-471. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15677504>.
 163. Sebastián D, Herrero L, Serra D, Asins G, Hegardt FG. CPT I overexpression protects L6E9 muscle cells from fatty acid-induced insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2007;292(3):E677-E686. doi:10.1152/ajpendo.00360.2006.
 164. Akkaoui M, Cohen I, Esnous C, et al. Modulation of the hepatic malonyl-CoA-carnitine palmitoyltransferase 1A partnership creates a metabolic switch allowing oxidation of de novo fatty acids. *Biochem J.* 2009;420(3):429-438. doi:10.1042/BJ20081932.
 165. Orellana-Gavaldà JM, Herrero L, Malandrino MI, et al. Molecular therapy for obesity and diabetes based on a long-term increase in hepatic fatty-acid oxidation. *Hepatology.* 2011;53(3):821-832. doi:10.1002/hep.24140.
 166. Monsénégo J, Mansouri A, Akkaoui M, et al. Enhancing liver mitochondrial fatty acid oxidation capacity in obese mice improves insulin sensitivity independently of hepatic steatosis. *J Hepatol.* 2012;56(3):632-639. doi:10.1016/j.jhep.2011.10.008.
 167. Wing RR, Phelan S. Long-term weight loss maintenance. *Am J Clin Nutr.* 2005;82(1 Suppl):222S - 225S. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16002825>. Accessed July 23, 2016.
 168. O'Neil PM, Smith SR, Weissman NJ, et al. Randomized placebo-controlled clinical trial of lorcaserin for weight loss in type 2 diabetes mellitus: the BLOOM-DM study. *Obesity (Silver Spring).* 2012;20(7):1426-1436. doi:10.1038/oby.2012.66.
 169. Khan A, Raza S, Khan Y, et al. Current updates in the medical management of

- obesity. *Recent Pat Endocr Metab Immune Drug Discov.* 2012;6(2):117-128. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22435392>. Accessed July 23, 2016.
170. Novo Nordisk. Liraglutide 3.0 mg for Weight Management. *Endocrinol Metab Drug Advis Comm.* 2014;11:1-287.
171. Medicines Agency E. Saxenda recommended for approval in weight management in adults. 2015.
172. Neff KJ, Olbers T, le Roux CW. Bariatric surgery: the challenges with candidate selection, individualizing treatment and clinical outcomes. *BMC Med.* 2013;11(1):8. doi:10.1186/1741-7015-11-8.
173. Vandenberghe LH, Wilson JM, Gao G. Tailoring the AAV vector capsid for gene therapy. *Gene Ther.* 2009;16(3):311-319. doi:10.1038/gt.2008.170.
174. Calcedo R, Vandenberghe LH, Gao G, Lin J, Wilson JM. Worldwide epidemiology of neutralizing antibodies to adeno-associated viruses. *J Infect Dis.* 2009;199(3):381-390. doi:10.1086/595830.
175. Balakrishnan B, R. Jayandharan G. Basic Biology of Adeno-Associated Virus (AAV) Vectors Used in Gene Therapy.
176. Lisowski L, Tay SS, Alexander IE. Adeno-associated virus serotypes for gene therapeutics. *Curr Opin Pharmacol.* 2015;24:59-67. doi:10.1016/j.coph.2015.07.006.
177. Hester ME, Foust KD, Kaspar RW, Kaspar BK. AAV as a gene transfer vector for the treatment of neurological disorders: novel treatment thoughts for ALS. *Curr Gene Ther.* 2009;9(5):428-433. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19860657>. Accessed July 24, 2016.
178. Trollet C, Athanasopoulos T, Popplewell L, Malerba A, Dickson G. Gene therapy for muscular dystrophy: current progress and future prospects. *Expert Opin Biol Ther.* 2009;9(7):849-866. doi:10.1517/14712590903029164.
179. Stieger K, Chauveau C, Rolling F. Preclinical studies on specific gene therapy for recessive retinal degenerative diseases. *Curr Gene Ther.* 2010;10(5):389-403. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20718697>. Accessed July 24, 2016.
180. Lagor WR, Brown RJ, Toh S-A, et al. Overexpression of apolipoprotein F reduces HDL cholesterol levels in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009;29(1):40-46. doi:10.1161/ATVBAHA.108.177105.

181. Brunengraber DZ, McCabe BJ, Kasumov T, Alexander JC, Chandramouli V, Previs SF. Influence of diet on the modeling of adipose tissue triglycerides during growth. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2003;285(4):E917-E925. doi:10.1152/ajpendo.00128.2003.
182. Kramer MG, Barajas M, Razquin N, et al. In vitro and in vivo comparative study of chimeric liver-specific promoters. *Mol Ther.* 2003;7(3):375-385. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12668133>. Accessed January 19, 2016.
183. Donello JE, Loeb JE, Hope TJ. Woodchuck hepatitis virus contains a tripartite posttranscriptional regulatory element. *J Virol.* 1998;72(6):5085-5092. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=110072&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Accessed January 19, 2016.
184. Nakai H, Yant SR, Storm TA, Fuess S, Meuse L, Kay MA. Extrachromosomal recombinant adeno-associated virus vector genomes are primarily responsible for stable liver transduction in vivo. *J Virol.* 2001;75(15):6969-6976. doi:10.1128/JVI.75.15.6969-6976.2001.
185. Guillouzo A, Rialland L, Fautrel A, Guyomard C. Survival and function of isolated hepatocytes after cryopreservation. *Chem Biol Interact.* 1999;121(1):7-16. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10418967>. Accessed January 19, 2016.
186. Hamel F, Grondin M, DenizEAU F, Averill-Bates DA, Sarhan F. Wheat extracts as an efficient cryoprotective agent for primary cultures of rat hepatocytes. *Biotechnol Bioeng.* 2006;95(4):661-670. doi:10.1002/bit.20953.
187. Moldéus P, Högberg J, Orrenius S. Isolation and use of liver cells. *Methods Enzymol.* 1978;52:60-71. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/672656>. Accessed January 19, 2016.
188. McMurray CH, Blanchflower WJ, Rice DA. Automated kinetic method for D-3-hydroxybutyrate in plasma or serum. *Clin Chem.* 1984;30(3):421-425. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6697489>. Accessed January 19, 2016.
189. Merrill AH, Sullards MC, Allegood JC, Kelly S, Wang E. Sphingolipidomics: high-throughput, structure-specific, and quantitative analysis of sphingolipids by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Methods.* 2005;36(2):207-224. doi:10.1016/j.ymeth.2005.01.009.
190. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram

- quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248-254. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/942051>. Accessed July 9, 2014.
191. Morillas M, Clotet J, Rubí B, et al. Identification of the two histidine residues responsible for the inhibition by malonyl-CoA in peroxisomal carnitine octanoyltransferase from rat liver. *FEBS Lett.* 2000;466(1):183-186. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10648838>. Accessed January 19, 2016.
 192. Saggerson ED, Carpenter CA. Response to starvation of hepatic carnitine palmitoyltransferase activity and its regulation by malonyl-CoA. Sex differences and effects of pregnancy. *Biochem J.* 1982;208(3):673-678. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1154017&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Accessed January 19, 2016.
 193. Prip-Buus C, Cohen I, Kohl C, Esser V, McGarry JD, Girard J. Topological and functional analysis of the rat liver carnitine palmitoyltransferase 1 expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 1998;429(2):173-178. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9650584>. Accessed January 19, 2016.
 194. Saggerson ED, Carpenter CA, Tselentis BS. Effects of thyroidectomy and starvation on the activity and properties of hepatic carnitine palmitoyltransferase. *Biochem J.* 1982;208(3):667-672. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1154016&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Accessed January 19, 2016.
 195. Mills SE, Foster DW, McGarry JD. Effects of pH on the interaction of substrates and malonyl-CoA with mitochondrial carnitine palmitoyltransferase I. *Biochem J.* 1984;219(2):601-608. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1153518&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Accessed January 19, 2016.
 196. Bieber LL, Wagner M. Effect of pH and acyl-CoA chain length on the conversion of heart mitochondrial CPT-I/CPT_o to a high affinity, malonyl-CoA-inhibited state. *Biochim Biophys Acta.* 1996;1290(3):261-266. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8765129>. Accessed January 19, 2016.
 197. Zammit VA. Time-dependence of inhibition of carnitine palmitoyltransferase I by malonyl-CoA in mitochondria isolated from livers of fed or starved rats.

- Evidence for transition of the enzyme between states of low and high affinity for malonyl-CoA. *Biochem J.* 1984;218(2):379-386. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1153351&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Accessed January 19, 2016.
198. Veerkamp JH, van Moerkerk TB, Glatz JF, Zuurveld JG, Jacobs AE, Wagenmakers AJ. ¹⁴C₂ production is no adequate measure of [¹⁴C]fatty acid oxidation. *Biochem Med Metab Biol.* 1986;35(3):248-259. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3087394>. Accessed January 19, 2016.
 199. Roduit R, Nolan C, Alarcon C, et al. A role for the malonyl-CoA/long-chain acyl-CoA pathway of lipid signaling in the regulation of insulin secretion in response to both fuel and nonfuel stimuli. *Diabetes.* 2004;53(4):1007-1019. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15047616>. Accessed January 19, 2016.
 200. Burnette WN. "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem.* 1981;112(2):195-203. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6266278>. Accessed June 5, 2015.
 201. Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (N Y).* 1993;11(9):1026-1030. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7764001>. Accessed March 18, 2015.
 202. De Temple M. Expresión de la quimera hCPT1A-GFP i del mutante hcpt1am en una cepa de levadura de baja fluorescencia. 2010.
 203. Askew EW, Dohm GL, Huston RL. Fatty acid and ketone body metabolism in the rat: response to diet and exercise. *J Nutr.* 1975;105(11):1422-1432. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/475>. Accessed July 24, 2016.
 204. Finck BN, Bernal-Mizrachi C, Han DH, et al. A potential link between muscle peroxisome proliferator- activated receptor-alpha signaling and obesity-related diabetes. *Cell Metab.* 2005;1(2):133-144. doi:10.1016/j.cmet.2005.01.006.
 205. Koves TR, Ussher JR, Noland RC, et al. Mitochondrial overload and incomplete fatty acid oxidation contribute to skeletal muscle insulin resistance. *Cell Metab.* 2008;7(1):45-56. doi:10.1016/j.cmet.2007.10.013.

206. Muoio DMMM, Koves TRKR. Skeletal muscle adaptation to fatty acid depends on coordinated actions of the PPARs and PGC1 α : implications for metabolic disease. <http://dx.doi.org/101139/H07-083>. 2007.
207. Meshkani R, Adeli K. Hepatic insulin resistance, metabolic syndrome and cardiovascular disease. *Clin Biochem.* 2009;42(13):1331-1346. doi:10.1016/j.clinbiochem.2009.05.018.
208. Samuel VT, Shulman GI. The pathogenesis of insulin resistance: integrating signaling pathways and substrate flux. *J Clin Invest.* 2016;126(1):12-22. doi:10.1172/JCI77812.
209. Berns KI, Linden RM. The cryptic life style of adeno-associated virus. *Bioessays.* 1995;17(3):237-245. doi:10.1002/bies.950170310.
210. Zincarelli C, Soltys S, Rengo G, Rabinowitz JE. Analysis of AAV serotypes 1-9 mediated gene expression and tropism in mice after systemic injection. *Mol Ther.* 2008;16(6):1073-1080. doi:10.1038/mt.2008.76.
211. Stefanovic-Racic M, Perdomo G, Mantell BS, Sipula IJ, Brown NF, O'Doherty RM. A moderate increase in carnitine palmitoyltransferase 1a activity is sufficient to substantially reduce hepatic triglyceride levels. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2008;294(5):E969-E977. doi:10.1152/ajpendo.00497.2007.
212. Akkaoui M, Cohen I, Esnous C, et al. Modulation of the hepatic malonyl-CoA-carnitine palmitoyltransferase 1A partnership creates a metabolic switch allowing oxidation of de novo fatty acids. *Biochem J.* 2009;420(3):429-438. doi:10.1042/BJ20081932.
213. Monsénégo et al. - 2012 - Enhancing liver mitochondrial fatty acid oxidation capacity in obese mice improves insulin sensitivity-annotated.pdf.
214. Monsénégo J, Mansouri A, Akkaoui M, et al. Enhancing liver mitochondrial fatty acid oxidation capacity in obese mice improves insulin sensitivity independently of hepatic steatosis. *J Hepatol.* 2012;56(3):632-639. doi:10.1016/j.jhep.2011.10.008.
215. An J, Muoio DM, Shiota M, et al. Hepatic expression of malonyl-CoA decarboxylase reverses muscle, liver and whole-animal insulin resistance. *Nat Med.* 2004;10(3):268-274. doi:10.1038/nm995.
216. Ishigaki Y, Katagiri H, Yamada T, et al. Dissipating excess energy stored in the

- liver is a potential treatment strategy for diabetes associated with obesity. *Diabetes*. 2005;54(2):322-332. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15677488>. Accessed July 24, 2016.
217. Savage DB, Choi CS, Samuel VT, et al. Reversal of diet-induced hepatic steatosis and hepatic insulin resistance by antisense oligonucleotide inhibitors of acetyl-CoA carboxylases 1 and 2. *J Clin Invest*. 2006;116(3):817-824. doi:10.1172/JCI27300.
 218. Bezy O, Tran TT, Pihlajamäki J, et al. PKC δ regulates hepatic insulin sensitivity and hepatosteatosis in mice and humans. *J Clin Invest*. 2011;121(6):2504-2517. doi:10.1172/JCI46045.
 219. Turinsky J, O'Sullivan DM, Bayly BP. 1,2-Diacylglycerol and ceramide levels in insulin-resistant tissues of the rat in vivo. *J Biol Chem*. 1990;265(28):16880-16885. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2211599>. Accessed August 27, 2016.
 220. Ussher JR, Koves TR, Cadete VJJ, et al. Inhibition of de novo ceramide synthesis reverses diet-induced insulin resistance and enhances whole-body oxygen consumption. *Diabetes*. 2010;59(10):2453-2464. doi:10.2337/db09-1293.
 221. Nakamura S, Takamura T, Matsuzawa-Nagata N, et al. Palmitate induces insulin resistance in H4IIEC3 hepatocytes through reactive oxygen species produced by mitochondria. *J Biol Chem*. 2009;284(22):14809-14818. doi:10.1074/jbc.M901488200.
 222. Monetti M, Levin MC, Watt MJ, et al. Dissociation of hepatic steatosis and insulin resistance in mice overexpressing DGAT in the liver. *Cell Metab*. 2007;6(1):69-78. doi:10.1016/j.cmet.2007.05.005.
 223. Choi CS, Savage DB, Kulkarni A, et al. Suppression of diacylglycerol acyltransferase-2 (DGAT2), but not DGAT1, with antisense oligonucleotides reverses diet-induced hepatic steatosis and insulin resistance. *J Biol Chem*. 2007;282(31):22678-22688. doi:10.1074/jbc.M704213200.
 224. Perry RJ, Kim T, Zhang X-M, et al. Reversal of Hypertriglyceridemia, Fatty Liver Disease, and Insulin Resistance by a Liver-Targeted Mitochondrial Uncoupler. *Cell Metab*. 2013;18(5):740-748. doi:10.1016/j.cmet.2013.10.004.
 225. Magkos F, Su X, Bradley D, et al. Intrahepatic diacylglycerol content is

- associated with hepatic insulin resistance in obese subjects. *Gastroenterology*. 2012;142(7):1444-1446.e2. doi:10.1053/j.gastro.2012.03.003.
226. Hundal RS, Salh BS, Schrader JW, Gómez-Muñoz A, Duronio V, Steinbrecher UP. Oxidized low density lipoprotein inhibits macrophage apoptosis through activation of the PI 3-kinase/PKB pathway. *J Lipid Res*. 2001;42(9):1483-1491. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11518769>. Accessed July 24, 2016.
227. Sunny NE, Parks EJ, Browning JD, Burgess SC. Excessive hepatic mitochondrial TCA cycle and gluconeogenesis in humans with nonalcoholic fatty liver disease. *Cell Metab*. 2011;14(6):804-810. doi:10.1016/j.cmet.2011.11.004.
228. Burgess SC, Jeffrey FMH, Storey C, et al. Effect of murine strain on metabolic pathways of glucose production after brief or prolonged fasting. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2005;289(1):E53-E61. doi:10.1152/ajpendo.00601.2004.
229. Summers SA. Ceramides in insulin resistance and lipotoxicity. *Prog Lipid Res*. 2006;45(1):42-72. doi:10.1016/j.plipres.2005.11.002.
230. Tao H, Zhang Y, Zeng X, Shulman GI, Jin S. Niclosamide ethanolamine-induced mild mitochondrial uncoupling improves diabetic symptoms in mice. *Nat Med*. 2014;20(11):1263-1269. doi:10.1038/nm.3699.
231. Motomura W, Inoue M, Ohtake T, et al. Up-regulation of ADRP in fatty liver in human and liver steatosis in mice fed with high fat diet. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;340(4):1111-1118. doi:10.1016/j.bbrc.2005.12.121.
232. Trevino MB, Mazur-Hart D, Machida Y, et al. Liver Perilipin 5 Expression Worsens Hepatosteatosis But Not Insulin Resistance in High Fat-Fed Mice. *Mol Endocrinol*. 2015;29(10):1414-1425. doi:10.1210/me.2015-1069.
233. Wang H, Hu L, Dalen K, et al. Activation of hormone-sensitive lipase requires two steps, protein phosphorylation and binding to the PAT-1 domain of lipid droplet coat proteins. *J Biol Chem*. 2009;284(46):32116-32125. doi:10.1074/jbc.M109.006726.
234. Turpin SM, Hoy AJ, Brown RD, et al. Adipose triacylglycerol lipase is a major regulator of hepatic lipid metabolism but not insulin sensitivity in mice. *Diabetologia*. 2011;54(1):146-156. doi:10.1007/s00125-010-1895-5.
235. Reid BN, Ables GP, Otlivanchik OA, et al. Hepatic overexpression of hormone-sensitive lipase and adipose triglyceride lipase promotes fatty acid oxidation,

- stimulates direct release of free fatty acids, and ameliorates steatosis. *J Biol Chem*. 2008;283(19):13087-13099. doi:10.1074/jbc.M800533200.
236. Martinez-Lopez N, Singh R. Autophagy and Lipid Droplets in the Liver. *Annu Rev Nutr*. 2015;35:215-237. doi:10.1146/annurev-nutr-071813-105336.
237. Alexaki A, Gupta SD, Majumder S, et al. Autophagy regulates sphingolipid levels in the liver. *J Lipid Res*. 2014;55(12):2521-2531. doi:10.1194/jlr.M051862.
238. Singh R, Kaushik S, Wang Y, et al. Autophagy regulates lipid metabolism. *Nature*. 2009;458(7242):1131-1135. doi:10.1038/nature07976.
239. Yang L, Li P, Fu S, et al. Defective hepatic autophagy in obesity promotes ER stress and causes insulin resistance. *Cell Metab*. 2010;11(6):467-478. doi:10.1016/j.cmet.2010.04.005.
240. Orellana-Gavaldà JM, Herrero L, Malandrino MI, et al. Molecular therapy for obesity and diabetes based on a long-term increase in hepatic fatty-acid oxidation. *Hepatology*. 2011;53(3):821-832. doi:10.1002/hep.24140.
241. Duarte JAG, Carvalho F, Pearson M, et al. A high-fat diet suppresses de novo lipogenesis and desaturation but not elongation and triglyceride synthesis in mice. *J Lipid Res*. 2014;55(12):2541-2553. doi:10.1194/jlr.M052308.
242. Delgado TC, Pinheiro D, Caldeira M, et al. Sources of hepatic triglyceride accumulation during high-fat feeding in the healthy rat. *NMR Biomed*. 2009;22(3):310-317. doi:10.1002/nbm.1327.
243. Lee WN, Bassilian S, Ajie HO, et al. In vivo measurement of fatty acids and cholesterol synthesis using D2O and mass isotopomer analysis. *Am J Physiol*. 1994;266(5 Pt 1):E699-E708. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8203508>. Accessed August 27, 2016.
244. Oosterveer MH, van Dijk TH, Tietge UJF, et al. High Fat Feeding Induces Hepatic Fatty Acid Elongation in Mice. Tomé D, ed. *PLoS One*. 2009;4(6):e6066. doi:10.1371/journal.pone.0006066.
245. Leavens KF, Easton RM, Shulman GI, Previs SF, Birnbaum MJ. Akt2 is required for hepatic lipid accumulation in models of insulin resistance. *Cell Metab*. 2009;10(5):405-418. doi:10.1016/j.cmet.2009.10.004.
246. Donnelly KL, Smith CI, Schwarzenberg SJ, Jessurun J, Boldt MD, Parks EJ. Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients

- with nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Invest*. 2005;115(5):1343-1351. doi:10.1172/JCI23621.
247. Lee JJ, Lambert JE, Hovhannisyan Y, et al. Palmitoleic acid is elevated in fatty liver disease and reflects hepatic lipogenesis. *Am J Clin Nutr*. 2015;101(1):34-43. doi:10.3945/ajcn.114.092262.
248. Timlin MT, Parks EJ. Temporal pattern of de novo lipogenesis in the postprandial state in healthy men. *Am J Clin Nutr*. 2005;81(1):35-42. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15640457>. Accessed August 27, 2016.
249. Hussain MM, Rava P, Walsh M, Rana M, Iqbal J. Multiple functions of microsomal triglyceride transfer protein. *Nutr Metab (Lond)*. 2012;9:14. doi:10.1186/1743-7075-9-14.
250. Chang BH, Liao W, Li L, Nakamuta M, Mack D, Chan L. Liver-specific inactivation of the abetalipoproteinemia gene completely abrogates very low density lipoprotein/low density lipoprotein production in a viable conditional knockout mouse. *J Biol Chem*. 1999;274(10):6051-6055. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10037685>. Accessed August 27, 2016.
251. Arguello G, Balboa E, Arrese M, Zanlungo S. Recent insights on the role of cholesterol in non-alcoholic fatty liver disease. *BBA - Mol Basis Dis*. 2015;1852:1765-1778. doi:10.1016/j.bbadis.2015.05.015.
252. Li F, Jiang C, Larsen MC, et al. Lipidomics Reveals a Link between CYP1B1 and SCD1 in Promoting Obesity. *J Proteome Res*. 2014;13(5):2679-2687. doi:10.1021/pr500145n.
253. Sanyal AJ, Pacana T. A Lipidomic Readout of Disease Progression in A Diet-Induced Mouse Model of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Trans Am Clin Climatol Assoc*. 2015;126:271-288. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26330688>. Accessed August 27, 2016.
254. Aviram R, Manella G, Kopelman N, et al. Lipidomics Analyses Reveal Temporal and Spatial Lipid Organization and Uncover Daily Oscillations in Intracellular Organelles. *Mol Cell*. 2016;62(4):636-648. doi:10.1016/j.molcel.2016.04.002.
255. Shon JC, Shin H-S, Seo YK, Yoon Y-R, Shin H, Liu K-H. Direct Infusion MS-Based Lipid Profiling Reveals the Pharmacological Effects of Compound K-Reinforced Ginsenosides in High-Fat Diet Induced Obese Mice. *J Agric Food Chem*.

- 2015;63(11):2919-2929. doi:10.1021/jf506216p.
256. Kasumov T, Li L, Li M, et al. Ceramide as a Mediator of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease and Associated Atherosclerosis. Zhang Y, ed. *PLoS One*. 2015;10(5):e0126910. doi:10.1371/journal.pone.0126910.
257. Nouredin M, Mato JM, Lu SC. Nonalcoholic fatty liver disease: update on pathogenesis, diagnosis, treatment and the role of S-adenosylmethionine. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2015;240(6):809-820. doi:10.1177/1535370215579161.

PUBLICACIONES

Pilar Valdecantos M., Prieto-Hontoria Pl, Pardo V, Módol T, Santamaría B, Weber M, Herrero L, Serra D, Muntané J, Cuadrado A, Moreno-Aliaga Mj, Alfredo Mj, Valverde Am. **Essential role of NRF2 in the protective effect of lipoic acid against lipoapoptosis in hepatocytes.** Free Radical Biology & Medicine. 2015 v. 84, p. 263-278. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2015.03.019. (Artículo de investigación)

Malandrino MI, Fucho R, Weber M, Calderón-Domínguez M, Mir JF, Valcarcel L, Escoté X, Gómez-Serrano M, Peral B, Salvadó L, Fernández-Veledo S, Casals N, Vázquez-Carrera M, Villarroya F, Vendrell JJ, Ser3ra D, Herrero L. **Enhanced fatty acid oxidation in adipocytes and macrophages reduces lipid-induced triglyceride accumulation and inflammation.** Am J Physiol Endocrinol Metab. 2015 May 1;308(9):E756-69. doi: 10.1152/ajpendo.00362.2014. (Artículo de investigación)

Herrero L, Mir JF, Weber M, Fucho R, Calderón M, Serra D. **Estratègies de modulació de l'oxidació d'àcids grassos com a tractament per combatre l'obesitat.** Revista de la Societat Catalana de Química. 2015 Dec, No. 14:16-24 doi: 10.2436/20.2003.01.61 (Artículo de revisión)

Calderon-Dominguez M, Mir JF, Fucho R, Weber M, Serra D, Herrero L. **Fatty Acid Metabolism and the Basis of Brown Adipose Tissue Function.** Adipocyte. 2016, Vol. 0, No. 0, 1-21 doi:10.1080/21623945.2015.1122857 (Artículo de revisión)

Calderon-Dominguez M, Sebastian D, Fucho R, Weber M, MIR JF, García-Casarrubios E, Obregón MJ, Zorzano A, Valverde Am, Serra D, Herrero L. **Carnitine palmitoyltransferase 1 increases lipolysis, UCP1 protein expression and mitochondrial activity in brown adipocytes.** Plos One. 2016, 11(7): e0159399. doi:10.1371/journal.pone.0159399 (Artículo de investigación)



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Free Radical Biology and Medicine

journal homepage: www.elsevier.com/locate/freeradbiomed

Original Contribution

Essential role of Nrf2 in the protective effect of lipoic acid against lipoapoptosis in hepatocytes



M. Pilar Valdecantos^{a,b}, Pedro Luis Prieto-Hontoria^c, Virginia Pardo^{a,e}, Teresa Módol^d, Beatriz Santamaría^{a,b,e}, Minéia Weber^{i,f}, Laura Herrero^{i,f}, Dolors Serra^{i,f}, Jordi Muntané^{j,g}, Antonio Cuadrado^{a,b,h}, María Jesús Moreno-Aliaga^{c,f}, J. Alfredo Martínez^{c,f}, Ángela M. Valverde^{a,b,e,*}

^a Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols (CSIC-UAM), 28029 Madrid, Spain

^b Instituto de Investigación Sanitaria La Paz, 28029 Madrid, Spain

^c Department of Nutrition, Food Science, and Physiology University of Navarra, 31008 Pamplona, Spain

^d Department of Biochemistry and Genetics, University of Navarra, 31008 Pamplona, Spain

^e Centro de Investigación Biomédica en Red de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas, Instituto de Salud Carlos III, 28029 Madrid, Spain

^f Centro de Investigación Biomédica en Red de la Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición, Instituto de Salud Carlos III, 28029 Madrid, Spain

^g Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas, Instituto de Salud Carlos III, 28029 Madrid, Spain

^h Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Neurodegenerativas, Instituto de Salud Carlos III, 28029 Madrid, Spain

ⁱ Department of Biochemistry and Molecular Biology, Institut de Biomedicina, Universitat de Barcelona, E-08028 Barcelona, Spain

^j Departamento de Cirugía General y Digestiva, Hospital Universitario Virgen del Rocío–Virgen Macarena/IBiS/CSIC/University of Sevilla, 41013 Sevilla, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 17 October 2014

Received in revised form

10 February 2015

Accepted 1 March 2015

Available online 1 April 2015

Keywords:

Antioxidant

Lipoic acid

Palmitic acid

Lipoapoptosis

Nrf2

Endoplasmic reticulum stress

Reactive oxygen species

Lipophagy

Nonalcoholic fatty liver disease

Free radicals

ABSTRACT

Excess of saturated free fatty acids, such as palmitic acid (PA), in hepatocytes has been implicated in nonalcoholic fatty liver disease. α -Lipoic acid (LA) is an antioxidant that protects against oxidative stress conditions. We have investigated the effects of LA in the early activation of oxidative and endoplasmic reticulum stress, lipid accumulation, and Nrf2-mediated antioxidant defenses in hepatocytes treated with PA or in rats fed a high-fat diet. In primary human hepatocytes, a lipotoxic concentration of PA triggered endoplasmic reticulum stress, induced the apoptotic transcription factor CHOP, and increased the percentage of apoptotic cells. Cotreatment with LA prevented these effects. Similar results were found in mouse hepatocytes in which LA attenuated PA-mediated activation of caspase 3 and reduced lipid accumulation by decreasing PA uptake and increasing fatty acid oxidation and lipophagy, thereby preventing lipoapoptosis. Moreover, LA augmented the proliferation capacity of hepatocytes after PA challenge. Antioxidant effects of LA ameliorated reactive oxygen species production and endoplasmic reticulum stress and protected against mitochondrial apoptosis in hepatocytes treated with PA. Cotreatment with PA and LA induced an early nuclear translocation of Nrf2 and activated antioxidant enzymes, whereas reduction of Nrf2 by siRNA abolished the benefit of LA on PA-induced lipoapoptosis. Importantly, posttreatment with LA reversed the established damage induced by PA in hepatocytes, as well as preventing obesity-induced oxidative stress and lipoapoptosis in rat liver. In conclusion, our work has revealed that in hepatocytes, Nrf2 is an essential early player in the rescue of oxidative stress by LA leading to protection against PA-mediated lipoapoptosis.

© 2015 Elsevier Inc. All rights reserved.

Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD)² is highly prevalent in Western countries and commonly accompanies some other clinical features of metabolic syndrome such as type 2 diabetes mellitus (T2DM), obesity, and dyslipidemia [1]. This disease is characterized

by accumulation of fat in the liver and encompasses a wide spectrum of liver disorders, ranging from benign simple steatosis to steatohepatitis [2]. Nonalcoholic steatohepatitis (NASH), which represents 5–10% of NAFLDs, is associated with hepatic inflammation, as well as with hepatocyte damage and various degrees of fibrosis. NASH can ultimately lead to cirrhosis, chronic liver disease with portal hypertension, liver failure, and hepatocellular carcinoma (HCC) [3,4].

Failure of the hepatocyte to metabolize free fatty acid (FFA) excess, particularly long-chain saturated FFAs such as palmitic acid (PA), by converting them into triglycerides (TGs) is associated with increased risk for hepatocyte lipoapoptosis, a cardinal pathogenic

Abbreviations: ER, endoplasmic reticulum; FFA, free fatty acid; HFD, high-fat diet; IRS, insulin receptor substrate; LA, α -lipoic acid; NAFLD, nonalcoholic fatty liver disease; NASH, nonalcoholic steatohepatitis; PA, palmitic acid

* Corresponding author at: Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols (CSIC-UAM), 28029 Madrid, Spain. Fax: +34 915854401.

E-mail address: avalverde@iib.uam.es (Á.M. Valverde).

feature of NASH [5,6]. The molecular mechanisms involved in FFA-induced toxicity have yet to be completely defined, but recent compelling data suggest that hepatocyte lipoapoptosis mainly arises from FFA-induced lipotoxic stress of intracellular organelles, in particular the mitochondria and endoplasmic reticulum (ER) [7].

Regarding mitochondria, FFA overload increases β -oxidation, resulting in an excessive number of electrons and the generation of mitochondrial reactive oxygen species (ROS). On the other hand, Yuzefovych and co-workers demonstrated that PA induces damage to mitochondrial DNA and increases superoxide production and drop in ATP production by causing aberrant respiratory complex formation [8,9]. Both factors contribute to establishing a vicious cycle that activates the induction of apoptosis (intrinsic apoptosis), but also induce insulin resistance and diabetes, also hallmarks of NASH. Therefore, NASH has recently been termed a mitochondrial disease [10–12]. With respect to the signaling pathways triggered by oxidative stress, both c-Jun N-terminal kinase (JNK) and p38 MAPK stress kinases have been involved in ROS-induced programmed cell death [13,14]. In this regard, some studies have suggested that PA induces lipotoxicity by activating the proapoptotic BH3-only protein Bcl-2-interacting mediator (Bim) and the BH3-only protein p53 upregulated modulator of apoptosis (Puma) via JNK [15–17]. Moreover, it has been suggested that mitochondria-derived ROS induced by PA may be major contributors to JNK activation in hepatic cells [18]. More recently, the activation of ER stress signaling induced by saturated FFA has been linked to hepatocyte lipoapoptosis [19–22]. Persistent ER stress was found in mice fed a methionine–choline-deficient diet, an experimental model of NASH [23–25], as well as in human patients [26,27].

Research into the attenuation or complete suppression of oxidative and ER stress during NAFLD has become a major challenge in recent years. Therefore, tight control of ROS levels by antioxidant molecules and detoxifying enzymes is important to restore the balance between oxidants and antioxidants in cells challenged with oxidative insults. In this regard, nuclear factor erythroid-2-related factor 2 (Nrf2) activates detoxifying enzymes by binding to antioxidant response elements (AREs) in target genes. Nrf2 represses the expression of genes involved in FA synthesis and, therefore, may play a pivotal role in the development of NASH [28]. In this context, the ability of α -lipoic acid (1,2-dithiolane-3-pentanoic acid; LA) to activate Nrf2 in various animal models of acute damage, such myocardial ischemia/reperfusion [29], arsenic [30,31], or acetaminophen intoxication [32], has been described. On the other hand, LA exerts beneficial physiological effects such as attenuation of oxidative stress, prevention of body weight gain induced by high-fat diet (HFD), and reduction of energy efficiency [33–35]. Moreover, some clinical trials demonstrate the ability of LA supplementation to improve T2DM and various complications such as retinopathy [36,37] or nephropathy [38,39]. In animal models, some beneficial effects of LA supplementation in reducing markers of oxidative and ER stress in NAFLD have been reported [40,41]. However, at the molecular level the sequential effects of LA on both kinds of stresses in hepatocyte overload by saturated FFA remain unknown. To address this issue, we have investigated the early activation of oxidative and ER-stress-related parameters in human and mouse hepatocytes treated with PA and the effects of LA. We found that the beneficial effects of LA on PA-mediated oxidative stress preceded its effects on ER stress, Nrf2 being an essential player in the rescue of lipoapoptosis by LA. Importantly, we have demonstrated for the first time by *in vitro* and *in vivo* approaches that lipophagy is involved in the beneficial effects of LA on lipid storage in hepatocytes and

also that LA administered to obese rats in an intervention protocol decreases hepatocyte lipoapoptosis.

Materials and methods

Reagents and antibodies

Fetal bovine serum (FBS) and culture media were obtained from Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). PA and LA were from Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, USA). Anti-cleaved (Asp175) caspase 3 (9661), anti-phospho-JNK (Thr183/Tyr185) (4668), anti-phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182) (9211), anti-phospho-PERK (Thr980) (3179), anti-phospho-eIF2 α (Ser51) (9721), anti-phospho-p53 (Ser15) (9286), anti-Bax (2772), anti-Puma (7467), and anti-Bim (2919) antibodies were purchased from Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA). Anti-Bclx (610211) antibody was from BD Biosciences (San Diego, CA, USA). Anti-JNK (sc-571), anti-p38 MAPK (sc-9212), anti-Nrf2 (C-20, sc-722), anti-PERK (sc-13073), anti-CHOP (sc-7351), anti-p53 (sc-393031), and anti-CD36/FAT (sc-9156) antibodies were from Santa Cruz (Dallas, TX, USA). Anti-IRS-1 (06-248), anti-IRS2 (06-506), anti-p85 α (06-195), anti-HO1 (AB1284), and anti-catalase (219010) antibodies were from Merck Millipore (Darmstadt, Germany). Anti- β -actin (A-5441) and anti- α -tubulin (T-5168) antibodies were from Sigma. Anti-Lamin B antibody (aB16048) was from Abcam (Cambridge, UK). Anti-manganese superoxide dismutase (ADI SOD 111) and anti-glutathione peroxidase (ADI SPA 541 E) antibodies were from Enzo Life Science (Farmingdale, NY, USA).

Animal model

Six-week-old male Wistar rats were obtained from the Research Center of Applied Pharmacology (Pamplona, Spain). Animals were housed in a temperature-controlled room ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) with a 12-h light–dark cycle, fed a pelleted chow diet, and given deionized water *ad libitum* for an adaptation period of 5 days. After this period, the rats were assigned to four experimental groups for 56 days. The control (C) group ($n = 10$) was fed a standard commercially available (Harlan Tekland Iberica, Barcelona, Spain) diet (4.6% wt/wt of energy as lipids). The obese group (OB) ($n = 6$) was fed *ad libitum* a commercially available HFD (OpenSource Diets, Research Diets, New Brunswick, NJ) (60% wt/wt of energy as lipids); the OLIP (obese + LA) group ($n = 10$) was fed *ad libitum* on a HFD supplemented with racemic α -LA for 56 days in a proportion of 0.25 g LA/100 g of diet, as previously described [34]; the posttreatment group (POST) ($n = 6$) was fed on a HFD for 42 days, and after this period we provided the HFD supplemented with LA in a proportion of 0.25 g LA/100 g of diet for the last 14 days. Body weight and food intake were recorded every 2–3 days. At the end of the experimental period, the rats were euthanized and blood and liver samples were immediately collected, frozen in liquid nitrogen, and kept at -80°C . All experimental procedures were performed according to national and institutional guidelines for animal care and use at the University of Navarra. Metabolic parameters (body weight gain, white adipose tissue (WAT) and liver weight, liver triglyceride content, plasma triglycerides, and free fatty acids) were determined as previously described [33,34,42,43].

Cell culture

Human hepatocytes were prepared from liver biopsies obtained from surgical resection for liver tumor after obtaining the patients' written consent. Isolation of hepatocytes was based on the two-step collagenase procedure [44]. The generation and

characterization of immortalized hepatocyte cell lines from mice have been previously described [45]. Cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) plus 10% heat-inactivated FBS and stimulated with PA and LA as described in the figure legends.

Free fatty acid preparation

PA was dissolved in isopropyl alcohol at a stock concentration of 80 mM. PA was added to DMEM containing 1% bovine serum albumin (BSA) to ensure a physiologic ratio between bound and unbound FFA in the medium, approximating the molar ratio present in plasma. The concentrations of PA used in the experiments (600–800 μ M) were similar to the fasting FFA plasma concentrations observed in human NASH, ranging from 700 to 1000 μ M [16]. The concentration of isopropyl alcohol (vehicle) was 1% in final incubations.

Fatty acid uptake

Mouse hepatocytes were treated for 4 h with or without LA in the absence or presence of PA. Then the cells were washed with phosphate-buffered saline (PBS) and incubated for 50 min in Krebs–Ringer buffer without glucose, containing 125 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 1.25 mM KH₂PO₄, 1.25 mM MgSO₄·7H₂O, 25 mM NaHCO₃, pH 7.4, and saturated oxygen. At the end of the incubation, 1 mM (final concentration) L-carnitine (Sigma–Aldrich), 80 μ M PA (Sigma–Aldrich), and 20 μ M [¹⁴C]palmitic acid (58 μ Ci/mol, PerkinElmer, Waltham, MA, USA) were added for a further 10 min. Then, the cells were washed with PBS and scraped in cold buffer (0.25 M sucrose, 10 mM Tris–HCl, 1 mM EDTA, and 1 mM dithiothreitol, pH 7.4). After two cycles of freezing/thawing in liquid nitrogen, radioactivity was counted in a Wallac 1409 counter (EG&G Co.). Results were normalized to total protein content of cell extracts.

Measurement of palmitate oxidation

FA oxidation was measured as previously described [46]. Briefly, hepatocytes were cultured in 25-cm² flasks until they reached 90% confluence. The day of the assay the cells were washed in PBS and incubated for 4 h at 37°C with medium containing DMEM, 1% fatty-acid-free BSA, 5% FBS, and 1% penicillin and streptomycin with or without 250 μ M LA and 600 μ M PA. Cells were washed with KRBH 0.1% BSA, incubated for 30 min at 37°C with KRBH 1% BSA, and washed again in KRBH 0.1% BSA. The cells were then incubated for 3 h at 37°C with fresh KRBH containing 2.5 mM glucose, 0.8 mM carnitine, plus 0.25 mM [¹⁻¹⁴C]palmitate (PerkinElmer). The scintillation values were normalized to the protein content of each flask.

Determination of reduced/oxidized glutathione (GSH/GSSG) ratio

Reduced and oxidized glutathione levels were measured by the Tietze method as modified by Rahman et al. [47]. For this purpose, cells were sonicated for 30 s in 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.5) containing 5 mM EDTA and 0.6% (wt/vol) sulfosalicylic acid and centrifuged at 8000g for 10 min at 4°C, and the corresponding extract was used for GSH (1:10 vol/vol) and GSSG (1:2 vol/vol) determinations. To determine GSSG levels, we treated samples with 2-vinylpyridine (Sigma–Aldrich) to eliminate all of the GSH present in the samples.

Measurement of superoxide and hydroperoxide production

Superoxide (O₂^{•-}) production was quantified by flow cytometry using dihydroethidium (DHE) as probe. The analysis of hydrogen peroxide (H₂O₂) was measured in mouse hepatocytes by fluorescence using 2',7'-dichlorofluorescein (DCFH) as previously described [48].

Detection of mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi_m$)

$\Delta\psi_m$ was measured by flow cytometry using the lipophilic cation MitoCapture reagent (Biovision, Milpitas, CA, USA), which fluoresces differently in healthy vs apoptotic cells. MitoCapture stains mitochondria in cells with high mitochondrial potential by forming bright red fluorescent aggregates (ex/em = 488/590). In cells with depolarized or damaged mitochondria, MitoCapture forms a monomer and thus it remains in the cytoplasm, fluorescing green (ex/em = 488/530). For staining, mouse hepatocytes were incubated with MitoCapture reagent according to the manufacturer's instructions with slight modifications. The cells were then washed in PBS and analyzed immediately by a flow cytometer (FACScan; BD Biosciences, San Jose, CA, USA). All data were analyzed with BD CellQuest Pro software.

Analysis of caspase 3 activity

Cells were scraped off, collected by centrifugation at 2500g for 5 min, and lysed at 4°C in 5 mM Tris–HCl, pH 8, 20 mM EDTA, 0.5% Triton X-100. Caspase 3 activity was determined as previously described [49]. Protein concentration of cell lysates was determined, and the results are presented as arbitrary units of caspase 3 activity/micrograms of total protein.

Immunofluorescence

Cells were grown in glass coverslips until 80% confluence was reached. Then, the cells were washed twice with PBS, after which they were fixed in 4% paraformaldehyde for 20 min at room temperature (RT) and then permeabilized with Triton 0.1% for 2 min. After that, the cells were blocked in PBS–3% BSA for 2 h at RT. Primary anti-Nrf2 or anti-LC3 (4108, Cell Signaling) antibodies were applied for 1 h at 37°C in PBS–1% BSA followed by 4 × 5-min washes in PBS, a 45-min incubation with fluorescence-conjugated secondary antibody (Alexa 488 goat anti-rabbit), and four final washes of 5 min each in PBS. Immunofluorescence was examined in a Nikon Eclipse 90i microscope. Immunofluorescence mounting medium was from Vector (Burlingame, CA, USA). For 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) staining, cells were washed with PBS, fixed in methanol (–20°C) for 2 min, and stained with 1 μ M DAPI for 5 min in the dark. After washing with PBS, nuclear morphology was analyzed by fluorescence or confocal microscopy.

For immunofluorescence analysis of lipid storage, cells were grown in glass coverslips until 80% confluence was reached. Then, the cells were washed twice with PBS, after which they were fixed in 4% paraformaldehyde for 20 min at RT and were stained with Nile red (0.1 μ g/ml) for 10 min at RT. Coverslips were mounted with fluorescent mounting medium and images were taken using a confocal microscope LSM710 (Zeiss, Oberkochen, Germany). In some experiments, after incubation with the secondary antibody, lipid droplets were stained with BODIPY 493/503 (Life Technology) at 2 μ g/ μ l for 10 min at RT.

Analysis of apoptosis by TUNEL

For cell death detection, human primary hepatocytes or paraffin-embedded liver biopsy sections (5 μ m) were stained using

the DeadEnd fluorimetric TUNEL system (Promega, Madison, WI, USA), according to the manual instructions. DAPI was used for DNA staining. After that, the liver sections and coverslips were mounted with fluorescent mounting medium and images were taken using the confocal microscope.

Analysis of cellular viability by crystal violet

After cell incubation with various treatments, the medium was discarded, and the remaining viable adherent cells were fixed with 1% glutaraldehyde for 10 min. Then, the cells were stained with crystal violet (0.1% wt/vol) for 30 min. After this time, the plates were rinsed with tap water and allowed to dry and, finally, 10% (vol/vol) acetic acid was added to allow solubilization. The absorbance of each plate was read in a spectrophotometer at 590 nm. Dishes without cells were processed in parallel to correct the nonspecific adhesion of crystal violet to the plastic.

Quantification of apoptotic cells by flow cytometry

After induction of apoptosis, adherent and nonadherent cells were collected by centrifugation, washed with PBS, and fixed with cold ethanol. The cells were then washed, resuspended in PBS, and incubated with RNase A (25 $\mu\text{g}/10^6$ cells) for 30 min at 37°C. After addition of 0.05% propidium iodide, the cells were analyzed by flow cytometry. All data were analyzed with BD CellQuest Pro software (BD Biosciences).

Electron microscopy in mouse hepatocytes

For electron microscopy, hepatocytes were fixed in glutaraldehyde (2%) plus *p*-formaldehyde (4%) for 60 min. Samples were postfixed in 1% osmium tetroxide for 60 min at 25°C, stained with uranyl acetate (5 mg/ml) for 1 h at 25°C, dehydrated in acetone, and embedded in Epon 812 (EMbed 812; Electron Microscopy Science, Hatfield, PA, USA). Ultrathin sections, unstained or post-stained with uranyl acetate and lead hydroxide, were examined under a Morgagni 268D transmission electron microscope (FEI, Hillsboro, OR, USA) equipped with a Mega View II charge-coupled device camera (SIS, Soft Imaging System GmbH, Munster, Germany) and analyzed with AnalySIS software (SIS).

Evaluation of the proliferative capacity of mouse hepatocytes

Immortalized mouse hepatocytes were cultured for 4 and 6 h with various treatments (control, PA, LA, PA plus LA). After this, the cells were trypsinized, replated, and grown in 10% FBS-supplemented medium for a further 48 h. The proliferative capacity was analyzed by crystal violet staining.

Extraction of nuclear and cytosolic proteins

Cells were resuspended at 4°C in 10 mM Hepes–KOH, pH 7.9, 1.5 mM MgCl_2 , 10 mM KCl, 0.5 mM dithiothreitol (DTT), 0.2 mM phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF), 0.75 $\mu\text{g}/\text{ml}$ leupeptin, 0.75 $\mu\text{g}/\text{ml}$ aprotinin (buffer A); allowed to swell on ice for 10 min; and then vortexed for 10 s. The samples were centrifuged and the supernatant containing the cytosolic fraction was stored at -70°C . The pellet was resuspended in cold buffer C (20 mM Hepes–KOH, pH 7.9, 25% glycerol, 420 mM NaCl, 1.5 mM MgCl_2 , 0.2 mM EDTA, 0.5 mM DTT, 0.2 mM PMSF, 0.75 $\mu\text{g}/\text{ml}$ leupeptin, 0.75 $\mu\text{g}/\text{ml}$ aprotinin) and incubated on ice for 20 min for high salt

extraction. After removal of cellular debris by centrifugation for 2 min at 4°C, the supernatant fraction was stored at -80°C .

Homogenization and preparation of cellular and tissue extracts

To obtain total cell lysates, cells from supernatants were collected by centrifugation at 2000g for 5 min at 4°C. Attached cells were scraped off in ice-cold PBS, pelleted by centrifugation at 4000g for 10 min at 4°C, and resuspended in lysis buffer (25 mM Hepes, 2.5 mM EDTA, 0.1% Triton X-100, 1 mM PMSF, and 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ leupeptin). Cellular lysates were clarified by centrifugation at 12,000g for 10 min. To obtain liver extracts, frozen livers were homogenized in 16 volumes (wt/vol) of ice-cold lysis buffer containing 50 mM Tris–HCl, 1% Triton X-100, 2 mM EGTA, 10 mM EDTA acid, 100 mM NaF, 1 mM $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$, 2 mM Na_3VO_4 , 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ PMSF, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ aprotinin, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ pepstatin A, and 1 g/ml leupeptin. Livers were homogenized using the Brinkman PT 10/35 Polytron and cleared by ultracentrifugation at 40,000g for 40 min at 4°C. The supernatant was aliquotted and stored at -80°C .

Protein determination

Protein determination was performed by the Bradford dye method, using the Bio-Rad reagent and BSA as the standard.

Western blot

After protein content determination, proteins were separated by SDS–PAGE. Gels were transferred to Immobilon membranes and were blocked using 5% nonfat dried milk or 3% BSA in 10 mM Tris–HCl, 150 mM NaCl, pH 7.5, and incubated overnight with the indicated antibodies in 0.05% Tween 20, 10 mM Tris–HCl, 150 mM NaCl, pH 7.5. Immunoreactive bands were visualized using the ECL Western blotting protocol (Millipore, Darmstadt, Germany).

Quantitative real-time PCR analysis and primer sequence

Total RNA of mouse hepatocytes samples was extracted using TRIzol reagent and was reverse transcribed using a SuperScript III First-Strand Synthesis System for qPCR following the manufacturer's indications. qPCR was performed with an ABI 7900 sequence detector using the SyBr green method and $d(\text{N})_6$ random hexamer with primers purchased from Invitrogen. PCR thermocycling parameters were 95°C for 10 min, 40 cycles of 95°C for 15 s, and 60°C for 1 min. Each sample was run in triplicate and was normalized to 36b4 RNA. Fold changes were determined using the $\Delta\Delta\text{C}_t$ method. Primer sequences are available upon request.

Statistical analysis

Data are reported as the mean \pm SEM. Normal distribution was assessed by two different tests, Shapiro–Wilk and Kolmogorov–Smirnov. To determine the effects of LA treatment, one-way ANOVA or Kruskal–Wallis followed by a Bonferroni or Dunns test, respectively, was carried out. The *p* values presented in figures and tables corresponded to post hoc test. The *p* values of ANOVA or Kruskal–Wallis test appear in a separate column in Table 1. All statistical analyses were performed using the GraphPad Prism 5.0 software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) and SPSS 15.0 software (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA). Differences were considered statistically significant at $p < 0.05$.

Table 1

Body composition, liver triglyceride content, and plasma lipid profile in lean and obese rats supplemented with LA.

	Control (n = 10)	OB (n = 6)	POST (n = 6)	ANOVA
Body weight gain (g)	166.7 ± 8.55	253 ± 12.6 ^{***}	220.3 ± 11.73 ^b	< 0.001
WAT (%)	7.2 ± 0.39	12.9 ± 0.64 ^{***}	10.89 ± 1.37 ^a	< 0.001
Liver triglyceride content (%)	3.6 ± 0.42	9.5 ± 0.45 ^{***}	5.1 ± 0.9 ^b	< 0.001
Plasma triglyceride (mg/dl)	69.9 ± 7.16	63.7 ± 4.6	44.8 ± 9.88 ^a	0.0024
Plasma free fatty acids (mg/dl)	0.80 ± 0.141	0.78 ± 0.212	0.56 ± 0.103 ^b	< 0.001
Plasma ketone bodies (mg/dl)	1.6 ± 0.14	1.8 ± 0.27	0.9 ± 0.14 ^b	< 0.001

Control, chow-fed animals; OB, HFD-fed animals; POST, HFD-fed animals plus posttreatment with LA. Parameters corresponding to the OLIP group (cotreatment with LA) have been previously reported [36,42]. Values are the mean ± SEM. Probabilities were calculated according to one-way ANOVA followed by post hoc multiple comparisons by Bonferroni test.

^{***} $p < 0.001$ vs control group.

^a $p < 0.05$ vs OB group.

^b $p < 0.01$ vs OB group.

Results

LA prevents the effects of PA in the activation of stress kinases, ER stress, and lipoapoptosis and increases the expression of Nrf2-related proteins in primary human hepatocytes

We first analyzed the effects of LA on PA-induced lipoapoptosis in primary human hepatocytes treated with PA (800 μM) in the absence or presence of LA (250 μM). Quantification of TUNEL-positive hepatocytes revealed a significant increase after PA treatment for 16 h, and this effect was not observed in cells cotreated with LA (Fig. 1A). At the molecular level, phosphorylation of stress kinases such as JNK and p38 MAPK, as well as the ER stress kinase eIF2α, was observed at 8 h in PA-treated human hepatocytes, whereas cotreatment with PA and LA abolished this effect (Fig. 1B). Similar results were found when treatments were prolonged up to 16 h (data not shown). Moreover, the induction of the ER-stress-related proapoptotic transcription factor CHOP, detected in PA-treated cells at 16 h, was significantly reduced by the cotreatment with LA (Fig. 1C).

The analysis of the antioxidant defenses, as monitored by protein levels of total Nrf2, manganese superoxide dismutase (Sod2), and catalase, revealed that cotreatment of PA with LA triggered the rapid (8 h) and strong induction of an antioxidant defense in response to PA, which was sustained up to 16 h (data not shown). Notably, LA alone was sufficient to increase some antioxidant defenses, although with a minor effect (Fig. 1D).

LA attenuates PA-mediated early lipid storage by decreasing PA uptake, increasing fatty acid oxidation, and inducing lipophagy in mouse hepatocytes

Owing to the limitations of human primary hepatocytes as an experimental cellular system, we analyzed the effects of LA on lipotoxicity in immortalized mouse hepatocytes generated and validated in our laboratory [45]. Because these cells were more sensitive to PA, the 600 μM PA concentration was used. As expected, an increase in total lipid accumulation was observed in PA-treated mouse hepatocytes at early times (4 h), accumulation that increased in a time-dependent manner, reaching a peak after 8 h of treatment. Interestingly, this increase was significantly prevented by cotreatment with LA (Fig. 2A and Supplementary Figs. 1A and 1B). We next investigated the LA lowering effects on the early lipid storage in hepatocytes. As depicted in Fig. 2B, treatment with LA plus PA decreased [¹⁴C]palmitic acid uptake into hepatocytes compared to cells treated with PA alone. Moreover, hepatocytes cultured with LA plus PA for 4 h showed decreased protein content of the fatty acid translocase CD36/FAT (Fig. 2C) and its mRNA levels (Fig. 2E) compared to those treated with PA alone,

and this effect was maintained at 8 h (Supplementary Fig. 1C). However, mRNA levels of FABP5 were not modulated by LA. We also analyzed genes involved in fatty acid transport, lipolysis, fatty acid synthesis, and oxidation (Fig. 2E and Supplementary Fig. 1D). Hepatocytes treated with PA plus LA for 4 h showed decreased *fasn* and *scd1* expression compared to the treatment with PA alone and, in contrast, genes modulating lipolysis (*pnpla2* and *lipc*) and fatty acid oxidation (*ppara*, *pgc1a*, *cpt1a*, and *aco1*) were increased by LA. Recently, it has been demonstrated that inhibition of autophagy in cultured hepatocytes and mouse liver increased TG storage in lipid droplets [50], involving lipophagy as a mechanism that participates in lipid mobilization [51]. Double immunofluorescence revealed lipid droplets interacting with punctate LC3, a marker of autophagosomes, in mouse hepatocytes treated with LA plus PA and this effect was completely absent in cells cultured with PA alone (Fig. 2F). In the light of these data, the presence of autophagosomes containing lipid droplets was observed exclusively in LA plus PA-treated hepatocytes.

Antioxidant effects of LA ameliorate PA-mediated ROS production and protect against mitochondrial apoptosis in mouse hepatocytes

Because excessive lipid accumulation triggers mitochondria-mediated apoptosis in hepatic cells [7], we analyzed PA-induced lipoapoptosis and the effects of LA. Caspase 3 cleavage and its enzymatic activity were induced by PA at 8 h and maintained up to 16 h (Figs. 3A and B, Supplementary Figs. 2A and 2B). Together with caspase 3 activation, PA treatment also increased the percentage of apoptotic hepatocytes in a time-dependent manner (Fig. 3C, Supplementary Fig. 2C). LA cotreatment was able to prevent caspase 3 cleavage and apoptosis of the hepatocytes at different experimental periods. To explore potential mechanisms involved in the aforementioned effects of LA on apoptosis, the activation of ER stress-mediated kinases was also evaluated. The responses in PERK, JNK, and p38 MAPK phosphorylation, found at 8 h and maintained at 16 h (Fig. 3D and Supplementary Figs. 2D and 2E), were prevented by LA cotreatment.

Treatment of mouse hepatocytes with PA decreased cellular viability and this effect was ameliorated by cotreatment with LA (Supplementary Fig. 3A). Taking into account that phosphorylation of JNK triggers the degradation of insulin receptor substrates 1 (IRS1) and 2 (IRS2), and the relationship between degradation of IRSs and reduction of hepatocyte viability previously reported by our group [26,52], degradation of both IRS1 and IRS2 induced by PA at 16–24 h was suppressed in cells cotreated with PA and LA (Supplementary Figs. 3B and 3C). Also, cells treated with PA were not able to proliferate after replating (Supplementary Fig. 3D), but cotreatment with PA plus LA prevented the deleterious effects of PA on cell proliferation after replating.

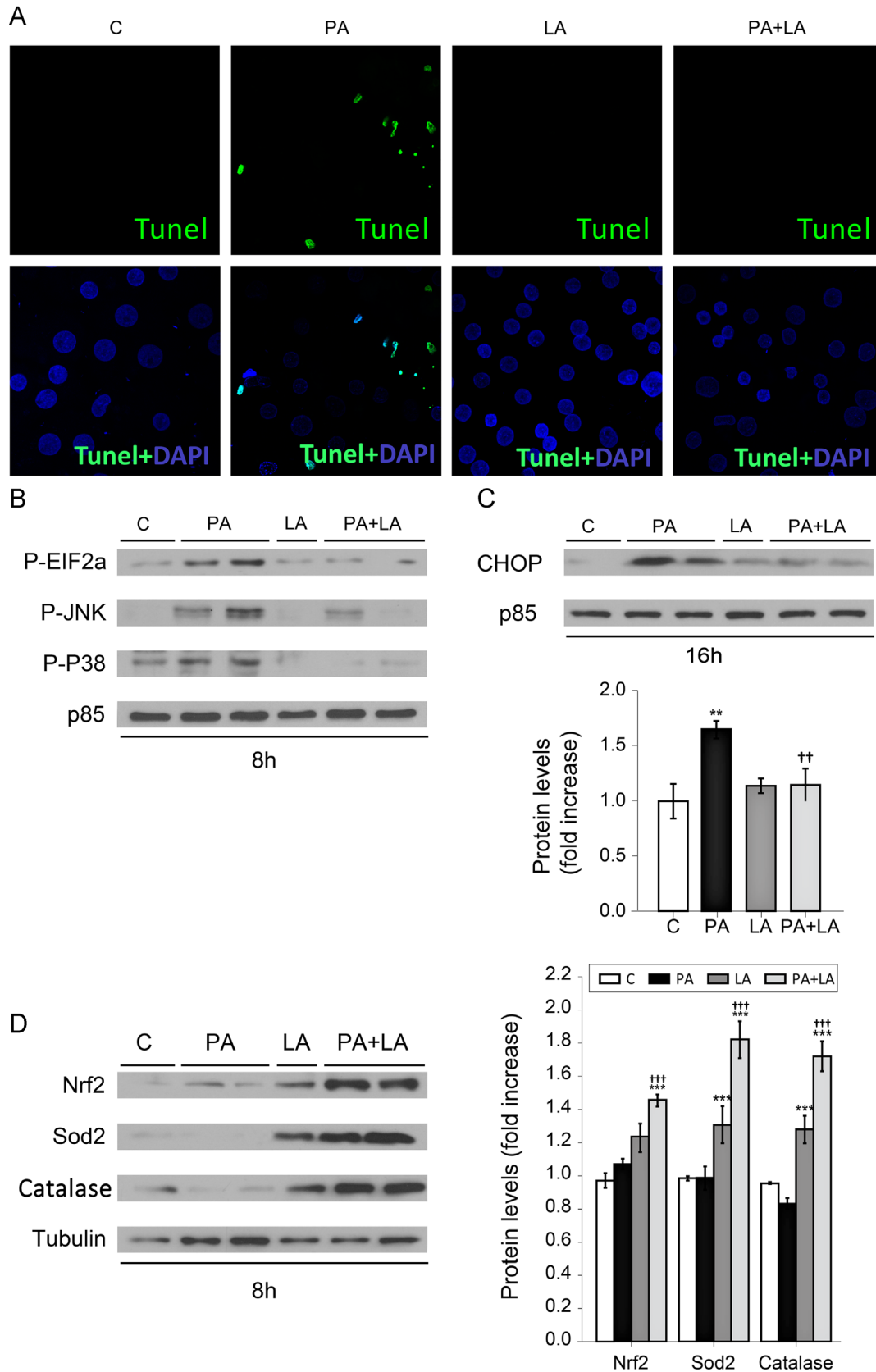


Fig. 1. Lipoic acid (LA) cotreatment prevents the effects of palmitic acid (PA) on the activation of ER stress kinases and lipopoptosis and increases the expression of Nrf2-related proteins in primary human hepatocytes. Study of apoptosis, ER stress markers, and antioxidant-related proteins in primary human hepatocytes treated with PA (800 μ M), LA (250 μ M), or both (PA + LA, 800 μ M + 250 μ M) for 16 h. (A) Representative images from TUNEL assay after 16 h of treatment. (B) Representative Western blot analysis of the phosphorylation of ER stress kinases (eIF2 α , JNK, p38 MAPK) at 8 h. (C) Protein expression of CHOP at 16 h and quantification of densitometric analysis of the autoradiograms corresponding to three independent experiments performed in duplicate. (D) Protein levels of Nrf2, Sod2, and catalase at 8 h. Representative Western blot (left) and quantification of densitometric analysis of the autoradiograms corresponding to three independent experiments performed in duplicate (right). Data are presented as the mean \pm SEM. ** p < 0.01 and *** p < 0.001 vs control (C) or †† p < 0.01 and ††† p < 0.001 vs PA group according to Kruskal-Wallis test followed by post hoc multiple comparisons by Dunns test.

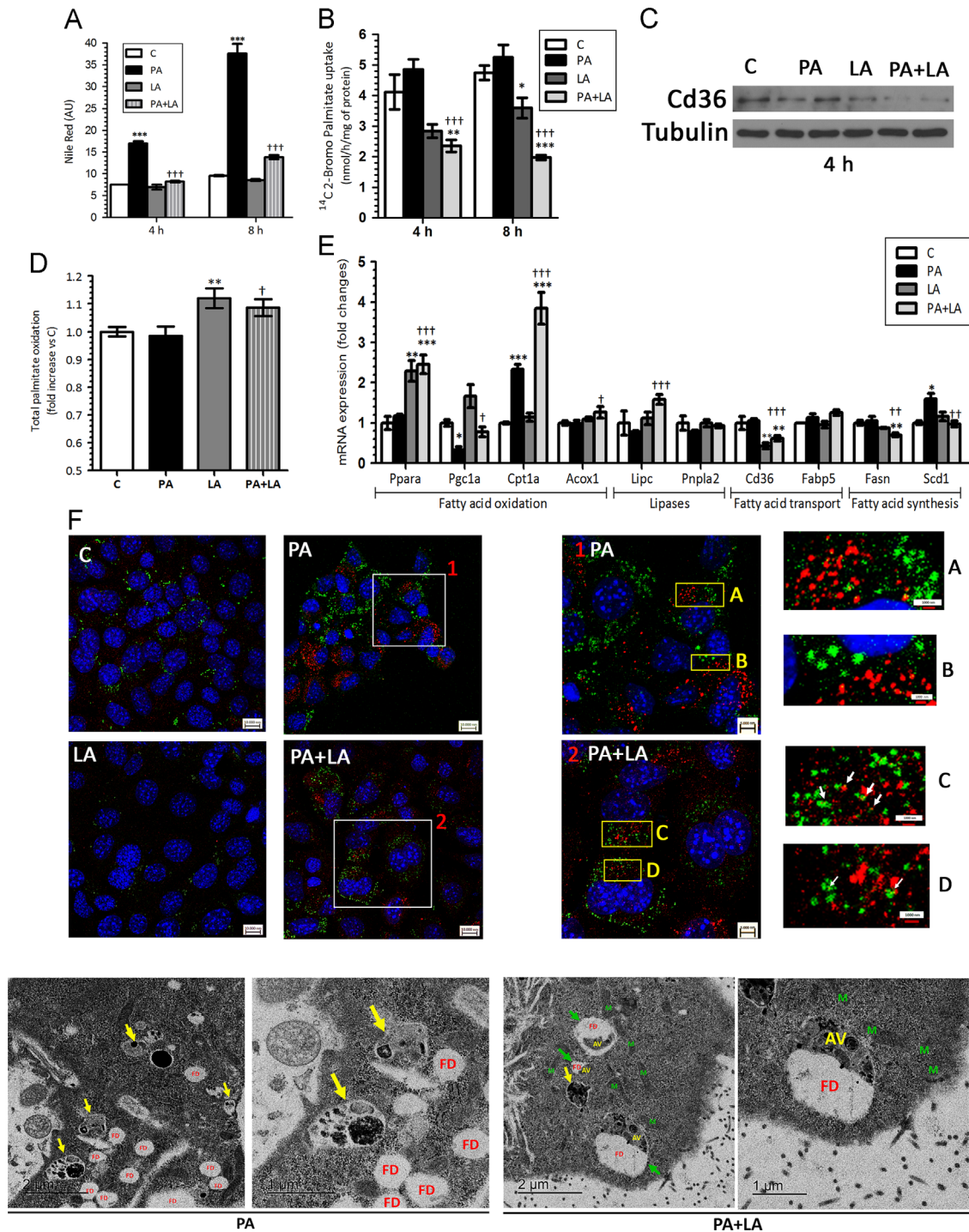


Fig. 2. LA attenuated PA-mediated early lipid storage by decreasing PA uptake, increasing fatty acid oxidation, and inducing lipophagy in mouse hepatocytes. Study of lipid storage in immortalized mouse hepatocytes treated with PA (600 μ M), LA (250 μ M), or both (PA + LA, 600 μ M + 250 μ M) for the indicated time periods. (A) Quantification of intracellular lipid storage measured by flow cytometry. (B) Effect of LA on fatty acid uptake evaluated by measuring labeled PA uptake. (C) Representative images of Western blot analysis using an antibody that detects CD36/FAT and α -tubulin as a loading control. (D) Total PA oxidation rate represented as the sum of acid-soluble products plus CO₂ oxidation in mouse hepatocytes after 4 h of treatments. (E) Analysis by real-time qPCR of mRNA levels of genes involved in fatty acid transport, lipolysis, fatty acid synthesis, and fatty acid oxidation at 4 h of treatment. (F) Representative images of LC3 immunofluorescence (red) and BODIPY 493/503 (green) after 4 h of treatment (top). The interaction between LC3 and intracellular lipids is indicated in the corresponding insets by an arrow. Representative electron microscope images of hepatocytes treated 4 h with PA or PA plus LA (FD, fat droplet; M, mitochondrion; AV autophagic vacuole) (bottom). Yellow arrows indicate autophagosomes and green arrows indicate autophagosomes containing lipid droplets. All data are from three to five independent experiments performed in duplicate and results are presented as the mean \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$ vs control (C) or † $p < 0.05$, †† $p < 0.01$, and ††† $p < 0.001$ vs PA group according to ANOVA followed by post hoc multiple comparisons by Bonferroni test.

To investigate which pathway was initially responsible for the protection elicited by LA against PA-mediated lipoapoptosis, we measured oxidative stress. Changes in hydroperoxide production were not detected before 8 h of PA treatment and peaked at 16 h,

and this effect was reversed with LA cotreatment (Fig. 3E). Next, we analyzed intracellular superoxide production as an indicator of mitochondrial oxidative damage. As depicted in Fig. 3F, PA induced an early peak at 4 h in superoxide production that was maintained

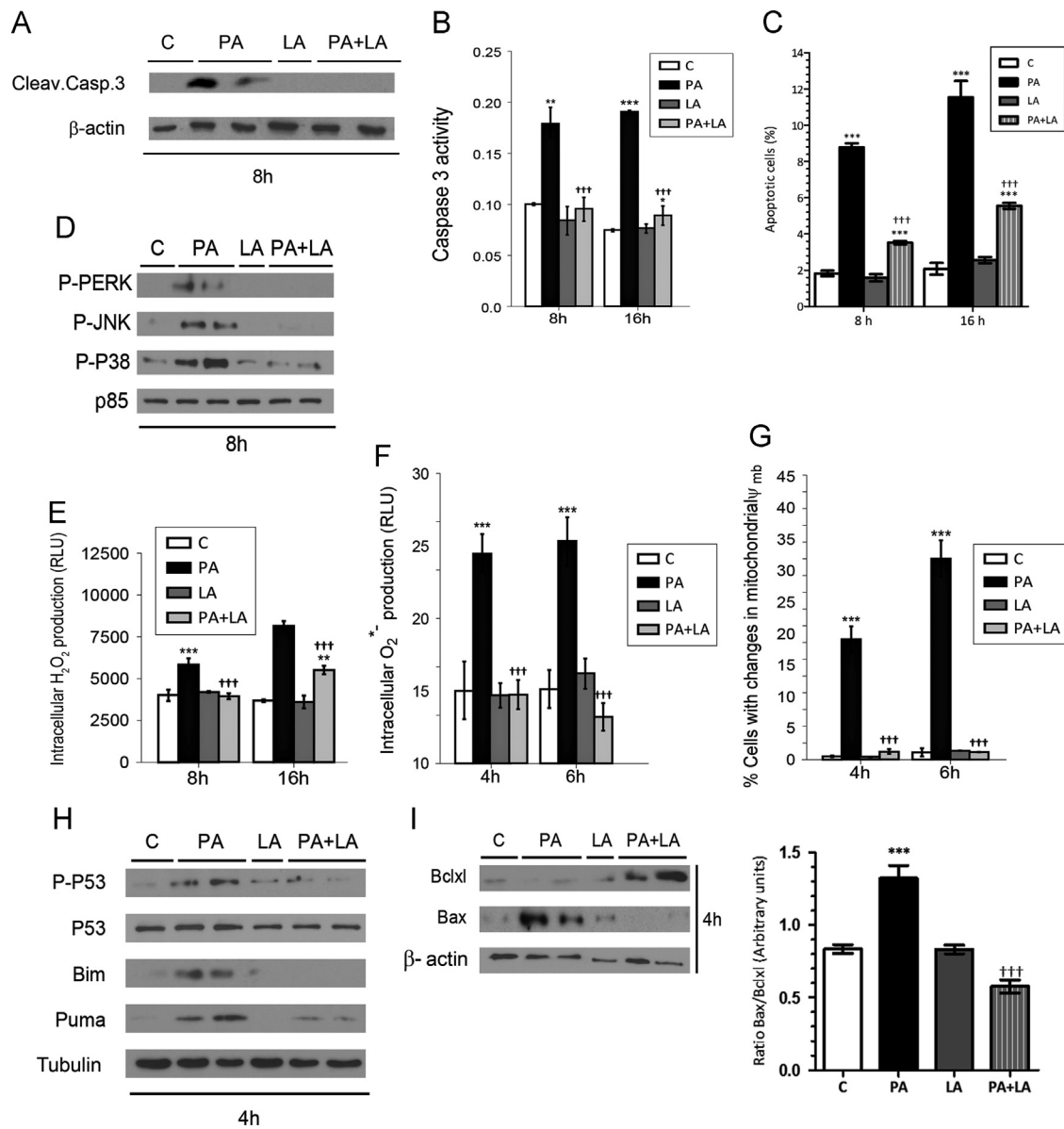


Fig. 3. Antioxidant effects of LA ameliorated PA-mediated ROS production and protected against mitochondrial apoptosis in mouse hepatocytes. Study of apoptosis and oxidative stress in immortalized mouse hepatocytes treated with PA (600 μ M), LA (250 μ M), or both (PA + LA, 600 μ M + 250 μ M) for the indicated time periods. (A) Representative images of Western blot analysis using an antibody that detects the active fragment of caspase 3. (B) Analysis of caspase 3 enzymatic assay by immunocapture activity kit. (C) Hepatocyte apoptosis (percentage of hypodiploid cells) assessed by flow cytometry. (D) Representative images of Western blot of the main proteins related to ER stress. (E) Quantification of intracellular hydrogen peroxide production by fluorimetry using DCFH probe. (F) Quantification of intracellular superoxide production by flow cytometry using DHE probe. (G) Analysis of the percentage of cells with a drop in the mitochondrial membrane potential by flow cytometry using the MitoCapture probe. (H) Representative images of Western blot analysis of proteins involved in the mitochondrial apoptotic pathway (p53, Bim, Puma). (I) Representative images of Western blots and analysis of the Bcl-xL/Bax ratio. All data are from five independent experiments performed in duplicate and results are presented as the mean \pm SEM. * p < 0.05, ** p < 0.01, and *** p < 0.001 vs control (C) or $^{***}p$ < 0.001 vs PA group according to ANOVA followed by post hoc multiple comparisons by Bonferroni test.

up to 8 h (data not shown), but superoxide production was not detected in hepatocytes treated with PA plus LA. In parallel with superoxide generation, PA led to mitochondrial membrane potential loss in hepatocytes in a time-dependent manner. However, combination of PA with LA prevented the mitochondrial membrane potential decrease induced by PA, particularly after 4 and 6 h of treatment (Fig. 3G).

Oxidative stress in the mitochondria triggers the intrinsic apoptotic pathway, which is tightly regulated by pro- and antiapoptotic proteins of the Bcl family. Our results show a strong increase in levels of the BH3-only proteins Bim and Puma after PA treatment, which correlated with the phosphorylation of p53, and this effect was attenuated in cells cotreated with PA plus LA at early times (Fig. 3H, Supplementary Fig. 4A). Moreover, when Bax (proapoptotic) and Bcl-xL (antiapoptotic)

proteins were analyzed we found increased Bax expression in PA-treated hepatocytes for 4 h that was maintained at 6 h (Fig. 3I, Supplementary Fig. 4B), but this response was absent in hepatocytes cotreated with PA and LA. Conversely, treatment with PA plus LA increased Bcl-xL protein content. Hence, the Bax/Bcl-xL ratio, which was augmented after PA treatment, was significantly attenuated by LA.

LA cotreatment induces early translocation of Nrf2 into the nucleus and activation of ARE phase II antioxidant enzymes in response to PA overload in mouse hepatocytes

The transcription factor Nrf2 is a master regulator of the early antioxidant defense, and we hypothesized that its expression and subcellular distribution could be modulated by LA. Nuclear

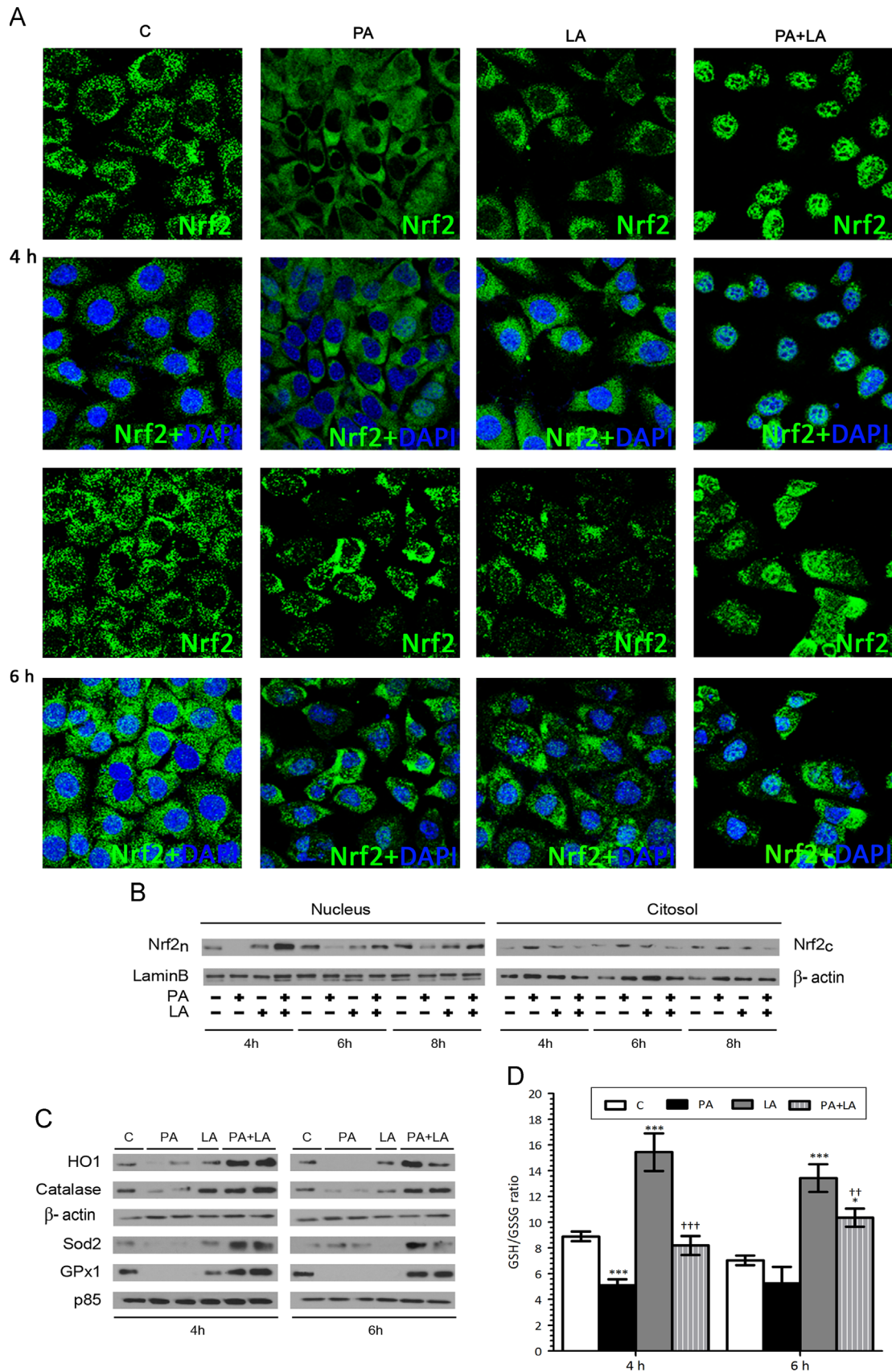


Fig. 4. LA cotreatment induced an early Nrf2 nuclear translocation and activation of ARE phase II antioxidant enzymes in response to PA overload in hepatocytes. Study of Nrf2 nuclear translocation, the expression of ARE-induced antioxidant enzymes, and glutathione levels in immortalized mouse hepatocytes treated with PA (600 μ M), LA (250 μ M), or both (PA + LA, 600 μ M + 250 μ M) for 4 and 6 h. (A) Representative images of immunofluorescence analysis of early Nrf2 nuclear translocation in the various experimental groups. (B) Analysis of Nrf2 in nuclear and cytosolic protein extracts by Western blot at several time periods. Representative autoradiograms are shown. (C) Representative images of Western blot analysis of main ARE-induced antioxidant enzymes after 4 and 6 h of treatment. (D) Determination of intracellular GSH/GSSG ratio at early experimental times. All data are from five independent experiments performed in duplicate and results are presented as the mean \pm SEM. * p < 0.05 and *** p < 0.001 vs control (C) or $^{††}p$ < 0.01 and $^{†††}p$ < 0.001 vs PA group according to ANOVA followed by post hoc multiple comparisons by Bonferroni test.

accumulation of Nrf2 was detected as early as 4 h in mouse hepatocytes cotreated with PA plus LA, whereas in cells treated with PA alone Nrf2 was localized exclusively in the cytosol (Figs. 4A and B). Moreover, after 6 h of cotreatment with LA plus PA, Nrf2 was translocated back to the cytosol where it was detected at 8 h (Figs. 4A and B, Supplementary Fig. 5A). In agreement with these observations, the expression of Nrf2-related proteins such as HO-1, Sod2, catalase, and GPx1 was elevated at 4–6 h in hepatocytes treated with LA plus PA compared to those treated with PA alone (Fig. 4C). The effect of LA on the early antioxidant response was reinforced by the analysis of the GSH/GSSG ratio. Our results show that PA induced a decrease in the GSH/GSSG ratio by the reduction in GSH levels and also by increasing GSSG levels at 8 h. By contrast, we observed that cotreatment with PA plus LA was able to increase the GSH/GSSG ratio (Fig. 4D, Supplementary Fig. 5B–D). To further investigate if GSH depletion contributes to the synergistic effect of the combination of LA and PA on the activation of Nrf2, we treated mouse hepatocytes with buthionine sulfoximine (BSO) in the absence or presence of LA (Supplementary Fig. 6A). Our results show that BSO alone partially induced Nrf2 nuclear translocation, but a stronger effect was reached with the combination of BSO plus LA. In agreement with this, in cells treated with BSO plus LA apoptosis was reduced by almost 50% compared with cells treated with BSO (Supplementary Fig. 6B), suggesting that nuclear translocation of Nrf2 by LA is probably involved in rescue from apoptosis.

Reduction of Nrf2 levels in mouse hepatocytes by small interfering RNA (siRNA) abolishes the beneficial effects of LA on PA-induced lipoapoptosis

To get more insight into the role of Nrf2 as a trigger of the antioxidant system to combat PA-mediated oxidative damage in hepatocytes, we decreased Nrf2 using siRNA (Figs. 5A and B). Remarkably, we found an increase in apoptosis in Nrf2-silenced hepatocytes after PA treatment or even in cells cotreated with PA and LA (Fig. 5C). Furthermore, the ability of LA to counteract the effect of PA in reducing cellular viability and proliferative capacity was significantly decreased when Nrf2 was reduced (Fig. 5D). At the molecular level, the induction of Nrf2-target proteins observed in the LA plus PA-treated hepatocytes was not detected in Nrf2-silenced cells (Fig. 5E). Of note, in agreement with the results shown in Fig. 4B, in mouse hepatocytes total Nrf2 was increased at 4 h of LA or LA plus PA treatment.

Posttreatment with LA efficiently protects mouse hepatocytes against oxidative stress, ER stress, and lipoapoptosis

Next, we investigated if LA posttreatment was able to reverse the established damage in hepatocytes treated with PA. For this goal, mouse hepatocytes were treated with PA for 8 h, after that, the culture medium was removed and replaced by fresh medium with or without LA supplementation for a further 16 h. Under these conditions, LA posttreatment reduced the intracellular lipid accumulation in hepatocytes (Fig. 6A). Moreover, both cleavage and caspase 3 activity were significantly reduced in hepatocytes posttreated with LA (Figs. 6B and C). Nevertheless, caspase 3 was still active in PA-treated cells despite its removal of the culture medium, and similar results were observed in the percentage of apoptotic cells (Fig. 6D).

We also analyzed whether the posttreatment with LA was able to prevent PA-induced oxidative and ER stress. As Fig. 6E shows, the generation of intracellular hydroperoxide was significantly reduced in hepatocytes posttreated with LA for 16 h after the initial stimulation with PA and the extracellular hydroperoxide content (released to the culture medium) revealed similar

responses. Moreover, PA-mediated phosphorylation of PERK, JNK, and p38 MAPK was blunted in the posttreatment with LA (Fig. 6F). Cell viability was significantly decreased in mouse hepatocytes treated with PA, whereas LA posttreatment reversed cell viability to basal levels (Supplementary Fig. 7A). Posttreatment with LA also prevented PA-mediated IRS1 and IRS2 degradation (Supplementary Fig. 7B).

Effects of LA posttreatment on body weight, hepatic triglycerides, and biochemical parameters in rats fed a high-fat diet

To elucidate the potential therapeutic application of LA in NAFLD, we analyzed its effects in an in vivo model of rats fed an HFD and cotreated and posttreated with LA. As expected, an increase in body weight was observed in rats fed an HFD (OB group), which was significantly reversed by posttreatment with LA after HFD (POST group) (Table 1). Furthermore, we observed an increase in white adipose tissue accumulation, which was reduced by LA posttreatment. HFD significantly increased hepatic triglyceride content, which was reduced by LA posttreatment. The biochemical analysis revealed that LA posttreatment reduced plasma triglycerides, free fatty acids, and ketone bodies compared with the controls (C group) (Table 1).

LA supplementation prevents HFD-induced liver apoptosis, activation of stress kinases, ER stress, and decrease in Nrf2-related proteins

Livers from obese rats exhibited TUNEL-positive cells compared with control rats (Fig. 7A). LA cotreatment along with the HFD (OLIP group) significantly prevented the incidence of TUNEL-positive cells induced by the HFD in the liver. At the molecular level, LA supplementation decreased the phosphorylation of JNK and p38 MAPK that was increased in the OB group (Fig. 7B, Supplementary Fig. 8A). In agreement with the effects observed in human hepatocytes, LA also mitigated the persistent unfolded protein response (UPR) observed in the obese animals as demonstrated by decreases in PERK, an ER stress marker upstream of eIF2 α , as well as in CHOP protein levels. In parallel, the analysis of Nrf2 expression and its antioxidant targets Sod2 and catalase revealed that HFD decreased antioxidant defenses in the liver and LA cotreatment prevented this effect (Fig. 7C, Supplementary Fig. 8B). Finally, we evaluated the effects of LA posttreatment in the alterations induced by the HFD in the liver. It should be noted that, in the liver, this intervention protocol was also able to reverse apoptosis (Fig. 7A), reduce the phosphorylation of PERK, and also decrease CHOP levels compared with the control rats fed the chow diet (Fig. 7B, Supplementary Fig. 8A). Moreover, the phosphorylation of p38 MAPK was totally blunted, whereas the effect on JNK phosphorylation was less evident. Regarding Nrf2 and its related antioxidant proteins, the posttreatment with LA significantly increased Nrf2, HO-1, and catalase levels, whereas Sod2 levels remained unchanged (Fig. 7C, Supplementary Fig. 8B).

Discussion

Nonalcoholic fatty liver disease may result in progressive liver disease with risks for cirrhosis and HCC [53]. Intracellular lipid accumulation in hepatocytes (first hit) followed by enhancement of oxidative stress (second hit) is required for the progression from simple fatty liver to NASH [54–57]. Moreover, several lines of evidence suggest that toxic ROS can cause ER stress responses such as the UPR [58]. Among therapies suggested for slowing disease progression, we have demonstrated the protective effect of LA cotreatment against the development of fatty liver associated with long-term HFD feeding through the modulation of both

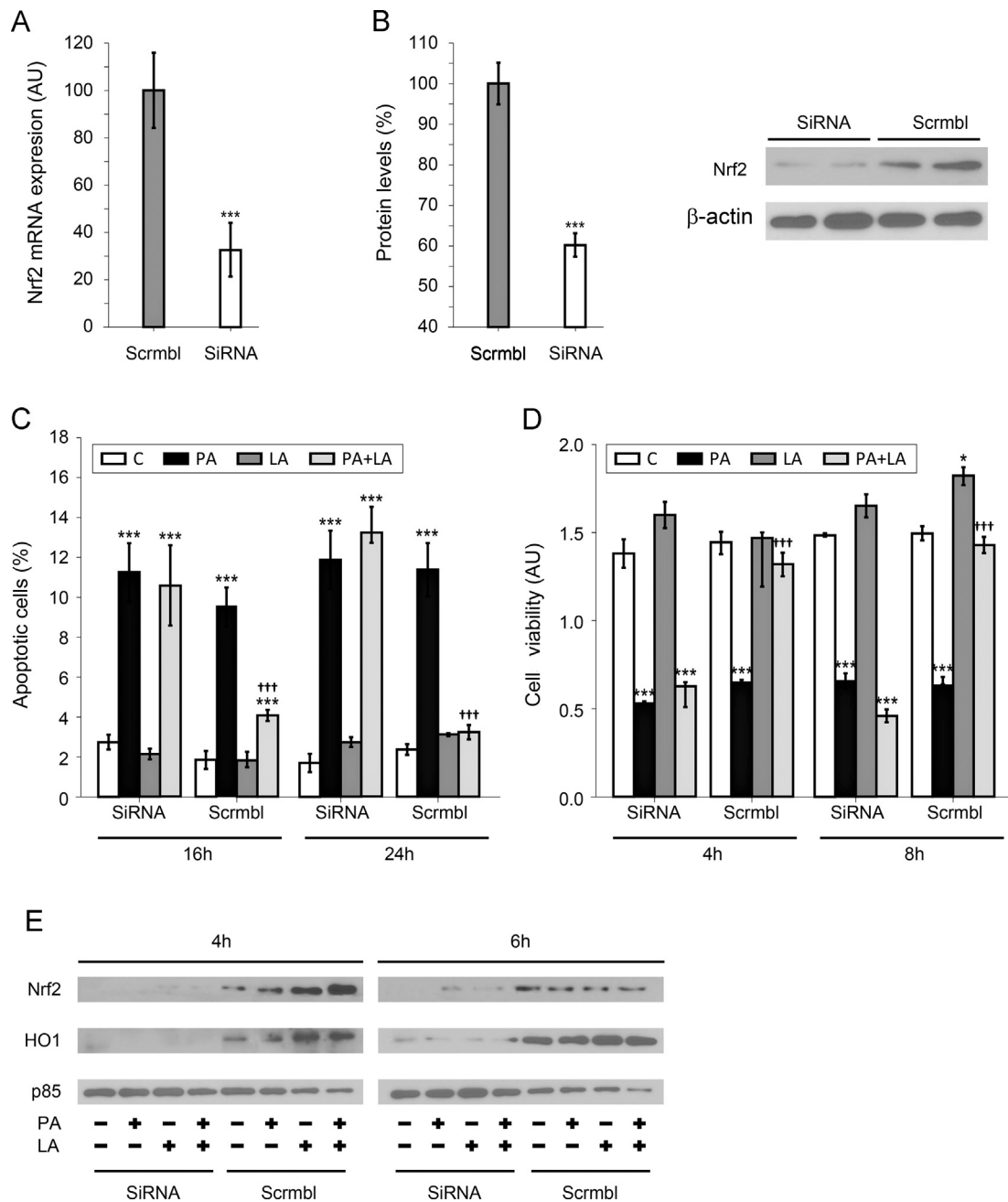


Fig. 5. Silencing of Nrf2 in hepatocytes blocks the beneficial effects of LA cotreatment on apoptosis, cell viability, and proliferation. Effects of Nrf2 siRNA in immortalized mouse hepatocytes treated with PA (600 μ M), LA (250 μ M), or both (PA + LA, 600 μ M + 250 μ M) for 4, 6, 8, 16, and 24 h were studied. (A) Analysis of mRNA levels of Nrf2 after siRNA treatment. Data are from six independent experiments randomly chosen. (B) Representative image of Western blot and quantification of protein levels of Nrf2 in cells treated with Nrf2 siRNA and scrambled siRNA. Data are from six independent experiments randomly chosen. (C) Measurement of hepatocyte apoptosis (percentage of hypodiploid cells) assessed by flow cytometry. (D) Colorimetric measurement and representative images of proliferation assay by crystal violet staining. Immortalized mouse hepatocytes were cultured for 4 and 8 h with various treatments (control, PA, LA, PA plus LA). After this, the cells were trypsinized, replated, and grown in 10% FBS-supplemented DMEM for 48 h in the presence of Nrf2 siRNA or scrambled siRNA to evaluate their proliferative capacity. (E) Protein expression levels of Nrf2 and HO-1 analyzed by Western blot. All data are from four or five independent experiments performed in duplicate and results are presented as the mean \pm SEM. In (A) and (B), *** p < 0.001 for Nrf2 siRNA vs scrambled siRNA. In (C) and (D), * p < 0.05 and *** p < 0.001 vs control (C) or ††† p < 0.001 vs PA group according to ANOVA followed by post hoc multiple comparisons by Bonferroni test.

mitochondrial function and lipid metabolism pathways [43]. In agreement with that, Yang et al. have recently shown that cotreatment with LA in C57BL/6J mice fed an HFD reduced lipid accumulation by increasing the SIRT1/AMPK pathway [59]. Furthermore, Kaya-Dagistanli et al. [60] also reported the beneficial effects of LA on liver apoptosis induced by *n*-6 polyunsaturated fatty acids. In humans, clinical trials with LA in NAFLD have not been developed, but this is not the case for obesity, T2DM, and associated complications [61]. We have recently reported that LA treatment increases mitochondrial

biogenesis and promotes browning in subcutaneous adipocytes from overweight/obese subjects [62], as well as the beneficial effects of LA in promoting body weight loss in healthy overweight/obese women under energy-restricted diets [63]. Administration of LA to patients with T2DM decreased plasma oxidative products and improved insulin sensitivity [64], strengthening the potential of the antioxidant properties of LA in human therapeutics. Despite these interesting findings, herein we have unraveled the sequence of molecular events that are triggered by LA in the protection against PA-induced

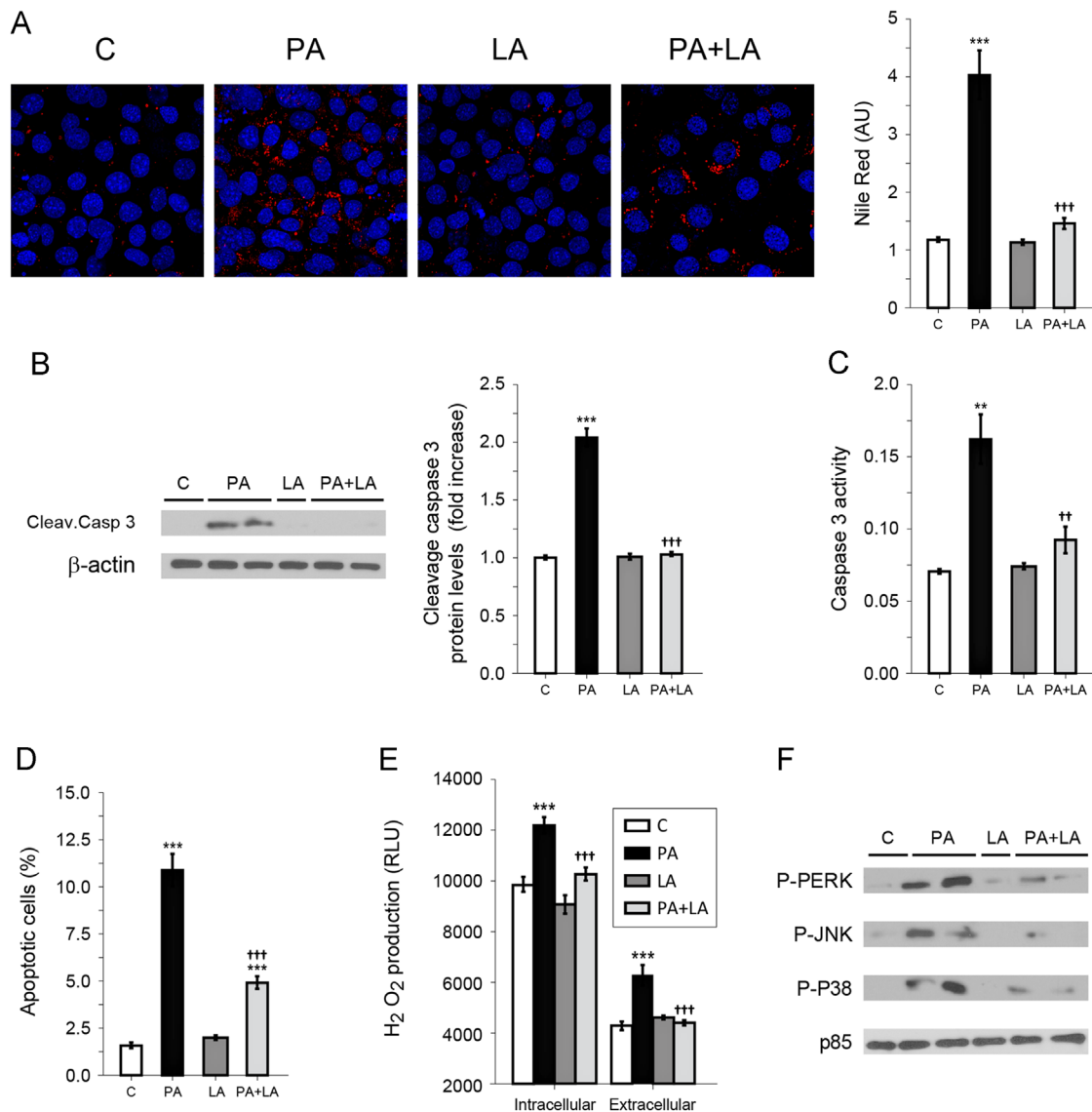


Fig. 6. LA posttreatment reversed the deleterious effects of PA in mouse hepatocytes. Analysis of lipid storage, apoptosis, caspase 3 activity, cell viability, and ER stress-related proteins. Immortalized mouse hepatocytes were treated with PA (600 μ M) for 8 h and after that the medium in half of the wells was removed and replaced by fresh medium supplemented with LA (250 μ M) for a further 16 h (PA + LA group). In the other half, fresh medium without LA was added (PA group). As control groups (C, LA) cells were cultured for 8 h with 5% FBS and 1% BSA medium and after that the medium was replaced by fresh medium with (LA) or without (C) LA (250 μ M). (A) Representative images and quantification of Nile red staining of the intracellular lipid bodies measured by flow cytometry. (B) Representative images of Western blot analysis using an antibody that detects the active fragment of caspase 3 and quantification of all experiments. (C) Analysis of caspase 3 enzymatic assay by immunocapture activity kit. (D) Measurement of hepatocyte apoptosis assessed by flow cytometry (percentage of hypodiploid cells). (E) Determination of intracellular and extracellular hydrogen peroxide production by fluorescence using the DCFH probe. (F) Representative Western blot analysis of the phosphorylation of stress kinases (PERK, JNK, p38 MAPK) after posttreatment with LA. All data are from five independent experiments performed in duplicate and results are presented as the mean \pm SEM. ** p < 0.01 and *** p < 0.001 vs C or ^{††} p < 0.01 and ^{†††} p < 0.001 vs PA group according to ANOVA followed by post hoc multiple comparisons by Bonferroni test.

lipoptosis in vitro in human and mouse hepatocytes and in vivo in HFD-fed rats. Our initial study in primary human hepatocytes revealed that the early activation of kinases induced by oxidative and ER stress is a signature of PA-mediated lipoptosis and, importantly, it was prevented by cotreatment with LA. Our subsequent studies in immortalized mouse hepatocytes [45,65] allowed us to delineate the sequential timing of these processes. We demonstrated that PA increased superoxide production at early periods (4 h) in parallel with a drop in the mitochondrial membrane potential. Moreover, at the same time we detected increased levels of proapoptotic members of the Bcl family, such as Bim, Bax, and Puma, the last induced by p53 in accordance with previous data reported by Cazavane and co-workers [66], and decreased levels of the antiapoptotic member Bcl-xL. All of these proteins are components of the mitochondrial “intrinsic” machinery that precedes the activation of

the effector caspase 3, leading to DNA fragmentation during apoptosis. Altogether, these data suggest that in mouse hepatocytes PA induces damages in mtDNA similar to those demonstrated in L6 myotubes [8,9] that could boost ROS production and generate a vicious cycle inducing intrinsic apoptosis.

One possible explanation for the beneficial effect of LA in preventing apoptosis in hepatocytes is its well-known capacity for activating endogenous antioxidant defenses [29,34,60,67]. In this regard, the machinery activated by the translocation of Nrf2 from the cytosolic to the nuclear compartment is one of the cellular responses against multiple damaging agents in mammalian cells including hepatocytes. In response to oxidative stress, modification of reactive cysteine residues within Keap1 induces a conformational change leading to Nrf2-Keap1 dissociation allowing Nrf2 nuclear translocation and binding to ARE-responsive target genes [68]. Interestingly, some

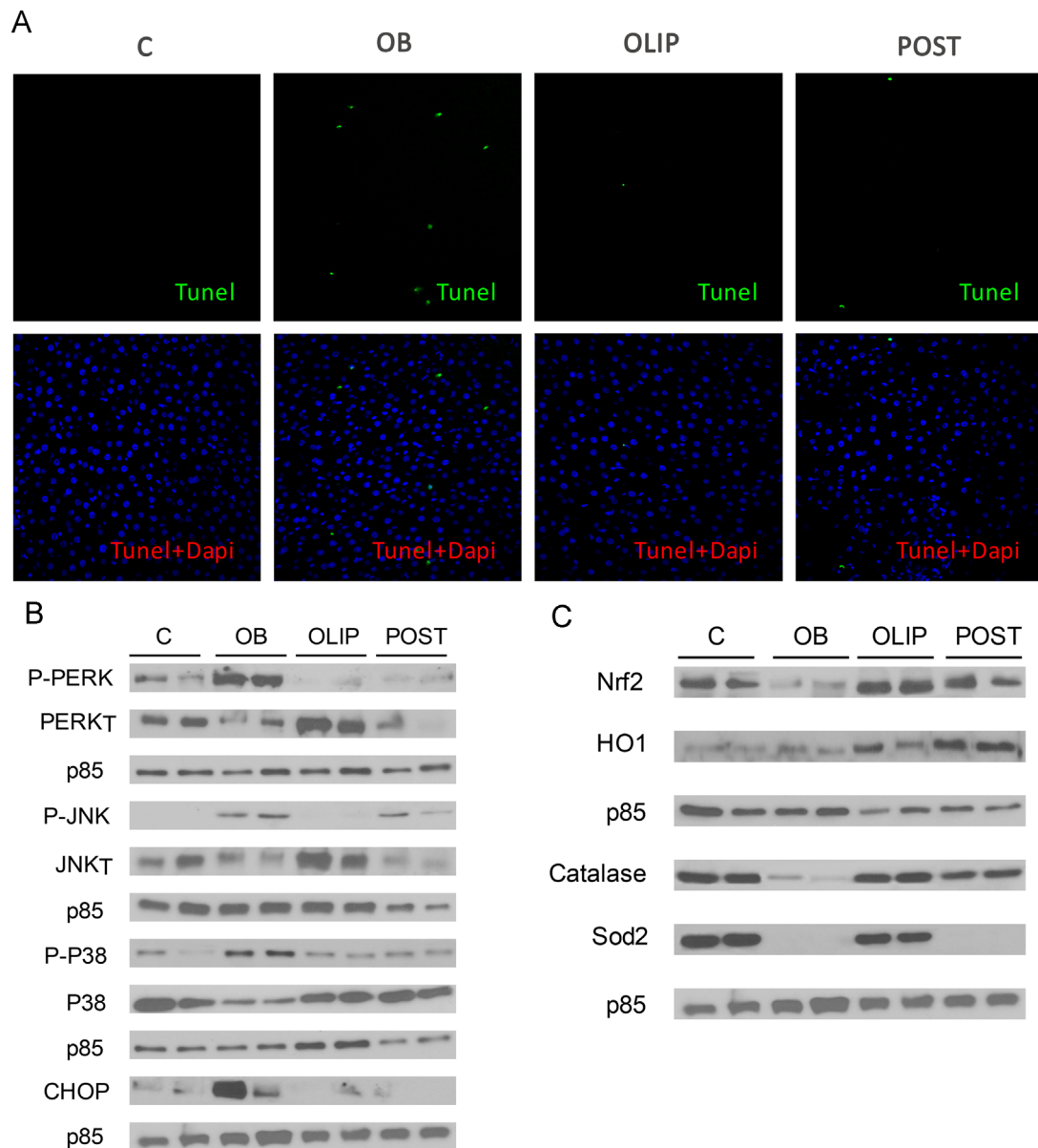


Fig. 7. LA supplementation prevents liver apoptosis, activation of stress kinases, ER stress, and decreased Nrf2-related proteins in rats fed an HFD. Wistar rats were fed on a HFD without or with supplementation with LA as described under Materials and methods. Control rats were fed a standard chow diet. (A) Representative images from TUNEL assay. (B) Representative Western blots of phosphorylation of ER stress kinases (p-PERK/PERK, p-JNK/JNK, p-p38 MAPK/p38 MAPK) and CHOP expression. (C) Representative Western blots of Nrf2, HO-1, Sod2, and catalase protein levels. C, chow-fed animals; OB, high-fat-fed animals; OLIP, high-fat-fed animals + LA supplementation for 56 days; POST, high-fat-fed animals for 42 days and then treated (posttreatment) with LA for 14 days.

authors have described that depletion of GSH disrupts Nrf2 interaction with Keap1 [69–71]. Our data showed that the combination of PA plus LA induced an early nuclear accumulation of Nrf2 at 4 h and this resulted in a strong protection against PA-induced apoptosis. Surprisingly, this effect correlated with an early drop in GSH levels. Experiments with the inhibitor of GSH synthesis, BSO, plus LA confirmed these results (Supplementary Fig. 6). Based on that, our hypothesis is that an early and transient increase in ROS production in hepatocytes by PA plus LA would have resulted in a precocious activation of Nrf2, boosting a synergistic effect. A similar hypothesis has been proposed for Nox4-generated ROS that activate the Nrf2 pathway in cardiomyocytes [72]. This effect reflects the sensitivity of the LA-mediated Nrf2 system to combat PA-induced oxidative stress and prevent the reduction in mitochondrial membrane potential. In fact, increased expression of ARE proteins such as HO-1, catalase, Sod2, and GPx1 was found at this early time period. Our data are in agreement with a recent study in a rat myocardial ischemia/reperfusion injury model in

which LA pretreatment promoted Nrf2 nuclear accumulation and the induction of cytoprotective genes such as HO-1 [29]. Moreover, Elshazly et al. recently demonstrated the ability of LA treatment to counteract the acetaminophen-induced hepatotoxicity through the activation of HO-1 and regulation of GSH levels [32]. A step further, our results in mouse hepatocytes with reduced Nrf2 levels by siRNA strongly suggest that the enhancement of the antioxidant defenses via Nrf2 is an early mechanism by which LA prevents lipoapoptosis in hepatocytes. These results in vitro were validated in our in vivo model of posttreatment with LA to obese rats. Notably, in the livers of obese rats treated with LA for 2 weeks an increase in the expression of Nrf2, HO-1, and catalase was probably responsible for the decrease in the activation of the kinases linked to oxidative stress (JNK and p38 MAPK) that precedes apoptosis.

On the other hand, during the past years it has been proposed that enhanced apoptosis in liver diseases may be at least partly due to unresolved ER stress [73]. In fact, the role of the PERK/ATF4/

CHOP signaling pathway has been demonstrated in saturated FA-induced ER stress and lipooptosis in LO2 and HepG2 human liver cell lines [19]. In the light of these results, we found activation of ER stress kinases and elevated CHOP expression in both human and mouse hepatocytes treated with PA. However, in the detailed analysis performed in mouse hepatocytes we did not detect the activation of ER stress kinases at the early time point (4 h) at which ROS levels and apoptotic signatures were already elevated in response to PA overload (results not shown). In fact, we detected PERK phosphorylation that mediates CHOP induction at 8 h in mouse or human hepatocytes, suggesting that ER stress might be secondary to oxidative stress. These results are supported by the protective effect of LA on PA-mediated ER stress that might also be a result of the capacity of LA to prevent ROS formation through the Nrf2 antioxidant system. In this regard, lipotoxic derangement of ER functions is probably due to the above-mentioned oxidative stress, disturbed calcium homeostasis, or altered membrane saturation. Therefore, it is not surprising that the protein processing machinery of the ER is sensitive to changes in the redox status of the hepatocyte [74]. In agreement with this, we found that inhibition of oxidative stress by LA protects hepatocytes from ER stress and, importantly, when oxidative stress is elevated in *Nfe2l2*-deficient mice, the UPR is perturbed and those mice are more sensitive to NASH when placed on an HFD [75]. Based on these findings, it can be speculated that in hepatocytes overloaded with PA oxidative stress might be a first hit in triggering apoptosis that is highly sensitive to the inhibition by LA. In the absence of LA, PA-mediated oxidative damage, initially affecting the mitochondria, might be extended to the ER, interfering with the proper UPR leading to sustained ER stress and boosting apoptosis.

Another explanation for the beneficial effect of LA in preventing apoptosis in hepatocytes is its capacity for reducing intracellular lipid accumulation [76], also observed under our experimental conditions. In fact, our data show for the first time that LA is able to decrease PA uptake by decreasing CD36/FAT levels and lipogenic gene expression, as well as increasing fatty acid oxidation in hepatocytes. However, because activation of mitochondrial metabolism promotes oxidative stress that damages mitochondria [77], LA-mediated reductions in intrahepatic lipid accumulation might be coupled to additional mechanisms that also alleviate oxidative damage. In this regard, we examined autophagic degradation of lipids, known as lipophagy [50], which has been recently reported to be involved in hepatic lipid catabolism during fasting [78,79]. Autophagosomes induced by LA frequently contained lipid droplets, suggesting an increase in lipophagy, which is consistent with the role of LA in fatty acid oxidation in hepatocytes. Importantly, in hepatocytes treated with LA plus PA interactions between autophagosomes and intracellular lipids were observed. These results have revealed an unknown effect of LA that deserves further investigation.

Finally, our data in mouse hepatocytes clearly demonstrated that, in addition to protecting against PA-mediated apoptosis, LA increased cellular viability and proliferation after replating. At the molecular level, IRS1 and IRS2, which connect the IR/IGF-IR with downstream survival signaling in hepatocytes [26,52], are negatively modulated by PA and this effect was prevented by LA co- and posttreatment. This is a critical issue that links the activation of JNK and p38 MAPK by oxidative and/or ER stress [14,80,81] with an early serine phosphorylation of IRS proteins that triggers proteasomal degradation [81,82]. In this regard, we have demonstrated for the first time that LA prevents degradation of IRS proteins induced by PA. In a previous study, it was shown that the protection of LA against TNF α /actinomycin D-mediated apoptosis was due to a direct activation of the IR [83]. However, levels of IRS proteins were not measured in that study. Because IRS proteins are downstream signaling mediators of the IR

activity, it is reasonable to suggest that, regardless of the activation of the IR, protein stability of IRSs is necessary to transmit survival signaling and cell proliferation downstream of the IR/IGF-I receptors.

Our results have potential therapeutic implications in the treatment of NAFLD in humans because short treatment with LA to obese rats was able to reverse apoptosis in the liver, at least in part by the inhibition of the kinases linked to oxidative and ER stress, and, on the other hand, it increases the Nrf2-mediated antioxidant responses. These *in vivo* findings were supported by our *in vitro* studies, demonstrating for the first time that LA posttreatment is able to rescue hepatocytes after lipooptotic insult with PA.

Conclusion

In conclusion and as summarized in the graphical abstract, our results strongly suggest that in hepatocytes, Nrf2 is an essential early player in the rescue of oxidative stress by LA leading to protection against PA-mediated lipooptosis. Importantly, we have demonstrated for the first time by *in vitro* and *in vivo* approaches that an intervention protocol based on the administration of LA after PA overload is able to substantially decrease hepatocyte lipooptosis.

Acknowledgments

We acknowledge the following grant support: SAF2012-33283 (Ministry of Economy and Competitiveness, MINECO, Spain), Comunidad de Madrid S2010/BMD-2423, EFSO and Amylin Paul Langerhans Grant, and Centro de Investigación Biomédica en Red de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (ISCIII, Spain) to A.M.V.; SAF2010-17822 (MINECO, Spain) and Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Neurodegenerativas (ISCIII, Spain) to A.C.; PI09/0185 (ISCIII, Spain) and Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (ISCIII, Spain) to J.M.; Línea especial “Nutrición, Obesidad y Salud” (University of Navarra LE/97) and AGL2006-04716/ALI and AGL2009-10873/ALI (Ministry of Science and Innovation, Spain) and Centro de Investigación Biomédica en Red de Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición (ISCIII, Spain) to D.S., J.A. M., and M.J.M.; SAF2013-45887-R to L.H. and SAF2011-30520-C02-01 to D.S. (MINECO, Spain), Generalitat de Catalunya (2014SGR-465 to D.S.); and EFSO/Lilly and EFSO/Janssen and L'Oréal-UNESCO research fellowships to L.H. M.W. is the recipient of a Ciência sem Fronteiras–CNPq fellowship (237976/2012-9). M.P.V. holds a scholarship from Instituto de Salud Carlos III (ISCIII, Ministry of Health, Spain).

Appendix A. Supporting information

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.03.019>.

References

- [1] Berlanga, A; Guiu-Jurado, E; Porras, JA.; Auguet, T. Molecular pathways in non-alcoholic fatty liver disease. *Clin. Exp. Gastroenterol* 7:221–239; 2014.
- [2] Day, CP; Saksena, S. Non-alcoholic steatohepatitis: definitions and pathogenesis. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 17(Suppl. 3):S377–S384; 2002.
- [3] Garcia-Monzon, C; Lo Iacono, O; Mayoral, R; Gonzalez-Rodriguez, A; Miqulena-Colina, ME; Lozano-Rodriguez, T; Garcia-Pozo, L; Vargas-Castrillon, J; Casado, M; Bosca, L; Valverde, AM; Martin-Sanz, P. Hepatic insulin resistance is associated with increased apoptosis and fibrogenesis in nonalcoholic steatohepatitis and chronic hepatitis C. *J. Hepatol* 54:142–152; 2011.

- [4] Vanni, E; Bugianesi, E; Kotronen, A; De Minicis, S; Yki-Jarvinen, H; Svegliati-Baroni, G. From the metabolic syndrome to NAFLD or vice versa? *Dig Liver Dis* **42**:320–330; 2010.
- [5] Feldstein, AE; Canbay, A; Angulo, P; Taniai, M; Burgart, LJ; Lindor, KD; Gores, GJ. Hepatocyte apoptosis and fas expression are prominent features of human nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology* **125**:437–443; 2003.
- [6] Unger, RH; Orci, L. Lipoapoptosis: its mechanism and its diseases. *Biochim. Biophys. Acta* **1585**:202–212; 2002.
- [7] Cazanave, SC; Gores, GJ. Mechanisms and clinical implications of hepatocyte lipoapoptosis. *Clin. Lipidol* **5**:71–85; 2010.
- [8] Yuzefovych, L; Wilson, G; Rachek, L. Different effects of oleate vs. palmitate on mitochondrial function, apoptosis, and insulin signaling in L6 skeletal muscle cells: role of oxidative stress. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **299**:E1096–E1105; 2010.
- [9] Yuzefovych, LV; Solodushko, VA; Wilson, GL; Rachek, LI. Protection from palmitate-induced mitochondrial DNA damage prevents from mitochondrial oxidative stress, mitochondrial dysfunction, apoptosis, and impaired insulin signaling in rat L6 skeletal muscle cells. *Endocrinology* **153**:92–100; 2012.
- [10] Begriche, K; Igoudjil, A; Pessayre, D; Fromenty, B. Mitochondrial dysfunction in NASH: causes, consequences and possible means to prevent it. *Mitochondrion* **6**:1–28; 2006.
- [11] Jun, DW; Cho, WK; Jun, JH; Kwon, HJ; Jang, KS; Kim, HJ; Jeon, HJ; Lee, KN; Lee, HL; Lee, OY; Yoon, BC; Choi, HS; Hahm, JS; Lee, MH. Prevention of free fatty acid-induced hepatic lipotoxicity by carnitine via reversal of mitochondrial dysfunction. *Liver Int.* **31**:1315–1324; 2011.
- [12] Pessayre, D; Fromenty, B. NASH: a mitochondrial disease. *J. Hepatol.* **42**:928–940; 2005.
- [13] Kamata, H; Honda, S; Maeda, S; Chang, L; Hirata, H; Karin, M. Reactive oxygen species promote TNF α -induced death and sustained JNK activation by inhibiting MAP kinase phosphatases. *Cell* **120**:649–661; 2005.
- [14] Song, Y; Li, X; Li, Y; Li, N; Shi, X; Ding, H; Zhang, Y; Liu, G; Wang, Z. Non-esterified fatty acids activate the ROS-p38-p53/Nrf2 signaling pathway to induce bovine hepatocyte apoptosis in vitro. *Apoptosis* **19**:984–997; 2014.
- [15] Akazawa, Y; Cazanave, S; Mott, JL; Elmi, N; Bronk, SF; Kohno, S; Charlton, MR; Gores, GJ. Palmitoleate attenuates palmitate-induced Bim and PUMA up-regulation and hepatocyte lipoapoptosis. *J. Hepatol.* **52**:586–593; 2010.
- [16] Cazanave, SC; Mott, JL; Elmi, NA; Bronk, SF; Werneburg, NW; Akazawa, Y; Kahraman, A; Garrison, SP; Zambetti, GP; Charlton, MR; Gores, GJ. JNK1-dependent PUMA expression contributes to hepatocyte lipoapoptosis. *J. Biol. Chem.* **284**:26591–26602; 2009.
- [17] Cazanave, SC; Wang, X; Zhou, H; Rahmani, M; Grant, S; Durrant, DE; Klaassen, CD; Yamamoto, M; Sanyal, AJ. Degradation of Keap1 activates BH3-only proteins Bim and PUMA during hepatocyte lipoapoptosis. *Cell Death Differ.* **21**:1303–1312; 2014.
- [18] Nakamura, S; Takamura, T; Matsuzawa-Nagata, N; Takayama, H; Misu, H; Noda, H; Nabemoto, S; Kurita, S; Ota, T; Ando, H; Miyamoto, K; Kaneko, S. Palmitate induces insulin resistance in H4IIEC3 hepatocytes through reactive oxygen species produced by mitochondria. *J. Biol. Chem.* **284**:14809–14818; 2009.
- [19] Cao, J; Dai, DL; Yao, L; Yu, HH; Ning, B; Zhang, Q; Chen, J; Cheng, WH; Shen, W; Yang, ZX. Saturated fatty acid induction of endoplasmic reticulum stress and apoptosis in human liver cells via the PERK/ATF4/CHOP signaling pathway. *Mol. Cell. Biochem.* **364**:115–129; 2012.
- [20] Pfaffenbach, KT; Gentile, CL; Nivala, AM; Wang, D; Wei, Y; Pagliassotti, MJ. Linking endoplasmic reticulum stress to cell death in hepatocytes: roles of C/EBP homologous protein and chemical chaperones in palmitate-mediated cell death. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **298**:E1027–E1035; 2010.
- [21] Wang, D; Wei, Y; Pagliassotti, MJ. Saturated fatty acids promote endoplasmic reticulum stress and liver injury in rats with hepatic steatosis. *Endocrinology* **147**:943–951; 2006.
- [22] Wei, Y; Wang, D; Gentile, CL; Pagliassotti, MJ. Reduced endoplasmic reticulum luminal calcium links saturated fatty acid-mediated endoplasmic reticulum stress and cell death in liver cells. *Mol. Cell. Biochem.* **331**:31–40; 2009.
- [23] Ganley, IG; Wong, PM; Jiang, X. Thapsigargin distinguishes membrane fusion in the late stages of endocytosis and autophagy. *Autophagy* **7**:1397–1399; 2011.
- [24] Greene, MW; Burrington, CM; Ruhoff, MS; Johnson, AK; Chongkraitatanakul, T; Kangwanpornisiri, A. PKC δ is activated in a dietary model of steatohepatitis and regulates endoplasmic reticulum stress and cell death. *J. Biol. Chem.* **285**:42115–42129; 2010.
- [25] Rinella, ME; Siddiqui, MS; Gardikiotes, K; Gottstein, J; Elias, M; Green, RM. Dysregulation of the unfolded protein response in db/db mice with diet-induced steatohepatitis. *Hepatology* **54**:1600–1609; 2011.
- [26] Gonzalez-Rodriguez, A; Mayoral, R; Agra, N; Valdecantos, MP; Pardo, V; Miquilena-Colina, ME; Vargas-Castrillon, J; Lo Iacono, O; Corazzari, M; Fimia, GM; Piacentini, M; Muntane, J; Bosca, L; Garcia-Monzon, C; Martin-Sanz, P; Valverde, AM. Impaired autophagic flux is associated with increased endoplasmic reticulum stress during the development of NAFLD. *Cell Death Dis* **5**:e1179; 2014.
- [27] Puri, P; Mirshahi, F; Cheung, O; Natarajan, R; Maher, JW; Kellum, JM; Sanyal, AJ. Activation and dysregulation of the unfolded protein response in nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* **134**:568–576; 2008.
- [28] Kitteringham, NR; Abdullah, A; Walsh, J; Randle, L; Jenkins, RE; Sison, R; Goldring, CE; Powell, H; Sanderson, C; Williams, S; Higgins, L; Yamamoto, M; Hayes, J; Park, BK. Proteomic analysis of Nrf2 deficient transgenic mice reveals cellular defence and lipid metabolism as primary Nrf2-dependent pathways in the liver. *J. Proteomics* **73**:1612–1631; 2010.
- [29] Deng, C; Sun, Z; Tong, G; Yi, W; Ma, L; Zhao, B; Cheng, L; Zhang, J; Cao, F; Yi, D. alpha-Lipoic acid reduces infarct size and preserves cardiac function in rat myocardial ischemia/reperfusion injury through activation of PI3K/Akt/Nrf2 pathway. *PLoS One* **8**:e58371; 2013.
- [30] Huerta-Olvera, SG; Macias-Barragan, J; Ramos-Marquez, ME; Armendariz-Borunda, J; Diaz-Barriga, F; Siller-Lopez, F. Alpha-lipoic acid regulates heme oxygenase gene expression and nuclear Nrf2 activation as a mechanism of protection against arsenic exposure in HepG2 cells. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **29**:144–149; 2010.
- [31] Lau, A; Whitman, SA; Jaramillo, MC; Zhang, DD. Arsenic-mediated activation of the Nrf2–Keap1 antioxidant pathway. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* **27**:99–105; 2013.
- [32] Elshazly, SM; El-Moselhy, MA; Barakat, W. Insights in the mechanism underlying the protective effect of alpha-lipoic acid against acetaminophen-hepatotoxicity. *Eur. J. Pharmacol.* **726**:116–123; 2014.
- [33] Prieto-Hontoria, PL; Perez-Matute, P; Fernandez-Galilea, M; Barber, A; Martinez, JA; Moreno-Aliaga, MJ. Lipoic acid prevents body weight gain induced by a high fat diet in rats: effects on intestinal sugar transport. *J. Physiol. Biochem.* **65**:43–50; 2009.
- [34] Valdecantos, MP; Perez-Matute, P; Gonzalez-Muniesa, P; Prieto-Hontoria, PL; Moreno-Aliaga, MJ; Martinez, JA. Lipoic acid improves mitochondrial function in nonalcoholic steatosis through the stimulation of sirtuin 1 and sirtuin 3. *Obesity (Silver Spring)* **20**:1974–1983; 2012.
- [35] Wollin, SD; Wang, Y; Kubow, S; Jones, PJ. Effects of a medium chain triglyceride oil mixture and alpha-lipoic acid diet on body composition, antioxidant status, and plasma lipid levels in the Golden Syrian hamster. *J. Nutr. Biochem.* **15**:402–410; 2004.
- [36] Bertolotto, F; Massone, A. Combination of alpha lipoic acid and superoxide dismutase leads to physiological and symptomatic improvements in diabetic neuropathy. *Drugs R&D* **12**:29–34; 2012.
- [37] Haritoglou, C; Gerss, J; Hammes, HP; Kampik, A; Ulbig, MW; Group, RS. Alpha-lipoic acid for the prevention of diabetic macular edema. *Ophthalmologica* **226**:127–137; 2011.
- [38] Cicek, M; Yildirim, A; Okyay, K; Yazici, AC; Aydinalp, A; Kanyilmaz, S; Muderrisoglu, H. Use of alpha-lipoic acid in prevention of contrast-induced nephropathy in diabetic patients. *Renal Failure* **35**:748–753; 2013.
- [39] Noori, N; Tabibi, H; Hosseiniapanah, F; Hedayati, M; Nafar, M. Effects of combined lipoic acid and pyridoxine on albuminuria, advanced glycation end-products, and blood pressure in diabetic nephropathy. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* **83**:77–85; 2013.
- [40] Stankovic, MN; Mladenovic, D; Ninkovic, M; Ethuricic, I; Sobajic, S; Jorgacevic, B; de Luka, S; Vukicevic, RJ; Radosavljevic, TS. The effects of alpha-lipoic acid on liver oxidative stress and free fatty acid composition in methionine-choline deficient diet-induced NAFLD. *J. Med. Food* **17**:254–261; 2014.
- [41] Min, AK; Kim, MK; Kim, HS; Seo, HY; Lee, KU; Kim, JG; Park, KG; Lee, IK. Alpha-lipoic acid attenuates methionine choline deficient diet-induced steatohepatitis in C57BL/6 mice. *Life Sci.* **90**:200–205; 2012.
- [42] Prieto-Hontoria, PL; Perez-Matute, P; Fernandez-Galilea, M; Martinez, JA; Moreno-Aliaga, MJ. Lipoic acid inhibits leptin secretion and Sp1 activity in adipocytes. *Mol. Nutr. Food Res.* **55**:1059–1069; 2011.
- [43] Valdecantos, MP; Perez-Matute, P; Gonzalez-Muniesa, P; Prieto-Hontoria, PL; Moreno-Aliaga, MJ; Martinez, JA. Lipoic acid administration prevents non-alcoholic steatosis linked to long-term high-fat feeding by modulating mitochondrial function. *J. Nutr. Biochem.* **23**:1676–1684; 2012.
- [44] Pichard, L; Raulet, E; Fabre, G; Ferrini, JB; Ourlin, JC; Maurel, P. Human hepatocyte culture. *Methods Mol. Biol.* **320**:283–293; 2006.
- [45] Valverde, AM; Fabregat, I; Burks, DJ; White, MF; Benito, M. IRS-2 mediates the antiapoptotic effect of insulin in neonatal hepatocytes. *Hepatology* **40**:1285–1294; 2004.
- [46] Orellana-Gavalda, JM; Herrero, L; Malandrino, MI; Paneda, A; Sol Rodriguez-Pena, M; Petry, H; Asins, G; Van Deventer, S; Hegardt, FG; Serra, D. Molecular therapy for obesity and diabetes based on a long-term increase in hepatic fatty-acid oxidation. *Hepatology* **53**:821–832; 2011.
- [47] Rahman, I; Kode, A; Biswas, SK. Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. *Nat. Protoc.* **1**:3159–3165; 2006.
- [48] Kuo, HT; Chen, HW; Hsiao, HH; Chen, HC. Heat shock response protects human peritoneal mesothelial cells from dialysate-induced oxidative stress and mitochondrial injury. *Nephrol. Dial. Transplant.* **24**:1799–1809; 2009.
- [49] Modol, T; Brice, N; Ruiz de Galarreta, M; Garcia Garzon, A; Iraburu, MJ; Martinez-Irujo, JJ; Lopez-Zabalza, MJ. Fibronectin peptides as potential regulators of hepatic fibrosis through apoptosis of hepatic stellate cells. *J. Cell. Physiol.* **230**:546–553; 2015.
- [50] Singh, R; Kaushik, S; Wang, Y; Xiang, Y; Novak, I; Komatsu, M; Tanaka, K; Cuervo, AM; Czaja, MJ. Autophagy regulates lipid metabolism. *Nature* **458**:1131–1135; 2009.
- [51] Singh, R; Cuervo, AM. Autophagy in the cellular energetic balance. *Cell Metab.* **13**:495–504; 2011.
- [52] Mobasher, MA; Valverde, AM. Signalling pathways involved in paracetamol-induced hepatotoxicity: new insights on the role of protein tyrosine phosphatase 1B. *Arch. Physiol. Biochem.* **120**:51–63; 2014.
- [53] Michelotti, GA; Machado, MV; Diehl, AM. NAFLD, NASH and liver cancer. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **10**:656–665; 2013.
- [54] Brunt, EM. Pathology of nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatol. Res.* **33**:68–71; 2005.

- [55] Brunt, EM. Histopathology of non-alcoholic fatty liver disease. *Clin. Liver Dis* **13**:533–544; 2009.
- [56] Brunt, EM; Kleiner, DE; Wilson, LA; Unalp, A; Behling, CE; Lavine, JE; Neuschwander-Tetri, BA. Portal chronic inflammation in nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD): a histologic marker of advanced NAFLD-clinicopathologic correlations from the Nonalcoholic Steatohepatitis Clinical Research Network. *Hepatology* **49**:809–820; 2009.
- [57] Richardson, MM; Jonsson, JR; Powell, EE; Brunt, EM; Neuschwander-Tetri, BA; Bhathal, PS; Dixon, JB; Weltman, MD; Tilg, H; Moschen, AR; Purdie, DM; Demetris, AJ; Clouston, AD. Progressive fibrosis in nonalcoholic steatohepatitis: association with altered regeneration and a ductular reaction. *Gastroenterology* **133**:80–90; 2007.
- [58] Lewis, MD; Roberts, BJ. Role of CYP2E1 activity in endoplasmic reticulum ubiquitination, proteasome association, and the unfolded protein response. *Arch. Biochem. Biophys.* **436**:237–245; 2005.
- [59] Yang, Y; Li, W; Liu, Y; Sun, Y; Li, Y; Yao, Q; Li, J; Zhang, Q; Gao, Y; Gao, L; Zhao, J. Alpha-lipoic acid improves high-fat diet-induced hepatic steatosis by modulating the transcription factors SREBP-1, FoxO1 and Nrf2 via the SIRT1/LKB1/AMPK pathway. *J. Nutr. Biochem.* **25**:1207–1217; 2014.
- [60] Kaya-Dagistanli, F; Tanriverdi, G; Altinok, A; Ozyazgan, S; Ozturk, M. The effects of alpha lipoic acid on liver cells damages and apoptosis induced by polyunsaturated fatty acids. *Food Chem. Toxicol.* **53**:84–93; 2013.
- [61] Golbidi, S; Badran, M; Laher, I. Diabetes and alpha lipoic acid. *Front. Pharmacol* **2**:69; 2011.
- [62] Fernandez-Galilea, M; Perez-Matute, P; Prieto-Hontoria, PL; Houssier, M; Burrell, MA; Langin, D; Martinez, JA; Moreno-Aliaga, M. J. alpha-Lipoic acid treatment increases mitochondrial biogenesis and promotes beige adipose features in subcutaneous adipocytes from overweight/obese subjects. *Biochim. Biophys. Acta* **1851**:273–281; 2015.
- [63] Huerta, AE; Navas-Carretero, S; Prieto-Hontoria, PL; Martinez, JA; Moreno-Aliaga, MJ. Effects of alpha-lipoic acid and eicosapentaenoic acid in overweight and obese women during weight loss. *Obesity (Silver Spring)* **23**:313–321; 2015.
- [64] Gianturco, V; Bellomo, A; D'Ottavio, E; Formosa, V.; Iori, A; Mancinella, M; Troisi, G.; Marigliano, V. Impact of therapy with alpha-lipoic acid (ALA) on the oxidative stress in the controlled NIDDM: a possible preventive way against the organ dysfunction? *Arch. Gerontol. Geriatr* **49**(Suppl. 1):129–133; 2009.
- [65] Nevado, C; Benito, M; Valverde, AM. Role of insulin receptor and balance in insulin receptor isoforms A and B in regulation of apoptosis in simian virus 40-immortalized neonatal hepatocytes. *Mol. Biol. Cell* **19**:1185–1198; 2008.
- [66] Cazanave, SC; Elmi, NA; Akazawa, Y; Bronk, SF; Mott, JL; Gores, GJ. CHOP and AP-1 cooperatively mediate PUMA expression during lipoapoptosis. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **299**:G236–G243; 2010.
- [67] Shay, KP; Michels, AJ; Li, W; Kong, AN; Hagen, TM. Cap-independent Nrf2 translation is part of a lipoic acid-stimulated detoxification stress response. *Biochim. Biophys. Acta* **1823**:1102–1109; 2012.
- [68] McMahon, M; Itoh, K; Yamamoto, M; Hayes, JD. Keap1-dependent proteasomal degradation of transcription factor Nrf2 contributes to the negative regulation of antioxidant response element-driven gene expression. *J. Biol. Chem.* **278**:21592–21600; 2003.
- [69] Lee, HR; Cho, JM; Shin, DH; Yong, CS; Choi, HG; Wakabayashi, N; Kwak, MK. Adaptive response to GSH depletion and resistance to L-buthionine-(S,R)-sulfoximine: involvement of Nrf2 activation. *Mol. Cell. Biochem.* **318**:23–31; 2008.
- [70] Jung, CL; Kim, HJ; Park, JH; Kong, AN; Lee, CH; Kim, JS. Synergistic activation of the Nrf2-signaling pathway by glycoellins under oxidative stress induced by glutathione depletion. *J. Agric. Food Chem.* **61**:4072–4078; 2013.
- [71] Chia, AJ; Goldring, CE; Kitteringham, NR; Wong, SQ; Morgan, P; Park, BK. Differential effect of covalent protein modification and glutathione depletion on the transcriptional response of Nrf2 and NF-kappaB. *Biochem. Pharmacol.* **80**:410–421; 2010.
- [72] Brewer, AC; Murray, TV; Arno, M; Zhang, M; Anilkumar, NP; Mann, GE; Shah, AM. Nox4 regulates Nrf2 and glutathione redox in cardiomyocytes in vivo. *Free Radic. Biol. Med.* **51**:205–215; 2011.
- [73] Zambo, V; Simon-Szabo, L; Szelenyi, P; Kereszturi, E; Banhegyi, G; Csala, M. Lipotoxicity in the liver. *World J. Hepatol* **5**:550–557; 2013.
- [74] Csala, M; Margittai, E; Banhegyi, G. Redox control of endoplasmic reticulum function. *Antioxid. Redox Signaling* **13**:77–108; 2010.
- [75] Meakin, PJ; Chowdhry, S; Sharma, RS; Ashford, FB; Walsh, SV; McCrimmon, RJ; Dinkova-Kostova, AT; Dillon, JF; Hayes, JD; Ashford, ML. Susceptibility of Nrf2-null mice to steatohepatitis and cirrhosis upon consumption of a high-fat diet is associated with oxidative stress, perturbation of the unfolded protein response, and disturbance in the expression of metabolic enzymes but not with insulin resistance. *Mol. Cell. Biol.* **34**:3305–3320; 2014.
- [76] Kuo, YT; Lin, TH; Chen, WL; Lee, HM. Alpha-lipoic acid induces adipose triglyceride lipase expression and decreases intracellular lipid accumulation in HepG2 cells. *Eur. J. Pharmacol.* **692**:10–18; 2012.
- [77] Egnatchik, RA; Leamy, AK; Noguchi, Y; Shiota, M; Young, JD. Palmitate-induced activation of mitochondrial metabolism promotes oxidative stress and apoptosis in H4IIEC3 rat hepatocytes. *Metabolism* **63**:283–295; 2014.
- [78] Seok, S; Fu, T; Choi, SE; Li, Y; Zhu, R; Kumar, S; Sun, X; Yoon, G; Kang, Y; Zhong, W; Ma, J; Kemper, B; Kemper, JK. Transcriptional regulation of autophagy by an FXR-CREB axis. *Nature* **516**:108–111; 2014.
- [79] Lee, JM; Wagner, M; Xiao, R; Kim, KH; Feng, D; Lazar, MA; Moore, DD. Nutrient-sensing nuclear receptors coordinate autophagy. *Nature* **516**:112–115; 2014.
- [80] Fu, S; Watkins, SM; Hotamisligil, GS. The role of endoplasmic reticulum in hepatic lipid homeostasis and stress signaling. *Cell Metab.* **15**:623–634; 2012.
- [81] Hancer, NJ; Qiu, W; Cherella, C; Li, Y; Copps, KD; White, MF. Insulin and metabolic stress stimulate multisite serine/threonine phosphorylation of insulin receptor substrate 1 and inhibit tyrosine phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **289**:12467–12484; 2014.
- [82] Qi, Y; Xu, Z; Zhu, Q; Thomas, C; Kumar, R; Feng, H; Dostal, DE; White, MF; Baker, KM; Guo, S. Myocardial loss of IRS1 and IRS2 causes heart failure and is controlled by p38alpha MAPK during insulin resistance. *Diabetes* **62**:3887–3900; 2013.
- [83] Diesel, B; Kulhanek-Heinze, S; Holtje, M; Brandt, B; Holtje, HD; Vollmar, AM; Kiemer, AK. Alpha-lipoic acid as a directly binding activator of the insulin receptor: protection from hepatocyte apoptosis. *Biochemistry* **46**:2146–2155; 2007.

Enhanced fatty acid oxidation in adipocytes and macrophages reduces lipid-induced triglyceride accumulation and inflammation

Maria Ida Malandrino,^{1,2} Raquel Fucho,^{1,2} Minéia Weber,^{1,2} María Calderon-Dominguez,^{1,2} Joan Francesc Mir,^{1,2} Lorea Valcarcel,^{1,2} Xavier Escoté,^{3,4} María Gómez-Serrano,^{2,5} Belén Peral,^{2,5} Laia Salvadó,^{4,6} Sonia Fernández-Veledo,^{3,4} Núria Casals,^{2,7} Manuel Vázquez-Carrera,^{4,6} Francesc Villarroya,^{1,2} Joan J Vendrell,^{3,4} Dolors Serra,^{1,2} and Laura Herrero^{1,2}

¹Department of Biochemistry and Molecular Biology, Institut de Biomedicina de la Universitat de Barcelona, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain; ²Institut de Biomedicina de la Universitat de Barcelona Fisiopatología de la Obesidad y la Nutrición, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain; ³Endocrinology and Diabetes Unit, Joan XXIII University Hospital, Institut d'Investigació Sanitària Pere i Virgili, Universitat Rovira i Virgili, Tarragona, Spain; ⁴Institut de Biomedicina de la Universitat de Barcelona de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain; ⁵Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols, Consejo Superior de Investigaciones Científicas and Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain; ⁶Pharmacology Unit, Department of Pharmacology and Therapeutic Chemistry and Institut de Biomedicina de la Universitat de Barcelona, Faculty of Pharmacy, University of Barcelona, Barcelona, Spain; and ⁷Basic Sciences Department, Faculty of Medicine and Health Sciences, Universitat Internacional de Catalunya, Barcelona, Spain

Submitted 30 July 2014; accepted in final form 19 February 2015

Malandrino MI, Fucho R, Weber M, Calderon-Dominguez M, Mir JF, Valcarcel L, Escoté X, Gómez-Serrano M, Peral B, Salvadó L, Fernández-Veledo S, Casals N, Vázquez-Carrera M, Villarroya F, Vendrell JJ, Serra D, Herrero L. Enhanced fatty acid oxidation in adipocytes and macrophages reduces lipid-induced triglyceride accumulation and inflammation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 308: E756–E769, 2015. First published February 24, 2015; doi:10.1152/ajpendo.00362.2014.—Lipid overload in obesity and type 2 diabetes is associated with adipocyte dysfunction, inflammation, macrophage infiltration, and decreased fatty acid oxidation (FAO). Here, we report that the expression of carnitine palmitoyl-transferase 1A (CPT1A), the rate-limiting enzyme in mitochondrial FAO, is higher in human adipose tissue macrophages than in adipocytes and that it is differentially expressed in visceral vs. subcutaneous adipose tissue in both an obese and a type 2 diabetes cohort. These observations led us to further investigate the potential role of CPT1A in adipocytes and macrophages. We expressed CPT1AM, a permanently active mutant form of CPT1A, in 3T3-L1 CARΔ1 adipocytes and RAW 264.7 macrophages through adenoviral infection. Enhanced FAO in palmitate-incubated adipocytes and macrophages reduced triglyceride content and inflammation, improved insulin sensitivity in adipocytes, and reduced endoplasmic reticulum stress and ROS damage in macrophages. We conclude that increasing FAO in adipocytes and macrophages improves palmitate-induced derangements. This indicates that enhancing FAO in metabolically relevant cells such as adipocytes and macrophages may be a promising strategy for the treatment of chronic inflammatory pathologies such as obesity and type 2 diabetes.

obesity; type 2 diabetes; adipocytes; macrophages; inflammation; fatty acid oxidation; CPT1

OBESITY HAS REACHED EPIDEMIC PROPORTIONS worldwide, leading to severe associated pathologies such as insulin resistance, type 2 diabetes (T2D), cardiovascular disease, Alzheimer's disease, hypertension, hypercholesterolemia, hypertriglyceri-

demia, nonalcoholic fatty liver disease, arthritis, asthma, and certain forms of cancer (12).

Over the last two decades, adipose tissue has gained crucial importance in the mechanisms involved in obesity-related disorders. The energy-storing white adipose tissue (WAT) is well vascularized and contains adipocytes, connective tissue, and numerous immune cells such as macrophages, T and B cells, mast cells, and neutrophils that infiltrate and increase their presence during obesity (22). Macrophages were the first immune cells reported to participate in obesity-induced insulin resistance (56). This highlights their pathological role in adipose tissue in addition to their traditional involvement in tissue repair and in response to dead and dying adipocytes (5, 14). Fat is an active endocrine tissue that secretes hormones such as leptin, adiponectin, or resistin and inflammatory cytokines such as TNF- α , IL-6, IL-1 β , etc. in response to several stimuli. It is therefore a complex organ controlling energy expenditure, appetite, insulin sensitivity, endocrine and reproductive functions, inflammation, and immunity (53).

The pathophysiology of obesity-induced insulin resistance has been attributed to ectopic fat deposition (39), increased inflammation, endoplasmic reticulum (ER) stress (16, 42), adipose tissue hypoxia (15) and mitochondrial dysfunction (32), and impaired adipocyte expansion and angiogenesis (50, 51, 54). In obesity, fatty acids (FA) together with other stimuli such as ceramide, various PKC isoforms, proinflammatory cytokines and reactive oxygen species (ROS), and ER stresses activate JNK, NF- κ B, RAGE, and TLR pathways both in adipocytes and macrophages triggering inflammation and insulin resistance (43).

Strenuous efforts are being made by the research community to elucidate the mechanisms involved in the pathophysiology of obesity-related disorders. However, an alternative strategy could be to act upstream by preventing the accumulation of lipids and the progression of obesity. In addition to reducing caloric intake, a potential effective approach to combating obesity would be to increase energy expenditure in key metabolic organs such as adipose tissue. Obese individuals and

Address for reprint requests and other correspondence: L. Herrero, Dept. of Biochemistry and Molecular Biology, IBUB, School of Pharmacy, Univ. of Barcelona, Av. Diagonal, 643, E-08028 Barcelona, Spain (e-mail: lherrero@ub.edu).

those with T2D are known to have lower fatty acid oxidation (FAO) rates and lower electron transport chain activity in muscle (17, 19, 37), together with higher glycolytic capacities and enhanced cellular FA uptake compared with nonobese and nondiabetic individuals (44). Thus, any strategy able to eliminate the excess of lipids found in obesity could be beneficial for health. Lipid levels can be reduced by inhibiting synthesis and transport or by increasing oxidation; here, we focus on the latter.

Malonyl-CoA, derived from glucose metabolism and the first intermediate in lipogenesis, regulates FAO by inhibiting carnitine palmitoyltransferase 1 (CPT1). This makes CPT1 the rate-limiting step in mitochondrial FA β -oxidation. Thus, in high-energy conditions, malonyl-CoA inhibits oxidation, diverting FAs' fate into TG accumulation. There are three CPT1 isoforms, with different tissue expressions: CPT1A (liver, kidney, intestine, pancreas, ovary, and mouse and human WAT), CPT1B (brown adipose tissue, skeletal muscle, heart, and rat and human WAT), and CPT1C (brain and testis) (2, 36). The fact that CPT1 controls FAO makes it a very attractive target to reduce lipid levels and fight against obesity and T2D. Despite their excess fat, obese individuals have reduced visceral WAT CPT1 mRNA and protein levels (20). This prompted our group and others to overexpress CPT1 in liver (26, 29, 45), muscle (3, 33, 40), and white adipocytes (9), which led to a decrease in triglyceride (TG) content and an improvement in insulin sensitivity.

Here, we show that CPT1A expression was higher in human adipose tissue macrophages than in mature adipocytes and that it was differentially expressed in visceral vs. subcutaneous adipose tissue. To further investigate the role of CPT1A in both adipocytes and macrophages, we used a permanently active mutant form of CPT1A, CPT1AM, which is insensitive to its inhibitor malonyl-CoA (27), to achieve continuous oxidation of lipids. When cells were incubated with palmitate to mimic obesity, CPT1AM restored most of the palmitate-induced imbalances. An increase in FAO in adipocytes and macrophages reduced TG content and inflammatory levels, improved insulin sensitivity in adipocytes, and reduced ER stress and ROS damage in macrophages.

MATERIALS AND METHODS

Human cohorts: selection of patients. Adipose tissue was selected from an adipose tissue biobank collection of the University Hospital Joan XXII (Tarragona, Spain). All subjects were of Caucasian origin and reported that their body weight had been stable for at least 3 mo before the study. They had no systemic disease other than obesity or T2D, and all had been free of any infections in the previous month before the study. Liver and renal diseases were specifically excluded by biochemical work-up. Appropriate Institutional Review Board approval and adequate biobank informed consent were obtained from all participants. Biobanking samples included plasma and total and fractionated adipose tissue from subcutaneous and visceral origin. All patients had fasted overnight before collection of blood and adipose tissue samples. Visceral adipose tissue (VAT) and subcutaneous adipose tissue (SAT) samples were obtained during surgical procedures that included laparoscopic surgery for hiatus hernia repair or cholecystectomy. Samples were selected according stratification by age, sex, and BMI and grouped into two cohorts:

Obesity cohort. Subjects were classified by BMI according to the World Health Organization criteria (WHO, 2000). The study included 19 lean, 28 overweight, and 15 obese nondiabetic subjects matched for age and sex (Table 1).

T2D cohort. Patients were classified as having T2D according to American Diabetes Association criteria (1997). Variability in metabolic control was assessed by stable glycated hemoglobin A_{1c} (HbA_{1c}) values during the previous 6 mo. These criteria having been gathered, there were 11 T2D subjects. As a control group, we selected 36 subjects without diabetes from the obesity cohort, matched for age, BMI, and sex (Table 2). No patient was being treated with thiazolidinedione.

Anthropometric measurements. Height was measured to the nearest 0.5 cm and body weight to the nearest 0.1 kg. BMI was calculated as weight (kilograms) divided by height (meters) squared. Waist circumference was measured midway between the lowest rib margin and the iliac crest.

Collection and processing of human samples. Samples from VAT (omental) and SAT (anterior abdominal wall) from the same individual were obtained during abdominal elective surgical procedures (cholecystectomy or surgery for abdominal hernia). All patients had fasted overnight at least 12 h before the surgical procedure. Blood samples were collected before the surgical procedure from the antecubital vein, 20 ml of blood with EDTA (1 mg/ml), and 10 ml of blood in silicone tubes. Collected blood (15 ml) was used for the

Table 1. Clinical, analytic, and CPT1A gene expression analysis of the obesity cohort

	Lean BMI <25 (13 M; 6 F)	Overweight 25 ≤ BMI <30 (16 M; 12 F)	Obese BMI ≥30 (9 M; 6 F)
Age, yr	51.7 ± 16.0	57.1 ± 15.0	57.4 ± 12.8
BMI, kg/m ²	23.6 (22.1–24.2)	27.2 (26.5–27.9)*	32.1 (30.8–33.6)*#
Waist, cm	83.0 (79.0–90.0)	97.0 (90.5–100.0)*	107.0 (100.0–117.2)*#
Cholesterol, mM	5.2 ± 1.2	4.9 ± 1.0	5.2 ± 0.8
HDL-cholesterol, mM	1.5 ± 0.5	1.3 ± 0.3	1.4 ± 0.3
Triglycerides, mM	1.0 (0.7–1.6)	1.1 (0.8–1.5)	1.0 (0.7–1.3)
Glucose, mM	4.8 ± 0.7	5.5 ± 0.5*	5.6 ± 0.5*
Insulin, μ IU/ml	3.4 (2.1–6.7)	4.0 (2.8–7.2)	6.6 (4.5–16.5)¶
HOMA-IR	0.75 (0.54–1.83)	1.01 (0.52–2.09)	1.60 (1.19–4.79)¶
sIL-6, pg/ml	1.4 (1.1–2.5)	1.0 (0.7–2.2)	2.5 (1.4–5.2)§
SBP, mmHg	120 (120–127)	130 (121–140)	145 (130–160)*§
DBP, mmHg	70 (60–80)	70 (70–80)	80 (78–90)¶
SAT CPT1A	0.85 (0.66–1.14)†	1.15 (0.85–1.60)†	0.86 (0.72–1.81)
VAT CPT1A	1.31 (1.07–2.50)	1.42 (0.97–3.00)	1.07 (0.84–1.76)

Values are expressed as means \pm SD or median (interquartile range) for non-Gaussian distributed variables. CPT1A, carnitine palmitoyltransferase 1A; BMI, body mass index; HOMA-IR, homeostasis model assessment of insulin resistance; sIL-6, soluble interleukin-6; SBP, systolic blood pressure; DBP, diastolic blood pressure; SAT, subcutaneous adipose tissue; VAT, visceral adipose tissue. Differences vs. Lean: * P < 0.001; ¶ P < 0.05. Differences vs. Overweight: # P < 0.001; § P < 0.05. † P < 0.05 SAT vs. VAT expression.

Table 2. Clinical, analytic, and CPT1A gene expression analysis of the T2D cohort

	Control (21 M, 15 F)	Type 2 Diabetes (5 M, 6 F)
Age, yr	61.6 ± 10.6	66.1 ± 8.6
BMI, kg/m ²	28.6 (27.0–31.5)	28.7 (26.9–30.4)
Waist, cm	100.0 (94.0–107.0)	97.0 (94.0–102.0)
Cholesterol, mM	5.1 ± 0.9	4.7 ± 1.2
HDL-chole., mM	1.4 (1.2–1.6)	1.2 (1.0–1.9)
Triglycerides, mM	1.0 (0.7–1.5)	1.7 (1.2–2.3)¶
NEFA, μM	775.5 ± 275.1	926.4 ± 412.3
Glycerol, μM	135.2 (117.2–222.3)	301.6 (209.6–465.3)¶¶
Glucose, mM	5.6 (5.3–5.8)	8.3 (7.0–10.1)*
Insulin, μIU/ml	4.5 (3.5–7.7)	10.2 (3.5–21.4)
HOMA-IR	1.22 (0.89–2.10)	3.66 (1.71–23.66)¶¶
sIL-6, pg/ml	1.4 (1.0–2.6)	1.5 (1.0–2.4)
SBP, mmHg	140 (130–150)	140 (124–156)
DBP, mmHg	80 (70–80)	80 (63–83)
SAT <i>CPT1A</i>	1.08 (0.79–1.59)†	1.70 (1.03–2.18)
VAT <i>CPT1A</i>	1.39 (0.87–2.28)	1.57 (0.98–1.96)

Values are expressed as means ± SD or median (interquartile range) for non-Gaussian distributed variables. Differences vs. controls: * $P < 0.001$; ¶ $P < 0.05$. Differences between SAT and VAT in the same group: † $P = 0.03$.

separation of plasma. Plasma samples were stored at -80°C until analytic measurements were performed; 5 ml of blood with EDTA was used for the determination of HbA_{1c}. Adipose tissue samples were collected, washed in PBS, immediately frozen in liquid N₂ and stored at -80°C .

Adipose tissue fractionation. Adipose tissue biopsies were processed immediately. The adipose tissue was finely diced into small pieces (10–30 mg), washed in PBS, and incubated in Medium 199 (Life Technologies) supplemented with 4% BSA plus 2 mg/ml collagenase type I (Sigma) for 1 h in a shaking water bath at 37°C . After digestion, mature adipocytes (ADI) were separated from tissue matrix by filtration through a 200-μm mesh fabric (Spectrum Laboratories). The filtrated solution was centrifuged for 5 min at 1,500 g. The mature adipocytes were removed from the top layer and the stromal vascular fraction (SVF) cells remained in the pellet. Cells were washed four times in PBS and processed for RNA and protein extraction.

Analytic methods. Glucose, cholesterol, and TG plasma levels were determined in an autoanalyzer (Hitachi 737, Boehringer Mannheim) using the standard enzyme methods. High-density lipoprotein (HDL) cholesterol was quantified after precipitation with polyethylene glycol at room temperature (PEG-6000). Plasma insulin was determined by radioimmunoassay (Coat-A-Count insulin; Diagnostic Products). Nonesterified free fatty acid (NEFA) serum levels were determined in an autoanalyzer (Advia 1200, Siemens) using an enzymatic method developed by Wako Chemicals. Plasma glycerol levels were analyzed by using a free glycerol determination kit, a quantitative enzymatic determination assay (Sigma-Aldrich). Intra- and interassay CVs were less than 6% and less than 9.1%, respectively. The degree of insulin resistance was determined by homeostasis model assessment (HOMA), as $[\text{glucose (mmol/l)} \times \text{insulin (mIU/l)}] / 22.5$. (24).

Immunohistochemistry. Five-micrometer sections of formalin-fixed paraffin-embedded adipose tissue were deparaffinized and rehydrated prior to antigen unmasking by boiling in 1 mM EDTA, pH 8. Sections were blocked in normal serum and incubated overnight with rabbit anti-CPT1A (Sigma-Aldrich) at 1:50 dilution. Secondary antibody staining was performed using a VECTASTAIN ABC kit (Vector Laboratories) and detected with diaminobenzidine (Vector Laboratories). Sections were counterstained with hematoxylin prior to dehydration and coverslip placement and examined under a Nikon Eclipse 90i microscope. As a negative control, the procedure was performed in the absence of primary antibody.

Immunofluorescence. Five-micrometer sections of formalin-fixed paraffin-embedded adipose tissue were blocked in normal serum and

incubated overnight with rabbit anti-CPT1A antibody (Sigma-Aldrich) at 1:50 dilution and with mouse anti-CD68 (Santa Cruz Biotechnology) at 1:50 dilution, washed, and visualized using Alexa fluor 546 goat anti-rabbit, and Alexa fluor 488 goat anti-mouse antibodies, respectively (1:500, Molecular Probes). The slides were counterstained with DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole) to reveal nuclei and were examined under a Nikon Eclipse 90i fluorescent microscope. As a negative control, the assay was performed in the absence of primary antibody.

Materials. Sodium palmitate, sodium oleate, BSA, and L-carnitine hydrochloride were purchased from Sigma Aldrich. DMEM, FBS, and penicillin-streptomycin mixture were purchased from Life Technologies.

Cell culture. Murine 3T3-L1 CARΔ1 preadipocytes, kindly given by Dr. Orlicky (Department of Pathology, UCHSC at Fitzsimons, Aurora, CO), were cultured and differentiated into mature adipocytes following the published protocol (31). Mature adipocytes were used for experiments at day 8 postdifferentiation. Murine RAW 264.7 macrophages were obtained from ATCC and were maintained in DMEM supplemented with 10% heat-inactivated FBS and 1% penicillin-streptomycin mixture. Simpson-Golabi-Behmel Syndrome (SGBS) human cells were cultured and differentiated to adipocytes as previously described (55).

Adenovirus infection. At day 8 of differentiation, 3T3-L1 CARΔ1 cells were infected with adenoviruses AdGFP [100 moi (multiplicity of infection)] and AdCPT1AM (13) (100 moi) for 24 h in serum-free DMEM, and then the medium was replaced with complete DMEM for additional 24 h. RAW 264.7 macrophages were infected with AdGFP (100 moi) and AdCPT1AM (100 moi) for 2 h in serum-free DMEM and then replaced with complete medium for an additional 72 h. Adenovirus infection efficiency was assessed in AdGFP-infected cells (see Fig. 3, A and B). The same batch of adenoviruses stored in 50-μl aliquots was used throughout the experiments.

FA treatment. Sodium palmitate was conjugated with FA-free BSA in a 5:1 ratio to yield a stock solution of 2.5 mM (40). Cells were incubated with 0.3 or 1 mM of this solution for 24 h (3T3-L1 CARΔ1 adipocytes) or 0.3, 0.5, or 0.75 mM for 24, 18, or 8 h (RAW 264.7 macrophages), respectively.

Adipocyte and macrophage viability. 3T3-L1 CARΔ1 adipocytes and RAW 264.7 macrophages were infected as previously described and incubated for 24 h with 1 or 0.3 mM palmitate, respectively. Cells were washed twice with PBS and lifted from the surface with trypsin followed by 2 min of incubation at 37°C . Trypsinization was stopped with 10% FBS-containing medium, and equal volumes of cell suspension were mixed with 0.4% Trypan blue staining. Trypan blue-positive and -negative cells were counted using a Neubauer chamber for adipocytes and a Countess Automated Cell Counter (Invitrogen) for macrophages. Percentage of viability was determined normalizing viable cells of each group to viable cells of BSA GFP group. Statistical significance was assessed using two-way ANOVA of three individual experiments (* $P < 0.05$).

CPT1 activity. Mitochondria-enriched fractions were obtained from cell culture grown in 10-cm² dishes, and CPT1 activity was measured by a radiometric method as described (13).

FA oxidation. Total oleate oxidation was measured in 3T3-L1 CARΔ1 adipocytes and RAW 264.7 macrophages grown in 25-ml flasks, differentiated, and infected as described above. The day of the assay, cells were washed in KRBH-0.1% BSA, preincubated at 37°C for 30 min in KRBH-1% BSA, and washed again in KRBH-0.1% BSA. Cells were then incubated for 3 h (3T3-L1 CARΔ1 adipocytes) or 2 h (RAW 264.7 macrophages) at 37°C with fresh KRBH containing 11 mM glucose, 0.8 mM carnitine, and 0.2 mM [¹⁻¹⁴C]oleate (PerkinElmer). Oxidation was measured as described (29). The scintillation values were normalized to the protein content of each flask.

TG content. Cells were grown in 12-well plates, differentiated, and infected as described above. After 24 h (3T3-L1 CARΔ1 adipocytes) or 18 h (RAW 264.7 macrophages) of FA treatment, cells were

collected for lipid extraction following a protocol of Gesta et al. (10) with minor modifications: after cell lysis with 0.1% SDS, 1/2/0.12 (vol/vol/vol) methanol-chloroform-0.5 M KCl solution was added, the two phases were separated by centrifugation, and the upper phase was dried with N₂. Finally, lipids were resuspended in 100% isopropanol, and TGs were quantified using a TG Triglyceride kit (Sigma) according to the manufacturer's instructions. Protein concentrations were used to normalize sample values.

Oil red O staining. RAW 264.7 macrophages grown on coverslips were infected as described above and incubated with 0.75 mM palmitate for 18 h. After this time, cells were rinsed twice with PBS, fixed in 10% paraformaldehyde for 30 min at room temperature, and washed again with PBS. Then, cells were rinsed with 60% isopropanol for 5 min to facilitate the staining of neutral lipids and were stained with filtered Oil red O working solution (0.3% Oil red O in isopropanol) for 15 min. After several washes with distilled water, the coverslips were removed and mounted on a drop of mount medium. The intracellular lipid vesicles stained with Oil red O were identified by their bright red color under the microscope.

Analysis of intracellular protein oxidation. RAW 264.7 macrophages were cultured in 12-well plates and infected as described before. After FA treatment, cell extracts were prepared and analyzed for protein oxidative modifications (i.e., carbonyl group content) with a OxyBlot Protein Oxidation Detection kit (Millipore), following the manufacturer's instructions.

Western blot analysis. 3T3-L1 CARΔ1 adipocytes and RAW 264.7 macrophages were cultured in 12-well plates, differentiated, and infected as described above. Cells were collected in lysis buffer (RIPA), and protein concentration was determined using a BCA protein assay kit (ThermoScientific). An equal amount of protein from whole cell lysates was resolved by 8% SDS-PAGE and transferred to PVDF membranes (Millipore). Signal detection was carried out with the ECL immunoblotting detection system (GE Healthcare), and the results were quantitatively analyzed using Image Quant LAS4000 Mini (GE Healthcare). The following antibodies were used: CPT1A [1/6,000 (13)], β-actin (1-19; 1/4,000, Santa Cruz), Akt and pAkt (Ser⁴⁷³; 1/1,000, Cell Signaling), C/EBP homologous protein (CHOP; GADD 153, 1/200; Santa Cruz) and insulin receptor-β (IRβ; 1/1,000; Santa Cruz). Human fat tissue was homogenized in RIPA buffer as previously described (34). Protein extracts (10–20 μg) were loaded, resolved on 10% SDS-PAGE, and transferred to Hybond ECL nitrocellulose membranes. Membranes were stained with 0.15% Ponceau red (Sigma-Aldrich) to ensure equal loading after transfer and then blocked with 5% (wt/vol) BSA in TBS buffer with 0.1% Tween 20. Immunoblotting was performed with 1:2,000 goat anti-human CPT1A (Abcam). Blots were incubated with the appropriate IgG-HRP-conjugated secondary antibody. Immunoreactive bands were visualized with an ECL-plus reagent kit (GE Healthcare). Optical densities of the immunoreactive bands were measured using Image J analysis software.

Analysis of mRNA expression by quantitative real-time PCR. Total RNA was extracted from cultured cells grown in 12-well plates using

Illustra Mini RNA Spin kit (GE Healthcare), and cDNA was obtained using a Transcriptor First Strand cDNA Synthesis kit (Roche). Quantitative real-time PCR was performed using a SYBR Green PCR Master Mix Reagent Kit (Life Technologies). Levels of mRNA were normalized to those of β-actin and expressed as fold change. Forward/reverse primers for several genes were used (Table 3; other sequences are available upon request):

Frozen human adipose tissue (400–500 mg) was homogenized with an Ultra-Turrax 8 (Ika). Total RNA from adipose biopsies, SVF, and isolated adipocytes were extracted by using an RNeasy Lipid Tissue Midi Kit (QIAGEN) following the manufacturer's instructions, and total RNA was treated with 55 U of RNase-free DNase (QIAGEN) to avoid contamination with genomic DNA. Between 0.2 and 1 μg of total RNA was reverse-transcribed to cDNA using TaqMan reverse transcription reagents (Applied Biosystems) and subsequently diluted with nuclease-free water (Sigma) to 20 ng/μl cDNA. For adipose tissue gene expression analysis, real-time quantitative PCR was performed, with duplicates, on a 7900HT Fast Real-Time PCR System using commercial Taqman Assays (Applied Biosystems). SDS software 2.3 and RQ Manager 1.2 (Applied Biosystems) were used to analyze the results with the comparative threshold cycle (C_T) method (2^{ΔΔC_T}). C_T values for each sample were normalized with an optimal reference gene (cyclophilin) after testing of three additional house-keeping genes: β-actin and RNA 18S. A panel of genes involved in the adipocyte differentiation and metabolism was selected in the study of CPT1A gene expression (Table 4).

Cytokine measurement in culture media. Cytokine protein levels in culture medium of 3T3-L1 CARΔ1 adipocytes and RAW 264.7 macrophages were measured by Luminex technology with a MILLIPLEX Analyzer Luminex 200x Ponenet System (MCYTOMAG-70K-08 Mouse Cytokine MAGNETIC Kit; Merck Millipore).

Analysis of cellular redox status. To detect ROS (superoxide) formation, MitoSOX Red (M36008, Life Technologies) fluorescence was measured by flow cytometry. RAW 264 cells were infected with 100 moi AdCPT1AM (or AdGFP as control) for 48 h; then, 16 h prior to ROS measurement, macrophages were treated with 0.75 mM palmitate BSA-conjugated (or with BSA as control). Medium was removed, and cells were incubated for 30 min with PBS containing 5 μM MitoSOX Red. The labeled macrophages were washed three times with HBSS-Ca-Mg, pelleted, resuspended in 300 μl of HBSS-Ca-Mg, and fixed by adding 1.2 ml of absolute ethanol and keeping them at –20°C for 5 min. Cells were pelleted again and resuspended in HBSS-Ca-Mg containing 3 μM DAPI to mark their nuclei. Then macrophages were analyzed by flow cytometry (Gallios Cytometer, Beckman-Coulter). The fluorescence intensity of MitoSOX Red was measured using excitation at 510 nm and emission at 580 nm.

Statistical analysis. Data are expressed as means ± SE and analyzed statistically using Student's *t*-test (column analysis) or two-way ANOVA (grouped analysis). All figures and statistical analyses were generated using GraphPad Prism 6. *P* < 0.05 was considered statistically significant. For human data, statistical analyses were performed with SPSS 12.0. Results are expressed as means ± SD. The nonnor-

Table 3. Forward and reverse primers

	Forward	Reverse
β-Actin	5'-AGGTGACAGCATTGCTTCTG-3'	5'-GCTGCCTCAACACCTCAAC-3'
CHOP	5'-CCCTGCCTTTACCTTGG-3'	5'-CCGCTCGTTCTCCTGCTC-3'
CPT1A*	5'-GCAGCAGATGCAGCAGATCC-3'	5'-TCAGGATCCTCCTCTGTATCCG-3'
EDEM	5'-AAGCCCTCTGGAACCTGCG-3'	5'-AACCCAAATGGCCGTCTGG-3'
GRP78	5'-ACTTGGGGACACCTATTCT-3'	5'-ATCGCCAATCAGACGGCTC-3'
IL-1β	5'-GCCCATCCTCTGTGACTCAT-3'	5'-AGGCCACAGGTATTTTGTCC-3'
MCP-1	5'-TCCCAATGAGTAGGCTGGAG-3'	5'-AAGTGCTTGAGGTGGTTGTG-3'
PDI	5'-ACCTGCTGGTGGAGTTCTATG-3'	5'-CGGCAGCTTGGCATACT-3'
TLR-4	5'-GGACTCTGATCATGGCACTG-3'	5'-CTGATCCATGCATTGGTAGGT-3'
TNF-α	5'-ACGGCATGGATCTCAAAGAC-3'	5'-AGATAGCAAATCGCTGAACG-3'

*Recognizes both carnitine palmitoyltransferase 1A (CPT1A) and the active mutant CPT1AM. See text for other definitions.

Table 4. Gene symbols, denominations, and assay ID numbers

Gene Symbol	Gene Denomination	Assay ID
ACC1	(acetyl-coenzyme carboxylase 1) ACACA	Hs00167385_m1
PCK2	(phosphoenolpyruvate carboxykinase 2)	Hs00388934_m1
PPAR α	(peroxisome proliferator-activated receptor- α)	Hs00231882_m1
PPAR γ	(peroxisome proliferator-activated receptor- γ)	Hs00234592_m1
AGPAT3	(1-acyl- <i>sn</i> -glycerol-3-phosphate acyltransferase- γ /LPAAT-g1)	Hs00987571_m1
AGPAT4	(1-acyl- <i>sn</i> -glycerol-3-phosphate acyltransferase/LPAAT-d)	Hs00220031_m1
AGPAT5	(1-acyl- <i>sn</i> -glycerol-3-phosphate acyltransferase/LPAAT-e)	Hs00218010_m1
AGPAT9	(1-acylglycerol-3-phosphate <i>O</i> -acyltransferase 9/LPAAT- θ)	Hs00262010_m1
CDS1	(phosphatidate cytidylyltransferase)	Hs00181633_m1
PCYT1A	(choline-phosphate cytidylyltransferase)	Hs00192339_m1
PCYT2	(ethanolamine-phosphate cytidylyltransferase)	Hs00161098_m1
PDE3B	(phosphodiesterase type 3)	Hs01057215_m1
FDFT1	(farnesyl-diphosphate farnesyltransferase 1)	Hs00926054_m1
SREBF1	(sterol regulatory element binding transcription factor 1)	Hs01088691_m1
BCL2	(B cell CLL/lymphoma 2)	Hs99999018_m1
CD163	Macrophage and monocyte marker	Hs01016661_m1
CPT1A	(carnitine palmitoyltransferase 1A)	Hs00912676_m1

mally distributed variables are represented as the median (interquartile range). Categorical variables are reported by number (percentages). Student's *t*-test analysis was used to compare the mean value of normally distributed continuous variables. Variables with a non-Gaussian distribution were analyzed using a nonparametric test (Kruskal-Wallis or Mann-Whitney test for independent samples or Wilcoxon test for related samples when necessary). Associations between continuous variables were sought by correlation analyses. Finally a stepwise multiple linear regression analysis was performed to determine independent variables associated with CPT1A gene expression levels in SAT and VAT depots. Results are expressed as unstandardized coefficient (B), and 95% confidence interval for B [95% CI(B)]. Differences are considered significant if a computed two-tailed probability value (*P*) is < 0.05.

RESULTS

CPT1A expression pattern in human adipose tissue from obese and diabetic patients. Visceral and subcutaneous adipose tissue (VAT and SAT, respectively) were analyzed from both an obesity cohort (lean, overweight and obese patients) and a T2D cohort (control and T2D patients). Tables 1 and 2 show the phenotypic and metabolic characteristics and CPT1A expression levels of the subjects. No differences in CPT1A gene expression levels either in SAT or in VAT depots were observed when comparing with the nonobese or the nondiabetic counterparts (Fig. 1, *A* and *B*; Tables 1 and 2). However, in the obesity cohort, CPT1A mRNA expression was significantly higher in lean and overweight VAT than in SAT (Fig. 1*A*); this difference was lost in the obese patients. These results were corroborated by Western blot with human adipose tissue of several lean and obese individuals (Fig. 1, *C* and *D*, *P* = 0.015). Similar results were obtained in the T2D cohort, where control subjects showed significantly higher CPT1A mRNA levels in VAT vs. SAT (Fig. 1*B*); however, this difference disappeared in T2D patients. Despite T2D patients showing a trend to express higher CPT1A levels in SAT and VAT compared with controls (the opposite of that in the obese subjects), this difference was nonsignificant. Since the CPT1B isoform is also expressed in human adipose tissue, we analyzed CPT1B mRNA (Fig. 1, *E* and *F*) and protein (data not shown) levels in human VAT and SAT of the

obesity and the T2D cohort. No differences were seen among the groups.

To establish the main relationship between CPT1A gene expression and key adipocyte genes involved in differentiation and metabolic pathways, we explored a panel of genes (see MATERIALS AND METHODS) both in SAT and in VAT depots of the obesity cohort. Results are shown from those genes that changed the most (up or down; Tables 5 and 6). Simple association analysis showed an inverse correlation between CPT1A and peroxisome proliferator-activated receptor- γ (PPAR γ) in SAT ($r = -0.38$, $P = 0.002$; Table 5). Positive CPT1A correlation in both VAT and SAT was found with 1-acylglycerol-3-phosphate *O*-acyltransferase 5 (AGPAT5; phospholipid biosynthesis), sterol regulatory element binding transcription factor 1 (SREBF1; glucose and lipid metabolism), B cell CLL/lymphoma 2 (BCL2; antiapoptosis), and CD163 (macrophage marker) (Table 5).

To study the main determinants of CPT1A gene expression levels, a stepwise multiple regression analysis was performed, including the aforementioned bivariate associations and confounding factors such as BMI, age and sex. This model showed that SAT CPT1A was positively associated with AGPAT5, SREBF1, and CD163 and that VAT CPT1A was positively correlated with SREBF1 and CD163 and negatively with age and PPAR γ (Table 6). The inverse relationship between CPT1A and PPAR γ was corroborated with the human adipocyte cell line SGBS. CPT1A mRNA expression dropped to a new steady state in adipocytes that was 11% of its expression in fibroblasts (data not shown).

CPT1A is highly expressed in human adipose tissue macrophages. To determine the cellular distribution of CPT1A gene and protein in human adipose tissue biopsies, we performed qRT-PCR and immunostaining analysis on both adipose and SVF. CPT1A mRNA levels were 42.6- and 43.4-fold increased in the SVF compared with mature adipocytes in both human SAT ($P < 0.05$) and VAT ($P < 0.05$), respectively (Fig. 2*A*). Immunohistological examination of SAT from obese subjects revealed CPT1A+ cells mostly in the SVF (Fig. 2*B*). Immunofluorescence detection showed a bright staining pattern in cells resembling adipose tissue macrophages. Costaining analysis using CPT1A and

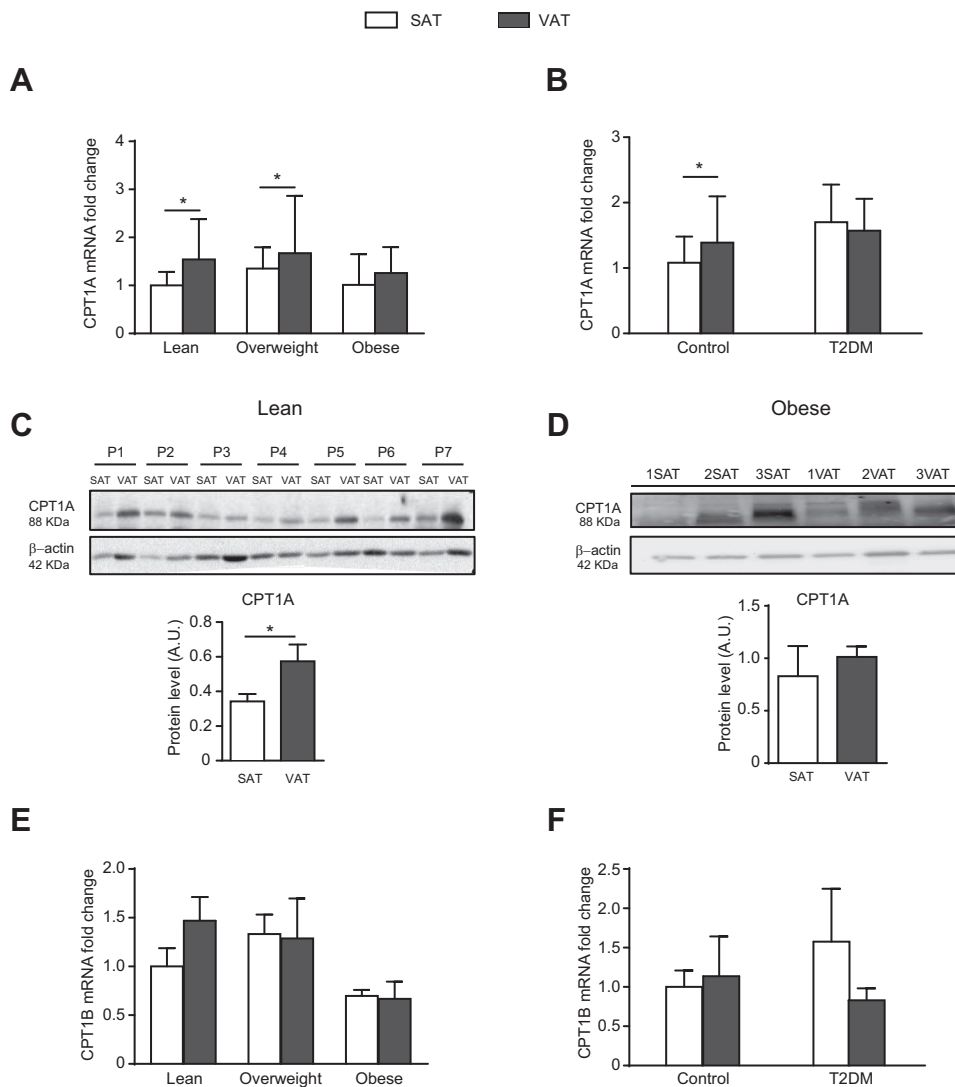


Fig. 1. Carnitine palmitoyltransferase 1A (CPT1A) gene and protein expression in human adipose tissue. *A* and *B*: CPT1A relative mRNA levels in human visceral (VAT) and subcutaneous adipose tissue (SAT) of the obesity (*A*) or the type 2 diabetes (T2D; *B*) cohort. Numbers of individuals: 19 lean, 28 overweight, 15 obese, 36 control, and 11 T2D (see Tables 1 and 2 for more details). *C* and *D*: CPT1A protein levels in human VAT and SAT of 7 lean individuals (P1-P7; *C*) and 3 obese individuals (*D*). *E* and *F*: CPT1B relative mRNA levels in human VAT and SAT of the obesity (*E*) or the T2D (*F*) cohort. **P* < 0.05.

CD68 (a macrophage marker) antibodies confirmed the expression of CPT1A in macrophages (Fig. 2C). Macrophages seemed to localize forming the so-called “crown-like structures” surrounding the adipocytes.

CPT1A-expressing adipocytes show enhanced FA oxidation and reduced TG content. To further study the role of CPT1A in adipocytes and macrophages, we decided to con-

tinue with in vitro studies. Since 3T3-L1 adipocytes are inefficiently infected with adenovirus, we decided to use the high-infection efficiency white adipocyte cell culture line, 3T3-L1 CARΔ1 adipocytes (31) (Fig. 3A). Cells were transduced for the first time with adenoviruses carrying the CPT1A gene or GFP as a control. Interestingly, CPT1A-

Table 5. Bivariate correlation analysis of CPT1A gene expression levels with several genes in human VAT and SAT of the obesity cohort

	CPT1A	
	SAT R	VAT R
PPAR γ	-0.382	
AGPAT5	0.639	0.714
SREBF1	0.525	0.757
BCL2	0.639	0.580
CD163	0.731	0.716

PPAR γ , peroxisome proliferator-activated receptor- γ ; AGPAT5, 1-acylglycerol-3-phosphate *O*-acyltransferase-5; SREBF1, sterol regulatory element-binding transcription factor 1; BCL2, B cell CLL/lymphoma 2; CD163, macrophage and monocyte marker. *P* < 0.005 for all correlations.

Table 6. Multiple regression analysis for CPT1A in VAT and SAT as dependent variable in the obesity cohort

Independent Variables	B (95% CI)	β st	<i>P</i>
SAT (<i>r</i> ² of the model: 0.71)			
CD163	0.34 (0.20–0.49)	0.446	<0.0001
AGPAT5	0.64 (0.33–0.95)	0.345	<0.0001
SREBF1	0.19 (0.06–0.33)	0.245	0.006
VAT (<i>r</i> ² of the model: 0.70)			
CD163	0.34 (0.21–0.48)	0.569	<0.0001
Age	-0.15 (-0.025–0.004)	-0.22	0.006
SREBF1	0.413 (0.13–0.69)	0.323	0.005
PPAR γ	-0.29 (-0.53–0.05)	-0.19	0.017

Independent variables included in the model: age, sex, BMI, PPAR α , PPAR γ , AGPAT5, SREBF1, BCL2, and macrophage and monocyte marker (CD163) gene expression levels. β st, standardized β -coefficient. CI, confidence interval.

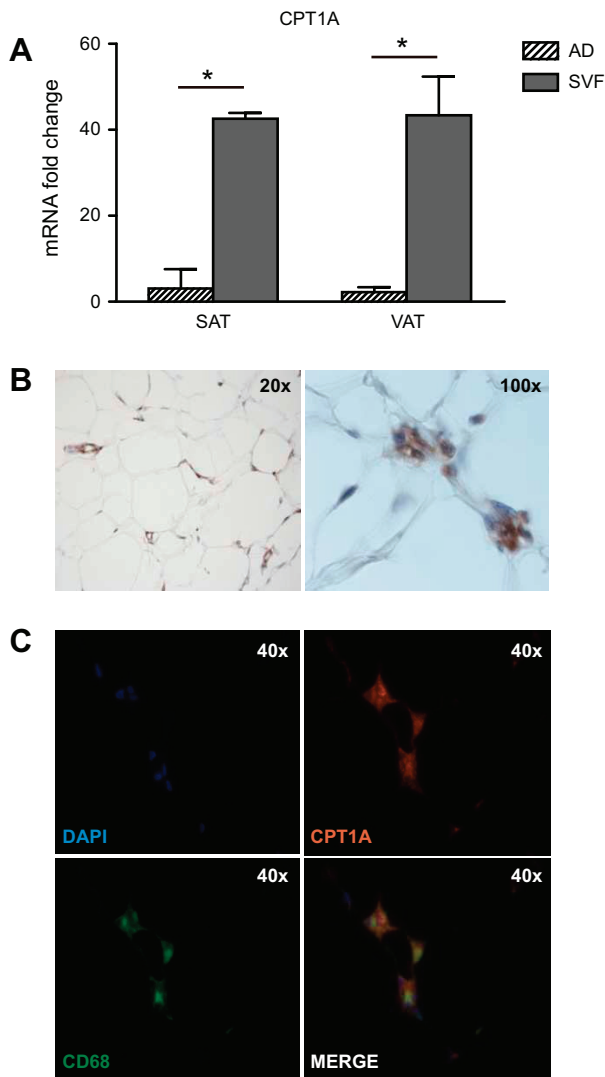


Fig. 2. CPT1A is highly expressed in human adipose tissue macrophages. *A*: CPT1A mRNA levels in both adipose (Ad) and stromal-vascular fraction (SVF) of human VAT and SAT; $n = 4$, $*P < 0.05$. *B*: immunohistochemical detection of CPT1A (brown) in SAT of obese subjects. *C*: immunofluorescence staining of CPT1A (red) and CD68 (green) proteins in SAT of obese individuals. Counterstaining of nuclei (DAPI) is shown in blue. Images are representative of adipose tissue preparations collected from 3 subjects.

expressing adipocytes were partially protected from palmitate-induced cell death (Fig. 3C).

CPT1A mRNA, protein, and activity levels were increased in CPT1AM-expressing adipocytes compared with GFP control cells (Fig. 4, A–C). CPT1AM-expressing adipocytes retained most of the CPT1 activity after incubation with the CPT1A inhibitor malonyl-CoA (Fig. 4C). The FA oxidation (FAO) rate was concordantly enhanced (1.37-fold increase, $P < 0.05$) in CPT1AM-expressing adipocytes (Fig. 4D). FA undergoing β -oxidation yield acetyl-CoA moieties that have two main possible fates: 1) complete oxidation to CO_2 and ATP production or 2) conversion to ketone bodies (mainly in the liver). Here, the total FAO rate was calculated as the sum of acid-soluble products plus CO_2 oxidation. CPT1AM expression blocked the palmitate-induced increase in TG content (Fig. 4E).

Enhanced adipocyte FAO improves insulin sensitivity and reduces inflammation. We examined the effect of increased FAO on insulin sensitivity and inflammatory responses in 3T3-L1 CAR Δ 1 adipocytes infected with AdCPT1AM. Palmitate-induced decrease in insulin-stimulated Akt phosphorylation and insulin receptor- β (IR β) protein levels was partially restored in CPT1AM-expressing adipocytes (Fig. 4, F–H). Palmitate-induced increase of proinflammatory markers [IL-1 β , monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), and IL-1 α] mRNA and protein levels was blunted in CPT1AM-expressing adipocytes (Fig. 4, I–K). Several palmitate concentrations and times of incubation were used to better fit the different dose and time responses of the cytokines and parameters measured. Consistent with previous studies (9, 11), palmitate incubation raised cytokines expression two- to threefold.

Increased FAO in CPT1AM-expressing macrophages protects from palmitate-induced TG accumulation. Since CPT1A was highly expressed in the SVF, and particularly in macrophages, of human adipose tissue, we decided to further analyze the effect of increased FAO on cultured macrophages. RAW 264.7 macrophages were efficiently infected with AdCPT1AM (Fig. 3B). CPT1AM-expressing macrophages were protected from palmitate induced cell death (Fig. 3D). CPT1AM-expressing macrophages showed a 2.4-fold ($P < 0.01$) increase in CPT1A mRNA levels, a 6.6-fold ($P < 0.01$) increase in protein levels, and a 2.2-fold ($P < 0.05$) increase in activity levels (Fig. 5, A–C). In addition, we showed that malonyl-CoA did not inhibit CPT1 activity in CPT1AM-expressing macrophages (Fig. 5C). CPT1AM-expressing macrophages showed a 1.5-fold increase in FAO rate compared with GFP control cells (Fig. 5D, $P < 0.05$) and a total restoration in palmitate-induced enhancement of TG content (Fig. 5, E and F).

Enhanced macrophage FAO reduced inflammation, ER stress, and ROS damage. Palmitate-induced increase in proinflammatory cytokines [TNF- α , MCP-1, IL-1 β , Toll-like receptor 4 (TLR-4), and IL-12p40], and ER stress markers (CHOP, GRP78, protein disulfide isomerase (PDI), and ER degradation enhancing α -mannosidase-like protein (EDEM)] mRNA and protein levels were blunted in CPT1AM-expressing macrophages (Fig. 6, A, B, D, and E). Consistent with previous studies (18, 47, 48), palmitate incubation raised cytokines expression two- to threefold. No differences were seen in anti-inflammatory markers such as IL-10, Mgl-1, and IL-4 in CPT1AM-expressing cells incubated with or without palmitate (Fig. 6C). Incubation with etomoxir, a permanent inhibitor of CPT1A, counteracted the reduction of MCP-1 expression seen in CPT1AM-expressing cells incubated with palmitate (data not shown). We also studied the effect of enhanced FAO in RAW 264.7 macrophages on palmitate-induced ROS damage by protein carbonyl content analysis. Palmitate-induced ROS damage was reduced in CPT1AM-expressing macrophages (Fig. 6F). This reduction was not detected when ROS (superoxide) was directly measured using the MitoSOX Red probe (Fig. 6G).

DISCUSSION

The obesity epidemic has put a spotlight on adipose tissue as a key player in obesity-induced insulin resistance (38). Obese individuals and those with T2D have lower FAO rates (17, 19, 37). Although these data were reported in skeletal muscle, we expected to see reduced CPT1A expression levels in the

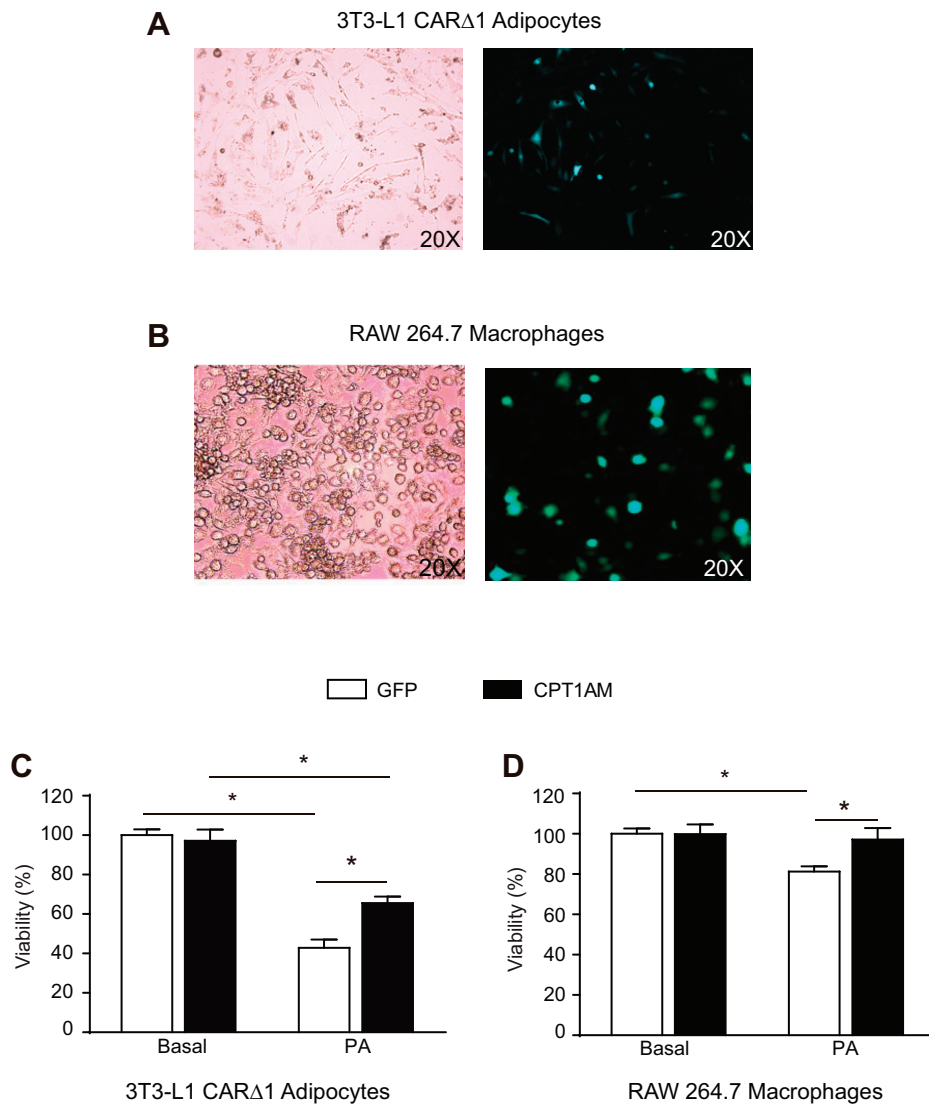


Fig. 3. Adenovirus infection efficiency and viability in 3T3-L1 CAR Δ 1 adipocytes and RAW 264.7 macrophages. Images were taken from AdGFP-infected 3T3-L1 CAR Δ 1 adipocytes (50% infection; A) or RAW 264.7 macrophages (70% infection; B) 48 or 72 h after infection, respectively. C and D: cCell viability of 3T3-L1 CAR Δ 1 adipocytes (C) or RAW 264.7 macrophages (D) infected with AdGFP or AdCPT1AM and incubated for 24 h with 1 or 0.3 mM palmitate (PA), respectively.

adipose tissue of both obese and T2D patients. However, no differences were seen in CPT1A mRNA expression between the obese or T2D patients and their respective controls either in VAT or in SAT. Other authors have reported a decrease in VAT CPT1 mRNA and protein levels in obese individuals (20). However, those authors did not specify which of the CPT1 isoforms was measured in VAT, CPT1A or CPT1B. We showed that CPT1A expression is higher in adipose tissue macrophages than in mature adipocytes. Since the obese adipose tissue has higher infiltration of immune cells such as macrophages, we postulate that the putative decrement of CPT1A expression in obese individuals could be compensated for by increased expression from the infiltrated macrophages and thus that no differences are seen between the groups. The CPT1B isoform is also expressed in human adipose tissue, and it has been shown to raise FAO in metabolic tissues such as skeletal muscle (3). Thus, we measured mRNA and protein levels in the obese and T2D cohorts. However, no differences were seen among the groups, indicating that CPT1B expression is not changed by obesity and T2D.

We found that, in insulin-sensitive individuals (control and overweight patients from the obese cohort and control patients

from the T2D cohort), CPT1A mRNA expression was higher in VAT than in SAT. However, no differences between VAT and SAT were seen in the more insulin-resistant individuals with a more proinflammatory environment: obese and T2D patients. A similar phenomenon was described for T regulatory cells, described to have anti-inflammatory properties and to improve obesity-induced insulin resistance (7). Those authors reported that the VAT and SAT of healthy individuals had similar low numbers of T regulatory cells at birth, with a progressive accumulation over time in the VAT, though not in the SAT. Our results suggest a CPT1A expression balance between SAT and VAT depots that may be disturbed in obese and T2D patients. The difference in CPT1A expression between these two fat depots is potentially crucial, given the association of VAT, but not SAT, with insulin resistance (1, 52). It might indicate, in healthy individuals, a potential protective role of CPT1A in the more insulin-resistant associated VAT.

Gene expression analysis revealed a negative association between CPT1A and the adipocyte marker of differentiation PPAR γ . This is consistent with the fact that while white adipocytes mature they shift their lipid preferences to storage rather than oxidation. Aging was associated with reduced

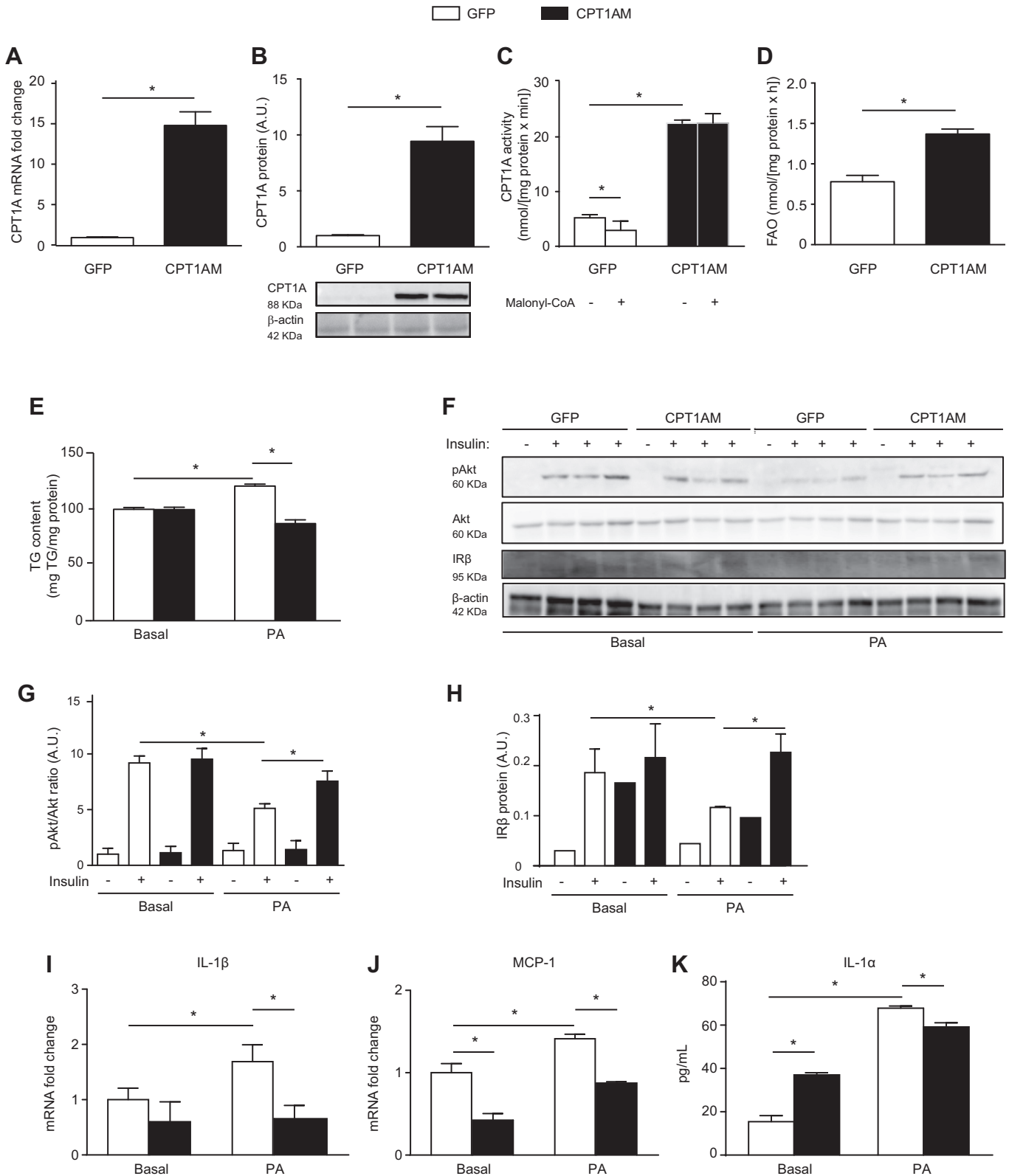


Fig. 4. Enhanced fatty acid oxidation (FAO) in 3T3-L1 CARΔ1 adipocytes improves lipid-induced triglyceride (TG) accumulation, insulin sensitivity, and inflammation. Relative CPT1A mRNA expression (A) and protein levels (B) in AdGFP- or AdCPT1AM-infected 3T3-L1 CARΔ1 adipocytes. C: CPT1A activity from mitochondria-enriched cell fractions incubated (or not) with 100 μM malonyl-CoA. D: total FAO rate represented as the sum of acid-soluble products plus CO₂ oxidation. E: TG content of adipocytes treated for 24 h with 1 mM PA. F: insulin signaling in GFP- and CPT1AM-expressing adipocytes incubated with 0.3 mM PA for 24 h, indicated by Western blotting of insulin-induced Akt phosphorylation (pAkt) and insulin receptor-β (IRβ). G: quantification of pAkt normalized by total Akt (fold change of arbitrary units, AU). H: quantification of IRβ normalized by β-actin. I and J: relative mRNA expression from GFP- or CPT1A-expressing adipocytes incubated with 1 mM PA for 24 h. K: protein levels of IL-1α in culture media of GFP- or CPT1A-expressing adipocytes incubated with 1 mM PA for 6 h. Shown are representative experiments out of 3; n = 3–6, *P < 0.05.

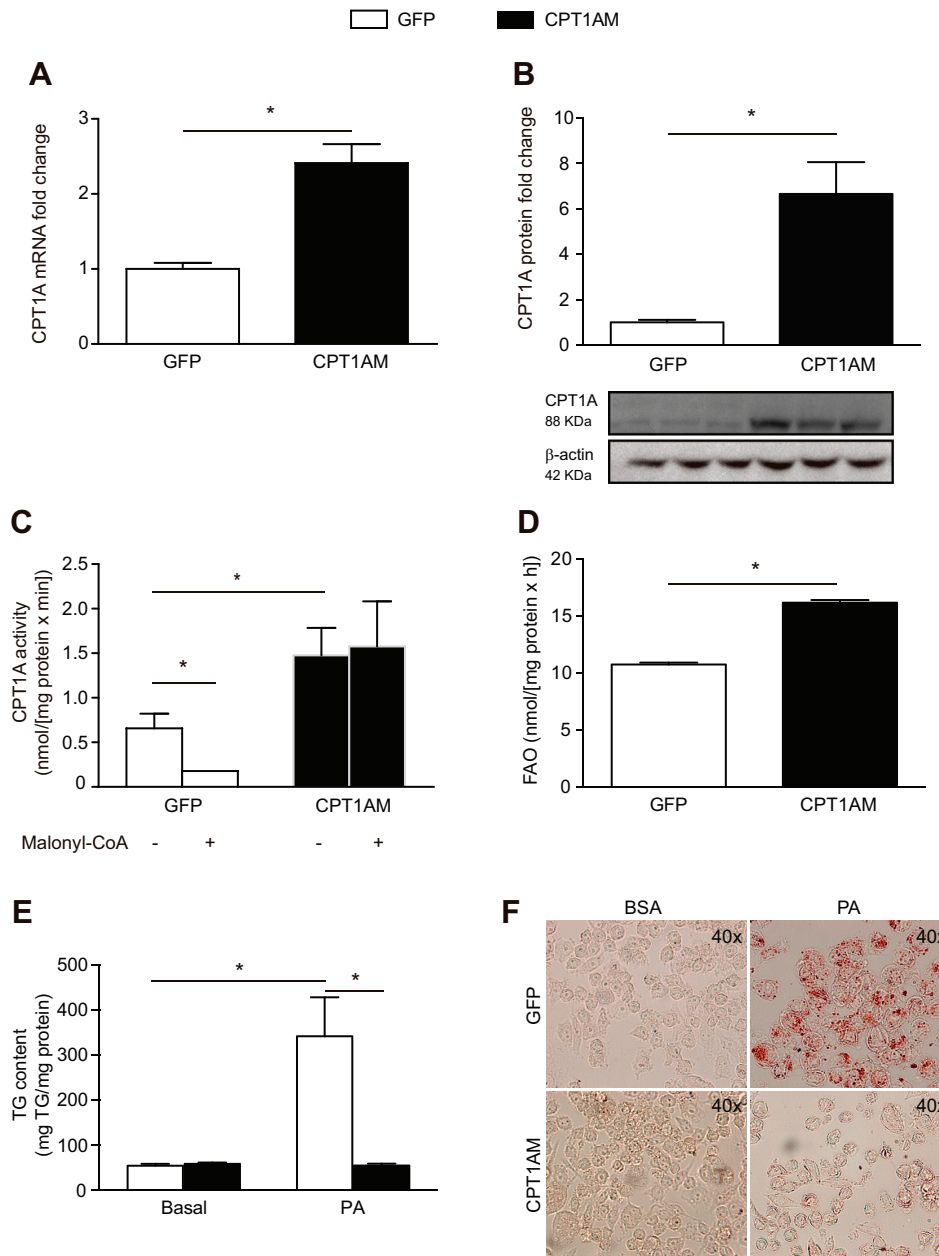


Fig. 5. Enhanced FAO and reduced TG content in CPT1AM-expressing RAW 264.7 macrophages. Relative CPT1A mRNA expression (A) and protein levels (B) in AdGFP- or AdCPT1AM-infected macrophages. C: CPT1 activity from mitochondria-enriched cell fractions incubated (or not) with 100 μ M malonyl-CoA. D: total FAO rate measured as the sum of acid-soluble products plus CO₂ oxidation. TG content (E) and Oil red O staining (F) of macrophages treated for 18 h with 0.75 mM PA. Shown are representative experiments out of 3; $n = 3-6$, * $P < 0.05$.

CPT1A expression in VAT. This might reflect a potential protective role of CPT1A expression in VAT that is lost with age. Considering that VAT accretion is a hallmark of aging and especially that it is a stronger risk factor for comorbidities and mortality (23), we speculate a favorable role of enhanced CPT1A expression in age metabolic decline and related pathological conditions. Positive correlation in both VAT and SAT CPT1A was found with AGPAT5, SREBF1, Bcl2, and CD163. These results may indicate a potential role of CPT1A in lipid biosynthesis processes (AGPAT5), glucose and lipid metabolism (SREBF1), and protecting adipose tissue from apoptosis (Bcl2). The positive association between CPT1A and CD163 (macrophage marker) was not surprising given the higher CPT1A expression in macrophages than in adipocytes (Fig. 2).

We are aware that many of the aforementioned associations may be secondary to obesity or T2D and that no causal

relationship may be inferred with this study design. To prove the causality of some of these observations, we performed in vitro studies directly targeting adipocytes and macrophages to burn off the excess lipids through an increase in FAO. We used the high-infection efficiency adipocyte cell line 3T3-L1 CAR Δ 1 (31) to express for the first time CPT1AM through adenoviral infection. Noteworthy, white adipocytes are designed to store lipids rather than to oxidize them. Thus, CPT1 activity in WAT is lower than in other tissues (6). However, CPT1AM-expressing adipocytes showed a 4.3-fold increase in CPT1 activity that was not inhibited despite incubation with high concentrations of malonyl-CoA. Since increased lipid accumulation, inflammation, ER stress, and ROS-induced protein damage trigger metabolic diseases, we decided to measure TG content, inflammation, ER stress, and ROS damage as important mechanisms that could explain the potential protec-

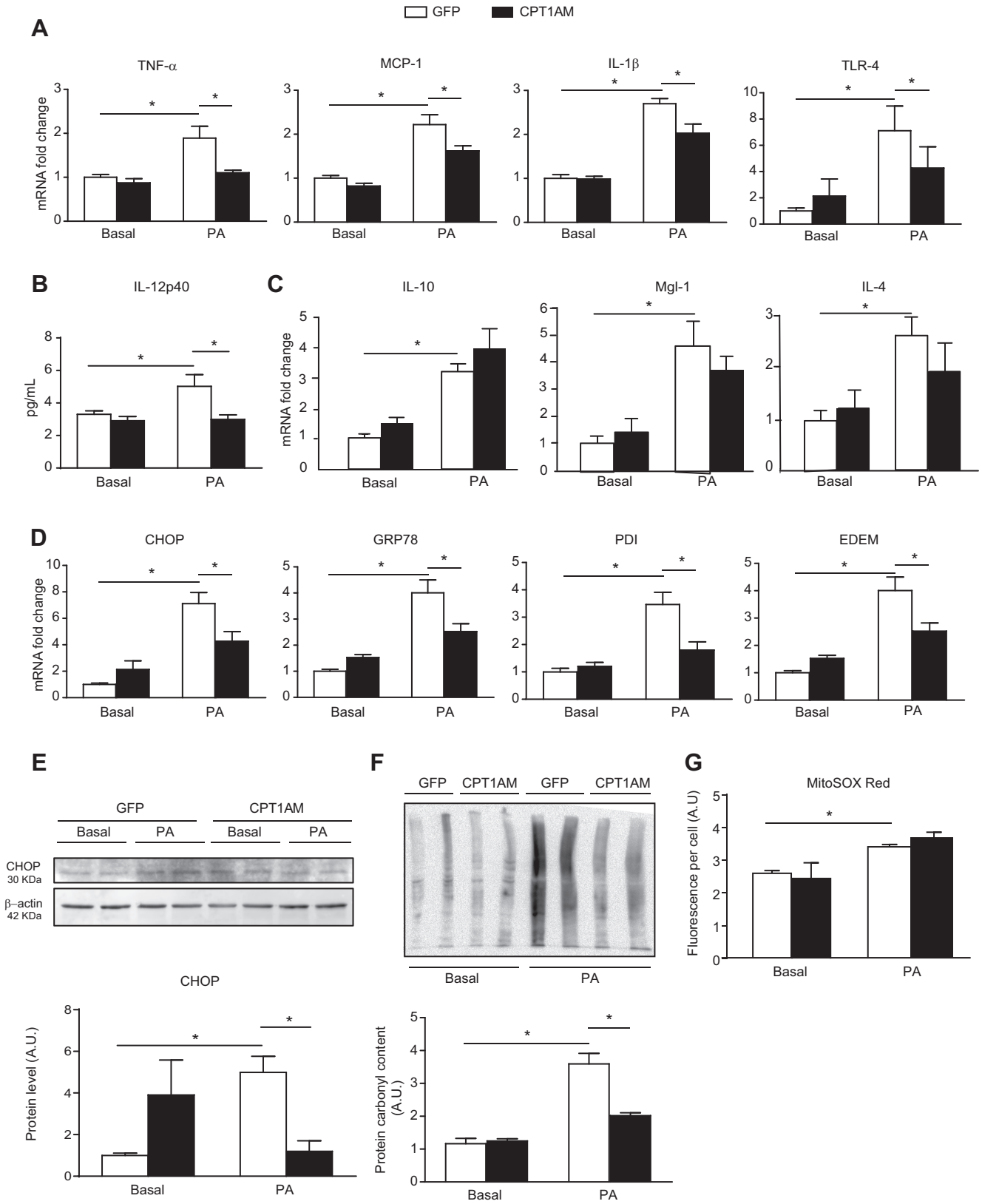


Fig. 6. CPT1AM expression reduced inflammation, ER stress, and ROS damage in RAW 264.7 macrophages. **A, C, D**: relative mRNA gene expression from macrophages incubated with 0.5 mM PA for 8 h (TNF- α and MCP-1) or 0.3 mM PA for 24 h (IL-10, Mgl-1, IL-4, IL-1 β , TLR-4, CHOP, GRP78, PDI, and EDEM). **B**: protein levels of IL-12p40 in culture media of macrophages incubated with 0.3 mM PA for 24 h. **E**: CHOP protein levels and quantification in macrophages incubated with 0.5 mM PA for 8 h. **F**: protein carbonyl content analysis and quantification in macrophages incubated with 0.75 mM PA for 18 h. **G**: measurement of ROS (superoxide) using the MitoSOX Red probe. Shown are representative experiments out of 3; $n = 3-4$, $*P < 0.05$.

tive effect of CPT1AM expression. Enhanced FAO led to complete restoration of TG content, improved insulin signaling (measured as pAkt), increased IR β expression and cell viability, and reduced inflammation in palmitate-incubated CPT1AM-expressing adipocytes. CPT1AM-expressing adipocytes showed a general improvement in lipid-induced derangements as a consequence of increased FA flux through mitochondria. However, enhanced FA flux in the absence of a concomitant dissipation of FAO metabolites has been associated with increased ROS damage (35) and inflammation (8, 21, 43). Interestingly, although no differences were seen in ER or oxidative stress (data not shown), CPT1AM-expressing adipocytes showed a significant decrease in proinflammatory mediators such as IL-1 β and MCP-1. The favorable role of CPT1A in adipocytes to attenuate FA-evoked insulin resistance and inflammation has been also described to act via suppression of JNK (9). These results suggest that factors other than a FAO increase per se are responsible for ROS production and inflammation. Accumulation of toxic substances (diacylglycerol or ceramides) (49), hypoxia (15), as well as cytokines (42) might participate in the induction of ROS damage and the inflammatory state. Several researchers have demonstrated that enhanced FAO through CPT1A or CPT1AM expression results in a decrease in relevant lipid mediators involved in inflammation and insulin resistance such as diacylglycerol, intracellular NEFAs, free FA, ceramides, and TG (3, 9, 13, 26, 29, 40, 45). Although some authors (3) did not see changes in skeletal muscle acylcarnitines' profile, our group has shown an increase in several acylcarnitines in CPT1AM-expressing neurons (25).

FA undergoing β -oxidation yield acetyl-CoA moieties that have two main possible fates: 1) entry to the TCA cycle for complete oxidation and ATP production or 2) conversion to ketone bodies (mainly in the liver). We observed increased FAO to CO₂ and acid-soluble products in CPT1AM-expressing adipocytes and macrophages. CPT1AM expression in liver has been shown to enhance ATP and ketone body production with no changes in glucose oxidation (13, 29). All together, this indicates a metabolic rate switch toward FA.

Monocytes were the first immune cells reported to infiltrate obese adipose tissue, differentiate to macrophages, produce inflammatory cytokines, and trigger insulin resistance (56, 57). Thus, we examined whether CPT1AM expression could play a protective role in obesity-induced macrophage derangements. We found that, in human WAT, CPT1A is highly expressed in SVF compared with adipocytes. This happened in both human VAT and SAT. A closer histological and immunofluorescence examination showed that macrophages present in the adipose tissue expressed CPT1A. This does not rule out CPT1A expression in other immune cells also present in the adipose tissue such as T and B cells, T regulatory cells, and mast cells.

Given the high CPT1A expression in human adipose tissue macrophages, we decided to study the effect of CPT1AM in RAW 264.7 macrophages. A permanently enhanced FAO rate in CPT1AM-expressing macrophages led to a complete restoration of palmitate-induced increase in TG content and a decrease in inflammation and ER and oxidative stress without affecting cell viability. Recent data show that FAO is capable of regulating the degree of acyl chain saturation in ER phospholipids (28). Since increasing the degree of saturation in ER phospholipids has been described to directly activate ER stress and inflammation (28), this might provide a mechanistic link to

how FAO alleviates ER stress under palmitate loading. Thus, enhancing CPT1A expression in macrophages may be a potential approach to fight against obesity-induced disorders.

In conclusion, we have shown that CPT1A expression was higher in human adipose tissue macrophages than in mature adipocytes and that it was differentially expressed in VAT vs. SAT. Further in vitro studies demonstrated that an increase in FAO in lipid-treated adipocytes and macrophages reduced TG content and inflammatory levels, improved insulin sensitivity in adipocytes, and reduced ER stress and ROS damage in macrophages. Adipocyte-specific knockout or transgenic animal models for CPT1A would be especially relevant to elucidate its potential protection against obesity-induced insulin resistance in vivo. Our data support the hypothesis that pharmacological or genetic strategies to enhance FAO may be beneficial for the treatment of chronic inflammatory pathologies such as obesity and T2D.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Prof. F. G. Hegardt and Dr. G. Asins for helpful comments and suggestions, A. Orozco for technical assistance, and R. Rycroft from the Language Service of the University of Barcelona for valuable assistance in the preparation of the English manuscript. We also thank D. Orlicky for kindly providing 3T3-L1 CAR1 adipocytes.

GRANTS

This study was supported by the Spanish Ministry of Science and Innovation (Grants SAF2010-20039 and SAF2013-45887-R to L. Herrero, SAF2011-30520-C02-01 to D. Serra, PI11/00085 to J. J. Vendrell, SAF2012-33014 to B. Peral, SAF2012-36186 to S. Fernández-Veledo, SAF2012-30708 to M. Vázquez-Carrera, SAF2011-23626 to F. Villarroya, and doctoral fellowships to M. I. Malandrino and J. F. Mir, by the CIBER Fisiopatología de la Obesidad y la Nutrición (Grant CB06/03/0001 to D. Serra), and CIBER Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (Grant CB07/08/0003 to M. Vázquez-Carrera, Instituto de Salud Carlos III, by the European Union (BetaBat project FP7-277713 to F. Villarroya), by the European Foundation for the Study of Diabetes (EFSD)/Lilly and EFSD/Janssen-Rising Star research fellowships to L. Herrero, and by a L'Oréal-UNESCO "For Women in Science" research fellowship to L. Herrero. S. Fernández-Veledo acknowledges support from the "Miguel Servet" tenure track program (CP10/00438) from the Fondo de Investigación Sanitaria and cofinanced by the European Regional Development Fund. M. Weber is a recipient of the Ciência sem Fronteiras-CNPq fellowship (237976/2012-9).

DISCLOSURES

No conflicts of interest, financial or otherwise, are declared by the author(s).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Author contributions: M.I.M., R.F., M.W., M.C.-D., J.F.M., L.V., X.E., M.G.-S., B.P., L.S., S.F.-V., N.C., M.V.-C., F.V., J.J.V., D.S., and L.H. conception and design of research; M.I.M., R.F., M.W., M.C.-D., J.F.M., L.V., X.E., M.G.-S., B.P., and L.S. performed experiments; M.I.M., R.F., M.W., M.C.-D., J.F.M., L.V., X.E., M.G.-S., B.P., L.S., M.V.-C., F.V., J.J.V., D.S., and L.H. analyzed data; M.I.M., R.F., M.W., M.C.-D., J.F.M., L.V., X.E., M.G.-S., B.P., L.S., S.F.-V., N.C., M.V.-C., F.V., J.J.V., D.S., and L.H. interpreted results of experiments; M.I.M., R.F., M.W., M.C.-D., L.V., X.E., M.G.-S., B.P., L.S., J.J.V., and L.H. prepared figures; M.I.M., R.F., M.C.-D., J.F.M., X.E., B.P., J.J.V., and L.H. drafted manuscript; M.I.M., R.F., M.C.-D., J.F.M., X.E., B.P., N.C., J.J.V., D.S., and L.H. edited and revised manuscript; M.I.M., R.F., M.W., M.C.-D., J.F.M., L.V., X.E., M.G.-S., B.P., L.S., S.F.-V., N.C., M.V.-C., F.V., J.J.V., D.S., and L.H. approved final version of manuscript.

REFERENCES

1. **Bosello O, Zamboni M.** Visceral obesity and metabolic syndrome. *Obes Rev* 1: 47–56, 2000.
2. **Brown NF, Hill JK, Esser V, Kirkland JL, Corkey BE, Foster DW, Garry JDMC.** Mouse white adipocytes and 3T3-L1 cells display an

- anomalous pattern of carnitine palmitoyltransferase (CPT) I isoform expression during differentiation. *Biochem J* 231: 225–231, 1997.
3. Bruce CR, Hoy AJ, Turner N, Watt MJ, Allen TL, Carpenter K, Cooney GJ, Febbraio M, Kraegen EW. Overexpression of carnitine palmitoyltransferase-1 in skeletal muscle is sufficient to enhance fatty acid oxidation and improve high-fat diet-induced insulin resistance. *Diabetes* 58: 550–558, 2009.
 5. Davies LC, Jenkins SJ, Allen JE, Taylor PR. Tissue-resident macrophages. *Nat Immunol* 14: 986–995, 2013.
 6. Doh KO, Kim YW, Park SY, Lee SK, Park JS, Kim JY. Interrelation between long-chain fatty acid oxidation rate and carnitine palmitoyltransferase I activity with different isoforms in rat tissues. *Life Sci* 77: 435–443, 2005.
 7. Feuerer M, Herrero L, Cipolletta D, Naaz A, Wong J, Nayer A, Lee J, Goldfine AB, Benoist C, Shoelson S, Mathis D. Lean, but not obese, fat is enriched for a unique population of regulatory T cells that affect metabolic parameters. *Nat Med* 15: 930–939, 2009.
 8. Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, Iwaki M, Yamada Y, Nakajima Y, Nakayama O, Makishima M, Matsuda M, Shimomura I. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest* 114: 1752–1761, 2004.
 9. Gao X, Li K, Hui X, Kong X, Sweeney G, Wang Y, Xu A, Teng M, Liu P, Wu D. Carnitine palmitoyltransferase 1A prevents fatty acid-induced adipocyte dysfunction through suppression of c-Jun N-terminal kinase. *Biochem J* 435: 723–732, 2011.
 10. Gesta S, Bezy O, Mori MA, Macotela Y, Lee KY, Kahn CR. Mesodermal developmental gene Tbx15 impairs adipocyte differentiation and mitochondrial respiration. *Proc Natl Acad Sci USA* 108: 2771–2776, 2011.
 11. Hamada Y, Nagasaki H, Fujita A, Seino Y, Shang QL, Suzuki T, Hashimoto H, Oiso Y. Involvement of de novo ceramide synthesis in pro-inflammatory adipokine secretion and adipocyte-macrophage interaction. *J Nutr Biochem* 25: 1309–1316, 2014.
 12. Haslam DW, James WPT. Obesity. *Lancet* 366: 1197–1209, 2005.
 13. Herrero L, Rubí B, Sebastián D, Serra D, Asins G, Maechler P, Prentki M, Hegardt FG. Alteration of the malonyl-CoA/carnitine palmitoyltransferase I interaction in the beta-cell impairs glucose-induced insulin secretion. *Diabetes* 54: 462–471, 2005.
 14. Herrero L, Shapiro H, Nayer A, Lee J, Shoelson SE. Inflammation and adipose tissue macrophages in lipodystrophic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 107: 240–245, 2010.
 15. Hosogai N, Fukuhara A, Oshima K, Miyata Y, Tanaka S, Segawa K, Furukawa S, Tochino Y, Komuro R, Matsuda M, Shimomura I. Adipose tissue hypoxia in obesity and its impact on adipocytokine dysregulation. *Diabetes* 56: 901–911, 2007.
 16. Hotamisligil GS. Endoplasmic reticulum stress and the inflammatory basis of metabolic disease. *Cell* 140: 900–917, 2010.
 17. Houmard JA. Intramuscular lipid oxidation and obesity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 294: R1111–R1116, 2008.
 18. Huang S, Rutkowski JM, Snodgrass RG, Ono-Moore KD, Schneider DA, Newman JW, Adams SH, Hwang DH. Saturated fatty acids activate TLR-mediated proinflammatory signaling pathways. *J Lipid Res* 53: 2002–2013, 2012.
 19. Kelley DE, He J, Menshikova EV, Ritov VB. Dysfunction of mitochondria in human skeletal muscle in type 2 diabetes. *Diabetes* 51: 2944–2950, 2002.
 20. Krishnan J, Danzer C, Simka T, Ukropec J, Walter KM, Kumpf S, Mirtschink P, Ukropcova B, Gasperikova D, Pedrazzini T, Krek W. Dietary obesity-associated Hif1 α activation in adipocytes restricts fatty acid oxidation and energy expenditure via suppression of the Sirt2-NAD⁺ system. *Genes Dev* 26: 259–270, 2012.
 21. Lin Y, Berg AH, Iyengar P, Lam TK, Giacca A, Combs TP, Rajala MW, Du X, Rollman B, Li W, Hawkins M, Barzilai N, Rhodes CJ, Fantus IG, Brownlee M, Scherer PE. The hyperglycemia-induced inflammatory response in adipocytes: the role of reactive oxygen species. *J Biol Chem* 280: 4617–4626, 2005.
 22. Mathis D. Immunological goings-on in visceral adipose tissue. *Cell Metab* 17: 851–859, 2013.
 23. Matsuzawa Y, Shimomura I, Nakamura T, Keno Y, Tokunaga K. Pathophysiology and pathogenesis of visceral fat obesity. *Ann NY Acad Sci* 748: 399–406, 1995.
 24. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 28: 412–419, 1985.
 25. Mera P, Mir JF, Fabriàs G, Casas J, Costa ASH, Malandrino MI, Fernández-López JA, Remesar X, Gao S, Chohann S, Rodríguez-Peña MS, Petry H, Asins G, Hegardt FG, Herrero L, Serra D. Long-term increased carnitine palmitoyltransferase 1A expression in ventromedial hypothalamus causes hyperphagia and alters the hypothalamic lipidomic profile. *PLoS One* 9: e97195, 2014.
 26. Monsénigo J, Mansouri A, Akkaoui M, Lenoir V, Esnou C, Fauveau V, Tavernier V, Girard J, Prip-Buus C. Enhancing liver mitochondrial fatty acid oxidation capacity in obese mice improves insulin sensitivity independently of hepatic steatosis. *J Hepatol* 56: 632–639, 2012.
 27. Morillas M, Gómez-Puertas P, Bentebibel A, Sellés E, Casals N, Valencia A, Hegardt FG, Asins G, Serra D. Identification of conserved amino acid residues in rat liver carnitine palmitoyltransferase I critical for malonyl-CoA inhibition. Mutation of methionine 593 abolishes malonyl-CoA inhibition. *J Biol Chem* 278: 9058–9063, 2003.
 28. Namgaladze D, Lips S, Leiker TJ, Murphy RC, Ekroos K, Ferreiros N, Geisslinger G, Brüne B. Inhibition of macrophage fatty acid β -oxidation exacerbates palmitate-induced inflammatory and endoplasmic reticulum stress responses. *Diabetologia* 57: 1067–1077, 2014.
 29. Orellana-Gavalda JM, Herrero L, Malandrino MI, Paneda A, Sol Rodríguez-Pena M, Petry H, Asins G, Van Deventer S, Hegardt FG, Serra D. Molecular therapy for obesity and diabetes based on a long-term increase in hepatic fatty-acid oxidation. *Hepatology* 53: 821–832, 2011.
 31. Orlicky DJ, DeGregori J, Schaack J. Construction of stable coxsackievirus and adenovirus receptor-expressing 3T3-L1 cells. *J Lipid Res* 42: 910–915, 2001.
 32. Patti ME, Corvera S. The role of mitochondria in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Endocr Rev* 31: 364–395, 2010.
 33. Perdomo G, Commerford SR, Richard AMT, Adams SH, Corkey BE, O'Doherty RM, Brown NF. Increased beta-oxidation in muscle cells enhances insulin-stimulated glucose metabolism and protects against fatty acid-induced insulin resistance despite intramyocellular lipid accumulation. *J Biol Chem* 279: 27177–27186, 2004.
 34. Pérez-Pérez R, García-Santos E, Ortega-Delgado FJ, López JA, Camafeita E, Ricart W, Fernández-Real JM, Peral B. Attenuated metabolism is a hallmark of obesity as revealed by comparative proteomic analysis of human omental adipose tissue. *J Proteomics* 75: 783–795, 2012.
 35. Pessayre D, Fromenty B, Mansouri A. Mitochondrial injury in steatohepatitis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 16: 1095–1105, 2004.
 36. Price N, van der Leij F, Jackson V, Corstorphine C, Thomson R, Sorensen A, Zammit V. A novel brain-expressed protein related to carnitine palmitoyltransferase I. *Genomics* 80: 433–442, 2002.
 37. Ritov VB, Menshikova EV, He J, Ferrell RE, Goodpaster BH, Kelley DE. Deficiency of subsarcolemmal mitochondria in obesity and type 2 diabetes. *Diabetes* 54: 8–14, 2004.
 38. Rosen ED, Spiegelman BM. What we talk about when we talk about fat. *Cell* 156: 20–44, 2014.
 39. Samuel VT, Shulman GI. Mechanisms for insulin resistance: common threads and missing links. *Cell* 148: 852–871, 2012.
 40. Sebastian D, Herrero L, Serra D, Asins G, Hegardt FG. CPT I overexpression protects L6E9 muscle cells from fatty acid-induced insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 292: E677–E686, 2007.
 42. Shoelson SE, Herrero L, Naaz A. Obesity, inflammation, and insulin resistance. *Gastroenterology* 132: 2169–2180, 2007.
 43. Shoelson SE, Lee J, Goldfine AB. Inflammation and insulin resistance. *J Clin Invest* 116: 1793–1801, 2006.
 44. Simoneau JA, Veerkamp JH, Turcotte LP, Kelley DE. Markers of capacity to utilize fatty acids in human skeletal muscle: relation to insulin resistance and obesity and effects of weight loss. *FASEB J* 13: 2051–2060, 1999.
 45. Stefanovic-Racic M, Perdomo G, Mantell BS, Sipula IJ, Brown NF, O'Doherty RM. A moderate increase in carnitine palmitoyltransferase 1a activity is sufficient to substantially reduce hepatic triglyceride levels. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 294: E969–E977, 2008.
 47. Suganami T, Nishida J, Ogawa Y. A paracrine loop between adipocytes and macrophages aggravates inflammatory changes: role of free fatty acids and tumor necrosis factor alpha. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25: 2062–2068, 2005.
 48. Suganami T, Tanimoto-Koyama K, Nishida J, Itoh M, Yuan X, Mizuarai S, Kotani H, Yamaoka S, Miyake K, Aoe S, Kamei Y, Ogawa Y. Role of the Toll-like receptor 4/NF- κ B pathway in saturated fatty acid-induced inflammatory changes in the interaction between adipocytes and macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27: 84–91, 2007.

49. **Summers SA.** Ceramides in insulin resistance and lipotoxicity. *Prog Lipid Res* 45: 42–72, 2006.
50. **Sun K, Kusminski CM, Scherer PE.** Adipose tissue remodeling and obesity. *J Clin Invest* 121: 2094–2101, 2011.
51. **Sun K, Wernstedt Asterholm I, Kusminski CM, Bueno AC, Wang ZV, Pollard JW, Brekken a R, Scherer PE.** Dichotomous effects of VEGF-A on adipose tissue dysfunction. *Proc Natl Acad Sci USA* 109: 5874–5879, 2012.
52. **Tran TT, Yamamoto Y, Gesta S, Kahn CR.** Beneficial effects of subcutaneous fat transplantation on metabolism. *Cell Metab* 7: 410–420, 2008.
53. **Villarroya F, Domingo P, Giralt M.** Lipodystrophy in HIV 1-infected patients: lessons for obesity research. *Int J Obes (Lond)* 31: 1763–1776, 2007.
54. **Virtue S, Vidal-Puig A.** Adipose tissue expandability, lipotoxicity and the Metabolic Syndrome—an allostatic perspective. *Biochim Biophys Acta* 1801: 338–349, 2010.
55. **Wabitsch M, Brenner RE, Melzner I, Braun M, Moller P, Heinze E, Debatin KM, Hauner H.** Characterization of a human preadipocyte cell strain with high capacity for adipose differentiation. *Int J Obes Relat Metab Disord* 25: 8–15, 2001.
56. **Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW.** Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest* 112: 1796–1808, 2003.
57. **Xu H, Barnes GT, Yang Q, Tan G, Yang D, Chou CJ, Sole J, Nichols A, Ross JS, Tartaglia LA, Chen H.** Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest* 112: 1821–1830, 2003.



Estratègies de modulació de l'oxidació d'àcids grassos com a tractament per combatre l'obesitat

Fatty acid oxidation regulation strategies to treat obesity

Laura Herrero,^{1,2,3} Joan Francesc Mir,^{1,2} Minéia Weber,^{1,2} Raquel Fucho,^{1,2} María Calderón^{1,2,3} i Dolors Serra^{1,2,3}

¹ Universitat de Barcelona. Facultat de Farmàcia. Departament de Bioquímica i Biologia Molecular

² Institut de Biomedicina de la Universitat de Barcelona (IBUB)

³ CIBER Fisiopatologia de la Obesidad y la Nutrición (CIBERObn)

Resum: L'estil de vida actual, amb dietes d'alt contingut calòric i falta d'exercici físic, fa que la incidència d'obesitat s'incrementi notablement. Augmentar la degradació de greixos o bé reduir la ingesta calòrica poden ser potencials estratègies terapèutiques. L'enzim carnitina palmitoiltransferasa I (CPT1) és el pas limitant de l'oxidació dels àcids grassos. En aquest article, es mostra com la modulació de la seva activitat en diferents teixits, com el fetge, el teixit adipós o l'hipotàlem, pot ser clau a l'hora d'augmentar la despesa energètica i controlar la ingesta d'aliments.

Paraules clau: Obesitat, ingesta, oxidació d'àcids grassos, CPT1.

Abstract: *Current lifestyles, with high-energy diets and little exercise, are triggering an alarming growth in obesity. Strategies that enhance fat degradation or reduce caloric food intake could be considered therapeutic interventions to reduce not only obesity, but also its associated disorders. The enzyme carnitine palmitoyltransferase I (CPT1) is the critical rate-determining regulator of fatty acid oxidation. In this paper, we show that this enzyme might play a key role in different tissues, such as liver, adipose tissue and hypothalamus, increasing energy expenditure and controlling food intake.*

Keywords: *Obesity, food intake, fatty acid oxidation, CPT1.*

Introducció

L'obesitat i els trastorns metabòlics associats, com ara la resistència a la insulina, la diabetis de tipus 2, les malalties cardiovasculars, el càncer i altres patologies, són un dels greus problemes de salut pública del segle XXI. Segons l'Organització Mundial de la Salut, hi ha més de sis-cents milions de persones obesas a tot el món i, més important encara, el sobrepès i l'obesitat són la cinquena causa de mort en l'àmbit mundial. En els últims anys, s'està fent un gran esforç per entendre la fisiopatologia de l'obesitat i, en particular, la seva associació amb la resistència a la insulina [1]. S'han proposat diversos mecanismes que podrien explicar aquesta relació causal:

a) Deposició de greix ectòpic: durant l'obesitat falla la capacitat d'expandir del teixit adipós i d'emmagatzemar l'excés de greix, i això comporta un augment del depòsit de lípids en altres òrgans perifèrics com el fetge, el múscul esquelètic i el

pàncrees. Aquesta acumulació excessiva de lípids crea un ambient lipotòxic que bloqueja el transport de glucosa i la correcta senyalització de la insulina.

b) Inflamació: l'excés de lípids acumulats en el teixit adipós durant l'obesitat causa hipòxia en els adipòcits i, a la vegada, el reclutament i l'activació de les cèl·lules immunes en aquest teixit. Els adipòcits engrandits per l'acumulació de lípids i les cèl·lules immunes infiltrades secreten moltes citocines inflammatòries que promouen un estat proinflamatori que contribueix a la resistència a la insulina local i també sistèmica.

c) La ingesta d'aliments: el sistema nerviós central, específicament l'hipotàlem, és extremament important en les patologies induïdes per l'obesitat, ja que desenvolupa un paper crucial en el control de la ingesta i la regulació del pes corporal. De fet, la leptina, una hormona secretada pels adipòcits, actua sobre l'hipotàlem inhibint la ingesta d'aliments i controlant el pes corporal. En els trastorns relacionats amb l'obesitat, aquesta hormona és essencial en les interrelacions entre el cervell i els altres òrgans.

Les estratègies terapèutiques actuals per combatre l'obesitat se centren en l'augment de la despesa energètica mitjançant l'exercici regular i/o en la reducció del consum d'energia. Però modificar i mantenir aquest estil de vida més saludable du-

Correspondència: Dolors Serra

Universitat de Barcelona. Facultat de Farmàcia. Departament de Bioquímica i Biologia Molecular

Av. de Joan XXIII, 27-31. 08028 Barcelona

Tel.: +34 934 024 522. Fax: +34 934 024 520

A/e: dserra@ub.edu

rant llargs períodes de temps és difícil, ja que requereix una gran força de voluntat i el pacient acaba abandonant moltes de les mesures adoptades. Tots els medicaments que es troben en el mercat contra l'obesitat van dirigits a limitar el consum d'energia. Tot i els grans esforços fets fins al moment per combatre l'obesitat, la llista de medicaments retirats del mercat per raons de seguretat sembla ser cada vegada més gran: fenfluramina, dexfenfluramina, sibutramina i rimonabant. Actualment, només l'orlistat i la lorcaserina tenen una indicació clínica aprovada per al tractament de l'obesitat. Les agències del medicament europea, EMA (European Medicines Agency), i americana, FDA (Food and Drug Administration), han aprovat l'ús de l'orlistat, i només la FDA, l'ús de la lorcaserina [2, 3]. La liraglutida, un fàrmac anteriorment aprovat com a antidiabètic, ha estat aprovada per les dues institucions com a fàrmac contra l'obesitat [4, 5]. Altres fàrmacs existents en el mercat, com la combinació de bupropió/naltrexona, que actuen en el sistema nerviós central augmentant l'activitat de les neurones POMC, han estat aprovats per la FDA, però no per l'agència europea EMA, ja que aquesta última és molt més restrictiva a l'hora d'aprovar medicaments per al control del pes que estiguin dirigits al sistema nerviós central. A causa, doncs, de la pandèmia de malalties relacionades amb l'obesitat (diabetis, resistència a la insulina, malalties cardiovasculars, asma, alguns tipus de càncer, Alzheimer, etc.), hi ha una gran necessitat de trobar nous fàrmacs que presentin un perfil més segur per optimitzar i individualitzar teràpies contra l'obesitat. Per tant, és imperatiu desenvolupar noves estratègies per abordar el problema i, entre elles, les destinades a augmentar la mobilització de lípids i l'oxidació de greixos són algunes de les més atractives.

Mobilització i oxidació dels àcids grassos

L'oxidació d'àcids grassos de cadena llarga es produeix en els mitocondris i duu a terme un paper clau en el desenvolupament de l'obesitat. El transport de lípids en el mitocondri es realitza a través del sistema carnitina palmitoiltransferasa (CPT). Aquest sistema està integrat per tres proteïnes: CPT1, acilcarnitina translocasa i CPT2. CPT1 catalitza l'etapa limitant de l'oxidació mitocondrial d'àcids grassos i està regulada pels canvis en els nivells de malonil-CoA. Aquests nivells estan controlats per l'acetil-CoA carboxilasa (ACC), que catalitza la síntesi de malonil-CoA i per malonil-CoA descarboxilasa (MCD), que en catalitza la degradació. Junts, aquests compo-

nents actuen com una xarxa metabòlica que detecta l'estat energètic de la cèl·lula. Un cop els àcids grassos de cadena llarga s'han degradat a acetil-CoA dins del mitocondri, es transformen en ATP a través del cicle de Krebs i la fosforilació oxidativa. Els teixits de mamífers expressen tres isoformes de CPT1: CPT1A, descoberta originalment al fetge, però que està present gairebé de forma ubíqua [6]; CPT1B, que es troba en múscul, cor i teixit adipós marró [7], i CPT1C, l'última isoforma descoberta, que s'expressa principalment en el cervell [8].

La nostra investigació indica que la modulació de la bioenergètica mitocondrial (i, en particular, l'oxidació d'àcids grassos) és un bon objectiu com a teràpia contra l'obesitat. La nostra estratègia es basa en dues intervencions: l'acció sobre teixits perifèrics, com ara el fetge i el teixit adipós, i l'acció central a l'hipotàlem. Per dur a terme la primera intervenció, el nostre grup ha obtingut una forma mutada de CPT1A, M593S-CPT1A (CPT1AM), que és una proteïna completament activa però totalment insensible a la inhibició per malonil-CoA [9]. La sobreexpressió de CPT1AM permet desconnectar el metabolisme de la glucosa, que augmenta els nivells de malonil-CoA, del dels àcids grassos, amb la qual cosa s'accelera la degradació d'aquests últims. Per tant, la reducció dels lípids cel·lulars es produeix d'una forma molt més eficient. En l'àmbit central, la nostra estratègia es basa en la inhibició de l'activitat CPT1, ja que sembla que està implicada en la via de senyalització d'hormones que controlen la ingesta d'aliments.

L'augment d'oxidació d'àcids grassos al mitocondri de fetge millora la resistència a la insulina i l'obesitat induïda per una dieta rica en greix en ratolins

Al fetge, en condicions associades a un excés d'energia crònica o a alteracions del metabolisme lipídic, hi ha una considerable acumulació de lípids. Això desencadena el desenvolupament de la malaltia del fetge gras no alcohòlica. Aquesta malaltia produeix una acumulació anormal de lípids i inflamació. També comporta un augment de la gluconeogènesi hepàtica, que deixa de ser sensible a la insulina. Aquest sol ser el començament de la diabetis, que pot conduir, en etapes posteriors, al desenvolupament d'alteracions més greus, com l'esteatohepatitis, la cirrosi i el carcinoma hepatocel·lular. Te-

nint en compte que el fetge gras és, en última instància, el resultat d'un desequilibri entre l'entrada i la sortida de lípids dels hepatòcits, qualsevol intervenció que estimuli l'oxidació hepàtica d'àcids grassos ha de donar lloc a una reducció de l'esteatosi hepàtica. S'han descrit diverses aproximacions farmacològiques que activen l'oxidació d'àcids grassos al fetge. Per exemple, l'ús d'agonistes de PPAR [10] i AMPK [11, 12] i d'antagonistes de l'ACC [13]. Més interessants són els estudis en rosegadors en els quals s'intenta reduir l'esteatosi augmentant l'oxidació d'àcids grassos específicament al fetge. En aquests estudis, la modulació a curt termini de l'expressió dels gens ACC [14] i MCD [15] produeix una reducció en els nivells de malonil-CoA i un augment de l'oxidació d'àcids grassos. A més a més, en aquests estudis, es va observar una disminució hepàtica del contingut de triglicèrids i una millora de la sensibilitat a la insulina dels animals obesos. Tot i els bons resultats, cal tenir en compte que aquests gens estan implicats en altres rutes metabòliques, i això planteja la qüestió sobre la seva eficàcia en tractaments a llarg termini.

Tenint en compte que l'enzim clau i limitant de l'oxidació dels àcids grassos és CPT1A, la seva sobreexpressió sembla una estratègia més adient a l'hora de reduir el contingut de lípids i aconseguir una millora general del metabolisme hepàtic. La sobreexpressió hepàtica de CPT1A mitjançant adenovirus s'ha dut a terme en rates obeses per Stefanovic-Racic *et al.* [16]. Aquests autors van observar que un lleuger augment de l'oxidació d'àcids grassos produïa una reducció dels nivells de triglicèrids hepàtics, però això no va suposar cap millora en la sensibilitat a la insulina. Aquest efecte moderat podria ser degut a l'augment dels nivells de malonil-CoA induïts per una

dieta alta en greixos, que podria limitar l'activitat de CPT1A *in vivo*, tot i haver-la sobreexpressat.

Per evitar la inhibició pel malonil-CoA, el nostre grup va generar fa temps una isoforma mutant de CPT1A, CPT1AM [9], que és insensible al malonil-CoA. Els resultats publicats pel nostre grup confirmen en la línia cel·lular pancreàtica INS-1 [17] i en la línia de cèl·lules de múscul L6E9 [18] que la sobreexpressió de CPT1AM mitjançant adenovirus és més eficient a l'hora d'augmentar l'oxidació d'àcids grassos que la forma de CPT1A salvatge. A més a més, la sobreexpressió de CPT1AM en les cèl·lules L6E9 produeix un augment de dues vegades l'oxidació de palmitat, i disminueix la seva esterificació cap a altres lípids cel·lulars. Resultats similars han estat obtinguts en cultius primaris d'hepatòcits pel grup de la doctora Prip-Buus [19] i també pel nostre grup.

A més dels estudis *in vitro*, s'han realitzat experiments *in vivo* en ratolins alimentats amb una dieta grassa [20]. Mitjançant la injecció per la vena de la cua de ratolins de virus adenoassociats (AAV) que contenen la CPT1AM dirigida per un promotor específic de fetge, es va obtenir una sobreexpressió hepàtica perllongada de CPT1AM. Això va permetre avaluar l'impacte metabòlic i mecanismes subjacents de l'augment de l'oxidació d'àcids grassos en ratolins amb obesitat induïda per una dieta alta en greixos, així com en ratolins genèticament obesos *db/db*. En aquests estudis, es va observar que els ratolins que expressaven CPT1AM en fetge mostraven una millora general del metabolisme hepàtic de la glucosa i dels lípids a causa de l'augment del flux d'àcids grassos cap al mitocondri. Això evitava l'acumulació intracel·lular de lípids al fetge i la producció de ROS i rescatava la malmena senyalització de la insulina (figura 1). Aquesta capacitat del fetge per fer front a un augment del flux dels àcids grassos cap al mitocondri, de manera que s'escapava d'una possible lesió hepàtica, podria ser explicada en part per la capacitat del fetge de formar cossos cetònics. Els cossos cetònics produïts per una major β -oxidació són fàcilment consumits per altres teixits, de manera que augmenta el flux de carbonis des del fetge cap a altres òrgans. A més a més, en aquests ratolins s'observà una reducció dels lípids acumulats en el teixit adipós blanc i un menor pes corporal, comparat amb el dels ratolins control, alimentats també amb una dieta rica en greixos. La senyalització de la insulina, deteriorada en teixits com ara el múscul o el teixit adipós blanc, també va millorar (figura 1). Aquests resultats han estat confirmats per un estudi posterior que van dur a terme Monsenego *et al.* [21].

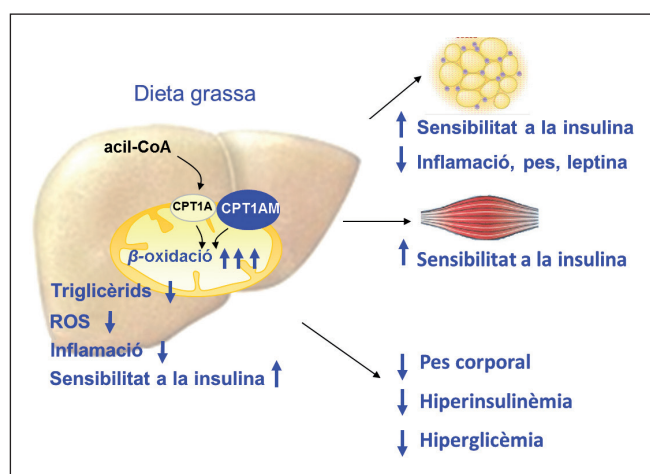


FIGURA 1. Efecte de la sobreexpressió de CPT1AM en fetge de ratolí amb obesitat induïda per dieta grassa.

En els ratolins genèticament obesos *db/db* que expressaven CPT1AM, també es va observar una millora de la hiperglucèmia i la hiperinsulinèmia que pateixen aquests animals. En conjunt, tots aquests resultats fan palès que un augment de la CPT1AM hepàtica pot ser una nova estratègia per al tractament de patologies del fetge gras i de l'obesitat.

L'augment de l'oxidació d'àcids grassos en adipòcits i en macròfags redueix el contingut en triglicèrids i la inflamació

Durant les dues últimes dècades, el teixit adipós ha guanyat importància com a responsable dels mecanismes implicats en els trastorns relacionats amb l'obesitat. El teixit adipós blanc és el responsable de l'emmagatzematge d'energia i conté adipòcits, teixit connectiu i nombroses cèl·lules immunes, com els macròfags, cèl·lules T i B, els mastòcits i els neutròfils, que s'infiltra i augmenten la seva presència durant l'obesitat. Els macròfags van ser les primeres cèl·lules immunes descrites implicades en la resistència a la insulina derivada de l'obesitat. Això mostrarà que, a més del seu paper convencional en la reparació de teixits i en la resposta a adipòcits moribunds, aquests poden desenvolupar un paper patològic en el teixit adipós [22]. El teixit adipós és també un teixit endocrí que secreta hormones com la leptina, l'adiponectina i la resistina i citocines inflamatòries com ara TNF- α , IL-6, IL-1 β , etc., en resposta a diversos estímuls. Per tant, és un òrgan complex que controla la despesa d'energia, la gana, la sensibilitat a la insulina, la inflamació i la immunitat.

La fisiopatologia de la resistència a la insulina induïda per l'obesitat s'ha atribuït a diversos factors, com ara la deposició de greix ectòpica, l'augment de la inflamació i l'estrès del reticle endoplasmàtic (RE), la hipòxia del teixit adipós i la disfunció mitocondrial, l'expansió dels adipòcits deteriorats i l'angiogènesi. En l'obesitat, els àcids grassos, juntament amb altres estímuls, com ara les ceramides, diverses isoformes de PKC, citocines proinflamatòries, ROS i estrès de RE, activen les vies de senyalització de JNK, NF- κ B, RAGE i TLR, tant en adipòcits com en macròfags, la qual cosa desencadena la inflamació i la resistència a la insulina [23].

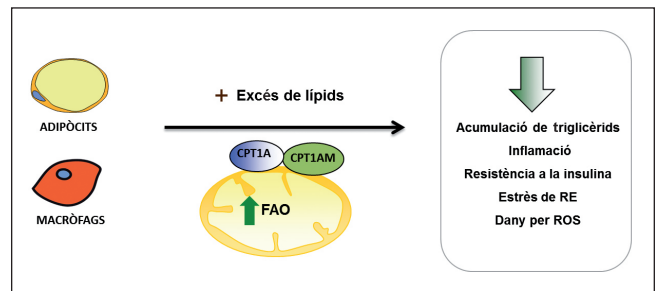


FIGURA 2. Efecte de l'augment de l'oxidació d'àcids grassos en adipòcits i macròfags incubats amb palmitat per sobreexpressió de CPT1AM.

S'ha descrit que les persones obeses i les persones amb diabetis de tipus 2 presenten nivells d'oxidació d'àcids grassos inferiors en diversos teixits. Així, s'ha observat que les persones obeses tenen reduïts els nivells d'expressió de CPT1 en el teixit adipós visceral [24]. Un estudi recent mostra que la sobreexpressió de CPT1A en adipòcits blancs disminueix el contingut de triglicèrids i millora la sensibilitat a la insulina [25]. En un estudi realitzat pel nostre grup, vam observar que l'expressió de CPT1A és major en els macròfags del teixit adipós humà que en adipòcits i que s'expressa diferencialment en teixit adipós visceral vs subcutani tant en una cohort d'obesos com en una de diabetis de tipus 2 [26]. Aquestes observacions ens van portar a investigar més a fons el paper potencial de CPT1A en adipòcits i macròfags. Quan vam expressar la CPT1AM en una línia cel·lular d'adipòcits 3T3-L1 CARD1 i en macròfags RAW 264,7 mitjançant adenovirus, vam observar un augment de l'oxidació d'àcids grassos en ambdós tipus cel·lulars. Quan les cèl·lules es van incubar amb palmitat per simular una situació d'obesitat, vam observar una disminució del contingut de triglicèrids, de la inflamació i de la sensibilitat a la insulina en adipòcits i una reducció d'estrès de RE i ROS en macròfags (figura 2). Tots aquests resultats indiquen que un augment de la mobilització i l'oxidació d'àcids grassos en cèl·lules metabòlicament rellevants, com ara adipòcits i macròfags, pot ser una estratègia prometedora per al tractament de patologies inflamatòries cròniques com l'obesitat i la diabetis de tipus 2.

La modulació de l'activitat CPT1 a l'hipotàlem regula la ingesta i el pes

El sistema nerviós central desenvolupa un paper important en l'avaluació i el control de l'homeòstasi energètica. L'hipotàlem és un òrgan complex organitzat en diferents nuclis formats per

agrupacions de neurones especialitzades que són sensibles a canvis en l'estatus energètic. Aquestes neurones responen als canvis energètics alterant l'expressió de neuromoduladors i neurotransmissors específics que, a la vegada, modifiquen la ingesta d'aliments i la despesa energètica. El metabolisme hipotalàmic dels àcids grassos participa en aquest procés i actua com a intermediari dels mecanismes moleculars de l'acció central d'hormones com la leptina, la grelina i els nutrients en el control de la ingesta i el balanç energètic [27].

Alguns estudis suggereixen que el malonil-CoA actua en aquests processos com a missatger molecular de l'estat nutricional [28]. Així, la leptina, hormona de la sacietat, realitza la seva acció anorexigènica augmentant els nivells de malonil-CoA a l'hipotàlem. També hi ha evidències clares del procés invers, és a dir, una disminució hipotalàmica dels nivells de malonil-CoA senyalitza un dèficit energètic que causa un augment de la ingesta i del pes [29]. Un clar candidat de l'acció del malonil-CoA és la CPT1. Al cervell hi ha dues isoformes de CPT1: CPT1A (en el mitocondri) i CPT1C (en el RE). Les dues isoformes tenen un lloc d'unió a malonil-CoA. No obstant això, les seves notables diferències en la localització subcel·lular i en l'activitat suggereixen una funció neuronal diferent per a cada isoforma.

S'ha proposat que, en situacions d'augment de malonil-CoA, aquest actuaria inhibint la CPT1A, la qual cosa limitaria l'oxidació dels acil-CoA de cadena llarga. L'acumulació d'acil-CoA o altres derivats lipídics permetria la seva interacció amb proteïnes que regularien l'expressió dels neuropèptids orexigènics (NPY i AgRP) i anorexigènics (POMC i CART). Donen suport a aquest mecanisme les observacions fetes amb la injecció intracerebroventricular (icv) d'una ribosonda que causa inhibició genètica de la CPT1A hipotalàmica i redueix la ingesta [30]. D'altra banda, s'ha observat que l'acció orexigènica de la grelina es dona a través d'una activació de la cinasa activada per AMP (AMPK), que, a la vegada, inactiva ACC, la qual cosa impedeix la síntesi de malonil-CoA i, en conseqüència, augmenta l'activitat CPT1A [29]. Aquest augment d'activitat CPT1A produeix un augment de ROS que podria ser responsable, en part, de l'activació de la senyalització de la resposta orexigènica.

Estudis recents realitzats pel nostre grup mostren que una sobreexpressió de CPT1AM en el nucli ventromedial (VMN) (nucli de sacietat) de l'hipotàlem produeix hiperfàgia (figura 3). Això va associat a canvis notables del perfil lipídic de la regió mediobasal (MBH), que comprèn els nuclis arqueats (ARC)

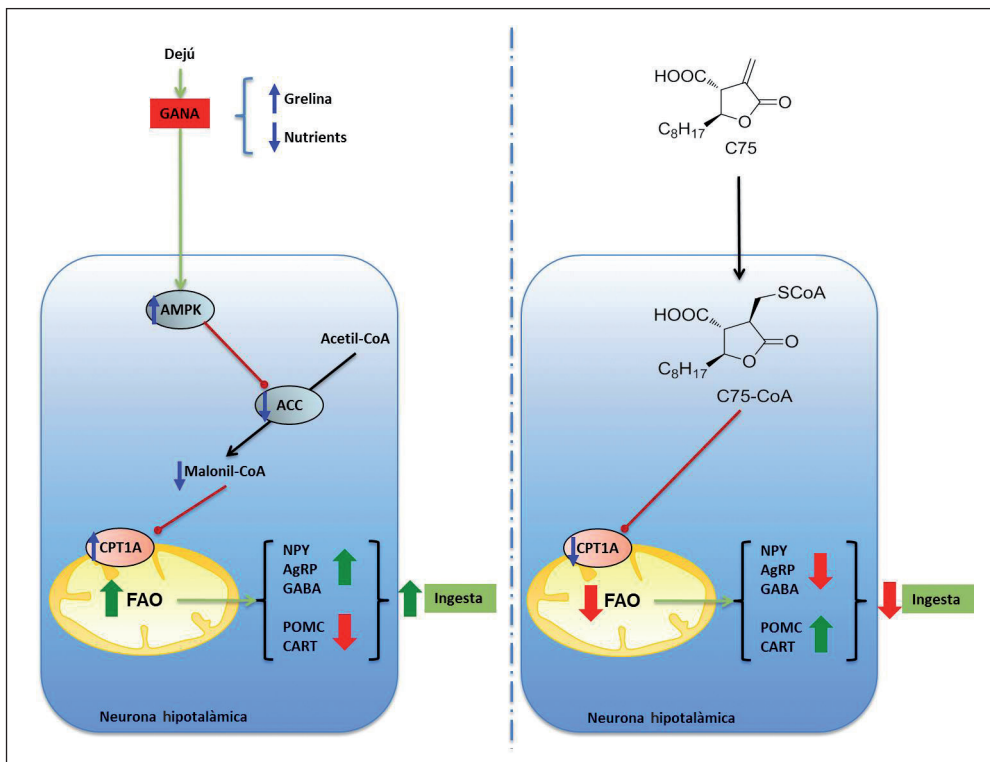


FIGURA 3. Modulació de l'activitat CPT1A a hipotàlem. L'augment de l'activitat CPT1A produeix un augment de la ingesta. La inhibició de l'activitat CPT1A per acció del C75 redueix la ingesta.

i VMN de l'hipotàlem, i a canvis en els nivells d'expressió dels transportadors de glutamat i GABA [31]. En canvi, al nucli ARC, aquesta mateixa sobreexpressió de CPT1A no altera la ingesta en resposta a la leptina [32]. Tot això apunta a un paper clau de CPT1A en el control de la ingesta. Malgrat totes aquestes evidències, encara no es coneixen exactament quins són els esdeveniments per sota de CPT1A en els diferents nuclis hipotalàmics que porten a la resposta orexigènica.

D'altra banda, s'ha realitzat un esforç important per dissenyar nous fàrmacs contra l'obesitat dirigits a augmentar els nivells de malonil-CoA en l'àmbit hipotalàmic. L'enzim àcid gras sintasa (AGS) catalitza la síntesi de palmitat a partir d'acetil-CoA i malonil-CoA. S'ha descrit que la inhibició d'AGS a l'hipotàlem suprimeix la ingesta d'aliments a través de l'acumulació de malonil-CoA [33]. El C75 és un inhibidor sintètic de l'AGS i s'ha proposat com un agent antiobesitat. La seva administració disminueix la gana i el pes corporal en rosegadors [34]. El nostre grup ha demostrat que el coenzim-A adducte de C75 (C75-CoA) és un potent inhibidor de la CPT1 [35] i que una part de la resposta anorexigènica del C75 pot ser deguda a la potent inhibició d'aquest producte sobre CPT1A. Totes aquestes dades indiquen que la CPT1A podria ser considerada una bona diana per al control de la gana amb vista a possibles accions terapèutiques contra l'obesitat.

Conclusions

La comunitat investigadora és conscient del fet que s'han de buscar nous tractaments per lluitar contra l'epidèmia actual de l'obesitat i de les malalties relacionades. Un canvi en la dieta i l'exercici físic regular són dues estratègies clàssiques i efectives per disminuir la sobrecàrrega de nutrients. Tot i així, el seu manteniment a llarg termini depèn de la voluntat del pacient. És per això que calen noves aproximacions que permetin reduir la càrrega de lípids i augmentar la despesa d'energia. D'altra banda, per modular la conducta alimentària, cal també desenvolupar nous medicaments que permetin reduir la ingesta. Els resultats del nostre grup i d'altres demostren que un augment sistèmic o una disminució en l'àmbit central de l'oxidació de lípids és una estratègia prometedora per lluitar contra l'obesitat i les malalties relacionades.

Agraïments

Voldríem agrair al Ministeri de Ciència i Innovació el finançament rebut pels projectes SAF2013-45887-R, de LH; SAF2014-52223-C2-1-R, de DS, i la beca doctoral de JFM. El CIBER Fisiopatología de la Obesidad y la Nutrición (CIBERObn) CB06/03/0001, de DS. Els ajuts a la recerca de la European Foundation for the Study of Diabetes, de LH; (EFSD)/Lilly i EFSD/Janssen-Rising Star, de LH, i L'Oréal-UNESCO «For Women in Science», de LH. L'ajut a la recerca de la Generalitat de Catalunya 2014SGR465, de DS. Els autors també agraeixen la beca doctoral «Ciencia sin fronteras» del Brasil de MW.

Referències

- [1] AHIMA, R. S. «Digging deeper into obesity». *J. Clin. Invest.*, núm. 121 (2011), p. 2076-2079.
- [2] O'NEIL, P. M.; SMITH, S. R.; WEISSMAN, N. J.; FIDLER, M. C.; SÁNCHEZ, M.; ZHANG, J.; RAETHER, B.; ANDERSON, C. M.; SHANAHAN, W. R. «Randomized placebo-controlled clinical trial of lorcaserin for weight loss in type 2 diabetes mellitus: the BLOOM-DM study». *Obes.*, núm. 20 (2012), p. 1426-1436.
- [3] KHAN, A.; RAZA, S.; KHAN, Y.; AKSOY, T.; KHAN, M.; WEINBERGER, Y.; GOLDMAN, J. «Current updates in the medical management of obesity». *Recent Pat. Endocr. Metab. Immune Drug Discov.*, núm. 6 (2012), p. 117-128.
- [4] NOVO NORDISK. *Liraglutide 3.0 mg for weight management: NDA 206-321: Briefing document* [en línia]. Silver Spring: US Food and Drug Administration. Endocrinologic and Metabolic Drugs Advisory Committee, 2014. <<http://www.fda.gov/downloads/advisorycommittees/committeesmeetingmaterials/drugs/endocrinologicandmetabolicdrugsadvisorycommittee/ucm413318.pdf>>.
- [5] EUROPEAN MEDICINES AGENCY (EMA). «Saxenda recommended for approval in weight management in adults: medicine to be used in addition to reduced-calorie diet and physical activity». Londres, 2015.
- [6] ESSER, V.; BRITTONSO, C. H.; WEIS, B. C.; FOSTER, D. W.; MCGARRY, J. D. «Cloning, sequencing, and expression of a cDNA encoding rat liver carnitine palmitoyltransferase I. Direct evidence that a single polypeptide is involved in inhibitor interaction and catalytic function». *J. Biol. Chem.*, núm. 268 (1993), p. 5817-5822.
- [7] YAMAZAKI, N.; SHINOHARA, Y.; SHIMA, A.; TERADA, H. «High expression of a novel carnitine palmitoyltransferase I like pro-

tein in rat brown adipose tissue and heart: isolation and characterization of its cDNA clone». *FEBS Lett.*, núm. 363 (1995), p. 41-45.

[8] PRICE, N.; LEIJ, F. van der; JACKSON, V.; CORSTORPHINE, C.; THOMSON, R.; SORENSEN, A.; ZAMMIT, V. «A novel brain-expressed protein related to carnitine palmitoyltransferase I». *Genomics*, núm. 80 (2002), p. 433-442.

[9] MORILLAS, M.; GÓMEZ-PUERTAS, P.; BENTEBIBEL, A.; SELLÉS, E.; CASALS, N.; VALENCIA, A.; HEGARDT, F. G.; ASINS, G.; SERRA, D. «Identification of conserved amino acid residues in rat liver carnitine palmitoyltransferase I critical for malonyl-CoA inhibition. Mutation of methionine 593 abolishes malonyl-CoA inhibition». *J. Biol. Chem.*, núm. 278 (2003), p. 9058-9063.

[10] BARROSO, E.; RODRÍGUEZ-CALVO, R.; SERRANO-MARCO, L.; ASTUDILLO, A. M.; BALSINDE, J.; PALOMER, X.; VÁZQUEZ-CARRERA, M. «The PPAR β/δ activator GW501516 prevents the down-regulation of AMPK caused by a high-fat diet in liver and amplifies the PGC-1 α -Lipin 1-PPAR α pathway leading to increased fatty acid oxidation». *Endocrinology*, núm. 152 (2011), p. 1848-1859.

[11] ZHOU, G.; MYERS, R.; LI, Y.; CHEN, Y.; SHEN, X.; FENYK-MELODY, J.; WU, M.; VENTRE, J.; DOEBBER, T.; FUJII, N.; MUSI, N.; HIRSHMAN, M. F.; GOODYEAR, L. J.; MOLLER, D. E. «Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action». *J. Clin. Invest.*, núm. 108 (2001), p. 1167-1174.

[12] VELASCO, G.; GEELEN, M. J.; GUZMÁN, M. «Control of hepatic fatty acid oxidation by 5'-AMP-activated protein kinase involves a malonyl-CoA-dependent and a malonyl-CoA-independent mechanism». *Arch. Biochem. Biophys.*, núm. 337 (1997), p. 169-175.

[13] HARWOOD, H. J.; PETRAS, S. F.; SHELLY, L. D.; ZACCARO, L. M.; PERRY, D. A.; MAKOWSKI, M. R.; HARGROVE, D. M.; MARTIN, K. A.; TRACEY, W. R.; CHAPMAN, J. G.; MAGEE, W. P.; DALVIE, D. K.; SOLIMAN, V. F.; MARTIN, W. H.; MULARSKI, C. J.; EISENBEIS, S. A. «Isozyme-nonspecific N-substituted bipiperidylcarboxamide acetyl-CoA carboxylase inhibitors reduce tissue malonyl-CoA concentrations, inhibit fatty acid synthesis, and increase fatty acid oxidation in cultured cells and in experimental animals». *J. Biol. Chem.*, núm. 278 (2003), p. 37099-37111.

[14] SAVAGE, D. B.; CHOI, C. S.; SAMUEL, V. T.; LIU, Z.-X.; ZHANG, D.; WANG, A.; ZHANG, X. M.; CLINE, G. W.; YU, X. X.; GEISLER, J. G.; BHANOT, S.; MONIA, B. P.; SHULMAN, G. I. «Reversal of diet-induced hepatic steatosis and hepatic insulin resistance by antisense oligonucleotide inhibitors of acetyl-CoA carboxylases 1 and 2». *J. Clin. Invest.*, núm. 116 (2006), p. 817-824.

[15] AN, J.; MUOIO, D. M.; SHIOTA, M.; FUJIMOTO, Y.; CLINE, G. W.; SHULMAN, G. I.; KOVES, T. R.; STEVENS, R.; MILLINGTON, D.; NEWGARD, C. B.

«Hepatic expression of malonyl-CoA decarboxylase reverses muscle, liver and whole-animal insulin resistance». *Nat. Med.*, núm. 10 (2004), p. 268-274.

[16] STEFANOVIC-RACIC, M.; PERDOMO, G.; MANTELL, B. S.; SIPULA, I. J.; BROWN, N. F.; O'DOHERTY, R. M. «A moderate increase in carnitine palmitoyltransferase 1a activity is sufficient to substantially reduce hepatic triglyceride levels». *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, núm. 294 (2008), p. E969-E977.

[17] HERRERO, L.; RUBÍ, B.; SEBASTIÁN, D.; SERRA, D.; ASINS, G.; MAECHLER, P.; PRENTKI, M.; HEGARDT, F. G. «Alteration of the malonyl-CoA/carnitine palmitoyltransferase I interaction in the β -cell impairs glucose-induced insulin secretion». *Diabetes*, núm. 54 (2005), p. 462-471.

[18] SEBASTIÁN, D.; HERRERO, L.; SERRA, D.; ASINS, G.; HEGARDT, F. G. «CPT I overexpression protects L6E9 muscle cells from fatty acid-induced insulin resistance». *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, núm. 292 (2007), p. E677-E686.

[19] AKKAQUI, M.; COHEN, I.; ESNOUS, C.; LENOIR, V.; SOURNAC, M.; GIRARD, J.; PRIP-BUUS, C. «Modulation of the hepatic malonyl-CoA-carnitine palmitoyltransferase 1A partnership creates a metabolic switch allowing oxidation of *de novo* fatty acids». *Biochem. J.*, núm. 420 (2009), p. 429-438.

[20] ORELLANA-GAVALDÀ, J. M.; HERRERO, L.; MALANDRINO, M. I.; PAÑEDA, A.; RODRÍGUEZ-PEÑA, M. S.; PETRY, H.; ASINS, G.; DEVENTER, S. van; HEGARDT, F. G.; SERRA, D. «Molecular therapy for obesity and diabetes based on a long-term increase in hepatic fatty-acid oxidation». *Hepatology*, núm. 53 (2011), p. 821-832.

[21] MONSÉNÉGO, J.; MANSOURI, A.; AKKAQUI, M.; LENOIR, V.; ESNOUS, C.; FAUVEAU, V.; TAVERNIER, V.; GIRARD, J.; PRIP-BUUS, C. «Enhancing liver mitochondrial fatty acid oxidation capacity in obese mice improves insulin sensitivity independently of hepatic steatosis». *J. Hepatol.*, núm. 56 (2012), p. 632-639.

[22] DAVIES, L. C.; JENKINS, S. J.; ALLEN, J. E.; TAYLOR, P. R. «Tissue-resident macrophages». *Nat. Immunol.*, núm. 14 (2013), p. 986-995.

[23] HERRERO, L.; SHAPIRO, H.; NAYER, A.; LEE, J.; SHOELSON, S. E. «Inflammation and adipose tissue macrophages in lipodystrophic mice». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, núm. 107 (2010), p. 240-245.

[24] KRISHNAN, J.; DANZER, C.; SIMKA, T.; UKROPEC, J.; WALTER, K. M.; KUMPF, S.; MIRTSCHINK, P.; UKROPCOVA, B.; GASPERIKOVA, D.; PEDRAZZINI, T.; KREK, W. «Dietary obesity-associated Hif1 α activation in adipocytes restricts fatty acid oxidation and energy expenditure via suppression of the Sirt2-NAD⁺ system». *Genes Dev.*, núm. 26 (2012), p. 259-270.

[25] GAO, X.; LI, K.; HUI, X.; KONG, X.; SWEENEY, G.; WANG, Y.; XU, A.; TENG, M.; LIU, P.; WU, D. «Carnitine palmitoyltransferase 1A pre-

vents fatty acid-induced adipocyte dysfunction through suppression of c-Jun N-terminal kinase». *Biochem. J.*, núm. 435 (2011), p. 723-732.

[26] MALANDRINO, M. I.; FUCHO, R.; WEBER, M.; CALDERÓN-DOMÍNGUEZ, M.; MIR, J. F.; VALCÁRCEL, L.; ESCOTÉ, X.; GÓMEZ-SERRANO, M.; PERAL, B.; SALVADÓ, L.; FERNÁNDEZ-VELEDO, S.; CASALS, N.; VÁZQUEZ-CARRERA, M.; VILLARROYA, F.; VENDRELL, J. J.; SERRA, D.; HERRERO, L. «Enhanced fatty acid oxidation in adipocytes and macrophages reduces lipid-induced triglyceride accumulation and inflammation». *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, núm. 308 (2015), p. E756-E769.

[27] LÓPEZ, M.; LELLIOTT, C. J.; VIDAL-PUIG, A. «Hypothalamic fatty acid metabolism: a housekeeping pathway that regulates food intake». *Bioessays*, núm. 29 (2007), p. 248-261.

[28] HU, Z.; CHA, S. H.; CHOHNAN, S.; LANE, M. D. «Hypothalamic malonyl-CoA as a mediator of feeding behavior». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, núm. 100 (2003), p. 12624-12629.

[29] LÓPEZ, M.; LAGE, R.; SAHA, A. K.; PÉREZ-TILVE, D.; VÁZQUEZ, M. J.; VARELA, L.; SANGIAO-ALVARELLOS, S.; TOVAR, S.; RAGHAY, K.; RODRÍGUEZ-CUENCA, S.; DEOLIVEIRA, R. M.; CASTAÑEDA, T.; DATTA, R.; DONG, J. Z.; CULLER, M.; SLEEMAN, M. W.; ÁLVAREZ, C. V.; GALLEGO, R.; LELLIOTT, C. J.; CARLING, D.; TSCHÖP, M. H.; DIÉGUEZ, C.; VIDAL-PUIG, A. «Hypothalamic fatty acid metabolism mediates the orexigenic action of ghrelin». *Cell. Metab.*, núm. 7 (2008), p. 389-399.

[30] OBICI, S.; FENG, Z.; ARDUINI, A.; CONTI, R.; ROSSETTI, L. «Inhibition of hypothalamic carnitine palmitoyltransferase-1 decreases food intake and glucose production». *Nat. Med.*, núm. 9 (2003), p. 756-761.

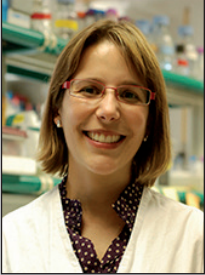
[31] MERA, P.; MIR, J. F.; FABRIÀS, G.; CASAS, J.; COSTA, A. S. H.; MALANDRINO, M. I.; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J. A.; REMESAR, X.; GAO, S.; CHOHNAN, S.; RODRÍGUEZ-PEÑA, M. S.; PETRY, H.; ASINS, G.; HEGARDT, F. G.; HERRERO, L.; SERRA, D. «Long-term increased carnitine palmitoyltransferase 1A expression in ventromedial hypothalamus causes hyperphagia and alters the hypothalamic lipidomic profile». *PLoS One*, núm. 9 (2014), p. e97195.

[32] GAO, S.; KEUNG, W.; SERRA, D.; WANG, W.; CARRASCO, P.; CASALS, N.; HEGARDT, F. G.; MORAN, T. H.; LOPASCHUK, G. D. «Malonyl-CoA mediates leptin hypothalamic control of feeding independent of inhibition of CPT-1 α ». *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, núm. 301 (2011), p. R209-R217.

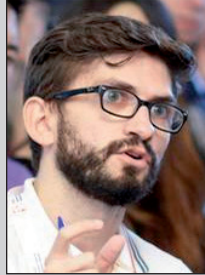
[33] GAO, S.; LANE, M. D. «Effect of the anorectic fatty acid synthase inhibitor C75 on neuronal activity in the hypothalamus and brainstem». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, núm. 100 (2003), p. 5628-5633.

[34] LOFTUS, T. M.; JAWORSKY, D. E.; FREHYWOT, G. L.; TOWNSEND, C. A.; RONNETT, G. V.; LANE, M. D.; KUHAJDA, F. P. «Reduced food intake and body weight in mice treated with fatty acid synthase inhibitors». *Science*, núm. 288 (2000), p. 2379-2381.

[35] MERA, P.; BENTEBIBEL, A.; LÓPEZ-VIÑAS, E.; CORDENTE, A. G.; GURUNATHAN, C.; SEBASTIÁN, D.; VÁZQUEZ, I.; HERRERO, L.; ARIZA, X.; GÓMEZ-PUERTAS, P.; ASINS, G.; SERRA, D.; GARCÍA, J.; HEGARDT, F. G. «C75 is converted to C75-CoA in the hypothalamus, where it inhibits carnitine palmitoyltransferase 1 and decreases food intake and body weight». *Biochem. Pharmacol.*, núm. 77 (2009), p. 1084-1095.



L. Herrero



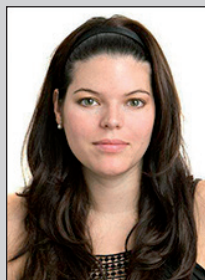
J. F. Mir



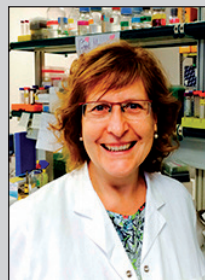
M. Weber



R. Fucho



M. Calderón



D. Serra

Laura Herrero és llicenciada en química i doctora en bioquímica per la Universitat de Barcelona (UB). Va realitzar el postdoctorat a la Universitat de Boston (Boston, MA, EUA) i al Joslin Diabetes Center (Harvard Medical School, Boston, MA, EUA). Actualment és professora lectora del Departament de Bioquímica i Biologia Molecular de la UB i membre de l'Institut de Biomedicina de la UB (IBUB) i del CIBERobn.

Joan Francesc Mir és llicenciat en farmàcia i màster en biotecnologia molecular per la Universitat de Barcelona (UB). Des de l'any 2006, col·labora amb el grup Regulació del Metabolisme Lipídic, al Departament de Bioquímica i Biologia Molecular de la Facultat de Farmàcia de la UB, i des de l'any 2011 hi realitza els estudis de doctorat.

Minéia Weber Blattes és llicenciada en farmàcia pel Centro Universitário Franciscano (UNIFRA, Brasil). Va realitzar un màster en ciències a la Universitat Federal de São Paulo (UNIFESP, Brasil). Des de l'any 2012, realitza els estudis de doctorat al grup Regulació del Metabolisme Lipídic, al Departament de Bioquímica i Biologia Molecular de la Facultat de Farmàcia de la Universitat de Barcelona (UB).

Raquel Fucho és llicenciada en biologia i doctora en biomedicina per la Universitat de Barcelona (UB). Actualment, és investigadora postdoctoral al grup Regulació del Metabolisme Lipídic, al Departament de Bioquímica i Biologia Molecular de la Facultat de Farmàcia de la UB.

María Calderón-Domínguez és llicenciada en biologia per la Universitat de Màlaga (UMA). Va realitzar la tesi doctoral a la Universitat Commonwealth de Virgínia (Richmond, VA, EUA), i va obtenir el títol de doctora en biologia cel·lular i molecular a la UMA. Des de l'any 2013, és investigadora postdoctoral al grup Regulació del Metabolisme Lipídic, al Departament de Bioquímica i Biologia Molecular de la Facultat de Farmàcia de la Universitat de Barcelona (UB), i membre del CIBERobn.

Dolors Serra és professora agregada al Departament de Bioquímica i Biologia Molecular de la Facultat de Farmàcia de la Universitat de Barcelona (UB), investigadora principal del grup Regulació del Metabolisme Lipídic i membre de l'Institut de Biomedicina de la UB (IBUB) i del CIBERobn.

Fatty acid metabolism and the basis of brown adipose tissue function

María Calderon-Dominguez^{a,b}, Joan F. Mir^{a,b}, Raquel Fucho^{a,b}, Minéia Weber^{a,b}, Dolors Serra^{a,b}, and Laura Herrero^{a,b}

^aDepartment of Biochemistry and Molecular Biology, School of Pharmacy, Institut de Biomedicina de la Universitat de Barcelona (IBUB), Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain; ^bCIBER Fisiopatología de la Obesidad y la Nutrición (CIBEROBN), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain

ABSTRACT

Obesity has reached epidemic proportions, leading to severe associated pathologies such as insulin resistance, cardiovascular disease, cancer and type 2 diabetes. Adipose tissue has become crucial due to its involvement in the pathogenesis of obesity-induced insulin resistance, and traditionally white adipose tissue has captured the most attention. However in the last decade the presence and activity of heat-generating brown adipose tissue (BAT) in adult humans has been rediscovered. BAT decreases with age and in obese and diabetic patients. It has thus attracted strong scientific interest, and any strategy to increase its mass or activity might lead to new therapeutic approaches to obesity and associated metabolic diseases. In this review we highlight the mechanisms of fatty acid uptake, trafficking and oxidation in brown fat thermogenesis. We focus on BAT's morphological and functional characteristics and fatty acid synthesis, storage, oxidation and use as a source of energy.

ARTICLE HISTORY

Received 13 August 2015
Revised 13 October 2015
Accepted 12 November 2015

KEYWORDS

brown adipose tissue; fatty acid oxidation; lipid metabolism; obesity

Introduction

Importance of adipose tissue in obesity

Current life styles and continuous nutrient excess are increasing the incidence of obesity at an alarming rate, especially at younger ages. Worldwide there are more than 600 million obese subjects and, importantly, most of the world's population live in countries where overweight and obesity kills more people than underweight.¹ Very worrisome are the concurrent and parallel increases in the prevalence of pathologic conditions associated with obesity such as insulin resistance, cardiovascular and Alzheimer disease, cancer, and type 2 diabetes.

Over the last 2 decades the obesity epidemic has put a spotlight on the adipose tissue as a key player in the mechanisms involved in obesity-related disorders. Human fat consists of energy-storing white adipose tissue (WAT) and brown adipose tissue (BAT), which controls thermogenesis by dissipating energy to produce heat. In addition to adipocytes, adipose tissue is well vascularized and contains connective tissue and numerous immune cells such as macrophages, T and B cells, mast cells and neutrophils.² It has been demonstrated that obesity-induced insulin resistance is due to several factors: ectopic fat deposition,³

increased inflammation and endoplasmic reticulum (ER) stress,^{4,5} adipose tissue hypoxia and mitochondrial dysfunction,^{6,7} and impaired adipocyte expansion and angiogenesis.^{8–10} Fat is also an active endocrine tissue that secretes hormones such as leptin, adiponectin or resistin and inflammatory cytokines such as tumor necrosis factor α (TNF α), interleukin (IL)-6, IL-1 β , etc. in response to several stimuli. Adipose tissue is therefore a complex and active organ controlling very important metabolic pathways such as energy expenditure, appetite, insulin sensitivity, endocrine and reproductive functions, inflammation and immunity.

Rediscovery of human active BAT

The fusion of positron-emission tomography (PET) and computed tomography (CT) images has allowed radiologists to retrieve both functional and structural information from a single image. In the course of using PET-CT to detect and stage tumors in humans, active BAT that increased after cold exposure was rediscovered.^{11,12} Until that moment BAT was considered exclusive to rodents and human neonates. However, the breakthrough came in 2009, when 5 independent research groups used PET-CT to identify the presence

CONTACT Laura Herrero  lherrero@ub.edu  Department of Biochemistry and Molecular Biology, School of Pharmacy, Institut de Biomedicina de la Universitat de Barcelona (IBUB), Universitat de Barcelona, Av. Diagonal, 643, Barcelona 08028, 08028, Spain.

© María Calderon-Dominguez, Joan F. Mir, Raquel Fucho, Minéia Weber, Dolors Serra and Laura Herrero. Published with license by Taylor & Francis

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-Non-Commercial license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>), which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited. The moral rights of the named author(s) have been properly cited.

and relevance of BAT in adult humans.¹³⁻¹⁷ All showed major depots of metabolically active fat in the cervical-supravicular region. Furthermore, these depots expressed type 2 iodothyronine deiodinase (DIO2), the β 3-adrenergic receptor, and the brown adipocyte-specific protein, uncoupling protein 1 (UCP1), which physiologically uncouples ATP production from mitochondrial respiration, thereby dissipating energy as heat.¹⁸ The expression of these proteins indicated the potential responsiveness of human BAT to both hormonal and pharmacological stimuli. Here, we review the possibility that BAT could be induced to enhance its lipid-burning function even further and thus be an effective target to fight against obesity and associated metabolic disorders.

Brown adipose tissue characteristics

BAT localization and morphology

Our knowledge of BAT has been significantly influenced by studies in rodent models. There, BAT is situated at the interscapular, cervical, mediastinal and retroperitoneal regions.¹⁹ While in infants BAT is mainly found in the interscapular area, in adult humans BAT is localized in a region extending from the anterior neck to the thorax.²⁰

In contrast to white adipocytes, which are unilocular, with polygonal morphology that optimizes their fat storing capacity, brown adipocytes are multiloculate and their color is due to their high mitochondrion content and vascular supply.²¹ BAT thermogenesis takes place in its numerous, densely-packed mitochondria containing the BAT-specific inner membrane protein UCP1. Multilocular lipid stores provide a rapid source of fatty acids (FAs) for activated mitochondria. FAs released into the circulation by the WAT are also an important source of FAs for brown adipocytes. Thermogenesis is classified into: 1) Obligatory thermogenesis, which takes into account the standard metabolic rate (energy used for basic function of cells and organs) and the heat generated during food metabolism (digestion, absorption, processing and storing of energy); and 2) Adaptive thermogenesis or heat production in response to environmental temperature and diet. Adaptive thermogenesis can be further divided into: cold-induced shivering thermogenesis, which takes place in skeletal muscle; cold-induced non-shivering thermogenesis, which takes place mainly in brown fat; and diet-induced thermogenesis triggered by overfeeding, which also takes place in BAT.²² Thus, BAT generates heat, with 2 main consequences: protection against cold exposure via non-shivering thermogenesis; and dissipation of the excess of energy from food. Therefore, BAT can be considered as

an organ that burns off excess lipids, and further examination of this property may lead to the development of novel strategies against diet-induced obesity.

Molecular BAT signature: beige and brown adipocytes

Comprehensive research is being done to define the still under debate cellular heterogeneity of human fat.²³ At least 2 types of thermogenic adipocyte exist in rodents and humans: classical brown adipocytes and beige (also called brite) adipocytes. They have both anatomical and developmental differences. While brown adipocytes are mainly located in the above-mentioned BAT depots, beige adipocytes co-locate with white adipocytes in WAT near vascular and neural innervation and appear in response to certain stimuli, such as chronic cold exposure or β 3-adrenergic signaling. In adult humans the ratio of brown to beige increases as one moves deeper within the neck and back.^{20,24-27}

BAT releases endocrine factors such as insulin-like growth factor I (IGF-1), IL-6 or fibroblast growth factor 21 (FGF21).²⁸ Brown adipocytes differ from white adipocytes due to their high expression of DIO2, the lipolytic regulator cell death-inducing DNA fragmentation factor- α -like effector A (CIDEA), and the transcription co-regulators PR domain-containing 16 (PRDM16) and peroxisome proliferator activated receptor gamma coactivator 1 α (PGC1 α).^{29,30} Beige and brown adipocytes have overlapping but distinct gene expression patterns.³¹ Both express the main thermogenic and mitochondrial genes, including *Ucp1*. However, some surface markers such as CD137, TBX1 and TMEM26 seem to be specific to murine beige adipocytes^{24,27} while other genes, like *Zic1* and *Lhx8*, appear to specifically mark classic brown adipocytes.^{20,32} Basal UCP1 expression and uncoupled respiration before hormonal stimulation are highest in brown fat cells and lower in beige cells, the lowest being found in white fat cells.²⁷ However, stimulation with a β 3-adrenergic agonist elevates UCP1 expression in beige cells to levels seen in brown fat cells (fold-change compared to white cells).^{27,33} This suggests that beige cells have a unique molecular signature with a dual role. They store energy in the absence of thermogenic stimuli but initiate heat production when appropriate signals are received.²⁷ White-to-beige conversion of adipocytes is a potential therapeutic approach to targeting obesity; however, the signals involved in this process still remain unclear.

Brown adipocytes arise from mesenchymal precursor cells common to the myogenic cell lineage and express myogenic factor 5 (*Myf5*).³⁴ Beige adipocytes derive from precursor cells that differ from those in classical BAT and are closer to the white adipocyte cell lineage.

Thus, while brown adipocytes come from a Pax7⁺/Myf5⁺ lineage shared with skeletal muscle, white and beige adipocytes derive from Pax7⁻/Myf5⁻ cells via distinct precursor cells. Beige adipocytes differentiate following activation by cold or other stimuli, and when the cold challenge is ceased, they become inactive, taking on the morphology of a white adipocyte.³⁵ However, the cell lineage and developmental origin of the adipose tissue is not so simple. Individual brown and white fats contain a mixture of adipocyte progenitor cells derived from Myf5⁺ and Myf5⁻ lineages, with numbers varying depending on the depot location. In fact, beige adipocytes in the retroperitoneal WAT are Myf5⁺.³⁶ For further information about the developmental origin of white, beige and brown adipocytes see other excellent reviews.^{34,37,38}

At least 2 mechanisms have been postulated to occur during the browning process: transdifferentiation of white into beige adipocytes vs. *de novo* brown adipogenesis. The transdifferentiation process is the conversion of a differentiated somatic cell type into another one.³⁹ The transdifferentiation of white into beige adipocytes has been reported in several studies.⁴⁰⁻⁴³ On the other hand, Lee *et al.* have shown that β 3-adrenergic stimulation induces the proliferation and further differentiation of precursors in WAT.⁴⁴ Furthermore, Myf5⁺ precursors have also been reported to differentiate into white adipocytes.^{36,45} Thus, whether the browning process arises from transdifferentiation or *de novo* brown adipogenesis is far from being fully understood. One could hypothesize that the 2 processes might take place simultaneously and to a different extent depending on the adipose depot or browning stimuli.

BAT activity in pathological conditions

Human studies showed that BAT was reduced in aging and in obese and diabetic patients, indicating that BAT participates in both cold-induced and diet-induced thermogenesis.¹³ This significant discovery highlights that any strategy able to increase the mass or activity of BAT could potentially be a promising therapy for obese and diabetic patients. In contrast, enhanced BAT activation has been described as a negative effect on cancer cachexia.⁴⁶ In this study, mice with cachexia-inducing colorectal tumor showed increased BAT activity despite thermoneutrality, indicating that BAT activation may contribute to impaired energy balance in cancer cachexia. Hibernoma is another BAT pathological condition. A hibernoma is a benign tumor of BAT that up to date has no clear explanation of its cause. It is very rare in humans and it is successfully treated by complete surgical excision.^{47,48} It has shown to

express UCP1 and thus potentially contribute to whole-body energy balance.

Activators of thermogenesis

Despite some controversy, a large body of evidence indicates that browning entails the enhancement of thermogenesis within WAT, i.e. increased expression and activity of UCP1 in what are normally considered WAT depots.⁴⁹ Several factors have been described to activate the browning of the adipose tissue such as irisin,⁵⁰ natriuretic peptides,⁵¹ bone morphogenetic protein 7 (BMP7)⁵² and BMP8b,⁵³ norepinephrine,⁵⁴ meteorin-like,⁵⁵ bile acids,⁵⁶ adenosine,⁵⁷ or FGF21.⁵⁸ Interestingly, recent studies have shown activation of human BAT by the β 3-adrenergic receptor agonist mirabegron.⁵⁹ β 3-adrenergic receptor is expressed in humans on the surfaces of brown and white adipocytes and urinary bladder. Cypess *et al.* administered 200 mg of oral mirabegron, currently approved to treat overactive bladder, to healthy and young humans. Mirabegron acutely stimulated human BAT thermogenesis and increased resting metabolic rate. Further studies would be needed to explore the specificity of mirabegron's mechanism of action, possible adverse effects such as tachycardia, and the dose used, which was 4-fold higher than that prescribed for overactive bladder.

Although a large number of browning agents have been described (extensively reviewed elsewhere)^{60,61} some studies showed that browning was a secondary consequence of enhanced heat loss, e.g. because of fur disruption in rodents.⁴⁹ The search for potential therapeutic browning agents to increase metabolism at thermoneutrality, to function through mechanisms other than those affecting heat loss and to finally decrease obesity should thus continue.

Fatty acid storage

FA synthesis, storage and metabolism are essential during thermogenesis because they are required for UCP1 proton transport activity in BAT.^{62,63} Fundamentally, brown adipocytes have 2 mechanisms to obtain lipids: FA uptake via lipoproteins carriers and *de novo* FA synthesis, also known as lipogenesis.

Fatty acid uptake

While brown adipocytes synthesize FAs, the enzyme lipoprotein lipase (LPL), bound at the endothelial cell surface, is the major source of FAs in BAT.⁶⁴ After a meal, dietary lipids are transported by chylomicrons and very low density proteins (VLDL) via lymphatic vessels into the bloodstream. Once triglyceride (TG) rich-

lipoproteins reach the bloodstream, LPL hydrolyzes them into free FAs (FFAs) and monoacylglycerol (MG) for BAT uptake. Indeed, BAT is an efficient modulator of triglyceridemia and it is contemplated as a major plasma lipid-clearing organ in rodents.⁶⁵⁻⁶⁷ In fact, FA uptake under cold exposure is higher in BAT than in skeletal muscle.⁶⁵ Under cold exposure, the β 3-adrenergic pathway enhances BAT FA flux and clearance via increased expression and activity of LPL.⁶⁵ However, the increase in LPL activity has also been shown to trigger adiposity and insulin resistance.⁶⁸ Adipocyte-specific LPL KO animals show an increase in FAs derived from lipogenesis and a decrease in polyunsaturated FAs, accompanied by an increase in the expression of lipogenic genes.⁶⁹ Glycosylphosphatidylinositol-anchored high density lipoprotein binding protein 1 (GPIHBP1) transports LPL across capillary endothelial cells, and GPIHBP1 KO mice show mislocated LPL in many tissues, including BAT,⁷⁰ decreased TG content and deficient lipolysis.⁷¹ Administration of PPAR γ agonists, such as rosiglitazone, in rodents increases BAT TG clearance and LPL activity, while lipogenesis is not increased. This suggests that under rosiglitazone treatment brown adipocytes metabolize FAs derived from TG hydrolyzed from lipoproteins or recycled from lipolysis.⁷²

Fatty acid transport

Once FAs are released by LPL, they are taken up into cells by plasmatic membrane receptors and transported for further utilization or storage.^{65,73-75} The most important FA transporters in BAT are the following (Fig. 1):

Cluster of differentiation 36 (CD36)

This integral membrane protein is expressed in BAT among other tissues.⁷³ CD36 belongs to the class B scavenger receptor family of cell surface proteins, whose main function is to translocate FAs, released by LPL activity, across the plasmatic membrane and thus provide a substrate for BAT thermogenesis.⁶⁵ Under cold exposure, CD36 expression and activity increase (Fig. 1).⁶⁵ However, CD36 is not a simple translocase; it is considered a lipid sensor and a regulator of FA uptake and transport in adipocytes.⁷⁶⁻⁷⁸ CD36 KO mice die after 24 hours of cold exposure, which implicates CD36 in thermogenesis.⁶⁵ In addition, CD36 genetic variability has been associated with body weight differences in humans.⁷⁹

FA transport proteins (FATPs)

There are 6 isoforms of FATPs. FATP1 and 4 can be found specifically in BAT (extensively reviewed

elsewhere).⁸⁰ These proteins translocate FAs into cells.⁸¹ They display very long-chain acyl-CoA synthetase activity,^{64,82} and their overexpression increases FA uptake.⁸³

G-protein-coupled receptors (GPCRs)

GPCRs comprise a family of proteins that respond to several ligands, and trigger a cascade of intracellular signaling (extensively reviewed elsewhere).⁸⁴ GPR41 (also known as FFA3) and GPR120 are activated by medium and long-chain FFA in BAT, and they are considered as sensors that maintain cell lipid homeostasis.⁸⁵ Interestingly, GPR120 mRNA expression increases under cold exposure (3).⁸⁶

Fatty acid binding proteins (FABPs)

Once in the cytoplasm, FFAs are minimally soluble. To prevent disruption of membrane or lipotoxicity, cells have soluble proteins that bind FFAs and transport them.⁸⁷ Brown adipocytes harbour 3 different isoforms: FABP3, FABP4 and FABP5.⁸⁸ FABP4, commonly known as adipocyte protein 2 (aP2), has been extensively used as a marker of adipocyte differentiation.⁸⁹ Although FABP4 is the most abundantly expressed isoform in BAT, only FABP3 and FABP5 are increased by cold exposure in rats.^{88,90} Interestingly, FABP3 is overexpressed in mice with diet-induced obesity and in UCP1 KO mice, and it is associated with increased thermogenesis.⁹¹ Thus, FFAs bind to FABPs present in brown adipocytes and are either stored or utilized to maintain thermogenesis (Fig. 1).

Lipogenesis

De novo FA synthesis or lipogenesis is the metabolic pathway that synthesizes FAs and ultimately induces TG synthesis.^{92,93} Excellent studies on WAT report that glucose uptake, a preliminary step in *de novo* FA synthesis, is also involved in the regulation of lipogenesis.^{94,95} Whether BAT contributes to this process is still unclear. A recent study examined the dynamics of *de novo* lipogenesis and lipolysis in classic brown, subcutaneous beige and classic white adipose tissues during chronic β 3-adrenergic receptor stimulation.⁹⁶ Sustained β 3-adrenergic stimulation increased *de novo* lipogenesis, TG turnover, and the expression of genes involved in FA synthesis and oxidation similarly in all adipose depots indicating that FA synthesis and FAO are tightly coupled during chronic β 3-adrenergic stimulation.

Lipogenesis takes place in the cytosol and it can be summarized in 3 steps: synthesis of FAs from acetyl-CoA,

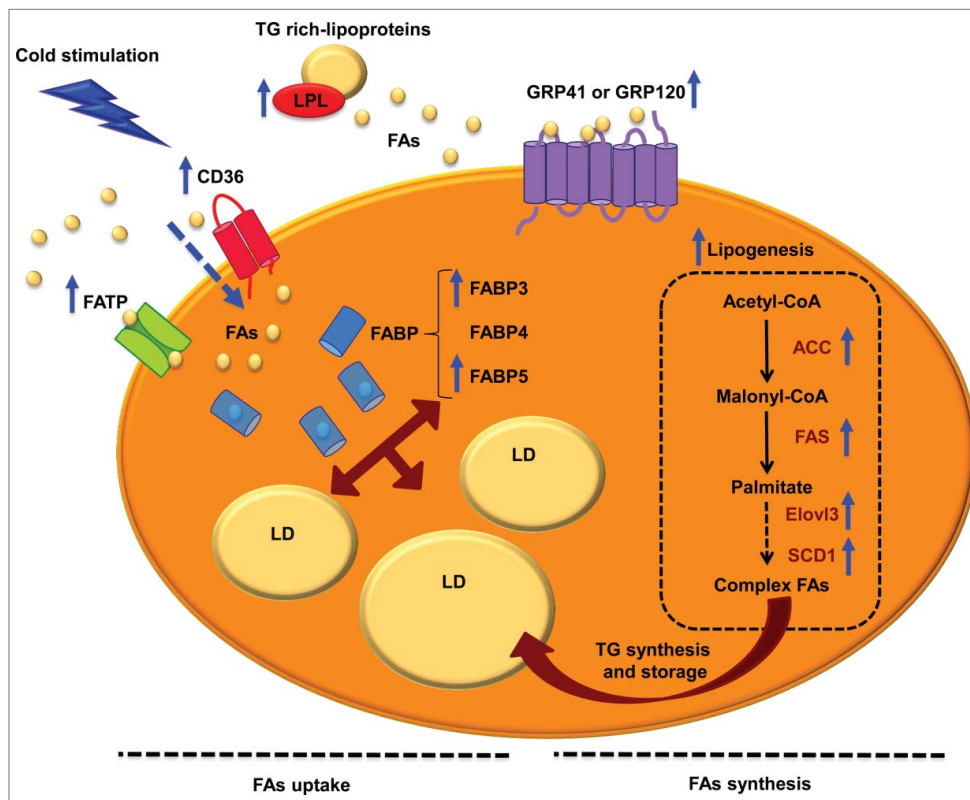


Figure 1. FA uptake and lipogenesis in brown adipocytes. Schematic representation of FA uptake, transport, synthesis and storage in brown adipocytes, which provide substrate to mitochondria for thermogenesis. While brown adipocytes synthesize FAs, the enzyme lipoprotein lipase (LPL) is the major source of FAs in BAT. Once triglyceride (TG) rich-lipoproteins reach the bloodstream, LPL hydrolyzes them into FFAs for BAT uptake. FAs are sensed and taken up by FFAs 3 (FFA3) proteins, cluster of differentiation 36 (CD36) and/or FA transport proteins (FATPs). Inside the cytoplasm, FAs are transported by FA binding proteins (FABP). On the other hand, FAs can be synthesized by lipogenesis. This process takes place in the cytosol, and the first phase begins with the formation of malonyl-CoA from acetyl-CoA by the action acetyl-CoA carboxylase (ACC). Then, FA synthetase (FAS) catalyzes various reactions to finally generate palmitate, a 16-carbon saturated FA. In BAT, the last phases of lipogenesis are carried out by very long chain FA 3 (ELOVL3) and stearoyl-CoA desaturase 1 (SCD1). Once FAs are synthesized they can be esterified, becoming available for FAO or stored as TG in lipid droplets (LD). Blue arrows indicate enhanced processes or expression of proteins after cold stimulation and β 3-adrenergic receptor activation.

elongation and desaturation. Lipogenesis begins with the carboxylation of acetyl-CoA to malonyl-CoA, the committed step catalyzed by acetyl-CoA carboxylase (ACC), which requires biotin cofactor.^{97,98} Finally, FA synthetase (FAS), a multifunctional cytosolic protein, catalyzes different reactions to form palmitate, a 16-carbon saturated FA.⁹³ It has been shown that adipose-specific FAS KO mice have increased energy expenditure, which comes from the browning of subcutaneous WAT.⁹⁹

In the second phase of lipogenesis, FAs derived from the FAS enzymatic reaction, are elongated by membrane-bound enzymes mostly localized in the ER.⁹³ This process is induced by the elongation of very long chain FA (ELOVL) proteins, which have 7 members in mice and humans.¹⁰⁰ Among them, Elov13 is expressed in BAT,¹⁰¹ and its expression and activity are upregulated under cold conditions to re-establish the intracellular pool of TG and preserve lipid homeostasis.¹⁰²⁻¹⁰⁴

ELOVL3 KO mice are resistant to diet-induced obesity, showing an increase in energy expenditure.¹⁰⁴

The final phase of lipogenesis is the desaturation of FAs. This process is catalyzed by desaturases, such as stearoyl-CoA desaturases (SCDs), which introduce double bonds at a specific position in a FA chain.^{93,97} SCD1 is the predominant isoform in adipose tissue and liver, and its downregulation in liver prevents diet-induced obesity.^{105,106} SCD1 KO mice show an increase in glucose uptake and glycogen metabolism, higher energy expenditure and basal thermogenesis in BAT.¹⁰⁷

Once FAs have been synthesized they can be esterified to be used for fatty acid oxidation (FAO) or stored as TG in lipid droplets. In BAT, the proper levels of TG are associated with thermogenic activity.¹⁰⁸ Since TG are composed of molecules of glycerol and 3 esterified FAs, TG synthesis depends on intracellular levels of glycerol-3-phosphate (G3P), the activated form of glycerol and

first intermediary in TG synthesis. Thus, G3P levels are preserved under rigorous control in brown adipocytes.⁶⁶ It has been shown that rosiglitazone, a PPAR γ agonist, increases BAT glycerolkinase activity, which phosphorylates glycerol generating G3P.⁶⁷ Since G3P comes from glucose, glucose metabolism plays a key role in BAT, as an important glucose-clearing organ, specifically under sympathetic activation.⁶⁵ In fact, G3P is a major substrate for BAT respiration.¹⁰⁹

In conclusion, coordinated FA uptake, transport and synthesis contribute to thermogenesis in BAT (Fig. 1). For this reason, the maintenance of the intracellular pool of TG to preserve lipid homeostasis in brown adipocytes is so important.^{110,111} Indeed, any of these processes might be a potential target in the treatment of obesity-related disorders, such as insulin resistance and diabetes.

Fatty acid storage

Cells package the excess of intracellular lipids in a phylogenetically conserved organelle called lipid droplet, preventing the lipotoxicity of lipids and cholesterol in the cytoplasm.^{112,113} Lipid droplets are composed of a neutral lipid core (cholesteryl ester and TGs) covered by a phospholipid monolayer, which contains proteins that regulate lipolysis. Among the lipid droplet membrane proteins found in brown adipocytes we will highlight fat storage-inducing transmembrane protein 2 (FITM2/FIT2), CIDEA and fat-specific protein 27 (FSP27 or CIDEC).

FITM2/FIT2 is strongly expressed in brown adipocytes and it determines the number of new lipid droplets formed in these cells.¹¹⁴ FIT2 KO mice show few but larger lipid droplets in interscapular BAT without changes in cellular TG levels.¹¹⁵ Thus, FIT2 is not essential for lipid droplet formation but it is required for normal storage of TG *in vivo*.

CIDEA is one of the 3 members of cell death-inducing DFF45-like effector (CIDE) family of proteins, which has emerged as an important regulator for various aspects of metabolism.¹¹⁶ CIDEA is highly expressed in lipid droplet membranes and mitochondria of brown adipocytes. It is involved in the browning phenomenon and it is considered as a BAT differentiation marker.^{117,118} CIDEA plays an inhibitory role during thermogenesis because it negatively modulates the activity of UCPI, being the first protein known to interact directly with an uncoupler protein.¹¹⁹⁻¹²¹ Moreover, CIDEA mRNA and protein are down-regulated after cold exposure¹²¹ and CIDEA-null mice are resistant to diet-induced obesity.¹¹⁸

FSP27 also belongs to the CIDE family, and it is over-expressed during adipogenesis in BAT. It has been

proposed as a novel lipid droplet protein that promotes TG storage and inhibits lipolysis, playing a key role in body energy homeostasis.^{122,123} FSP27 interacts directly with another lipid droplet protein, perilipin 1, which is involved in lipolysis by indirect activation of the adipose triglyceride lipase (ATGL) at the lipid droplet surface.¹²³ Furthermore, FSP27 KO mice have larger lipid droplets and higher TG serum levels.¹²⁴

Thus, the above-mentioned proteins involved in FA storage contribute to the multilocular phenotype of brown adipocytes. Lipid droplets prevent lipotoxicity and provide FAs as substrates for mitochondrial thermogenesis. Therefore, the regulation and function of these proteins might be a target for enhancing BAT activity.

Fatty acids as a source of energy

Lipolysis

Intracellular lipolysis is the catabolic process that allows cells to obtain FAs and glycerol from the breakdown of TG stored in lipid droplets. Cells use these FAs and glycerol endogenously in times of metabolic need with the exception of WAT, which can also export them to circulation so they can reach other tissues in fasting or exercise periods.¹²⁵ In BAT, lipolysis is vital to its main physiological function, the cold response. To raise body temperature BAT dissipates energy as heat and mobilizes FAs from the breakdown of TGs stored in lipid droplets to mitochondria for thermogenesis.¹⁰⁸ Lipolysis can be classified in 2 types depending on the pH-optimum of action of the enzymes involved. Accordingly, there is neutral lipolysis, which relies on 3 key enzymes that work at a pH-optimum of 7, and acid lipolysis that depends on lysosomal degradation of TG by acidic lipases. Next we will focus on neutral lipolysis.

Neutral lipolysis

Neutral lipolysis takes place in the cytosol and it is the result of the action of 3 consecutive lipases that hydrolyze each ester bond of TG to obtain 3 FAs and glycerol. The 3 major lipases are ATGL, hormone sensitive lipase (HSL) and monoacylglycerol lipase (MGL).

ATGL/Desnutrin/calcium-independent phospholipase A2 ζ (iPLA2 ζ) was discovered in 2004 by 3 independent laboratories.¹²⁶⁻¹²⁸ It is strongly expressed in both WAT and BAT and performs the first step of TG lipolysis, the hydrolysis of TG into diacylglycerides (DG) and FAs (Fig. 2).¹²⁹ It exhibits high substrate specificity for TG and it is associated with lipid droplets.¹²⁶ ATGL regulation is complex and mRNA or protein levels of the enzyme do not always correlate with enzyme activity.

This happens because ATGL has strong post translational regulation that often requires accessory proteins.¹³⁰ CGI-58 (Comparative gene identification-58) is a coactivator of ATGL that is necessary for full hydrolase activity.¹³¹ On the other hand, G0S2 (G0/G1 switch gene 2) inactivates ATGL.¹³² ATGL deficient mice accumulate TGs in all organs and have enlarged fat depots, especially BAT, which also displays defective thermogenesis.¹³³ Moreover, aP2-ATGL overexpressing mice display increased lipolysis and FAO in WAT and increased thermogenesis, resulting in higher energy expenditure and resistance to obesity.¹³⁴ Microarrays from ATGL KO BAT indicate a decrease in mRNA expression of genes involved in FAO and down-regulation of PPAR α target genes.^{135,136} In addition, a study using ATGL knock down brown adipocytes demonstrated that ATGL is required for the maximal induction of genes involved in

FAO and mitochondrial electron transport.¹³⁷ All together, these results point to the crucial role of lipolysis and its first step, TG hydrolysis by ATGL, in thermogenesis.

HSL performs the second step in TG lipolysis, hydrolyzing DG into MG and FAs (Fig. 2).¹³⁸ Similarly to ATGL, HSL mRNA and protein expression are highest in WAT and BAT.^{139,140} Although DG are its preferred substrate, HSL can also hydrolyze TG, cholesterol esters, MGs and retinyl esters.¹⁴¹ Before ATGL was known, HSL was believed to be the rate-limiting enzyme for TG hydrolysis. However, HSL-/- mice efficiently hydrolyze TG and accumulate large amounts of DG, indicating that, *in vivo*, HSL has a more important role as a DG than as a TG hydrolase.¹⁴² Activation of HSL occurs in 2 steps: protein phosphorylation and binding to perilipins.¹⁴³ HSL has 5 putative phosphorylation sites and

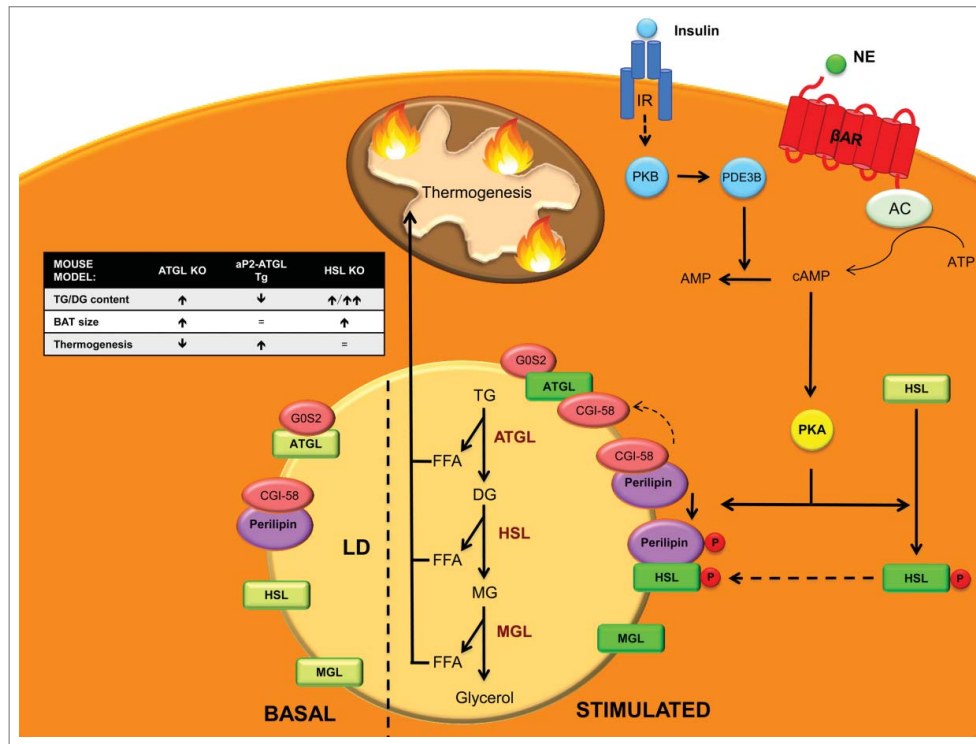


Figure 2. Neutral lipolysis players and regulation in BAT. Neutral lipolysis allows cells to obtain 3 free fatty acids (FFAs) and glycerol from the hydrolysis of triglycerides (TG). Three enzymes control this process: adipose triglyceride lipase (ATGL), which hydrolyzes TG into diacylglycerol (DG), hormone sensitive lipase (HSL), which has high affinity for DG and converts them into monoacylglycerols (MG) and monoacylglycerol lipase (MGL), which finalizes the hydrolysis of MG into glycerol and FFA that are used as a fuel for thermogenesis. In basal state ATGL is inhibited by G0/G1 switch gene 2 (G0S2) and ATGL co-activator comparative gene identification-58 (CGI-58) is kidnapped by perilipin. In addition, HSL is located in the cytosol and thus unable to reach its substrates. Upon β -adrenergic stimulation, adenyl cyclase (AC) increases cAMP levels that activate protein kinase A (PKA), which phosphorylates HSL promoting its translocation to the membrane of lipid droplets (LD). PKA also phosphorylates perilipin, which releases CGI-58 that can then fully activate ATGL. Phosphorylated perilipin also enhances HSL activity. On the other hand, insulin stimulation, through protein kinase B (PKB) activates phosphodiesterase 3B (PDE3B) which converts cAMP into AMP decreasing PKA activation and its lipolytic action. Figure insert: mouse models of the enzymes involved in neutral lipolysis. ATGL KO mice accumulate TGs and have enlarged BAT, which displays defective thermogenesis.¹³³ aP2-ATGL overexpressing mice show a reduction in TGs and increased thermogenesis.¹³⁴ HSL KO mice accumulate TGs and specially large amounts of DG leading to an enlarged BAT.¹⁴²

one of the most widely studied kinases that regulate its activity is cAMP-dependent Protein Kinase (PKA). Other kinases include AMPK, extracellular signal-regulated kinase (ERK), glycogen synthase kinase-4 and Ca²⁺/calmodulin dependent kinase II.¹³⁰

Glucagon, adrenaline or β 3-adrenergic agonist stimulation, through adenylyl cyclase (AC) activation increases cyclic AMP (cAMP) levels within the cell. This activates PKA that in turn phosphorylates HSL on serines 659 and 660, promoting its translocation from the cytoplasm to lipid droplets, where it acts on its substrates (Fig. 2).¹⁴⁴ Perilipins have an important role mediating this translocation, and PKA-mediated phosphorylation of perilipin is necessary for HSL translocation to lipid droplets and full induction of HSL activity. On the other hand, insulin activates cAMP phosphodiesterase, promoting cAMP hydrolysis, lowering PKA activity, HSL activation and lipolysis.¹⁴⁴ Mice lacking HSL display normal thermogenesis¹⁴⁵ and are not cold sensitive despite a lipolytic defect that results in brown adipocyte hypertrophy due to TG and DG accumulation. Apparently, during HSL deficiency sufficient amounts of FAs that are not HSL-dependent are mobilized for mitochondrial heat production. Later work on HSL null mice established that HSL KO mice are resistant to high-fat diet (HFD) effects due to an increase in energy expenditure.¹⁴⁶ This was linked to increased UCP1 and carnitine palmitoyltransferase (CPT) 1 expression levels in white adipocytes as well as an increase in white adipocyte mitochondrial size (see section 4.2.1 for more information). White adipocytes had increased basal O₂ consumption and increased uncoupling. In addition, HSL is required to sustain normal expression levels of retinoblastoma protein (pRb) and receptor interacting protein 140 (RIP140), which both promote differentiation into the white, rather than the brown, adipocyte lineage. Thus, HSL may be involved in the determination of white versus brown adipocytes during adipocyte differentiation.¹⁴⁶

MGL specifically hydrolyzes MG derived from intracellular and extracellular TG hydrolysis and phospholipid hydrolysis into FAs and glycerol, culminating the lipolysis process (Fig. 2). It is ubiquitously expressed in tissues and localizes in cell membrane, cytoplasm and lipid droplets.¹⁴⁷ MGL has been implicated in the degradation of the bioactive MG 2-arachidonoyl glycerol, which is a potent endogenous agonist of cannabinoid receptors.¹⁴⁸

Upon lipolysis stimulation the most important mechanisms regulating lipolysis are: 1) Activation of ATGL by CGI-58; and 2) PKA-mediated phosphorylation of HSL and perilipin 1 (Fig. 2). In basal state, CGI-58 is bound and kidnaped by perilipin 1, and thus unable to activate ATGL. In addition, HSL is located in the cytosol far

from its substrates. Upon hormonal stimulation, PKA phosphorylates HSL, promoting its translocation to the lipid droplet surface, where it hydrolyzes its substrates.^{149,150} In addition, PKA phosphorylates perilipin 1, liberating CGI-58, which is then available to bind and activate ATGL.¹⁵¹

The final result of lipolysis is the provision of energy to the cell in the form of FFAs and glycerol. Elevated levels of FFAs can be toxic for cells.⁸ Brown adipocytes can prevent this lipotoxicity by matching this increment in FFAs with an increase in oxidative capacity. β 3-adrenergic stimulation triggers lipase activation, resulting in a rise of lipolytic products that act as ligands of PPAR α and PPAR δ . PPAR activation promotes expression of oxidative genes such as UCP1 or PGC1 α and as a result expands the oxidative capacity to match FA supply.¹³⁷ These findings highlight the importance of coupling lipolysis with increased oxidative capacity, which ultimately depends on the uptake of FAs to the mitochondria for FAO by carnitine acyltransferases.

Fatty acid oxidation

Consistent with its physiological role, BAT presents one of the highest FAO rates in the body.¹⁵² Most of the oxidation of longchain fatty acids (LCFAs) to acetyl-CoA takes place in the mitochondrial matrix, although peroxisomal FAO has also been implicated in thermogenesis.

Mitochondrial fatty acid oxidation

Traditionally, research on the regulation of BAT thermogenesis has focused on the central role of UCP1 in maximizing rates of proton leak and heat production. In fact, FAs and HFD activate UCP1 and diet-induced thermogenesis.¹⁵³⁻¹⁵⁵ However, studies by Yu *et al.*¹⁵⁶ support the hypothesis that additional systems and genes cooperate in the thermogenic system. These authors demonstrated that cold induces simultaneous FA synthesis and FAO in murine BAT. Similar conclusions were obtained by Mottillo *et al.*⁹⁶ In addition, it has recently been reported in primary brown adipocyte culture that intracellular FA levels are critical for thermogenesis¹⁵⁷ and that in rodents maximal BAT thermogenesis relies on the levels of LCFA pool, which activates entry to the mitochondria.¹⁵⁸ Acyl-CoA synthetase-1 (ACSL) mediates the conversion of FAs to acyl-CoA and specifically directs them toward mitochondrial FAO via the CPT1 system (Fig. 3). Experiments with ACSL KO mice showed that ACSL is required for cold thermogenesis.¹⁵⁹

The CPT system permits the entry of LCFAs into the mitochondrial matrix, where they can undergo FAO.

The first component of the system, CPT1 is located on the mitochondrial outer membrane (Fig. 3). This enzyme catalyzes the *trans* esterification of a fatty acyl group from CoA to carnitine, which is considered the rate-limiting step in the regulation of mitochondrial FAO of FAs.^{160,161} Acylcarnitines are shuttled to the mitochondrial matrix by the transporter carnitine/acylcarnitine translocase (CACT). Once inside the mitochondria, acylcarnitines are converted to acyl-CoA by CPT2, located in the inner mitochondrial membrane, and can thus enter the FAO cycle. There are 3 isoforms of CPT1, denoted CPT1A,^{162,163} CPT1B¹⁶⁴ and CPT1C.¹⁶⁵ They differ in their sequence, tissue distribution, intracellular location, kinetics and malonyl-CoA sensitivity. CPT1B is strongly expressed in BAT, skeletal muscle, heart, testis and, in some species, in WAT (human, rat and hamster)^{108,166} while CPT1A is predominant in other tissues such as liver, kidney, lung, ovary, spleen, brain, intestine, mouse WAT and pancreas. CPT1C appears to be expressed exclusively in the neurons and testis. While CPT1A and B are located on the mitochondrial outer membrane and both isoforms are involved in the regulation of the flux

of FAs into the mitochondria, CPT1C has been found on the ER membrane¹⁶⁷ and its function seems to be related with ceramide metabolism rather than FAO.^{168,169}

CPT1A and B isoforms have high sequence similarity but show important kinetic differences. In particular, they differ in their affinities for the substrate carnitine and their physiological inhibitor malonyl-CoA,¹⁷⁰ which is synthesized from acetyl-CoA by ACC and is degraded by malonyl-CoA decarboxylase.¹⁷¹ CPT1B has higher affinity for the inhibitor malonyl-CoA and lower affinity for carnitine than CPT1A.^{172,173} Doh et al.¹⁵² examined the relation between the long-chain FAO rate and the CPT1A and CPT1B activity in different tissues. They found that all the tissues containing CPT1B showed a strong positive correlation between palmitate oxidation rate and the CPT1 activity and, among the tissues with CPT1B (heart, red and white gastrocnemius and BAT), BAT showed the highest palmitate oxidation and CPT1 activity. In addition, mice lacking CPT1B die during cold-exposure as a result of their inability to perform thermogenesis.¹⁷⁴ These observations indicate that CPT1B may play an important role in enhancing BAT

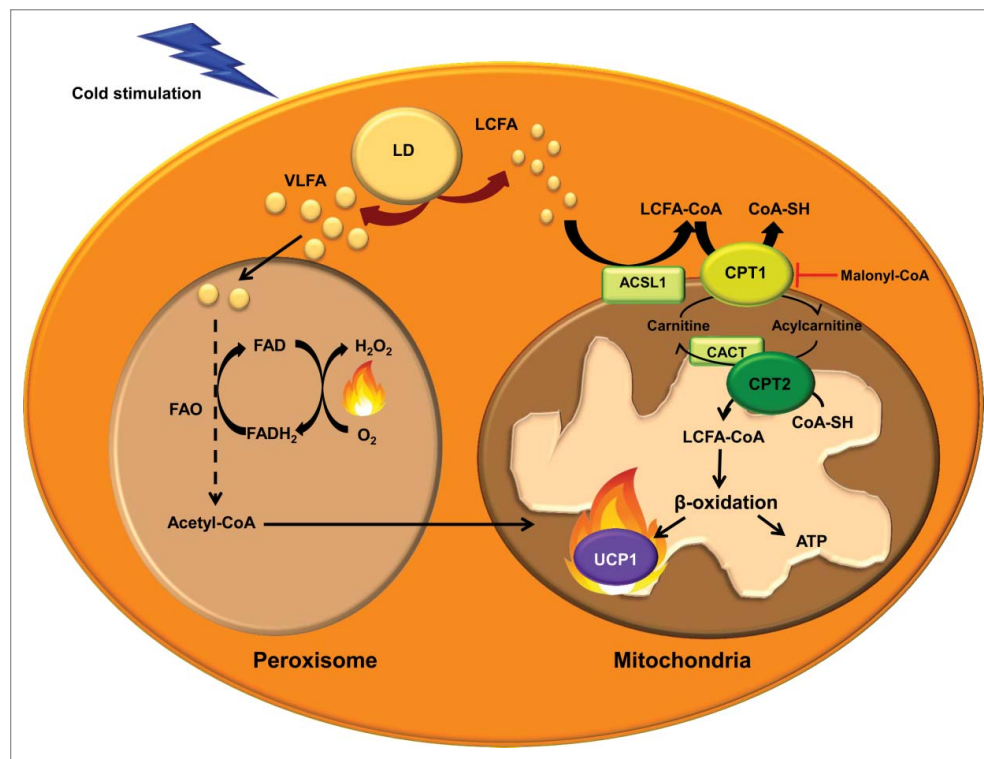


Figure 3. Mitochondrial and peroxisomal fatty acid oxidation. Transport of long-chain fatty acids (LCFAs) from the cytosol to the mitochondrial matrix for FAO involves the activation to acyl-CoA by acyl-CoA synthetase-1 (ACSL), conversion of LCFA-CoA to LCFA-carnitines by carnitine palmitoyltransferase (CPT) 1, translocation across the inner mitochondrial membrane by the carnitine/acylcarnitine translocase (CACT) and reconversion to LCFA-CoA by CPT2. These acyl-CoAs are β -oxidized and render acetyl-CoA. The entry of acetyl-CoA to the tricarboxylic acid cycle generates NADH and FADH. These cofactors transfer the electrons to the electron transport chain, where the protons are transported to the mitochondrial intermembrane space to generate energy as ATP. UCP1 dissipates the proton gradient, releasing energy as heat. Very long chain fatty acids (VLFA) enter the peroxisome to be shortened by peroxisomal FAO. Shortened acyl-CoAs and acetyl-CoA are transported to the mitochondria to be completely oxidized.

thermogenesis. Indeed, inhibitors of CPT1 also inhibit mitochondrial respiration driven by LCFA in murine BAT.¹⁵⁸ Interestingly, BAT of diabetic rats showed decreased CPT1 activity and FAO.¹⁷⁵ Further, a recent study in adipose CPT2 KO mice demonstrated that FAO is required for both acute cold adaptation and the induction of thermogenic genes in BAT.¹⁷⁶ Taking into account the effect that this and other mitochondrial FAO alterations¹⁷⁷ produce in thermogenesis and cold intolerance, it could be an appealing strategy to enhance FAO in BAT mitochondria to increase energy expenditure and fight against obesity-induced metabolic disorders. Studies enhancing FAO by CPT1 overexpression in the context of obesity have shown a decrease in TG content and an improvement in insulin sensitivity.¹⁷⁸⁻¹⁸⁸ These results indicate that activation of FAO may provide the basis for the development of novel treatment options for obesity.¹⁸⁹

Peroxisomal fatty acid oxidation

Oxidation of very long chain FAs preferentially occurs in peroxisomes rather than in mitochondria (Fig. 3).¹⁹⁰ However, FAO in peroxisomes is not carried to completion. Since peroxisomes, unlike mitochondria, lack a citric-acid cycle and respiratory chain, shorter FAs can be shuttled to the mitochondria to be oxidized. During cold exposure peroxisomal FAO is also activated in BAT.¹⁹¹ Furthermore, catalase protein, a marker of the quantity of peroxisomes, is dramatically increased in rat BAT under cold exposure.¹⁹² However, the contribution of peroxisomal FAO to thermogenesis is not well established. Acetyl-CoAs produced by peroxisomal FAO may enter the mitochondria to fuel UCP1-mediated thermogenesis. Alternatively, a recent review by Lodhi *et al.*¹⁹³ suggests that peroxisomal FAO may contribute to adaptive thermogenesis independently of UCP1 by the generation of heat instead of ATP. Peroxisomes do not have a respiratory chain and the electrons from FADH₂, obtained in the first step of peroxisomal FAO, are transferred by the flavoprotein acyl-CoA oxidase directly to O₂ producing H₂O₂, and energy is released as heat.

In summary, mitochondrial and peroxisomal FAO are necessary for thermogenesis in BAT, and enhancing these catabolic processes is an unexplored strategy in our fight against the current obesity epidemic.

Future directions: BAT fat-burning power as a potential therapy against obesity

Despite the considerable current effort made worldwide, the prevalence of obesity and associated metabolic diseases is rising exponentially, jointly with their healthcare costs. The first line therapy is based on behavioral

modifications, including healthy eating and exercise. However, this meets limited success when it comes to long-term maintenance of weight loss. Bariatric surgery achieves a sustained weight loss over the years, but its cost and associated dangers reduce its clinical indication to morbidly obese patients.¹⁹⁴ Moreover, the endocrine effects of bariatric surgery seem to be more important than the mechanically induced food restriction, which has led many researchers to assess obesity treatments based on the endocrine modifications derived from it.¹⁹⁵ Interestingly, bariatric surgery also leads to alterations in the microbiome.¹⁹⁶

Even though the list of potential anti-obesity drugs is increasing, the approval of new anti-obesity drugs has met relatively limited success. This is due to the history of withdrawals of anti-obesity drugs from the market due to serious adverse effects (i.e., dinitrophenol, fenfluramine, dexfenfluramine, phenylpropanolamine, sibutramine and rimonabant).^{197,198} This has led US Food and Drug Administration (FDA) and European Medicines Agency (EMA) to make it harder for pharmaceutical corporations to market new anti-obesity drugs, especially in the case of the European regulator.¹⁹⁹ Today, the lipase inhibitor orlistat is approved by both FDA and EMA but it has shown limited long-term effectiveness.²⁰⁰ In the US, the serotonergic lorcaserin is also approved,^{201,202} but its European marketing authorization application has been withdrawn because of the lack of evidence regarding safety in tumorigenesis in long-term use.²⁰³ Liraglutide, a previously approved antidiabetic drug, has recently been approved by both regulators for an anti-obesity indication.^{204,205} Nonetheless, the fixed-dose combination of bupropion/naltrexone, which is described to act in the central nervous system (CNS) by increasing POMC neuron activity, has obtained marketing approval as an anti-obesity drug by the FDA,²⁰⁶ but the EMA seems to be much more conservative regarding the approval of weight-management drug with effect on the CNS.²⁰⁷

The mechanisms of action of obesity-management drugs are classified into 3 groups:²⁰⁸ 1) centrally acting medications impairing dietary intake (including bupropion/naltrexone and lorcaserin); 2) medications that act peripherally to impair dietary absorption (e.g., orlistat); and 3) medications that increase energy expenditure, whose effect is mediated by CNS. We propose that the increase in energy expenditure is a promising way to manage obesity, but only if this could be achieved via a direct effect on peripheral tissues without involving the CNS. Thus, some of the collateral effects, which caused other drugs to be withdrawn, would be overcome. Here we highlight an increase in FAO as a potential approach to enhance energy expenditure in peripheral tissues.

Several studies enhancing FAO by CPT1 overexpression in the context of obesity have shown an improved metabolic phenotype.¹⁷⁸⁻¹⁸⁷ Thus, an increasing body of evidence highlights FAO activation as a potential target to develop novel anti-obesity strategies.

The pathogenesis of obesity is multifactorial and complex. However, the rediscovery of active BAT in adult humans and its relevance in metabolism has put a spotlight on this tissue as a potential target for therapies against obesity and metabolic diseases. A large number of activators of thermogenesis are increasingly being identified. This year, the β 3-adrenergic receptor agonist mirabegron, the first compound able to stimulate human BAT thermogenesis and to increase resting metabolic rate, has been described.⁵⁹ Although further studies are needed to explore the specificity of its mechanism of action and potential adverse effects, mirabegron provides the first evidence of human BAT thermogenesis stimulation.

As a controller of thermogenesis BAT is a good modulator of triglyceridemia, an important consumer of glucose and the major plasma lipid-clearing organ in rodents. Furthermore, diabetes has been shown to decrease CPT1 activity and FAO in rat BAT.¹⁷⁵ Thus, strategies designed to enhance the fat-burning power of BAT and to increase lipid mobilization and oxidation could be very useful in the treatment of obesity and associated pathologies. Traditionally, most research has focused on the activation of BAT thermogenesis through UCP1. However, recent studies have shown that cold stimulates both FA synthesis and FAO in murine BAT.^{96,156} Moreover, BAT peroxisomal FAO may generate heat independently of UCP1.¹⁹³ BAT transplantation is another strategy proving BAT's lipid-burning capacity in obesity. BAT transplantation to HFD-induced obese mice has shown a beneficial effect improving whole-body energy metabolism by increasing FAO-related genes such as PPAR α , PGC1 α , CPT1B and UCP1 in endogenous BAT.²⁰⁹ Although the present review is focused on obesity, it is noteworthy to mention the role of BAT in atherosclerosis. Data showing both a positive and negative effect of BAT activation in the development of atherosclerosis have been reported.^{210,211} On the one hand, Dong et al.²¹⁰ showed that sustained cold exposure accelerated the atherosclerotic plaque development by increasing plasma levels of small low-density lipoproteins (LDL) in apolipoprotein E (*ApoE*) and LDL receptor (*LDLr*) deficient atherosclerosis mouse models. On the other hand, Berbee et al.²¹¹ reported that APOE*3-Leiden.CETP mice (a model for human-like lipoprotein metabolism) treated with Western diet, to induce hyperlipidaemia and atherosclerosis, plus CL316243 (a β 3-adrenergic receptor agonist) had fewer atherosclerotic lesions. In this case BAT activation lead to enhanced uptake of FAs from

TG-rich lipoproteins into BAT and increased hepatic clearance of cholesterol-enriched remnants and lower plasma cholesterol levels. The apparent opposite effects between the 2 studies could be explained by the different mouse model used. ApoE and LDL receptor are essential for hepatic clearance of TG-rich lipoprotein remnants. Thus, this pathway is blocked in *ApoE* (-/-) or *LDLr* (-/-) mice but not in APOE*3-Leiden.CETP mice. In fact, the antiatherogenic effect seen by Berbee *et al.* was blunted in *ApoE* (-/-) or *LDLr* (-/-) mice. Importantly, mice treated with the β 3-receptor agonist lost weight and had increased FAO. This indicates that the beneficial effect of BAT activation on atherosclerosis could be the consequence of decreased obesity and enhanced FAO shedding light into FAO as a potential target to fight against obesity-induced metabolic disorders such as atherosclerosis.

At least 3 questions still need to be answered before increased BAT FAO can become an effective approach for obesity therapy. First, it is not known whether FAO enhancement might reach a limit in BAT, in which thermogenesis is tightly adjusted to the environmental temperature. Second, since increasing flux through FAO would only make sense together with a corresponding enhancement of energy demand,²¹² the physiological relevance of this strategy might be questioned if the individual is at thermoneutrality. Third, secondary effects of BAT pharmacological activation may include excessive body temperature or increased food intake as a compensatory effect to re-establish energy balance. Increased BAT FAO may augment mitochondrial burning capacity through an increase in the number of mitochondria and/or the increased expression of UCPs, and thus dissipate the excess of energy as heat and ATP. These could well alleviate the mitochondrial pressure found in lipid overload states.

In summary, an increase in FAO and BAT mass and/or activity could indeed be one of the underlying protective mechanisms against obesity-induced metabolic abnormalities. Although more research is needed, we strongly believe that enhancing BAT thermogenic power through increased FAO may be available in the near future as a therapy to treat obesity and its associated severe diseases.

Abbreviations

AC	adenyl cyclase
ACC	acetyl-CoA carboxylase
AMPK	AMP-dependent protein kinase
ATG	autophagy-related protein
ATGL	adipose triglyceride lipase
BAT	brown adipose tissue

BMP8b	bone morphogenetic protein 8b
cAMP	cyclic AMP
CIDEA	cell death-inducing DNA fragmentation factor- α -like effector A
CGI-58	comparative gene identification-58
CNS	central nervous system
CPT	carnitine palmitoyltransferase
DG	diacylglycerol
DIO2	type 2 iodothyronine deiodinase
ELOVL	elongation of very long chain FA
ER	endoplasmic reticulum
FA	fatty acid
FAO	fatty acid oxidation
FFA	free fatty acids
FGF21	fibroblast growth factor 21
G0S2	G0/G1 switch gene 2
GPCRs	G-protein-coupled receptors
HFD	high-fat diet
HSL	hormone-sensitive lipase
IGF-1	insulin-like growth factor I
IL-1 β	interleukin-1 β
IL-6	interleukin-6
KO	knockout
LAL	lysosomal acid lipase
MEFs	primary mouse fibroblasts
MG	monoacylglycerol
MGL	monoacylglycerol lipase
Myf5+	myogenic factor 5-positive
iPLA2 ζ	calcium-independent phospholipase A2 ζ
PGC1 α	peroxisome proliferator activated receptor gamma coactivator 1 alpha
PKA	protein kinase A
PKB	protein kinase B
PRDM16	PR domain-containing 16
pRb	retinoblastoma protein
RIP140	receptor interacting protein 140
TG	triglyceride
TNF α	tumor necrosis factor α
UCP1	uncoupling protein-1
WAT	white adipose tissue

Disclosure of potential conflicts of interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

Acknowledgment

We thank Robin Rycroft for valuable assistance in the preparation of the English manuscript.

Funding

This work was supported by the Ministry of Spain (SAF2013-45887-R to LH, SAF2014-52223-C2-1-R to DS

(grant cofounded by Fondos Europeos de Desarrollo Regional de la Unión Europea (FEDER)) and doctoral fellowship to JFM), by the Centro de Investigación Biomédica en Red Fisiopatología de la Obesidad y la Nutrición (CIBEROBN) (Grant CB06/03/0001 to DS), by Generalitat de Catalunya (2014SGR465 to DS), and by the European Foundation for the Study of Diabetes (EFSD)/Janssen-Rising Star and L'Oréal-UNESCO "For Women in Science" research fellowships to LH. MW is a recipient of the Ciència sem Fronteiras-CNPq fellowship (237976/2012-9).

References

1. World Health Organization. Obesity and overweight. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/> (accessed 1 October 2015)
2. Mathis D. Immunological goings-on in visceral adipose tissue. *Cell Metab* 2013; 17:851-9; PMID:23747244; <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2013.05.008>
3. Samuel VT, Shulman GI. Mechanisms for insulin resistance: common threads and missing links. *Cell* 2012; 148:852-71; PMID:22385956; <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2012.02.017>
4. Shoelson SE, Herrero L, Naaz A. Obesity, inflammation, and insulin resistance. *Gastroenterology* 2007; 132:2169-80; PMID:17498510; <http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2007.03.059>
5. Hotamisligil GS. Endoplasmic reticulum stress and the inflammatory basis of metabolic disease. *Cell* 2010; 140:900-17; PMID:20303879; <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2010.02.034>
6. Hosogai N, Fukuhara A, Oshima K, Miyata Y, Tanaka S, Segawa K, Furukawa S, Tochino Y, Komuro R, Matsuda M, et al. Adipose tissue hypoxia in obesity and its impact on adipocytokine dysregulation. *Diabetes* 2007; 56:901-11; PMID:17395738; <http://dx.doi.org/10.2337/db06-0911>
7. Patti M-E, Corvera S. The role of mitochondria in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Endocr Rev* 2010; 31:364-95; PMID:20156986; <http://dx.doi.org/10.1210/er.2009-0027>
8. Virtue S, Vidal-Puig A. Adipose tissue expandability, lipotoxicity and the Metabolic Syndrome—an allostatic perspective. *Biochim Biophys Acta* 2010; 1801:338-49; PMID:20056169; <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbali.2009.12.006>
9. Sun K, Kusminski CM, Scherer PE. Adipose tissue remodeling and obesity. *J Clin Invest* 2011; 121:2094-101; PMID:21633177; <http://dx.doi.org/10.1172/JCI45887>
10. Sun K, Wernstedt Asterholm I, Kusminski CM, Bueno AC, Wang ZV, Pollard JW, Brekken RA, Scherer PE. Dichotomous effects of VEGF-A on adipose tissue dysfunction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012; 109:5874-9; PMID:22451920; <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1200447109>
11. Hany TF, Gharehpapagh E, Kamel EM, Buck A, Himmshagen J, Von Schulthess GK. Brown adipose tissue: a factor to consider in symmetrical tracer uptake in the neck and upper chest region. *Eur J Nucl Med* 2002; 29:1393-8; PMID:12271425; <http://dx.doi.org/10.1007/s00259-002-0902-6>

12. Nedergaard J, Bengtsson T, Cannon B. Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007; 293:E444-52; PMID:17473055; <http://dx.doi.org/10.1152/ajpendo.00691.2006>
13. Cypess AM, Lehman S, Williams G, Tal I, Rodman D, Goldfine AB, Kuo FC, Palmer EL, Tseng YH, Doria A, et al. Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. *N Engl J Med* 2009; 360:1509-17; PMID:19357406; <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa0810780>
14. Virtanen KA, Lidell ME, Orava J, Heglind M, Westergren R, Niemi T, Taittonen M, Laine J, Savisto NJ, Enerback S, et al. Functional brown adipose tissue in healthy adults. *N Engl J Med* 2009; 360:1518-25; PMID:19357407; <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa0808949>
15. Zingaretti MC, Crosta F, Vitali A, Guerrieri M, Frontini A, Cannon B, Nedergaard J, Cinti S. The presence of UCP1 demonstrates that metabolically active adipose tissue in the neck of adult humans truly represents brown adipose tissue. *Faseb J* 2009; 23:3113-20; PMID:19417078; <http://dx.doi.org/10.1096/fj.09-133546>
16. Saito M, Okamatsu-Ogura Y, Matsushita M, Watanabe K, Yoneshiro T, Nio-Kobayashi J, Iwanaga T, Miyagawa M, Kameya T, Nakada K, et al. High incidence of metabolically active brown adipose tissue in healthy adult humans: effects of cold exposure and adiposity. *Diabetes* 2009; 58:1526-31; PMID:19401428; <http://dx.doi.org/10.2337/db09-0530>
17. Van Marken Lichtenbelt WD, Vanhomerig JW, Smulders NM, Drossaerts JM, Kemerink GJ, Bouvy ND, Schrauwen P, Teule GJ. Cold-activated brown adipose tissue in healthy men. *N Engl J Med* 2009; 360:1500-8; PMID:19357405; <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa0808718>
18. Mailloux RJ, Harper M-E. Uncoupling proteins and the control of mitochondrial reactive oxygen species production. *Free Radic Biol Med* 2011; 51:1106-15; PMID:21762777; <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.06.022>
19. Frontini A, Cinti S. Distribution and development of brown adipocytes in the murine and human adipose organ. *Cell Metab* 2010; 11:253-6; PMID:20374956; <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2010.03.004>
20. Cypess AM, White AP, Vernochet C, Schulz TJ, Xue R, Sass CA, Huang TL, Roberts-Toler C, Weiner LS, Sze C, et al. Anatomical localization, gene expression profiling and functional characterization of adult human neck brown fat. *Nat Med* 2013; 19:635-9; PMID:23603815; <http://dx.doi.org/10.1038/nm.3112>
21. Cinti S. Between brown and white: novel aspects of adipocyte differentiation. *Ann Med* 2011; 43:104-15; PMID:21254898; <http://dx.doi.org/10.3109/07853890.2010.535557>
22. Tseng YH, Cypess AM, Kahn CR. Cellular bioenergetics as a target for obesity therapy. *Nat Rev Drug Discov* 2010; 9:465-82; PMID:20514071; <http://dx.doi.org/10.1038/nrd3138>
23. Xue R, Lynes MD, Dreyfuss JM, Shamsi F, Schulz TJ, Zhang H, Huang TL, Townsend KL, Li Y, Takahashi H, et al. Clonal analyses and gene profiling identify genetic biomarkers of the thermogenic potential of human brown and white preadipocytes. *Nat Med* 2015; 21:760-8; PMID:26076036; <http://dx.doi.org/10.1038/nm.3881>
24. Jespersen NZ, Larsen TJ, Peijs L, Dagaard S, Homøe P, Loft A, de Jong J, Mathur N, Cannon B, Nedergaard J, et al. A classical brown adipose tissue mRNA signature partly overlaps with brite in the supraclavicular region of adult humans. *Cell Metab* 2013; 17:798-805; PMID:23663743; <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2013.04.011>
25. Lidell ME, Betz MJ, Dahlqvist Leinhard O, Heglind M, Elander L, Slawik M, Mussack T, Nilsson D, Romu T, Nuutila P, et al. Evidence for two types of brown adipose tissue in humans. *Nat Med* 2013; 19:631-4; PMID:23603813; <http://dx.doi.org/10.1038/nm.3017>
26. Sharp LZ, Shinoda K, Ohno H, Scheel DW, Tomoda E, Ruiz L, Hu H, Wang L, Pavlova Z, Gilsanz V, et al. Human BAT possesses molecular signatures that resemble beige/brite cells. *PLoS One* 2012; 7:e49452; PMID:23166672; <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0049452>
27. Wu J, Boström P, Sparks LM, Ye L, Choi JH, Giang A-H, Khandekar M, Virtanen KA, Nuutila P, Schaart G, et al. Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. *Cell* 2012; 150:366-76; PMID:22796012; <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2012.05.016>
28. Villarroya J, Cereijo R, Villarroya F. An endocrine role for brown adipose tissue? *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2013; 305:E567-72; PMID:23839524; <http://dx.doi.org/10.1152/ajpendo.00250.2013>
29. Gesta S, Tseng YH, Kahn CR. Developmental origin of fat: tracking obesity to its source. *Cell* 2007; 131:242-56; PMID:17956727; <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2007.10.004>
30. Ortega FJ, Jilkova ZM, Moreno-Navarrete JM, Pavelka S, Rodriguez-Hermosa JI, Kopeck Ygrave J, Fernandez-Real JM. Type I iodothyronine 5'-deiodinase mRNA and activity is increased in adipose tissue of obese subjects. *Int J Obes* 2011; 36:320-4; PMID:21610697; <http://dx.doi.org/10.1038/ijo.2011.101>
31. Peirce V, Carobbio S, Vidal-Puig A. The different shades of fat. *Nature* 2014; 510:76-83; PMID:24899307; <http://dx.doi.org/10.1038/nature13477>
32. Waldén TB, Hansen IR, Timmons JA, Cannon B, Nedergaard J. Recruited vs. nonrecruited molecular signatures of brown, "brite," and white adipose tissues. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2012; 302:E19-31; PMID:21828341; <http://dx.doi.org/10.1152/ajpendo.00249.2011>
33. Bartelt A, Heeren J. Adipose tissue browning and metabolic health. *Nat Rev Endocrinol* 2014; 10:24-36; PMID:24146030; <http://dx.doi.org/10.1038/nrendo.2013.204>
34. Rosenwald M, Wolfrum C. The origin and definition of brite versus white and classical brown adipocytes. *Adipocyte* 2014; 3:4-9; PMID:24575363; <http://dx.doi.org/10.4161/adip.26232>
35. Timmons JA, Wennmalm K, Larsson O, Walden TB, Lassmann T, Petrovic N, Hamilton DL, Gimeno RE, Wahlestedt C, Baar K, et al. Myogenic gene expression signature establishes that brown and white adipocytes originate from distinct cell lineages. *Proc Natl Acad Sci*

- U S A 2007; 104:4401-6; PMID:17360536; <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0610615104>
36. Sanchez-Gurmaches J, Hung C-M, Sparks CA, Tang Y, Li H, Guertin DA. PTEN loss in the Myf5 lineage redistributes body fat and reveals subsets of white adipocytes that arise from Myf5 precursors. *Cell Metab* 2012; 16:348-62; PMID:22940198; <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2012.08.003>
 37. Tseng Y-H, Cypess AM, Kahn CR. Cellular bioenergetics as a target for obesity therapy. *Nat Rev Drug Discov* 2010; 9:465-82; PMID:20514071; <http://dx.doi.org/10.1038/nrd3138>
 38. Kajimura S, Spiegelman BM, Seale P. Brown and beige fat: physiological roles beyond heat generation. *Cell Metab* 2015; 22:546-59; PMID:26445512; <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2015.09.007>
 39. Zhou Q, Melton DA. Extreme makeover: converting one cell into another. *Cell Stem Cell* 2008; 3:382-8; PMID:18940730; <http://dx.doi.org/10.1016/j.stem.2008.09.015>
 40. Barbatelli G, Murano I, Madsen L, Hao Q, Jimenez M, Kristiansen K, Giacobino JP, De Matteis R, Cinti S. The emergence of cold-induced brown adipocytes in mouse white fat depots is determined predominantly by white to brown adipocyte transdifferentiation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2010; 298:E1244-53; PMID:20354155; <http://dx.doi.org/10.1152/ajpendo.00600.2009>
 41. Barbatelli G, Morroni M, Vinesi P, Cinti S, Michetti F. S-100 protein in rat brown adipose tissue under different functional conditions: a morphological, immunocytochemical, and immunochemical study. *Exp Cell Res* 1993; 208:226-31; PMID:8359217; <http://dx.doi.org/10.1006/excr.1993.1241>
 42. Himms-Hagen J, Melnyk A, Zingaretti MC, Ceresi E, Barbatelli G, Cinti S. Multilocular fat cells in WAT of CL-316243-treated rats derive directly from white adipocytes. *Am J Physiol Cell Physiol* 2000; 279:C670-81; PMID:10942717
 43. Rosenwald M, Perdikari A, Rüllicke T, Wolfrum C. Bidirectional interconversion of brite and white adipocytes. *Nat Cell Biol* 2013; 15:659-67; PMID:23624403; <http://dx.doi.org/10.1038/ncb2740>
 44. Lee Y-H, Petkova AP, Mottillo EP, Granneman JG. In vivo identification of bipotential adipocyte progenitors recruited by β 3-adrenoceptor activation and high-fat feeding. *Cell Metab* 2012; 15:480-91; PMID:22482730; <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2012.03.009>
 45. Schulz TJ, Huang P, Huang TL, Xue R, McDougall LE, Townsend KL, Cypess AM, Mishina Y, Gussoni E, Tseng Y-H. Brown-fat paucity due to impaired BMP signalling induces compensatory browning of white fat. *Nature* 2013; 495:379-83; PMID:23485971; <http://dx.doi.org/10.1038/nature11943>
 46. Tsoi M, Moore M, Burg D, Painter A, Taylor R, Lockie SH, Turner N, Warren A, Cooney G, Oldfield B, et al. Activation of thermogenesis in brown adipose tissue and dysregulated lipid metabolism associated with cancer cachexia in mice. *Cancer Res* 2012; 72:4372-82; PMID:22719069; <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-3536>
 47. Vijgen GHEJ, Bouvy ND, Smidt M, Kooreman L, Schaart G, van Marken Lichtenbelt W. Hibernoma with metabolic impact? *BMJ Case Rep* 2012; 2012:bcr2012006325-bcr2012006325; PMID:22914232
 48. Radi Z, Bartholomew P, Elwell M, Vogel WM. Comparative pathophysiology, toxicology, and human cancer risk assessment of pharmaceutical-induced hibernoma. *Toxicol Appl Pharmacol* 2013; 273:456-63; PMID:24141031; <http://dx.doi.org/10.1016/j.taap.2013.10.011>
 49. Nedergaard J, Cannon B. The browning of white adipose tissue: some burning issues. *Cell Metab* 2014; 20:396-407; PMID:25127354; <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2014.07.005>
 50. Lo JC, Cinti S, Tu H, Kajimura S, Korde A, Choi JH, Wu J, Zingaretti MC, Rasbach KA, Vind BF, et al. A PGC1- α -dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis. *Nature* 2012; 481:463-8; PMID:22237023; <http://dx.doi.org/10.1038/nature10777>
 51. Bordicchia M, Liu D, Amri EZ, Ailhaud G, Dessi-Fulgheri P, Zhang C, Takahashi N, Sarzani R, Collins S. Cardiac natriuretic peptides act via p38 MAPK to induce the brown fat thermogenic program in mouse and human adipocytes. *J Clin Invest* 2012; 122:1022-36; PMID:22307324; <http://dx.doi.org/10.1172/JCI59701>
 52. Boon MR, van den Berg SAA, Wang Y, van den Bossche J, Karkampouna S, Bauwens M, De Saint-Hubert M, van der Horst G, Vukicevic S, de Winther MPJ, et al. BMP7 activates brown adipose tissue and reduces diet-induced obesity only at subthermoneutrality. *PLoS One* 2013; 8:e74083; PMID:24066098; <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0074083>
 53. Whittle AJ, Carobbio S, Martins L, Slawik M, Hondares E, Vazquez MJ, Morgan D, Csikasz RI, Gallego R, Rodriguez-Cuenca S, et al. BMP8B increases brown adipose tissue thermogenesis through both central and peripheral actions. *Cell* 2012; 149:871-85; PMID:22579288; <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2012.02.066>
 54. Villarroya F, Vidal-Puig A. Beyond the sympathetic tone: the new brown fat activators. *Cell Metab* 2013; 17:638-43; PMID:23583169; <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2013.02.020>
 55. Rao RR, Long JZ, White JP, Svensson KJ, Lou J, Lokurkar I, Jedrychowski MP, Ruas JL, Wrann CD, Lo JC, et al. Meteorin-like is a hormone that regulates immune-adipose interactions to increase beige fat thermogenesis. *Cell* 2014; 157:1279-91; PMID:24906147; <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2014.03.065>
 56. Watanabe M, Houten SM, Matakı C, Christoffolete MA, Kim BW, Sato H, Messaddeq N, Harney JW, Ezaki O, Kodama T, et al. Bile acids induce energy expenditure by promoting intracellular thyroid hormone activation. *Nature* 2006; 439:484-9; PMID:16400329; <http://dx.doi.org/10.1038/nature04330>
 57. Gnad T, Scheibler S, von Kügelgen I, Scheele C, Kilić A, Glöde A, Hoffmann LS, Reverte-Salisa L, Horn P, Mutlu S, et al. Adenosine activates brown adipose tissue and recruits beige adipocytes via A2A receptors. *Nature* 2014; PMID:25317558; PMID:25317558
 58. Hondares E, Rosell M, Gonzalez FJ, Giralto M, Iglesias R, Villarroya F. Hepatic FGF21 expression is induced at birth via PPARalpha in response to milk intake and contributes to thermogenic activation of neonatal brown fat.

- Cell Metab 2010; 11:206-12; PMID:20197053; <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2010.02.001>
59. Cypess AM, Weiner LS, Roberts-Toler C, Elia EF, Kessler SH, Kahn PA, English J, Chatman K, Trauger SA, Doria A, et al. Activation of human brown adipose tissue by a β 3-adrenergic receptor agonist. *Cell Metab* 2015; 21:33-8; PMID:25565203; <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2014.12.009>
 60. Wu J, Cohen P, Spiegelman BM. Adaptive thermogenesis in adipocytes: is beige the new brown? *Genes Dev* 2013; 27:234-50; PMID:23388824; <http://dx.doi.org/10.1101/gad.211649.112>
 61. Bonet ML, Oliver P, Palou A. Pharmacological and nutritional agents promoting browning of white adipose tissue. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids* 2013; 1831:969-85; PMID:23246573; <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbalip.2012.12.002>
 62. Divakaruni AS, Humphrey DM, Brand MD. Fatty acids change the conformation of uncoupling protein 1 (UCP1). *J Biol Chem* 2012; 287:36845-53; PMID:22952235; <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M112.381780>
 63. Fedorenko A, Lishko PV, Kirichok Y. Mechanism of fatty-acid-dependent UCP1 uncoupling in brown fat mitochondria. *Cell* 2012; 151:400-13; PMID:23063128; <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2012.09.010>
 64. Bartelt A, Merkel M, Heeren J. A new, powerful player in lipoprotein metabolism: brown adipose tissue. *J Mol Med (Berl)* 2012; 90:887-93; PMID:22231746; <http://dx.doi.org/10.1007/s00109-012-0858-3>
 65. Bartelt A, Bruns OT, Reimer R, Hohenberg H, Ittrich H, Peldschus K, Kaul MG, Tromsdorf UI, Weller H, Waurisch C, et al. Brown adipose tissue activity controls triglyceride clearance. *Nat Med* 2011; 17:200-5; PMID:21258337; <http://dx.doi.org/10.1038/nm.2297>
 66. Festuccia WT, Blanchard P-G, Deshaies Y. Control of brown adipose tissue glucose and lipid metabolism by PPAR γ . *Front Endocrinol (Lausanne)* 2011; 2:84; PMID:22654830
 67. Festuccia WT, Blanchard P-G, Turcotte V, Laplante M, Sariahmetoglu M, Brindley DN, Richard D, Deshaies Y. The PPAR γ agonist rosiglitazone enhances rat brown adipose tissue lipogenesis from glucose without altering glucose uptake. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2009; 296:R1327-35; PMID:19211718; <http://dx.doi.org/10.1152/ajpregu.91012.2008>
 68. Duivenvoorden I, Teusink B, Rensen PC, Romijn JA, Havekes LM, Voshol PJ. Apolipoprotein C3 deficiency results in diet-induced obesity and aggravated insulin resistance in mice. *Diabetes* 2005; 54:664-71; PMID:15734841; <http://dx.doi.org/10.2337/diabetes.54.3.664>
 69. Bartelt A, Weigelt C, Cherradi ML, Niemeier A, Tödter K, Heeren J, Scheja L. Effects of adipocyte lipoprotein lipase on de novo lipogenesis and white adipose tissue browning. *Biochim Biophys Acta* 2013; 1831:934-42; PMID:23228690; <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbalip.2012.11.011>
 70. Davies BSJ, Beigneux AP, Barnes RH, Tu Y, Gin P, Weinstein MM, Nobumori C, Nyrén R, Goldberg I, Olivecrona G, et al. GPIHBP1 is responsible for the entry of lipoprotein lipase into capillaries. *Cell Metab* 2010; 12:42-52; PMID:20620994; <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2010.04.016>
 71. Weinstein MM, Goulbourne CN, Davies BSJ, Tu Y, Barnes RH, Watkins SM, Davis R, Reue K, Tontonoz P, Beigneux AP, et al. Reciprocal metabolic perturbations in the adipose tissue and liver of GPIHBP1-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2012; 32:230-5; PMID:22173228; <http://dx.doi.org/10.1161/ATVBAHA.111.241406>
 72. Laplante M, Festuccia WT, Soucy G, Gélinas Y, Lalonde J, Deshaies Y. Involvement of adipose tissues in the early hypolipidemic action of PPAR γ agonism in the rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2007; 292:R1408-17; PMID:17170230; <http://dx.doi.org/10.1152/ajpregu.00761.2006>
 73. Glatz JFC, Luiken JJFP, Bonen A. Membrane fatty acid transporters as regulators of lipid metabolism: implications for metabolic disease. *Physiol Rev* 2010; 90:367-417; PMID:20086080; <http://dx.doi.org/10.1152/physrev.00003.2009>
 74. McArthur MJ, Atshaves BP, Frolov A, Foxworth WD, Kier AB, Schroeder F. Cellular uptake and intracellular trafficking of long chain fatty acids. *J Lipid Res* 1999; 40:1371-83; PMID:10428973
 75. Sasaki A, Sivaram P, Goldberg IJ. Lipoprotein lipase binding to adipocytes: evidence for the presence of a heparin-sensitive binding protein. *Am J Physiol* 1993; 265:E880-8; PMID:8279543
 76. Baillie AG, Coburn CT, Abumrad NA. Reversible binding of long-chain fatty acids to purified FAT, the adipose CD36 homolog. *J Membr Biol* 1996; 153:75-81; PMID:8694909; <http://dx.doi.org/10.1007/s002329900111>
 77. Jochen AL, Hays J, Mick G. Inhibitory effects of cerulenin on protein palmitoylation and insulin internalization in rat adipocytes. *Biochim Biophys Acta* 1995; 1259:65-72; PMID:7492617; [http://dx.doi.org/10.1016/0005-2760\(95\)00147-5](http://dx.doi.org/10.1016/0005-2760(95)00147-5)
 78. Martin C, Passilly-Degrace P, Gaillard D, Merlin J-F, Chevrot M, Besnard P. The lipid-sensor candidates CD36 and GPR120 are differentially regulated by dietary lipids in mouse taste buds: impact on spontaneous fat preference. *PLoS One* 2011; 6:e24014.
 79. Bokor S, Legry V, Meirhaeghe A, Ruiz JR, Mauro B, Widhalm K, Manios Y, Amouyel P, Moreno LA, Molnár D, et al. Single-nucleotide polymorphism of CD36 locus and obesity in European adolescents. *Obesity (Silver Spring)* 2010; 18:1398-403; PMID:19893500; <http://dx.doi.org/10.1038/oby.2009.412>
 80. Gimeno RE. Fatty acid transport proteins. *Curr Opin Lipidol* 2007; 18:271-6; PMID:17495600; <http://dx.doi.org/10.1097/MOL.0b013e3281338558>
 81. Hagberg CE, Falkevall A, Wang X, Larsson E, Huusko J, Nilsson I, van Meeteren LA, Samen E, Lu L, Vanwilde-meersch M, et al. Vascular endothelial growth factor B controls endothelial fatty acid uptake. *Nature* 2010; 464:917-21; PMID:20228789; <http://dx.doi.org/10.1038/nature08945>
 82. Stienstra R, Haim Y, Riahi Y, Netea M, Rudich A, Leibowitz G. Autophagy in adipose tissue and the beta cell: implications for obesity and diabetes. *Diabetologia* 2014;

- 57:1505-16; PMID:24795087; <http://dx.doi.org/10.1007/s00125-014-3255-3>
83. Doege H, Stahl A. Protein-mediated fatty acid uptake: novel insights from in vivo models. *Physiology (Bethesda)* 2006; 21:259-68; PMID:16868315; <http://dx.doi.org/10.1152/physiol.00014.2006>
 84. Milligan G, Stoddart LA, Brown AJ. G protein-coupled receptors for free fatty acids. *Cell Signal* 2006; 18:1360-5; PMID:16716567; <http://dx.doi.org/10.1016/j.cellsig.2006.03.011>
 85. Ulven T. Short-chain free fatty acid receptors FFA2/GPR43 and FFA3/GPR41 as new potential therapeutic targets. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2012; 3:111; PMID:23060857
 86. Rosell M, Kaforou M, Frontini A, Okolo A, Chan Y-W, Nikolopoulou E, Millership S, Fenech ME, MacIntyre D, Turner JO, et al. Brown and white adipose tissues: intrinsic differences in gene expression and response to cold exposure in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2014; 306:E945-64; PMID:24549398; <http://dx.doi.org/10.1152/ajpendo.00473.2013>
 87. LaLonde JM, Bernlohr DA, Banaszak LJ. The up-and-down beta-barrel proteins. *FASEB J* 1994; 8:1240-7; PMID:8001736
 88. Yamamoto T, Yamamoto A, Watanabe M, Matsuo T, Yamazaki N, Kataoka M, Terada H, Shinohara Y. Classification of FABP isoforms and tissues based on quantitative evaluation of transcript levels of these isoforms in various rat tissues. *Biotechnol Lett* 2009; 31:1695-701; PMID:19565192; <http://dx.doi.org/10.1007/s10529-009-0065-7>
 89. Shan T, Liu W, Kuang S. Fatty acid binding protein 4 expression marks a population of adipocyte progenitors in white and brown adipose tissues. *FASEB J* 2013; 27:277-87; PMID:23047894; <http://dx.doi.org/10.1096/fj.12-211516>
 90. Nakamura Y, Sato T, Shiimura Y, Miura Y, Kojima M. FABP3 and brown adipocyte-characteristic mitochondrial fatty acid oxidation enzymes are induced in beige cells in a different pathway from UCP1. *Biochem Biophys Res Commun* 2013; 441:42-6; PMID:24129192; <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.10.014>
 91. Yamashita H, Wang Z, Wang Y, Segawa M, Kusudo T, Kontani Y. Induction of fatty acid-binding protein 3 in brown adipose tissue correlates with increased demand for adaptive thermogenesis in rodents. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 377:632-5; PMID:18938135; <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.10.041>
 92. Ameer F, Scandiuzzi L, Hasnain S, Kalbacher H, Zaidi N. De novo lipogenesis in health and disease. *Metabolism* 2014; 63:895-902; PMID:24814684; <http://dx.doi.org/10.1016/j.metabol.2014.04.003>
 93. Lodhi IJ, Wei X, Semenkovich CF. Lipoexpediency: de novo lipogenesis as a metabolic signal transmitter. *Trends Endocrinol Metab* 2011; 22:1-8; PMID:20889351; <http://dx.doi.org/10.1016/j.tem.2010.09.002>
 94. Herman MA, Peroni OD, Villoria J, Schön MR, Abumrad NA, Blüher M, Klein S, Kahn BB. A novel ChREBP isoform in adipose tissue regulates systemic glucose metabolism. *Nature* 2012; 484:333-8; PMID:22466288; <http://dx.doi.org/10.1038/nature10986>
 95. Eissing L, Scherer T, Tödter K, Knippschild U, Greve JW, Buurman WA, Pinnschmidt HO, Rensen SS, Wolf AM, Bartelt A, et al. De novo lipogenesis in human fat and liver is linked to ChREBP- β and metabolic health. *Nat Commun* 2013; 4:1528; PMID:23443556; <http://dx.doi.org/10.1038/ncomms2537>
 96. Mottillo EP, Balasubramanian P, Lee Y-H, Weng C, Kershaw EE, Granneman JG. Coupling of lipolysis and de novo lipogenesis in brown, beige, and white adipose tissues during chronic β 3-adrenergic receptor activation. *J Lipid Res* 2014; 55:2276-86; PMID:25193997; <http://dx.doi.org/10.1194/jlr.M050005>
 97. Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. *Biochemistry*. 7th edition. New York: WH Freeman; 2012.
 98. Bianchi A, Evans JL, Iverson AJ, Nordlund AC, Watts TD, Witters LA. Identification of an isozymic form of acetyl-CoA carboxylase. *J Biol Chem* 1990; 265:1502-9; PMID:1967254
 99. Lodhi IJ, Yin L, Jensen-Urstad APL, Funai K, Coleman T, Baird JH, El Ramahi MK, Razani B, Song H, Fu-Hsu F, et al. Inhibiting adipose tissue lipogenesis reprograms thermogenesis and PPAR γ activation to decrease diet-induced obesity. *Cell Metab* 2012; 16:189-201; PMID:22863804; <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2012.06.013>
 100. Kihara A. Very long-chain fatty acids: elongation, physiology and related disorders. *J Biochem* 2012; 152:387-95; PMID:22984005; <http://dx.doi.org/10.1093/jb/mvs105>
 101. Tvrdik P, Westerberg R, Silve S, Asadi A, Jakobsson A, Cannon B, Loison G, Jakobsson A. Role of a new mammalian gene family in the biosynthesis of very long chain fatty acids and sphingolipids. *J Cell Biol* 2000; 149:707-18; PMID:10791983; <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.149.3.707>
 102. Jakobsson A, Jörgensen JA, Jakobsson A. Differential regulation of fatty acid elongation enzymes in brown adipocytes implies a unique role for Elovl3 during increased fatty acid oxidation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2005; 289:E517-26; PMID:15855229; <http://dx.doi.org/10.1152/ajpendo.00045.2005>
 103. Tvrdik P, Asadi A, Kozak LP, Nedergaard J, Cannon B, Jakobsson A. Cig30, a mouse member of a novel membrane protein gene family, is involved in the recruitment of brown adipose tissue. *J Biol Chem* 1997; 272:31738-46; PMID:9395518; <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.272.50.31738>
 104. Zadavec D, Brolinson A, Fisher RM, Carneheim C, Csikasz RI, Bertrand-Michel J, Borén J, Guillou H, Rudling M, Jakobsson A. Ablation of the very-long-chain fatty acid elongase ELOVL3 in mice leads to constrained lipid storage and resistance to diet-induced obesity. *FASEB J* 2010; 24:4366-77; PMID:20605947; <http://dx.doi.org/10.1096/fj.09-152298>
 105. Miyazaki M, Flowers MT, Sampath H, Chu K, Oztelberger C, Liu X, Ntambi JM. Hepatic stearoyl-CoA desaturase-1 deficiency protects mice from carbohydrate-induced adiposity and hepatic steatosis. *Cell Metab* 2007; 6:484-96; PMID:18054317; <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2007.10.014>
 106. Ntambi JM, Miyazaki M, Stoehr JP, Lan H, Kendzierski CM, Yandell BS, Song Y, Cohen P, Friedman JM, Attie AD. Loss of stearoyl-CoA desaturase-1 function protects

- mice against adiposity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99:11482-6; PMID:12177411; <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.132384699>
107. Rahman SM, Dobrzyn A, Lee S, Dobrzyn P, Miyazaki M, Ntambi JM. Stearoyl-CoA desaturase 1 deficiency increases insulin signaling and glycogen accumulation in brown adipose tissue. *Am J Physiol Endocrinol Metab* October 2005; 53706:381-7
 108. Townsend KL, Tseng Y-H. Brown fat fuel utilization and thermogenesis. *Trends Endocrinol Metab* 2014; 25:168-77; PMID:24389130; <http://dx.doi.org/10.1016/j.tem.2013.12.004>
 109. Orr AL, Quinlan CL, Perevoshchikova IV, Brand MD. A refined analysis of superoxide production by mitochondrial sn-glycerol 3-phosphate dehydrogenase. *J Biol Chem* 2012; 287:42921-35; PMID:23124204; <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M112.397828>
 110. Cannon B, Nedergaard J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev* 2004; 84:277-359; PMID:14715917; <http://dx.doi.org/10.1152/physrev.00015.2003>
 111. Moura MAF, Festuccia WTL, Kawashita NH, Garófalo MAR, Brito SRC, Kettelhut IC, Migliorini RH. Brown adipose tissue glyceroneogenesis is activated in rats exposed to cold. *Pflugers Arch* 2005; 449:463-9; PMID:15688247; <http://dx.doi.org/10.1007/s00424-004-1353-7>
 112. Brasaemle DL, Wolins NE. Packaging of fat: an evolving model of lipid droplet assembly and expansion. *J Biol Chem* 2012; 287:2273-9; PMID:22090029; <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.R111.309088>
 113. Walther TC, Farese RV. Lipid droplets and cellular lipid metabolism. *Annu Rev Biochem* 2012; 81:687-714; PMID:22524315; <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-biochem-061009-102430>
 114. Beller M, Thiel K, Thul PJ, Jäckle H. Lipid droplets: a dynamic organelle moves into focus. *FEBS Lett* 2010; 584:2176-82; PMID:20303960; <http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2010.03.022>
 115. Miranda DA, Kim J-H, Nguyen LN, Cheng W, Tan BC, Goh VJ, Tan JSY, Yaligar J, Kn BP, Velan SS, et al. Fat storage-inducing transmembrane protein 2 is required for normal fat storage in adipose tissue. *J Biol Chem* 2014; 289:9560-72; PMID:24519944; <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M114.547687>
 116. Gong J, Sun Z, Li P. CIDE proteins and metabolic disorders. *Curr Opin Lipidol* 2009; 20:121-6; PMID:19276890; <http://dx.doi.org/10.1097/MOL.0b013e328328d0bb>
 117. Cinti S. Transdifferentiation properties of adipocytes in the adipose organ. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2009; 297(5):E977-86; PMID:19458063; <http://dx.doi.org/10.1152/ajpendo.00183.2009>
 118. Zhou Z, Yon Toh S, Chen Z, Guo K, Ng CP, Ponniah S, Lin S-C, Hong W, Li P. Cidea-deficient mice have lean phenotype and are resistant to obesity. *Nat Genet* 2003; 35:49-56; PMID:12910269; <http://dx.doi.org/10.1038/ng1225>
 119. Li P. Cidea, brown fat and obesity. *Mech Ageing Dev* 2004; 125:337-8; PMID:15063110; <http://dx.doi.org/10.1016/j.mad.2004.01.002>
 120. Qi J, Gong J, Zhao T, Zhao J, Lam P, Ye J, Li JZ, Wu J, Zhou H-M, Li P. Downregulation of AMP-activated protein kinase by Cidea-mediated ubiquitination and degradation in brown adipose tissue. *EMBO J* 2008; 27:1537-48; PMID:18480843; <http://dx.doi.org/10.1038/emboj.2008.92>
 121. Shimizu T, Yokotani K. Acute cold exposure-induced down-regulation of CIDEA, cell death-inducing DNA fragmentation factor-alpha-like effector A, in rat interscapular brown adipose tissue by sympathetically activated beta3-adrenoreceptors. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 387:294-9; PMID:19577538; <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.06.147>
 122. Grahn THM, Kaur R, Yin J, Schweiger M, Sharma VM, Lee M-J, Ido Y, Smas CM, Zechner R, Lass A, et al. Fat-specific protein 27 (FSP27) interacts with adipose triglyceride lipase (ATGL) to regulate lipolysis and insulin sensitivity in human adipocytes. *J Biol Chem* 2014; 289:12029-39; PMID:24627478; <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M113.539890>
 123. Puri V, Konda S, Ranjit S, Aouadi M, Chawla A, Chouinard M, Chakladar A, Czech MP. Fat-specific protein 27, a novel lipid droplet protein that enhances triglyceride storage. *J Biol Chem* 2007; 282:34213-8; PMID:17884815; <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M707404200>
 124. Toh SY, Gong J, Du G, Li JZ, Yang S, Ye J, Yao H, Zhang Y, Xue B, Li Q, et al. Up-regulation of mitochondrial activity and acquirement of brown adipose tissue-like property in the white adipose tissue of fsp27 deficient mice. *PLoS One* 2008; 3:e2890; PMID:18682832; <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0002890>
 125. Lafontan M, Langin D. Lipolysis and lipid mobilization in human adipose tissue. *Prog Lipid Res* 2009; 48:275-97; PMID:19464318; <http://dx.doi.org/10.1016/j.plipres.2009.05.001>
 126. Zimmermann R, Strauss JG, Haemmerle G, Schoiswohl G, Birner-Gruenberger R, Riederer M, Lass A, Neuberger G, Eisenhaber F, Hermetter A, et al. Fat mobilization in adipose tissue is promoted by adipose triglyceride lipase. *Science* 2004; 306:1383-6; PMID:15550674; <http://dx.doi.org/10.1126/science.1100747>
 127. Villena JA, Roy S, Sarkadi-Nagy E, Kim K-H, Sul HS. Desnutrin, an adipocyte gene encoding a novel patatin domain-containing protein, is induced by fasting and glucocorticoids: ectopic expression of desnutrin increases triglyceride hydrolysis. *J Biol Chem* 2004; 279:47066-75; PMID:15337759; <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M403855200>
 128. Jenkins CM, Mancuso DJ, Yan W, Sims HF, Gibson B, Gross RW. Identification, cloning, expression, and purification of three novel human calcium-independent phospholipase A2 family members possessing triacylglycerol lipase and acylglycerol transacylase activities. *J Biol Chem* 2004; 279:48968-75; PMID:15364929; <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M407841200>
 129. Zechner R, Kienesberger PC, Haemmerle G, Zimmermann R, Lass A. Adipose triglyceride lipase and the lipolytic catabolism of cellular fat stores. *J Lipid Res* 2009; 50:3-21; PMID:18952573; <http://dx.doi.org/10.1194/jlr.R800031-JLR200>
 130. Lass A, Zimmermann R, Oberer M, Zechner R. Lipolysis - a highly regulated multi-enzyme complex mediates the catabolism of cellular fat stores. *Prog Lipid Res* 2011; 50:14-27; PMID:21087632; <http://dx.doi.org/10.1016/j.plipres.2010.10.004>

131. Lass A, Zimmermann R, Haemmerle G, Riederer M, Schoiswohl G, Schweiger M, Kienesberger P, Strauss JG, Gorkiewicz G, Zechner R. Adipose triglyceride lipase-mediated lipolysis of cellular fat stores is activated by CGI-58 and defective in Chanarin-Dorfman Syndrome. *Cell Metab* 2006; 3:309-19; PMID:16679289; <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2006.03.005>
132. Yang X, Lu X, Lombès M, Rha GB, Chi Y-I, Guerin TM, Smart EJ, Liu J. The G(0)/G(1) switch gene 2 regulates adipose lipolysis through association with adipose triglyceride lipase. *Cell Metab* 2010; 11:194-205; PMID:20197052; <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2010.02.003>
133. Haemmerle G, Lass A, Zimmermann R, Gorkiewicz G, Meyer C, Rozman J, Heldmaier G, Maier R, Theussl C, Eder S, et al. Defective lipolysis and altered energy metabolism in mice lacking adipose triglyceride lipase. *Science* 2006; 312:734-7; PMID:16675698; <http://dx.doi.org/10.1126/science.1123965>
134. Ahmadian M, Duncan RE, Varady KA, Frasson D, Hellerstein MK, Birkenfeld AL, Samuel VT, Shulman GI, Wang Y, Kang C. Adipose overexpression of desnutrin promotes fatty acid use and attenuates diet-induced obesity. 2009; 58.
135. Pinent M, Hackl H, Burkard TR, Prokesch A, Papak C, Scheideler M, Hämmerle G, Zechner R, Trajanoski Z, Strauss JG. Differential transcriptional modulation of biological processes in adipocyte triglyceride lipase and hormone-sensitive lipase-deficient mice. *Genomics* 2008; 92:26-32; PMID:18572100; <http://dx.doi.org/10.1016/j.ygeno.2008.03.010>
136. Ahmadian M, Abbott MJ, Tang T, Hudak CSS, Kim Y, Bruss M, Hellerstein MK, Lee H-Y, Samuel VT, Shulman GI, et al. Desnutrin/ATGL is regulated by AMPK and is required for a brown adipose phenotype. *Cell Metab* 2011; 13:739-48; PMID:21641555; <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2011.05.002>
137. Mottillo EP, Bloch AE, Leff T, Granneman JG. Lipolytic products activate peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) α and δ in brown adipocytes to match fatty acid oxidation with supply. *J Biol Chem* 2012; 287:25038-48; PMID:22685301; <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M112.374041>
138. Vaughan M, Berger J, Steinberg D. Hormone-sensitive lipase and tissue hormone-sensitive lipase and monoglyceride activities in adipose tissue. *J Biol Chem* 1964; 239:401-9; PMID:14169138
139. Holm C, Osterlund T, Laurell H, Contreras JA. Molecular mechanisms regulating hormone-sensitive lipase and lipolysis. *Annu Rev Nutr* 2000; 20:365-93; PMID:10940339; <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.nutr.20.1.365>
140. Holm C, Fredrikson G, Cannon B, Belfrage P. Hormone-sensitive lipase in brown adipose tissue: identification and effect of cold exposure. *Biosci Rep* 1987; 7:897-904; PMID:3329536; <http://dx.doi.org/10.1007/BF01119481>
141. Fredrikson G, Belfrage P. Positional specificity of hormone-sensitive lipase from rat adipose tissue. *J Biol Chem* 1983; 258:14253-6; PMID:6643478
142. Haemmerle G, Zimmermann R, Hayn M, Theussl C, Waeg G, Wagner E, Sattler W, Magin TM, Wagner EF, Zechner R. Hormone-sensitive lipase deficiency in mice causes diglyceride accumulation in adipose tissue, muscle, and testis. *J Biol Chem* 2002; 277:4806-15; PMID:11717312; <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M110355200>
143. Wang H, Hu L, Dalen K, Dorward H, Marcinkiewicz A, Russell D, Gong D, Londos C, Yamaguchi T, Holm C, et al. Activation of hormone-sensitive lipase requires two steps, protein phosphorylation and binding to the PAT-1 domain of lipid droplet coat proteins. *J Biol Chem* 2009; 284:32116-25; PMID:19717842; <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M109.006726>
144. Holm C. Molecular mechanisms regulating hormone-sensitive lipase and lipolysis. *Biochem Soc Trans* 2003; 31:1120; PMID:14641008; <http://dx.doi.org/10.1042/bst0311120>
145. Osuga J -I, Ishibashi S, Oka T, Yagyu H, Tozawa R, Fujimoto A, Shionoiri F, Yahagi N, Kraemer FB, Tsutsumi O, et al. Targeted disruption of hormone-sensitive lipase results in male sterility and adipocyte hypertrophy, but not in obesity. *Proc Natl Acad Sci* 2000; 97:787-92; PMID:10639158; <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.97.2.787>
146. Ström K, Hansson O, Lucas S, Nevsten P, Fernandez C, Klint C, Movérare-Skrtic S, Sundler F, Ohlsson C, Holm C. Attainment of brown adipocyte features in white adipocytes of hormone-sensitive lipase null mice. *PLoS One* 2008; 3:e1793; PMID:18335062; <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0001793>
147. Sakurada T, Noma A. Subcellular localization and some properties of monoacylglycerol lipase in rat adipocytes. *J Biochem* 1981; 90:1413-9; PMID:7338512
148. Zechner R, Zimmermann R, Eichmann TO, Kohlwein SD, Haemmerle G, Lass A, Madeo F. FAT SIGNALS—lipases and lipolysis in lipid metabolism and signaling. *Cell Metab* 2012; 15:279-91; PMID:22405066; <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2011.12.018>
149. Egan JJ, Greenberg AS, Chang M, Wek SA, Moos MC, Londos C. Mechanism of hormone-stimulated lipolysis in adipocytes: Translocation of hormone-sensitive lipase to the lipid storage droplet. 1992; 89:8537-41; PMID:1528859
150. Clifford GM. Translocation of Hormone-sensitive Lipase and Perilipin upon Lipolytic Stimulation of Rat Adipocytes. *J Biol Chem* 2000; 275:5011-5; PMID:10671541; <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.275.7.5011>
151. Granneman JG, Moore H-PH, Granneman RL, Greenberg AS, Obin MS, Zhu Z. Analysis of lipolytic protein trafficking and interactions in adipocytes. *J Biol Chem* 2007; 282:5726-35; PMID:17189257; <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M610580200>
152. Doh K-O, Kim Y-W, Park S-Y, Lee S-K, Park JS, Kim J-Y. Interrelation between long-chain fatty acid oxidation rate and carnitine palmitoyltransferase 1 activity with different isoforms in rat tissues. *Life Sci* 2005; 77:435-43; PMID:15894012; <http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2004.11.032>
153. Feldmann HM, Golozoubova V, Cannon B, Nedergaard J. UCP1 ablation induces obesity and abolishes diet-induced thermogenesis in mice exempt from thermal stress by living at thermoneutrality. *Cell Metab* 2009; 9:203-9; PMID:19187776; <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2008.12.014>
154. Ueta CB, Fernandes GW, Capelo LP, Fonseca TL, Maculan FD, Gouveia CHA, Brum PC, Christoffolete MA,

- Aoki MS, Lancellotti CL, et al. $\beta(1)$ Adrenergic receptor is key to cold- and diet-induced thermogenesis in mice. *J Endocrinol* 2012; 214:359-65; PMID:22728333; <http://dx.doi.org/10.1530/JOE-12-0155>
155. Rothwell NJ, Stock MJ. A role for brown adipose tissue in diet-induced thermogenesis. *Nature* 1979; 281:31-5; PMID:551265; <http://dx.doi.org/10.1038/281031a0>
 156. Yu XX, Lewin DA, Forrest W, Adams SH. Cold elicits the simultaneous induction of fatty acid synthesis and beta-oxidation in murine brown adipose tissue: prediction from differential gene expression and confirmation in vivo. *FASEB J* 2002; 16:155-68; PMID:11818363; <http://dx.doi.org/10.1096/fj.01-0568com>
 157. Li Y, Fromme T, Schweizer S, Schöttl T, Klingenspor M. Taking control over intracellular fatty acid levels is essential for the analysis of thermogenic function in cultured primary brown and brite / beige adipocytes. *EMBO Rep* 2014; 15:1069-76.
 158. Bukowiecki LJ, Folllea N, Lupien J, Paradis A. Metabolic relationships between lipolysis and respiration in rat brown. *Respiration* 1981; 256:12840-8
 159. Ellis JM, Li LO, Wu P-C, Koves TR, Ilkayeva O, Stevens RD, Watkins SM, Muoio DM, Coleman RA. Adipose acyl-CoA synthetase-1 directs fatty acids toward beta-oxidation and is required for cold thermogenesis. *Cell Metab* 2010; 12:53-64; PMID:20620995; <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2010.05.012>
 160. McGarry JD, Foster DW. Regulation of hepatic fatty acid oxidation and ketone body production. *Annu Rev Biochem* 1980; 49:395-420; PMID:6157353; <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.bi.49.070180.002143>
 161. McGarry JD, Woeltje KF, Kuwajima M, Foster DW. Regulation of ketogenesis and the renaissance of carnitine palmitoyltransferase. *Diabetes Metab Rev* 1989; 5:271-84; PMID:2656156; <http://dx.doi.org/10.1002/dmr.5610050305>
 162. Curtis DE, Sukumaran S, Shao X, Parameswara V, Rashid S, Corte A, Smith AR, Ren J, Esser V, Hammer RE, et al. Article Molecular Mechanisms of Hepatic Steatosis and Insulin Resistance in the AGPAT2-Deficient Mouse Model of Congenital Generalized Lipodystrophy. 2009; 165-76.
 163. Esser V, Britton CH, Weis BC, Foster DW, McGarry JD. Cloning, sequencing, and expression of a cDNA encoding rat liver carnitine palmitoyltransferase I: Direct evidence that a single polypeptide is involved in inhibitor interaction and catalytic function. *J Biol Chem* 1993; 268:5817-22; PMID:8449948
 164. Yamazaki N, Shinohara Y, Shima A, Terada H. High expression of a novel carnitine palmitoyltransferase I like protein in rat brown adipose tissue and heart: isolation and characterization of its cDNA clone. *FEBS Lett* 1995; 363:41-5; PMID:7729550; [http://dx.doi.org/10.1016/0014-5793\(95\)00277-G](http://dx.doi.org/10.1016/0014-5793(95)00277-G)
 165. Price N, van der Leij F, Jackson V, Corstorphine C, Thomson R, Sorensen A, Zammit V. A novel brain-expressed protein related to carnitine palmitoyltransferase I. *Genomics* 2002; 80:433-42; PMID:12376098; <http://dx.doi.org/10.1006/geno.2002.6845>
 166. Brown NF, Hill JK, Esser V, Kirkland JL, Corkey BE, Foster DW, McGarry JD. Mouse white adipocytes and 3T3-L1 cells display an anomalous pattern of carnitine palmitoyltransferase (CPT) I isoform expression during differentiation. Inter-tissue and inter-species expression of CPT I and CPT II enzymes. *Biochem J* 1997; 327 (Pt 1):225-31; PMID:9355756; <http://dx.doi.org/10.1042/bj3270225>
 167. Sierra AY, Gratacós E, Carrasco P, Clotet J, Ureña J, Serra D, Asins G, Hegardt FG, Casals N. CPT1c is localized in endoplasmic reticulum of neurons and has carnitine palmitoyltransferase activity. *J Biol Chem* 2008; 283:6878-85; PMID:18192268; <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M707965200>
 168. Gao S, Zhu G, Gao X, Wu D, Carrasco P, Casals N, Hegardt FG, Moran TH, Lopaschuk GD. Important roles of brain-specific carnitine palmitoyltransferase and ceramide metabolism in leptin hypothalamic control of feeding. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108:9691-6; PMID:21593415; <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1103267108>
 169. Ramírez S, Martins L, Jacas J, Carrasco P, Pozo M, Clotet J, Serra D, Hegardt FG, Diéguez C, López M, et al. Hypothalamic ceramide levels regulated by CPT1C mediate the orexigenic effect of ghrelin. *Diabetes* 2013; 62:2329-37; PMID:23493572; <http://dx.doi.org/10.2337/db12-1451>
 170. Ramsay RR, Gandour RD, Van Der Leij FR. Molecular enzymology of carnitine transfer and transport. *Biochim Biophys Acta - Protein Struct Mol Enzymol* 2001; 1546:21-43; PMID:11257506; [http://dx.doi.org/10.1016/S0167-4838\(01\)00147-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0167-4838(01)00147-9)
 171. Alam A, Saggerson E. Malonyl-CoA and the regulation of fatty acid oxidation in soleus muscle. *Biochem J* 1998; 241:233-41; PMID:9693125; <http://dx.doi.org/10.1042/bj3340233>
 172. Esser V, Brown NF, Cowan AT, Foster DW, McGarry JD, Lett HF. Expression of a cDNA Isolated from Rat Brown Adipose Tissue and Heart Identifies the Product as the Muscle Isoform of Carnitine Palmitoyltransferase I (M-CPT I) isolated from rat brown adipose tissue (BAT) by. *Biochemistry* 1996; 271:6972-7
 173. Morillas M, Gómez-Puertas P, Bentebibel A, Sellés E, Casals N, Valencia A, Hegardt FG, Asins G, Serra D. Identification of conserved amino acid residues in rat liver carnitine palmitoyltransferase I critical for malonyl-CoA inhibition: Mutation of methionine 593 abolishes malonyl-CoA inhibition. *J Biol Chem* 2003; 278:9058-63; PMID:12499375; <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M209999200>
 174. Ji S, You Y, Kerner J, Hoppel CL, Schoeb TR, Chick WSH, Hamm DA, Sharer JD, Wood PA. Homozygous carnitine palmitoyltransferase 1b (muscle isoform) deficiency is lethal in the mouse. *Mol Genet Metab* 2008; 93:314-22; PMID:18023382; <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymgme.2007.10.006>
 175. Jamal Z, Saggerson ED. Changes in brown-adipose-tissue mitochondrial processes in streptozotocin-diabetes. *Biochem J* 1988; 252:293-6; PMID:3421907; <http://dx.doi.org/10.1042/bj2520293>
 176. Lee J, Ellis JM, Wolfgang MJ. Adipose fatty acid oxidation is required for thermogenesis and potentiates oxidative stress-induced inflammation. *Cell Rep* 2015; 10:266-79; PMID:25578732; <http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2014.12.023>

177. Schuler AM, Gower BA, Matern D, Rinaldo P, Vockley J, Wood PA. Synergistic heterozygosity in mice with inherited enzyme deficiencies of mitochondrial fatty acid beta-oxidation. *Mol Genet Metab* 2005; 85:7-11; PMID:15862275; <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymgme.2004.09.006>
178. Bruce CR, Hoy AJ, Turner N, Watt MJ, Allen TL, Carpenter K, Cooney GJ, Febbraio MA, Kraegen EW. Overexpression of carnitine palmitoyltransferase-1 in skeletal muscle is sufficient to enhance fatty acid oxidation and improve high-fat diet-induced insulin resistance. *Diabetes* 2009; 58:550-8; PMID:19073774; <http://dx.doi.org/10.2337/db08-1078>
179. Perdomo G, Commerford SR, Richard A-MT, Adams SH, Corkey BE, O'Doherty RM, Brown NF. Increased beta-oxidation in muscle cells enhances insulin-stimulated glucose metabolism and protects against fatty acid-induced insulin resistance despite intramyocellular lipid accumulation. *J Biol Chem* 2004; 279:27177-86; PMID:15105415; <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M403566200>
180. Stefanovic-Racic M, Perdomo G, Mantell BS, Sipula IJ, Brown NF, O'Doherty RM. A moderate increase in carnitine palmitoyltransferase 1a activity is sufficient to substantially reduce hepatic triglyceride levels. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2008; 294:E969-77; PMID:18349115; <http://dx.doi.org/10.1152/ajpendo.00497.2007>
181. Orellana-Gavaldà JM, Herrero L, Malandrino MI, Pañeda A, Sol Rodríguez-Peña M, Petry H, Asins G, Van Deventer S, Hegardt FG, Serra D, et al. Molecular therapy for obesity and diabetes based on a long-term increase in hepatic fatty-acid oxidation. *Hepatology* 2011; 53:821-32; PMID:21319201; <http://dx.doi.org/10.1002/hep.24140>
182. Monsenego J, Mansouri A, Akkaoui M, Lenoir V, Esnous C, Fauveau V, Tavernier V, Girard J, Prip-Buus C, Monsénego J, et al. Enhancing liver mitochondrial fatty acid oxidation capacity in obese mice improves insulin sensitivity independently of hepatic steatosis. *J Hepatol* 2012; 56:632-9; PMID:22037024; <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhep.2011.10.008>
183. Sebastián D, Herrero L, Serra D, Asins G, Hegardt FG, Sebastian D, Herrero L, Serra D, Asins G, Hegardt FG. CPT I overexpression protects L6E9 muscle cells from fatty acid-induced insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007; 292:E677-86; PMID:17062841; <http://dx.doi.org/10.1152/ajpendo.00360.2006>
184. Namgaladze D, Lips S, Leiker TJ, Murphy RC, Ekroos K, Ferreiros N, Geisslinger G, Brüne B. Inhibition of macrophage fatty acid β -oxidation exacerbates palmitate-induced inflammatory and endoplasmic reticulum stress responses. *Diabetologia* 2014; 57:1067-77; PMID:24488024; <http://dx.doi.org/10.1007/s00125-014-3173-4>
185. Gao X, Li K, Hui X, Kong X, Sweeney G, Wang Y, Xu A, Teng M, Liu P, Wu D. Carnitine palmitoyltransferase 1A prevents fatty acid-induced adipocyte dysfunction through suppression of c-Jun N-terminal kinase. *Biochem J* 2011; 435:723-32; PMID:21348853; <http://dx.doi.org/10.1042/BJ20101680>
186. Malandrino MI, Fucho R, Weber M, Calderon-Dominguez M, Mir JF, Valcarcel L, Escoté X, Gómez-Serrano M, Peral B, Salvadó L, et al. Enhanced fatty acid oxidation in adipocytes and macrophages reduces lipid-induced triglyceride accumulation and inflammation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2015; 308:E756-69; PMID:25714670; <http://dx.doi.org/10.1152/ajpendo.00362.2014>
187. Herrero L, Rubí B, Sebastián D, Serra D, Asins G, Maechler P, Prentki M, Hegardt FG. Alteration of the malonyl-CoA/carnitine palmitoyltransferase I interaction in the beta-cell impairs glucose-induced insulin secretion. *Diabetes* 2005; 54:462-71; PMID:15677504; <http://dx.doi.org/10.2337/diabetes.54.2.462>
188. Mera P, Mir JF, Fabriás G, Casas J, Costa ASH, Malandrino MI, Fernández-López J-A, Remesar X, Gao S, Chohnan S, et al. Long-term increased carnitine palmitoyltransferase 1A expression in ventromedial hypothalamus causes hyperphagia and alters the hypothalamic lipidomic profile. *PLoS One* 2014; 9:e97195; PMID:24819600; <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0097195>
189. Serra D, Mera P, Malandrino MI, Mir JF, Herrero L. Mitochondrial fatty acid oxidation in obesity. *Antioxid Redox Signal* 2013; 19:269-84; PMID:22900819; <http://dx.doi.org/10.1089/ars.2012.4875>
190. Singh I, Moser AE, Goldfischer S, Moser HW. Lignoceric acid is oxidized in the peroxisome: implications for the Zellweger cerebro-hepato-renal syndrome and adrenoleukodystrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984; 81:4203-7; PMID:6588384; <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.81.13.4203>
191. Nedergaard J, Alexson S, Cannon B. Cold adaptation in the rat: increased brown fat peroxisomal beta-oxidation relative to maximal mitochondrial oxidative capacity. *Am J Physiol Cell Physiol* 1980; 239:C208-16
192. Ahlabo I, Barnard T. Observations on peroxisomes in brown adipose tissue of the rat. *J Histochem Cytochem* 1971; 19:670-5; PMID:4107748; <http://dx.doi.org/10.1177/19.11.670>
193. Lodhi IJ, Semenkovich CF. Peroxisomes: a nexus for lipid metabolism and cellular signaling. *Cell Metab* 2014; 19:380-92; PMID:24508507; <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2014.01.002>
194. Schneider BE, Mun EC. Surgical management of morbid obesity. *Diabetes Care* 2005; 28:475-80; PMID:15677820; <http://dx.doi.org/10.2337/diacare.28.2.475>
195. Mumphy MB, Patterson LM, Zheng H, Berthoud H-R. Roux-en-Y gastric bypass surgery increases number but not density of CCK-, GLP-1-, 5-HT-, and neurotensin-expressing enteroendocrine cells in rats. *Neurogastroenterol Motil* 2013; 25:e70-9; PMID:23095091; <http://dx.doi.org/10.1111/nmo.12034>
196. Tremaroli V, Karlsson F, Werling M, Ståhlman M, Kovatcheva-Datchary P, Olbers T, Fändriks L, le Roux CW, Nielsen J, Bäckhed F. Roux-en-Y gastric bypass and vertical banded gastroplasty induce long-term changes on the human Gut microbiome contributing to fat mass regulation. *Cell Metab* 2015; 22:228-38; PMID:26244932; <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2015.07.009>
197. Hurt RT, Edakkanambeth Varayil J, Ebbert JO. New pharmacological treatments for the management of obesity. *Curr Gastroenterol Rep* 2014; 16:394; PMID:24828101; <http://dx.doi.org/10.1007/s11894-014-0394-0>

198. Jackson VM, Price DA, Carpino PA. Investigational drugs in Phase II clinical trials for the treatment of obesity: implications for future development of novel therapies. *Expert Opin Investig Drugs* 2014; 23:1055-66; PMID:25000213; <http://dx.doi.org/10.1517/13543784.2014.918952>
199. EMA. Guideline on clinical evaluation of medicinal products used in weight control. London: 2014. Available from: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2014/07/WC500170278.pdf
200. Derosa G, Maffioli P. Anti-obesity drugs: a review about their effects and their safety. *Expert Opin Drug Saf* 2012; 11:459-71; PMID:22439841; <http://dx.doi.org/10.1517/14740338.2012.675326>
201. O'Neil PM, Smith SR, Weissman NJ, Fidler MC, Sanchez M, Zhang J, Raether B, Anderson CM, Shanahan WR. Randomized Placebo-Controlled Clinical Trial of Lorcaserin for Weight Loss in Type 2 Diabetes Mellitus: The BLOOM-DM Study. *Obes (Silver Spring)* 2012; 20:1426-36; PMID:22421927; <http://dx.doi.org/10.1038/oby.2012.66>
202. Khan A, Raza S, Khan Y, Aksoy T, Khan M, Weinberger Y, Goldman J. Current updates in the medical management of obesity. *Recent Pat Endocr Metab Immune Drug Discov* 2012; 6:117-28; PMID:22435392; <http://dx.doi.org/10.2174/187221412800604644>
203. EMA. Withdrawal of the marketing authorisation application for Belviq (lorcaserin). London: 2013. Available from: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Medicine_QA/2013/05/WC500143811.pdf
204. FDA. Liraglutide 3.0 mg for Weight Management NDA 206-321 Briefing Document Endocrinologic and Metabolic Drug Advisory Committee. Silver Spring, MD: 2014. Available from: <http://www.fda.gov/downloads/advisorycommittees/committeesmeetingmaterials/drugs/endocrinologicandmetabolicdrugsadvisorycommittee/ucm413318.pdf>
205. EMA. Saxenda recommended for approval in weight management in adults Medicine to be used in addition to reduced-calorie diet and physical activity. London: 2015. Available from: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Press_release/2015/01/WC500180857.pdf
206. Jeon WS, Park CY. Antiobesity pharmacotherapy for patients with type 2 diabetes: focus on long-term management. *Endocrinol Metab (Seoul, Korea)* 2014; 29:410-7; PMID:25559569; <http://dx.doi.org/10.3803/EnM.2014.29.4.410>
207. Caixàs A, Albert L, Capel I, Rigla M. Naltrexone sustained-release/bupropion sustained-release for the management of obesity: review of the data to date. *Drug Des Devel Ther* 2014; 8:1419-27; PMID:25258511; <http://dx.doi.org/10.2147/DDDT.S55587>
208. Hamdy O, Uwaifo GI, Oral EA. Obesity Medication. *Medscape* 2015; Available from: <http://emedicine.medscape.com/article/123702-medication>
209. Zhu Z, Spicer EG, Gavini CK, Goudjo-Ako AJ, Novak CM, Shi H. Enhanced sympathetic activity in mice with brown adipose tissue transplantation (transBATation). *Physiol Behav* 2014; 125:21-9; PMID:24291381; <http://dx.doi.org/10.1016/j.physbeh.2013.11.008>
210. Dong M, Yang X, Lim S, Cao Z, Honek J, Lu H, Zhang C, Seki T, Hosaka K, Wahlberg E, et al. Cold exposure promotes atherosclerotic plaque growth and instability via UCP1-dependent lipolysis. *Cell Metab* 2013; 18:118-29; PMID:23823482; <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2013.06.003>
211. Berbée JFP, Boon MR, Khedoe PPSJ, Bartelt A, Schlein C, Worthmann A, Kooijman S, Hoeke G, Mol IM, John C, et al. Brown fat activation reduces hypercholesterolaemia and protects from atherosclerosis development. *Nat Commun* 2015; 6:6356; PMID:25754609; <http://dx.doi.org/10.1038/ncomms7356>
212. Muoio DM, Neuffer PD. Lipid-induced mitochondrial stress and insulin action in muscle. *Cell Metab* 2012; 15:595-605; PMID:22560212; <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2012.04.010>

RESEARCH ARTICLE

Carnitine Palmitoyltransferase 1 Increases Lipolysis, UCP1 Protein Expression and Mitochondrial Activity in Brown Adipocytes

María Calderon-Dominguez^{1,2}, David Sebastián^{3,4}, Raquel Fucho^{1,2}, Minéa Weber^{1,2}, Joan F. Mir^{1,2}, Ester García-Casarrubios⁵, María Jesús Obregón⁵, Antonio Zorzano^{3,4}, Ángela M. Valverde^{4,5}, Dolores Serra^{1,2}, Laura Herrero^{1,2*}

1 Department of Biochemistry and Physiology, Institut de Biomedicina de la Universitat de Barcelona (IBUB), Universitat de Barcelona, E-08028, Barcelona, Spain, **2** Centro de Investigación Biomédica en Red de Fisiopatología de la Obesidad y la Nutrición (CIBEROBN), Instituto de Salud Carlos III, E-28029, Madrid, Spain, **3** Institute for Research in Biomedicine (IRB Barcelona) and Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, E-08028, Barcelona, Spain, **4** Centro de Investigación Biomédica en Red de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERDEM), Instituto de Salud Carlos III, E-28029, Madrid, Spain, **5** Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols (CSIC-UAM) and Instituto de Investigación Sanitaria La Paz, 28029, Madrid, Spain

* lherrero@ub.edu



OPEN ACCESS

Citation: Calderon-Dominguez M, Sebastián D, Fucho R, Weber M, Mir JF, García-Casarrubios E, et al. (2016) Carnitine Palmitoyltransferase 1 Increases Lipolysis, UCP1 Protein Expression and Mitochondrial Activity in Brown Adipocytes. PLoS ONE 11(7): e0159399. doi:10.1371/journal.pone.0159399

Editor: Miguel López, University of Santiago de Compostela School of Medicine - CIMUS, SPAIN

Received: May 5, 2016

Accepted: July 3, 2016

Published: July 20, 2016

Copyright: © 2016 Calderon-Dominguez et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper.

Funding: This work was supported by the Ministry of Spain - MINECO (SAF2013-45887-R to LH, SAF2014-52223-C2-1-R to DS and SAF-2015-65267-R to AMV that were cofunded by the Fondos Europeos de Desarrollo Regional de la Unión Europea [FEDER], SAF2012-32491 to MJO, SAF2013-40987R to AZ, and a doctoral fellowship to JFM), the Centro de Investigación Biomédica en Red Fisiopatología de la Obesidad y la Nutrición

Abstract

The discovery of active brown adipose tissue (BAT) in adult humans and the fact that it is reduced in obese and diabetic patients have put a spotlight on this tissue as a key player in obesity-induced metabolic disorders. BAT regulates energy expenditure through thermogenesis; therefore, harnessing its thermogenic fat-burning power is an attractive therapeutic approach. We aimed to enhance BAT thermogenesis by increasing its fatty acid oxidation (FAO) rate. Thus, we expressed carnitine palmitoyltransferase 1AM (CPT1AM), a permanently active mutant form of CPT1A (the rate-limiting enzyme in FAO), in a rat brown adipocyte (rBA) cell line through adenoviral infection. We found that CPT1AM-expressing rBA have increased FAO, lipolysis, UCP1 protein levels and mitochondrial activity. Additionally, enhanced FAO reduced the palmitate-induced increase in triglyceride content and the expression of obese and inflammatory markers. Thus, CPT1AM-expressing rBA had enhanced fat-burning capacity and improved lipid-induced derangements. This indicates that CPT1AM-mediated increase in brown adipocytes FAO may be a new approach to the treatment of obesity-induced disorders.

Introduction

Obesity is a major public health problem and a worldwide epidemic contributing to the development of associated pathological conditions, such as insulin resistance, type 2 diabetes, cardiovascular disease, nonalcoholic fatty liver disease, and some forms of cancer among others [1,2]. Adipose tissue has gained a crucial role in the study of the mechanisms involved in

(CIBEROBN) (Grant CB06/03/0001 to DS), the Centro de Investigación Biomédica en red de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERDEM), the Generalitat de Catalunya (2014SGR465 to DS, and 2014SGR48 to AZ), the Comunidad de Madrid (S2010/BMD-2423 to MJO and AMV), INTERREG IV-B-SUDOE-FEDER (DIOMED, SOE1/P1/E178) to AZ, and the European Foundation for the Study of Diabetes (EFSDF)/Janssen-Rising Star and L'Oréal-UNESCO "For Women in Science" research fellowships to LH. AZ is a recipient of ICREA-Academia (Generalitat de Catalunya) and MW is a recipient of the Ciência sem Fronteiras-CNPq fellowship (237976/2012-9). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Abbreviations: BAT, brown adipose tissue; CIDEA, cell death-inducing DNA fragmentation factor- α -like effector A; rBA, rat brown adipocyte cells; CHOP, C/EBP homologous protein; CPT1A, carnitine palmitoyltransferase 1A; CPT1AM, permanently active mutant form of CPT1A; EDEM, ER degradation enhancing α -mannosidase-like protein; ER, endoplasmic reticulum; FA, fatty acids; FAO, fatty acid oxidation; Mfn2, mitofusin 2; Mt-ATP6, Mitochondrial ATP synthase 6; Mt-Co1, cytochrome C oxidase I; Mt-Co2, cytochrome C oxidase II; Mt-Nd1, NADH dehydrogenase 1; Mt-Cyb, cytochrome b; NEFA, nonesterified fatty acids; OCR, oxygen consumption rate; PGC1a, peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 alpha; PRDM16, PR domain-containing 16; TG, triglyceride; Tim 44, translocase of mitochondrial inner membrane 44; UCP1, uncoupling protein 1; WAT, white adipose tissue.

obesity-related disorders. Adipose tissue is classified into energy-storing white adipose tissue (WAT) and brown adipose tissue (BAT), which controls thermogenesis by burning fatty acids (FA) to produce heat and defend the body against cold. Traditionally, WAT has been implicated in the pathogenesis of obesity-induced insulin resistance [2–5]. BAT has received less attention, because it is less abundant, and it was considered exclusive to rodents and human neonates. However, in the last decade, active BAT was discovered in adult humans by a combination of positron-emission tomography (PET) and computed tomography (CT) (PET-CT) [6–12]. Furthermore, it was shown that BAT is reduced in obese and diabetic patients [8]. Thus, BAT has become a leading research topic, since any strategy that can enhance BAT mass or activity may be a potential therapeutic approach to obesity-induced diabetes.

The cellular heterogeneity of fat is still under debate [13]. To date, at least two types of thermogenic adipocytes have been described in humans and rodents: the classical brown adipocytes, and beige (also called brite) adipocytes. They differ in both their developmental origin and their anatomical localization [14]. Beige adipocytes are located within the WAT and appear in response to certain stimuli such as cold exposure or β 3-adrenergic signals. A recent study has identified *Zic1* and *Tcf21* as specific markers for brown and white adipocytes, respectively, while *Cd137*, *Epsti1*, *Tbx1*, and *Tmem26* would be specific for beige adipocytes [15].

Any strategy that can reduce lipid accumulation would be beneficial for the treatment of obesity and related disorders. Studies in rodents have demonstrated that BAT modulates triglyceridemia and controls lipid clearance [16–18]. The aim of our study was to enhance the thermogenic capacity of BAT by increasing its fatty acid oxidation (FAO). Our group and others have shown that increased FAO in white adipocytes and macrophages [19], liver [20–22], pancreas [23,24], neurons [25] and muscle [26–28] results in an improvement in lipid-induced derangements. Cold stimulates FAO in mice, which indicates that FAO is required for thermogenesis [29].

Here we focused on the FAO key enzyme, carnitine palmitoyltransferase 1 (CPT1). CPT1 facilitates the transfer of FAs into the mitochondria for oxidation. There are three CPT1 isoforms, with differences in kinetics, sensitivity to their physiological inhibitor malonyl-CoA, and tissue expression: CPT1A (liver, intestine, kidney, ovary, pancreas, brain and mouse and human WAT), CPT1B (BAT, heart, skeletal muscle and rat and human WAT) and CPT1C (brain and testis) [30,31]. Interestingly, BAT CPT1 activity is decreased in diabetic rats [32]. Thus, we attempted to overexpress a permanently active mutant form of CPT1A, CPT1AM, which is insensitive to malonyl-CoA [33], in a brown adipocyte rat cell line (rBA) through adenoviral infection. The choice of CPT1AM was based on the following points: 1) the CPT1A isoform has lower sensitivity to malonyl-CoA inhibition and higher affinity for the substrate than CPT1B [34]; 2) CPT1A could be differentiated from the BAT endogenous main isoform, CPT1B, and 3) CPT1AM is a permanently active mutant that would ensure constant high levels of FAO, independently of the levels of malonyl-CoA, which is usually derived from glucose metabolism and is the first intermediate in lipogenesis. This last point is particularly relevant in obesity, where in addition to high lipid levels high glucose (and therefore high malonyl-CoA) levels are present.

Here we demonstrate that CPT1AM-expressing rBA display higher FAO, lipolysis, uncoupling protein 1 (UCP1) expression, and mitochondrial respiration. Enhanced FAO in palmitate-incubated rBA reduced triglyceride content and the expression of fatty acid binding protein 4 (FABP4) and tumor necrosis factor α (TNF α), obese and inflammatory markers, respectively. We conclude that CPT1AM-expressing rBA had enhanced lipolysis and UCP1 protein expression, considered as indicators of increased thermogenesis, and showed an improvement in lipid-induced derangements. This highlights CPT1AM-mediated BAT FAO as a new approach to treat obesity and related disorders.

Materials and Methods

Materials

Norepinephrine, sodium palmitate, sodium oleate and FA-free BSA were purchased from Sigma Aldrich (St. Louis, MO). DMEM, FBS and penicillin/streptomycin mixture were purchased from Life Technologies (Carlsbad, CA). Etomoxir was kindly provided by Dr. H. P. O. Wolf (GMBH, Allensbach, Germany).

Cell culture and differentiation of brown adipocytes

Immortalized rBA from neonatal rats were generated as previously described [35]. rBA preadipocytes were grown in DMEM supplemented with 10% fetal serum, 1% penicillin/streptomycin and 2 mM HEPES. rBA were differentiated in DMEM supplemented with 10% fetal serum, 1 nM T3 and 20 nM insulin (differentiation media) until confluence (day 0). Then, cells were incubated with induction medium containing 1 μ M rosiglitazone, 0.5 μ M dexamethasone, 0.125 μ M indomethacin and 0.5 mM isobutylmethylxanthine (IBMX) for two days. Finally, cells were incubated for a further three days in differentiation media, after which they exhibited a fully differentiated phenotype with numerous multilocular lipid droplets in their cytoplasm.

Oil Red O staining

rBA were grown and differentiated on coverslips. They were rinsed twice in PBS, fixed in 10% paraformaldehyde for 30 minutes at room temperature, and washed again in PBS. Then, cells were rinsed in 60% isopropanol for 5 min to facilitate the staining of neutral lipids, and stained with filtered Oil Red O working solution (0.3% Oil Red O in isopropanol) for 15 minutes. After several washes in distilled water, the coverslips were removed and fixed with mount medium. The intracellular lipid vesicles stained with Oil Red O were identified by their bright red color under the microscope.

Adenovirus (Ad) infection

At day 6 of differentiation, rBA were infected with AdGFP (100 moi) and AdCPT1AM (100 moi) for 48 hours in serum-free DMEM, 1% penicillin/streptomycin and 2 mM HEPES. Adenovirus infection efficiency was assessed in AdGFP-infected cells.

Western blot analysis

rBA were cultured in 12-well plates, differentiated and infected as described above. Cells were harvested in lysis buffer (RIPA), and protein concentration was determined using a BCA protein assay kit (Thermoscientific). Samples were separated on 8% and 12% SDS-PAGE gels, for CPT1A and UCP1 respectively, and then transferred onto PVDF membranes (Millipore). The following primary antibodies were used: CPT1A (1/6,000) [24], Tim 44 (1/5,000; BD Bioscience), UCP1 (1/1,000; Abcam) and b-actin (I-19; 1/4,000; Santa Cruz). Blots were incubated with the appropriate IgG-HRP-conjugated secondary antibody. Protein bands were visualized using the ECL immunoblotting detection system (GE Healthcare) and developed on an ImageQuant LAS4000 mini Fuji luminescence imaging system. For the analysis of protein expression, bands from at least three independent experiments were quantified by densitometry using Image J analysis software.

Analysis of mRNA expression by quantitative real-time PCR

Total RNA was isolated from rBA using an Illustra MiniRNA Spin kit (GE Healthcare), and cDNA was obtained using a Transcriptor First Strand cDNA Synthesis kit (Roche), following the manufacturer's instructions. Relative quantification of mRNA was performed using a LightCycler[®] 480 instrument (Roche) in 10 µL of reaction medium by using 6.5 ng of cDNA, forward and reverse primers at 100 nM each, and a SYBR Green PCR Master Mix Reagent kit (Life Technologies). Primer pairs are shown in [Table 1](#). The mRNA levels were normalized to those of b-actin and expressed as fold change.

Fatty acid oxidation assay

The FAO rate was measured in rBA grown in 25-cm² flasks, differentiated and infected as described above. On the day of the assay, cells were washed in KRBH 0.1% BSA (FA free), pre-incubated at 37°C for 30 min in KRBH 1% BSA, and washed again in KRBH 0.1% BSA. Cells were then incubated for 3 hours at 37°C with fresh KRBH containing 11 mM glucose, 0.8 mM carnitine plus 0.2 mM [1-¹⁴C] oleate (Perkin Elmer). Oxidation was measured as previously described [21].

Glycerol release

rBA were seeded, differentiated in 12-wells plates and infected as described above or incubated in the presence or absence of 5 µM norepinephrine and 180 µM etomoxir for 6 hours. Then, the cell medium was removed and glycerol levels were measured using the TG Triglyceride kit (Sigma-Aldrich), according to the manufacturer's instructions. Samples were normalized by the protein concentration present in each well.

Table 1. Quantitative real-time PCR oligonucleotides.

Gene Name	Forward	Reverse
b-actin	5' - AAGTCCCTCACCTCCCAAAG - 3'	5' AAGCAATGCTGTACCTTCCC - 3'
Cidea	5' -TGATATCCGCTGCACAAGC - 3'	5' -CACCTGGGCAGCATAGGA - 3'
Cd137	5' -AGCTGACAGAGACCTGTGG - 3'	5' -CACATGCACAGACACCAA - 3'
Fabp4	5' -GAGGAGACGAGATGGTGACAA - 3'	5' -GCTCATGCCCTTTCGTAAAC - 3'
Mt-Atp6	5' -TAAGCATAGCCATCCCCCTA - 3'	5' -TTAGTTTGTGTGCGGAAGCCTAGA - 3'
Mt-Co1	5' -TCGGAACCTCTACCTATTATTG - 3'	5' -CTCGAATTAGAATACTTAAAGCTGTCC - 3'
Mt-Co2	5' -TAAGCATAGCCATCCCCCTA - 3'	5' -TTAGTTTGTGTGCGGAAGCCTAGA - 3'
Mt-Cyb	5' -CCCTAGTACTATTCTTCCAGACCT - 3'	5' -AGGGGGTTAGCGGGTGTAT - 3'
Mt-Nd1	5' -CCTCAACCTAGGCATACCATT - 3'	5' -AGGCTCATCCCGATCATAGA - 3'
Pgc1a	5' - AAAGGGCCAAGCAGAGAGA - 3'	5' - GTAAATCACACGGCGCTCTT - 3'
Prdm16	5' -CGGATGTTCCCCAACAAAT - 3'	5' -ACGCTCTTCTGTGTGGACAA - 3'
Tnfa	5' -AAATGGGCTCCCTCTCATCAGTTC - 3'	5' -TCTGCTTGGTGGTTTGTACGAC - 3'
Zic1	5' -AACCTCAAGATCCACAAAAGGA - 3'	5' -CCTCGAACTCGCACTTGAA - 3'
Cpt1a*	5' - ACAATGGGACATTCAGGAG - 3'	5' - AAAGACTGGCGTCTCA - 3'
Cpt1b	5' - GTGACTGGTGGGAAGAGTACG - 3'	5' - CTGCTTGTGGCTCGTGT - 3'
Cpt1c	5' - GCCTGCCAATTTGTGAGAG - 3'	5' - GGCAAGGCACTGTTGGTC - 3'
Mfn2	5' -ATTGGCCACACCACCAAT - 3'	5' -TGGCTAGCTGGTTCAG - 3'

* Recognizes both CPT1A and CPT1AM

doi:10.1371/journal.pone.0159399.t001

Lipid extraction from rBA

rBA were seeded, differentiated in 12-wells plates and infected as described above. Then, cells were collected for lipid extraction following Gesta *et al* protocol [36] with minor modifications: after cell lysis with 0.1% SDS, 1/2/0.12 (v/v/v) methanol/chloroform/0.5M KCl solution was added, the two phases were separated by centrifugation and the upper phase was dried with N₂. Finally, lipids were resuspended in 100% isopropanol.

Measurement of nonesterified fatty acids

Nonesterified fatty acids (NEFAs) were measured in rBA lipid extracts by NEFA-HR detection kit (Wako Diagnostics) according to the manufacturer's instructions. NEFA levels were normalized against protein content.

Seahorse bioanalyzer

The Seahorse XF24 (Seahorse Bioscience, www.seahorsebio.com) was used to measure oxygen consumption rate (OCR) in mature brown adipocytes. For a typical bioenergetic profile we used oligomycin to block ATP synthase; the uncoupler carbonyl cyanide-4-(trifluoromethoxy) phenylhydrazone (FCCP) to measure maximal respiratory capacity; followed by rotenone, the complex 1 inhibitor, and antimycin-A to leave only non-mitochondrial activity to be measured (all from Sigma-Aldrich). Cells were differentiated in customized Seahorse 24-well plates and infected as described above. Before the measurement, cells were incubated for 1 hour with XF Assay Medium (Seahorse Bioscience) plus 5 mM glucose. During the assay, we injected the following at the final concentrations shown: 0.2 μM oligomycin, 0.2 μM FCCP, 1 μM rotenone, and 1 μM antimycin-A. OCR was calculated by plotting the O₂ tension of media as a function of time (pmol/min), and data were normalized by the protein concentration measured in each individual well. The results were quantified as the average of 8–10 wells +/- SEM per time point in at least three independent experiments.

Fatty acid (FA) treatment

Sodium palmitate was conjugated with free BSA in a 5:1 ratio to yield a stock solution of 2.5 mM [27]. Cells were incubated with 0.3 mM or 1 mM of this solution or only BSA (basal control) for 24 hours.

Triglycerides measurement

Triglycerides (TG) were quantified in rBA lipid extracts using TG Triglyceride kit (Sigma), according to the manufacturer's instructions. Protein concentrations were used to normalize sample values.

Statistical analysis

Data are expressed as the mean ± SEM. Control and experimental groups were compared using Student's *t*-test (column analysis) or two-way ANOVA (grouped analysis). *P*<0.05 was considered statistically significant. All figures and statistical analyses were generated using GraphPad Prism 6 software.

Results

Characterization of rBA differentiation stage

A time-course study was performed to assess the differentiation stage of rBA. Differentiation was evaluated by Oil Red O staining, mRNA expression of BAT differentiation markers, and protein levels of UCP1. Oil Red O staining showed an increase in neutral lipid accumulation, starting at day 6 of differentiation (Fig 1A and 1B). The mRNA levels of the brown adipocyte differentiation markers CIDEA, PGC1 α , PRDM16 and Zic1 increased at day 3, and peaked at day 6 of differentiation (Fig 1C). The mRNA levels of the beige adipocyte marker CD137 were unchanged (Fig 1C), which indicates that rBA did not show a beige phenotype. The protein levels of the classical BAT marker, UCP1, were maximal at day 6 of differentiation (Fig 1D). Therefore, day 6, when cells were completely differentiated and had reached maturity, was chosen to perform the expression of CPT1AM.

In addition, we analyzed the mRNA expression pattern of CPT1 isoforms during differentiation (Fig 1E). As expected, CPT1B (the isoform most expressed in BAT), showed higher mRNA changes than the other two isoforms starting at day 3 of differentiation. CPT1A was also increased at day 3 and 6 of differentiation compared to day 0, but to a lesser extent than CPT1B. At day six of differentiation, the three isoforms were significantly increased compared to undifferentiated rBA (day 0).

Enhanced FAO in CPT1AM-expressing rBA

Fully differentiated and mature rBA (day 6) were infected with adenoviruses carrying the CPT1AM gene or GFP as a control. The efficiency of the infection was evaluated in rBA transduced with AdGFP (Fig 2A upper panel; 52.8% infected cells). CPT1A mRNA and protein levels were 9.82- and 3.52-fold higher, respectively, in CPT1AM-expressing rBA than in GFP control cells (Fig 2A lower panel and Fig 2B). The mRNA expression levels of the other CPT1 isoforms (CPT1B and CPT1C) were unaltered in CPT1AM-expressing rBA (S1A Fig and S1 Table). In turn, the FAO rate was 3.42-fold higher in CPT1AM-expressing rBA (Fig 2C). To evaluate whether the increase in FAO was related to an increase in mitochondrial content, we measured the expression of Tim 44 (translocase of mitochondrial inner membrane 44, a mitochondrial content marker), PGC1 α (a mitochondrial biogenesis marker) and Mfn2 (target gene of PGC1 α). No changes were seen in any of these markers, which indicate that CPT1AM expression did not affect mitochondrial content or mitochondrial biogenesis (Fig 2D–2F). Interestingly, the mRNA expression of the mitochondrial electron transport respiratory chain (ETC) complexes such as mitochondrial NADH dehydrogenase 1 (Mt-Nd1, complex I), cytochrome b (Mt-Cyb, complex III), cytochrome C oxidase I (Mt-Co1, complex IV component), and ATP synthase 6 (Mt-ATP6, complex V), were increased in CPT1AM-expressing rBA (Fig 2G).

CPT1AM expression increases lipolysis and UCP1 protein levels

The effects of increased FAO on lipolysis and UCP1 protein levels were measured as markers of activation of thermogenesis. We measured intracellular nonesterified fatty acids (NEFAs) and glycerol release, which are two major products of lipolysis, a conventional method to quantify thermogenesis. NEFAs and glycerol levels were increased in CPT1AM-expressing rBA, indicating that CPT1AM expression stimulates lipolysis (Fig 3A and 3B). CPT1AM-expressing cells showed a 1.6-fold increase in UCP1 protein levels compared to GFP-infected cells (Fig 3C).

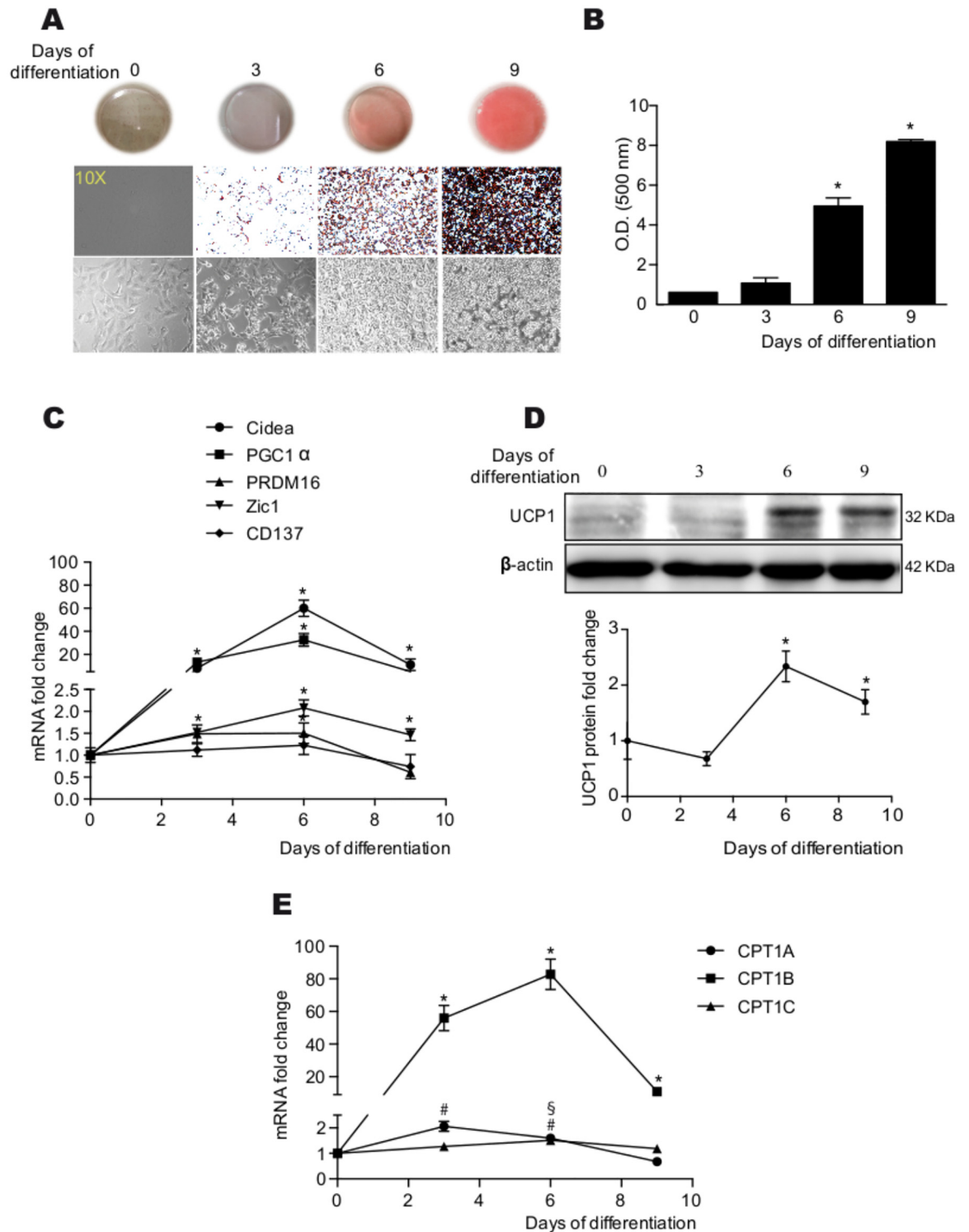


Fig 1. Assessment of rBA differentiation. (A) Oil Red O staining of rBA at different days of differentiation. (B) Quantification of the Oil Red O staining images. (C) Relative mRNA expression of brown (CIDEA, PGC1 α , PRDM16, and Zic1) or beige adipocyte markers (CD137). (D) UCP1 protein expression. € Relative mRNA expression of the three CPT1 isoforms during rBA differentiation. The values represent the mean \pm SEM of at least three independent experiments. *, #, § $P < 0.05$ compared with day 0 of differentiation of CPT1B, CPT1A and CPT1C, respectively.

doi:10.1371/journal.pone.0159399.g001

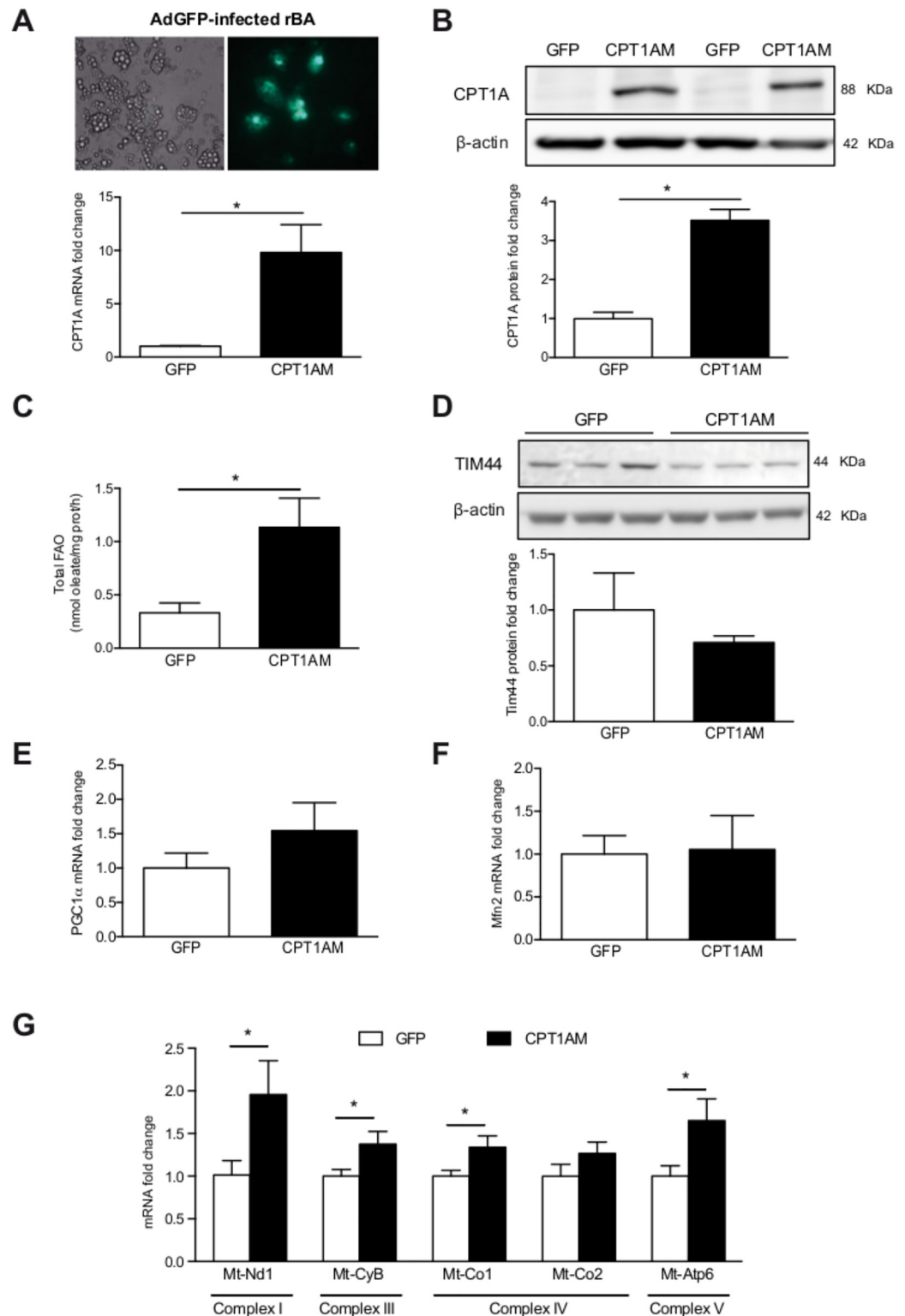


Fig 2. Enhanced FAO in CPT1AM-expressing rBA. (A) (upper panel) AdGFP-infected rBA 48h after infection. A (lower panel): Relative CPT1A mRNA expression in AdGFP- or AdCPT1AM-infected rBA. (B) Whole cell lysates from GFP- and CPT1AM-expressing rBA were subjected to immunoblot analysis with a specific antibody against CPT1A and b-actin. (C) Total FAO rate represented as the sum of acid soluble products plus CO₂ oxidation. (D) Whole cell lysates from GFP- and CPT1AM-expressing rBA were subjected to immunoblot

analysis with a specific antibody against Tim 44 and b-actin. (E-F) Relative PGC1a and Mfn2 mRNA expression in AdGFP- or AdCPT1AM-infected rBA. (G) Relative mRNA expression of the mitochondrial ETC complexes. Shown representative experiment out of 3, n = 3–4. **P* < 0.05.

doi:10.1371/journal.pone.0159399.g002

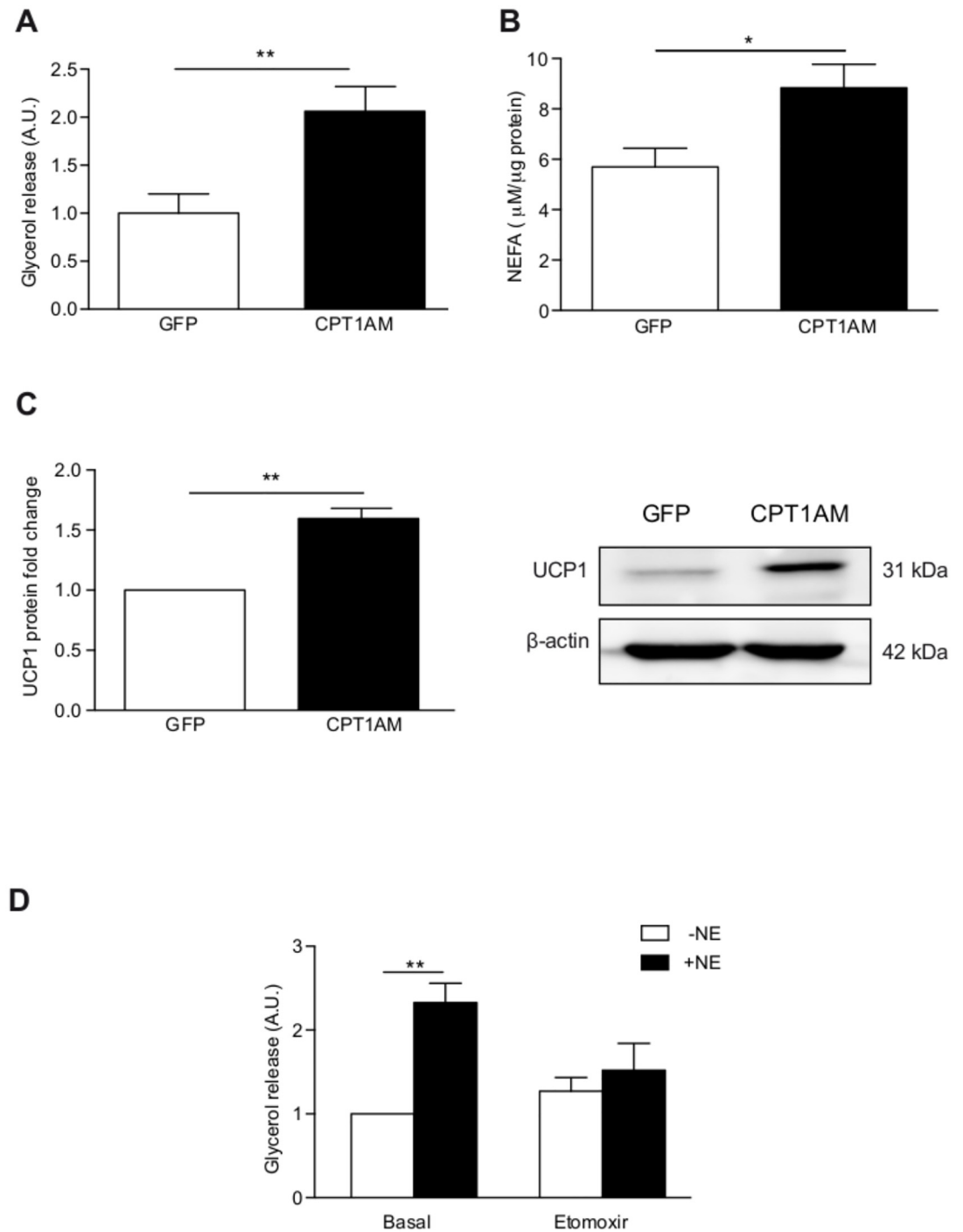


Fig 3. Enhanced lipolysis and UCP1 protein levels in CPT1AM-expressing rBA. (A, B) Lipolysis measured as glycerol release and intracellular NEFAs concentration in GFP- and CPT1AM-expressing rBA. (C) CPT1AM expression increases UCP1 protein levels. (D) Glycerol release in rBA incubated for 6 hours with or without 5 µM norepinephrine (NE) and 180 µM etomoxir. Shown representative experiment out of 3, n = 3–4. **P* < 0.05, ***P* < 0.01.

doi:10.1371/journal.pone.0159399.g003

To further examine the role of FAO in rBA thermogenesis, rBA were stimulated with nor-epinephrine (NE) and incubated with or without etomoxir, an irreversible CPT1-specific inhibitor. Glycerol release was measured after 6 hours of treatment. The NE-induced increase in lipolysis was blunted in etomoxir-treated rBA (Fig 3E).

Increased mitochondrial respiration in CPT1AM-expressing rBA

The CPT1AM-induced increase in FAO, UCP1 protein levels and lipolysis prompted us to evaluate potential changes in rBA energetics. Bioenergetic studies were performed using a XF24 Extracellular Flux Analyzer (Seahorse Biosciences) to measure the mitochondrial activity. First, basal respiration was measured, followed by exposure to oligomycin, an inhibitor of ATP synthase, which allowed the measurement of ATP synthesis-coupled respiration and H⁺ leak. Then, the uncoupler carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy) phenylhydrazone [FCCP] was added to measure the maximal respiratory capacity, followed by the Complex I inhibitor rotenone and complex III inhibitor antimycin A, which left only non-mitochondrial respiration to be measured (Fig 4A). Interestingly, the bioenergetic profile of CPT1AM-expressing rBA revealed significant increases in overall mitochondrial respiration (Fig 4A–4F). CPT1AM-expressing rBA showed higher basal respiration (Fig 4B), H⁺ leak (Fig 4C), maximal respiratory capacity (Fig 4D), ATP synthesis-coupled respiration (Fig 4E), and reserve capacity (Fig 4F) than GFP control cells.

CPT1AM expression reduces palmitate-induced derangements

The palmitate-induced increase in triglyceride (TG) accumulation was blunted in CPT1AM-expressing rBA (Fig 5A). The mRNA levels of the obesity (FABP4) and inflammatory (TNF α) markers were increased after palmitate treatment. However, CPT1AM-expressing rBA were protected from a palmitate-induced increase in FABP4 and TNF α (Fig 5B and 5C). The mRNA levels of the ER stress markers CHOP and EDEM were decreased in CPT1AM-expressing rBA compared to GFP-control cells (S1B Fig and S1 Table).

Discussion

Obesity and associated diseases such as diabetes have become a worldwide health threat. Dyslipidemia is a common characteristic shared by these metabolic disorders, and the lipid-central point of view has become popular in recent years. The finding that humans have active brown fat has raised high expectations for the treatment of obesity-induced diseases, since brown fat can dissipate caloric energy and reduce both obesity and diabetes in experimental animals [8–12,37–40]. In fact, after short-term cold exposure, brown fat is the main lipid clearance organ [16]. Thus, recent years have seen increasing interest in the regulation of BAT thermogenesis. Most of the strategies have been focused on the role of UCP1 and attempts to enhance heat production, although other authors argue that additional genes may cooperate in the thermogenic function [41].

The finding that BAT is the tissue with the highest FAO rate [42] and that the activity of the FAO rate-limiting enzyme, CPT1, is decreased in BAT of diabetic rats [32] led us to hypothesize that BAT thermogenic power could be enhanced by increasing its FAO. Thus, we overexpressed the constitutively active mutant form, CPT1AM, in rBA.

The assessment of rBA differentiation by Oil Red O staining, UCP1 protein levels and mRNA expression of several BAT differentiation markers showed that the rBA were fully differentiated and mature at day 6. Thus, day 6 was chosen for further experiments. The expression pattern of the three CPT1 isoforms (CPT1A, CPT1B and CPT1C) indicated that all were significantly increased during differentiation, especially CPT1B. Although further studies will

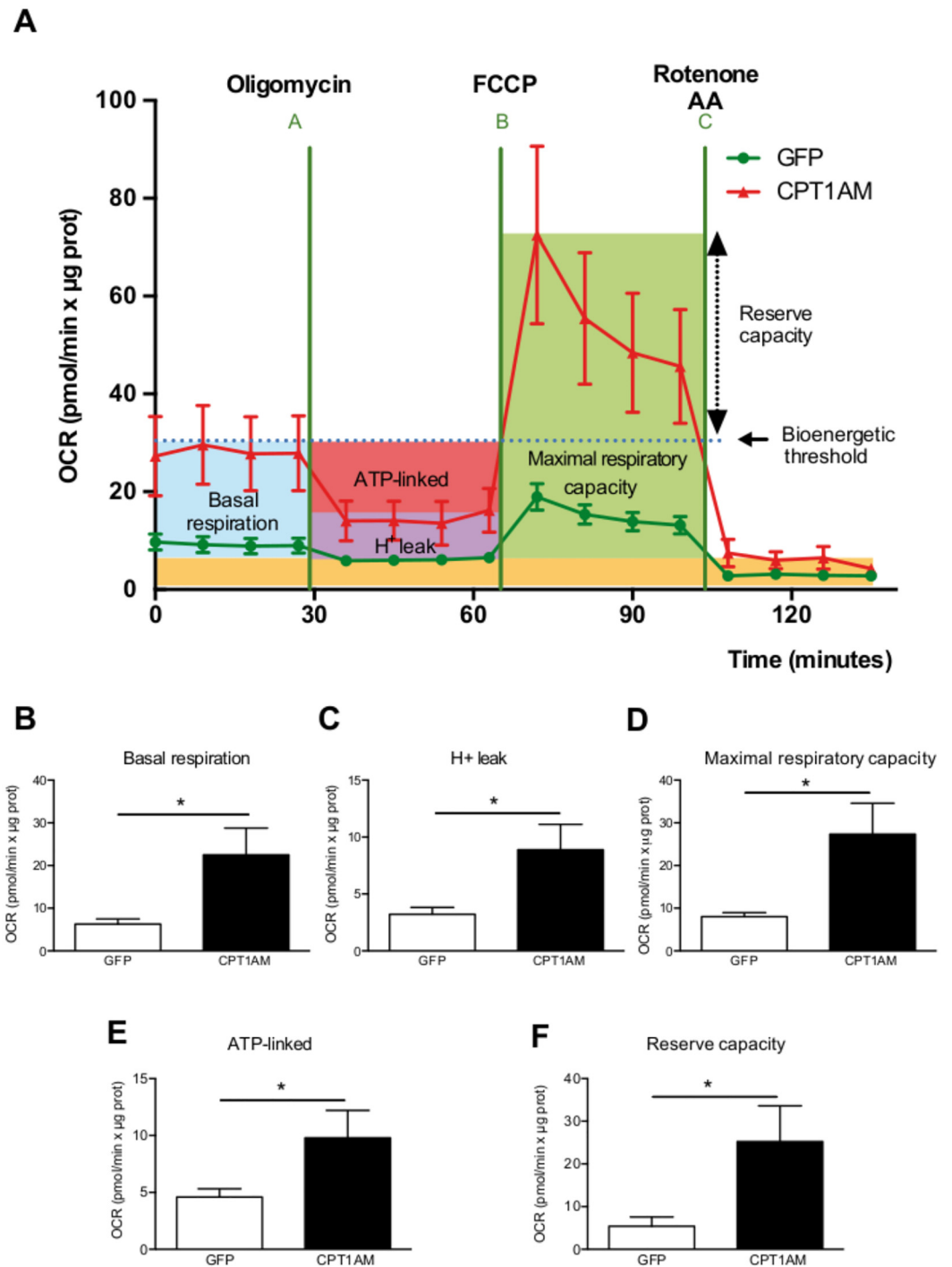


Fig 4. Increased mitochondrial activity in CPT1AM-expressing rBA. (A) Bioenergetic profile of GFP- and CPT1AM-expressing rBA. (B-F) Quantification of Seahorse analysis: basal respiration (B), H⁺ leak (C), maximal respiratory capacity (D), ATP-linked (E) and reserve capacity (F). Shown representative experiment out of 3, n = 8–10. *P < 0.05.

doi:10.1371/journal.pone.0159399.g004

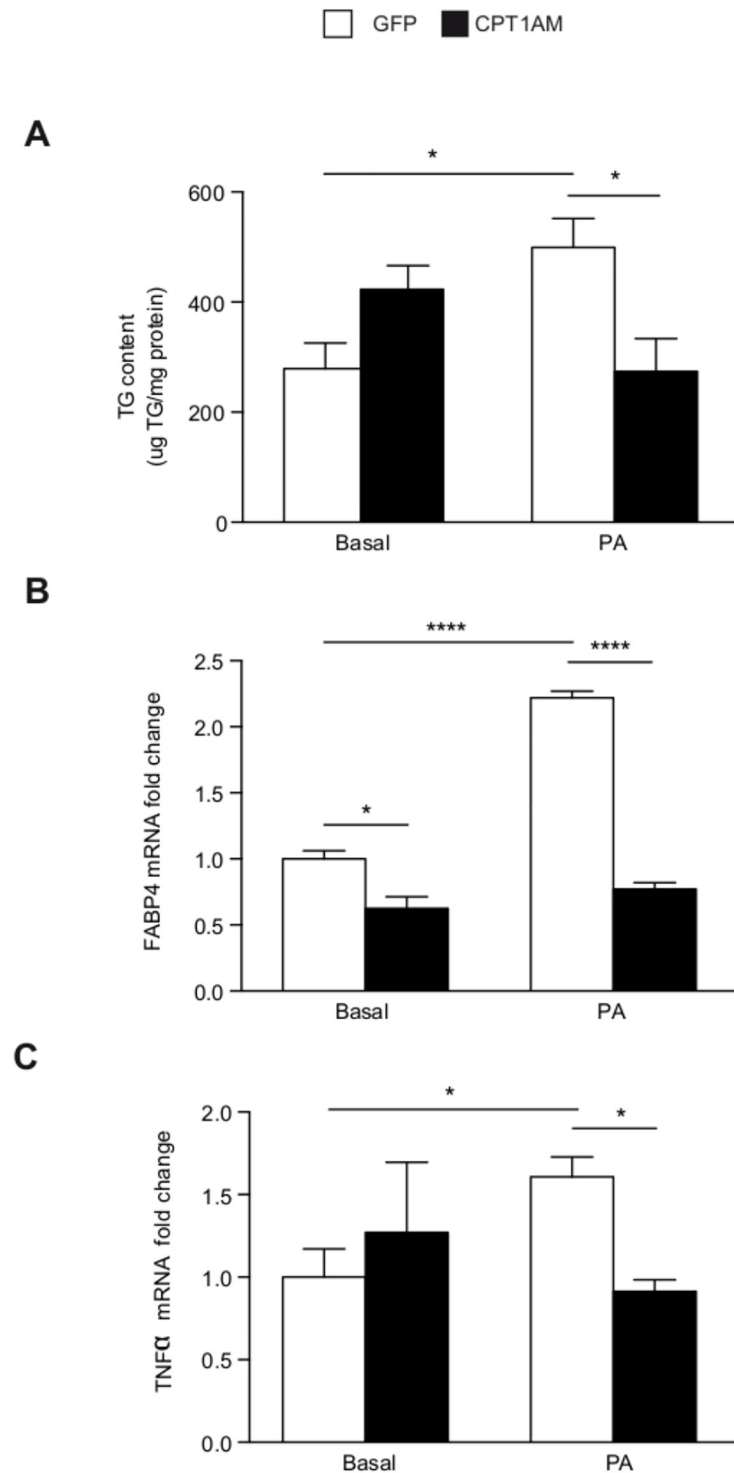


Fig 5. CPT1AM expression is able to reduce lipid-induced derangements. (A) TG content in GFP- or CPT1AM-expressing rBA treated with BSA (basal) or 1 mM palmitate (PA) for 24 hours. (B-C) Relative mRNA expression of FABP4 and TNF α in GFP- or CPT1AM-expressing rBA incubated with 1 mM (FABP4) or 0.3 mM (TNF α) PA. Shown representative experiment out of 3, n = 3–4. * P < 0.05, ** P < 0.01.

doi:10.1371/journal.pone.0159399.g005

be necessary to identify the specific function of each isoform in BAT, these results implicate all three isoforms in the differentiation of brown adipocytes.

Despite BAT being the tissue with the highest FAO rate [42], here we were able to further increase FAO in rBA by the expression of CPT1AM. This was achieved without changes in mitochondrial content or biogenesis. CPT1AM-expressing cells had higher lipolysis and UCP1 protein expression, usually considered as increased thermogenesis. This indicates that CPT1AM-mediated increase in FAO could be an alternative pathway for the regulation of thermogenesis. Initially, BAT thermogenesis requires a plentiful supply of FAs as substrates [43,44]. Therefore, lipolysis is activated during this process, releasing FAs from TG. FAs could be transported into the mitochondria, be involved in the regulation of UCP1 or directly activate UCP1, which uncouples oxidative phosphorylation from ATP production, generating heat [45,46]. Although further experiments will be needed to determine UCP1 regulation during CPT1AM expression, here we have shown that FAO enhancement not only increases lipolysis in rBA, but it is also associated with increased UCP1 protein expression, whose levels are rate-limiting for thermogenesis [47]. Since FA constitute the primary substrate for BAT [48] we hypothesize that CPT1AM expression increases the provision of BAT FA by: 1) directly introducing them into the mitochondria and 2) enhancing lipolysis. The liberated FA then activate and bind to UCP1 in the inner mitochondrial membrane resulting in proton transport, heat generation, and oxygen consumption [48,49]. Thus, CPT1AM may directly or indirectly trigger lipid mobilization to provide BAT mitochondria with fuel (FA).

Several studies have demonstrated the importance of FAO in BAT. Ji *et al.* showed that CPT1B^{+/-} mice developed fatal hypothermia as a result of their inability to perform thermogenesis [50]. More recently, a study in adipocyte-specific CPT2 KO mice indicated that FAO is required for the induction of thermogenic genes in BAT and cold adaptation [29]. In addition, Chondronikola *et al.* have shown that humans with higher amounts of BAT have also higher FAO during cold exposure and that BAT volume is associated with increased lipid metabolism (whole-body FA turnover and oxidation) and adipose tissue insulin sensitivity [51,52]. Here we show that etomoxir (a CPT1-specific inhibitor) blocks TG breakdown in NE-stimulated rBA. These observations indicate that lipolysis supplies substrates for thermogenesis, but when CPT1 is inhibited, free FAs are not transported into the mitochondria and lipolysis is blunted. This would support previous observations that CPT1 inhibitors suppress mitochondrial respiration [53], and that FAO plays an important role during thermogenesis. CPT1AM-expressing rBA displayed increased basal respiration, H⁺ leak, maximal respiratory capacity, and reserve capacity. The increase in H⁺ leak is consistent with the increase seen in UCP1 protein expression. CPT1AM-expressing rBA showed increased lipolysis (FA substrate availability) and mitochondrial ETC complexes mRNA expression. This could have contributed to the enhanced maximal respiratory capacity [54]. Reserve capacity is the difference between maximal respiratory capacity and basal respiration, and it is a useful qualitative indicator of mitochondrial energetic status [54,55]. Thus, our data indicate that enhanced FAO in brown adipocytes potentiates mitochondrial activity.

Finally, we evaluated whether enhanced FAO by CPT1AM expression in the context of obesity would improve lipid-induced derangements. Thus, we decided to mimic an obese phenotype in our cellular rBA model. Traditionally, FA incubation has been used to activate thermogenesis [56]. We tested several palmitate concentrations and different times of incubation to achieve a lipid-induced increase in TG accumulation and FABP4 and TNF α mRNA expression, similar to that previously observed in obese and lipodystrophic mice [16,57,58]. Enhanced FAO in rBA reduced TG content and FABP4 and TNF α mRNA levels, thereby protecting brown adipocytes from obesity and inflammation. These observations highlight

CPT1AM-mediated activation of FAO in brown adipocytes as a potential strategy to treat obesity-induced diseases.

In summary, we have shown that CPT1AM expression in rBA increases FAO, lipolysis, UCP1 protein levels and mitochondrial activity. Incubation of rBA with the CPT1-specific inhibitor, etomoxir, blocks NE-stimulated lipolysis. Furthermore, enhanced FAO restored the palmitate-induced increase in TG accumulation and the expression levels of obese and inflammatory markers. We conclude that enhancing the fat-burning power of brown adipocytes through CPT1AM expression may protect them from lipid-induced derangements. Thus, CPT1AM-mediated increase in lipolysis, UCP1 protein expression and mitochondrial activity in brown adipocytes may lead to a new treatment of obesity and related disorders.

Supporting Information

S1 Fig. mRNA expression levels of CPT1 isoforms and ER stress markers. (A) Relative mRNA expression of CPT1A, CPT1B and CPT1C in GFP- or CPT1AM-expressing rBA. (B) Relative mRNA expression of BiP, CHOP and EDEM in GFP- or CPT1AM-expressing rBA incubated with 1 mM palmitate (PA). See [S1 Table](#) for primer design. Shown representative experiment out of 3, n = 3–4. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. (TIF)

S1 Table. Quantitative real-time PCR oligonucleotides. (DOCX)

Acknowledgments

We thank Lucille Banham from the Language Services at the Universitat de Barcelona for valuable assistance in the preparation of the English manuscript and Anna Orozco for research assistance.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: MCD DS RF MW JFM AMV DS LH. Performed the experiments: MCD DS RF MW EGC. Analyzed the data: MCD DS RF MW JFM EGC MJO AZ AMV DS LH. Contributed reagents/materials/analysis tools: MJO AZ AMV DS LH. Wrote the paper: MCD DS RF MJO AMV DS LH.

References

1. World Health Organization (n.d.) Obesity and overweight. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/> (accessed 5 January 2016).
2. Shoelson SE, Herrero L, Naaz A (2007) Obesity, inflammation, and insulin resistance. *Gastroenterology* 132: 2169–2180. doi: [10.1053/j.gastro.2007.03.059](https://doi.org/10.1053/j.gastro.2007.03.059) PMID: [17498510](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17498510/)
3. Samuel VT, Shulman GI (2012) Mechanisms for insulin resistance: Common threads and missing links. *Cell* 148: 852–871. doi: [10.1016/j.cell.2012.02.017](https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.02.017) PMID: [22385956](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22385956/)
4. Sun K, Kusminski CM, Scherer PE (2011) Adipose tissue remodeling and obesity. *J Clin Invest* 121: 2094–2101. doi: [10.1172/JCI45887](https://doi.org/10.1172/JCI45887) PMID: [21633177](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21633177/)
5. Virtue S, Vidal-Puig A (2010) Adipose tissue expandability, lipotoxicity and the Metabolic Syndrome—An allostatic perspective. *Biochim Biophys Acta—Mol Cell Biol Lipids* 1801: 338–349.
6. Hany TF, Gharehpapagh E, Kamel EM, Buck A, Himms-Hagen J, et al. (2002) Brown adipose tissue: A factor to consider in symmetrical tracer uptake in the neck and upper chest region. *Eur J Nucl Med* 29: 1393–1398. doi: [10.1007/s00259-002-0902-6](https://doi.org/10.1007/s00259-002-0902-6)
7. Nedergaard J, Bengtsson T, Cannon B (2007) Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 293: E444–E452. doi: [10.1152/ajpendo.00691.2006](https://doi.org/10.1152/ajpendo.00691.2006) PMID: [17473055](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17473055/)

8. Cypess AM, Lehman S, Williams G, Tal I, Rodman D, et al. (2009) Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. *N Engl J Med* 360: 1509–1517.
9. Virtanen KA, Lidell ME, Orava J, Heglind M, Westergren R, et al. (2009) Functional brown adipose tissue in healthy adults. *N Engl J Med* 360: 1518–1525. doi: [10.1056/NEJMoa0808949](https://doi.org/10.1056/NEJMoa0808949) PMID: [19357407](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19357407/)
10. Zingaretti MC, Crosta F, Vitali A, Guerrieri M, Frontini A, et al. (2009) The presence of UCP1 demonstrates that metabolically active adipose tissue in the neck of adult humans truly represents brown adipose tissue. *FASEB J* 23: 3113–3120. doi: [10.1096/fj.09-133546](https://doi.org/10.1096/fj.09-133546) PMID: [19417078](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19417078/)
11. Saito M, Okamatsu-Ogura Y, Matsushita M, Watanabe K, Yoneshiro T, et al. (2009) High incidence of metabolically active brown adipose tissue in healthy adult humans: effects of cold exposure and adiposity. *Diabetes* 58: 1526–1531. doi: [10.2337/db09-0530](https://doi.org/10.2337/db09-0530) PMID: [19401428](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19401428/)
12. van Marken Lichtenbelt WD, Vanhomerig JW, Smulders NM, Drossaerts JM a FL, Kemerink GJ, et al. (2009) Cold-activated brown adipose tissue in healthy men. *N Engl J Med* 360: 1500–1508. doi: [10.1056/NEJMoa0808718](https://doi.org/10.1056/NEJMoa0808718) PMID: [19357405](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19357405/)
13. Xue R, Lynes MD, Dreyfuss JM, Shamsi F, Schulz TJ, et al. (2015) Clonal analyses and gene profiling identify genetic biomarkers of the thermogenic potential of human brown and white preadipocytes. *Nat Med* 21: 760–768. doi: [10.1038/nm.3881](https://doi.org/10.1038/nm.3881) PMID: [26076036](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26076036/)
14. Calderon-Dominguez M, Mir JF, Fucho R, Weber M, Serra D, Herrero L (2016) Fatty Acid Metabolism and the Basis of Brown Adipose Tissue Function. *Adipocyte*: 5:98–118. doi: [10.1080/21623945.2015.1122857](https://doi.org/10.1080/21623945.2015.1122857) PMID: [27386151](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27386151/)
15. de Jong JM a, Larsson O, Cannon B, Nedergaard J (2015) A stringent validation of mouse adipose tissue identity markers. *Am J Physiol—Endocrinol Metab* 308: E1085–E1105. doi: [10.1152/ajpendo.00023.2015](https://doi.org/10.1152/ajpendo.00023.2015) PMID: [25898951](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25898951/)
16. Bartelt A, Bruns OT, Reimer R, Hohenberg H, Iltich H, et al. (2011) Brown adipose tissue activity controls triglyceride clearance. *Nat Med* 17: 200–205. doi: [10.1038/nm.2297](https://doi.org/10.1038/nm.2297) PMID: [21258337](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21258337/)
17. Festuccia WT, Blanchard P-G, Deshaies Y (2011) Control of Brown Adipose Tissue Glucose and Lipid Metabolism by PPAR γ . *Front Endocrinol (Lausanne)* 2: 84. doi: [10.3389/fendo.2011.00084](https://doi.org/10.3389/fendo.2011.00084)
18. Festuccia WT, Blanchard P-G, Turcotte V, Laplante M, Sariahmetoglu M, et al. (2009) The PPAR γ agonist rosiglitazone enhances rat brown adipose tissue lipogenesis from glucose without altering glucose uptake. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 296: R1327–R1335. doi: [10.1152/ajpregu.91012.2008](https://doi.org/10.1152/ajpregu.91012.2008) PMID: [19211718](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19211718/)
19. Malandrino MI, Fucho R, Weber M, Calderon-Dominguez M, Mir JF, et al. (2015) Enhanced fatty acid oxidation in adipocytes and macrophages reduces lipid-induced triglyceride accumulation and inflammation. *Am J Physiol—Endocrinol Metab* 308: E756–E769. doi: [10.1152/ajpendo.00362.2014](https://doi.org/10.1152/ajpendo.00362.2014) PMID: [25714670](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25714670/)
20. Stefanovic-Racic M, Perdomo G, Mantell BS, Sipula IJ, Brown NF, et al. (2008) A moderate increase in carnitine palmitoyltransferase 1a activity is sufficient to substantially reduce hepatic triglyceride levels. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 294: E969–E977. doi: [10.1152/ajpendo.00497.2007](https://doi.org/10.1152/ajpendo.00497.2007) PMID: [18349115](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18349115/)
21. Orellana-Gavaldà JM, Herrero L, Malandrino MI, Pañeda A, Sol Rodríguez-Peña M, et al. (2011) Molecular therapy for obesity and diabetes based on a long-term increase in hepatic fatty-acid oxidation. *Hepatology* 53: 821–832. doi: [10.1002/hep.24140](https://doi.org/10.1002/hep.24140) PMID: [21319201](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21319201/)
22. Monsénégó J, Mansouri A, Akkaoui M, Lenoir V, Esnous C, et al. (2012) Enhancing liver mitochondrial fatty acid oxidation capacity in obese mice improves insulin sensitivity independently of hepatic steatosis. *J Hepatol* 56: 632–639. doi: [10.1016/j.jhep.2011.10.008](https://doi.org/10.1016/j.jhep.2011.10.008) PMID: [22037024](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22037024/)
23. Rubi B, Antinozzi PA, Herrero L, Ishihara H, Asins G, et al. (2002) Adenovirus-mediated overexpression of liver carnitine palmitoyltransferase I in INS1E cells: effects on cell metabolism and insulin secretion. *Biochem J* 364: 219–226. PMID: [11988095](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11988095/)
24. Herrero L, Rubí B, Sebastián D, Serra D, Asins G, et al. (2005) Alteration of the malonyl-CoA/carnitine palmitoyltransferase I interaction in the beta-cell impairs glucose-induced insulin secretion. *Diabetes* 54: 462–471. doi: [10.2337/diabetes.54.2.462](https://doi.org/10.2337/diabetes.54.2.462) PMID: [15677504](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15677504/)
25. Mera P, Mir JF, Fabriàs G, Casas J, Costa ASH, et al. (2014) Long-term increased carnitine palmitoyltransferase 1A expression in ventromedial hypothalamus causes hyperphagia and alters the hypothalamic lipidomic profile. *PLoS One* 9: e97195. doi: [10.1371/journal.pone.0097195](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0097195) PMID: [24819600](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24819600/)
26. Perdomo G, Commerford SR, Richard A-MT, Adams SH, Corkey BE, et al. (2004) Increased beta-oxidation in muscle cells enhances insulin-stimulated glucose metabolism and protects against fatty acid-induced insulin resistance despite intramyocellular lipid accumulation. *J Biol Chem* 279: 27177–27186. doi: [10.1074/jbc.M403566200](https://doi.org/10.1074/jbc.M403566200) PMID: [15105415](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15105415/)
27. Sebastián D, Herrero L, Serra D, Asins G, Hegardt FG (2007) CPT I overexpression protects L6E9 muscle cells from fatty acid-induced insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 292: E677–E686. doi: [10.1152/ajpendo.00360.2006](https://doi.org/10.1152/ajpendo.00360.2006) PMID: [17062841](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17062841/)

28. Bruce CR, Hoy AJ, Turner N, Watt MJ, Allen TL, et al. (2009) Overexpression of carnitine palmitoyltransferase-1 in skeletal muscle is sufficient to enhance fatty acid oxidation and improve high-fat diet-induced insulin resistance. *Diabetes* 58: 550–558. doi: [10.2337/db08-1078](https://doi.org/10.2337/db08-1078) PMID: [19073774](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19073774/)
29. Lee J, Ellis JM, Wolfgang MJ (2015) Adipose Fatty Acid Oxidation Is Required for Thermogenesis and Potentiates Oxidative Stress-Induced Inflammation. *Cell Rep* 10: 266–279. doi: [10.1016/j.celrep.2014.12.023](https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.12.023) PMID: [25578732](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25578732/)
30. Brown NF, Hill JK, Esser V, Kirkland JL, Corkey BE, et al. (1997) Mouse white adipocytes and 3T3-L1 cells display an anomalous pattern of carnitine palmitoyltransferase (CPT) I isoform expression during differentiation. Inter-tissue and inter-species expression of CPT I and CPT II enzymes. *Biochem J* 327: 225–231. PMID: [9355756](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9355756/)
31. Price N, van der Leij F, Jackson V, Corstorphine C, Thomson R, et al. (2002) A novel brain-expressed protein related to carnitine palmitoyltransferase I. *Genomics* 80: 433–442. doi: [10.1006/geno.2002.6845](https://doi.org/10.1006/geno.2002.6845) PMID: [12376098](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12376098/)
32. Jamal Z, Saggerson ED (1988) Changes in brown-adipose-tissue mitochondrial processes in streptozotocin-diabetes. *Biochem J* 252: 293–296. PMID: [3421907](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3421907/)
33. Morillas M, Gómez-Puertas P, Bentebibel A, Sellés E, Casals N, et al. (2003) Identification of conserved amino acid residues in rat liver carnitine palmitoyltransferase I critical for malonyl-CoA inhibition: Mutation of methionine 593 abolishes malonyl-CoA inhibition. *J Biol Chem* 278: 9058–9063. doi: [10.1074/jbc.M209999200](https://doi.org/10.1074/jbc.M209999200) PMID: [12499375](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12499375/)
34. McGarry JD, Mills SE, Long CS, Foster DW (1983) Observations on the affinity for carnitine, and malonyl-CoA sensitivity, of carnitine palmitoyltransferase I in animal and human tissues. Demonstration of the presence of malonyl-CoA in non-hepatic tissues of the rat. *Biochem J* 214: 21–28. PMID: [6615466](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6615466/)
35. Lorenzo M, Valverde a. M, Teruel T, Benito M (1993) IGF-I is a mitogen involved in differentiation-related gene expression in fetal rat brown adipocytes. *J Cell Biol* 123: 1567–1575. doi: [10.1083/jcb.123.6.1567](https://doi.org/10.1083/jcb.123.6.1567) PMID: [8253851](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8253851/)
36. Gesta S, Bezy O, Mori MA, Macotella Y, Lee KY, et al. (2011) Mesodermal developmental gene Tbx15 impairs adipocyte differentiation and mitochondrial respiration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 2771–2776. doi: [10.1073/pnas.1019704108](https://doi.org/10.1073/pnas.1019704108) PMID: [21282637](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21282637/)
37. Zhang Y, Xu Q, Liu YH, Zhang XS, Wang J, et al. (2015) Medium-Chain Triglyceride Activated Brown Adipose Tissue and Induced Reduction of Fat Mass in C57BL/6J Mice Fed High-fat Diet. *Biomed Environ Sci* 28: 97–104. doi: [10.3967/bes2015.012](https://doi.org/10.3967/bes2015.012) PMID: [25716560](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25716560/)
38. Liu X, Wang S, You Y, Meng M, Zheng Z, et al. (2015) Brown Adipose Tissue Transplantation Reverses Obesity in Ob/Ob Mice. *Endocrinology* 156: 2461–2469. doi: [10.1210/en.2014-1598](https://doi.org/10.1210/en.2014-1598) PMID: [25830704](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25830704/)
39. Heppner KM, Marks S, Holland J, Ottaway N, Smiley D, et al. (2015) Contribution of brown adipose tissue activity to the control of energy balance by GLP-1 receptor signalling in mice. *Diabetologia* 58: 2124–2132. doi: [10.1007/s00125-015-3651-3](https://doi.org/10.1007/s00125-015-3651-3) PMID: [26049402](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26049402/)
40. Thiam AR, Farese R V, Walther TC (2013) The biophysics and cell biology of lipid droplets. *Nat Rev Mol Cell Biol* 14: 775–786. doi: [10.1038/nrm3699](https://doi.org/10.1038/nrm3699) PMID: [24220094](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24220094/)
41. Yu XX, Lewin DA, Forrest W, Adams SH (2002) Cold elicits the simultaneous induction of fatty acid synthesis and beta-oxidation in murine brown adipose tissue: prediction from differential gene expression and confirmation in vivo. *FASEB J* 16: 155–168. doi: [10.1096/fj.01-0568com](https://doi.org/10.1096/fj.01-0568com) PMID: [11818363](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11818363/)
42. Doh K-O, Kim Y-W, Park S-Y, Lee S-K, Park JS, et al. (2005) Interrelation between long-chain fatty acid oxidation rate and carnitine palmitoyltransferase 1 activity with different isoforms in rat tissues. *Life Sci* 77: 435–443. doi: [10.1016/j.lfs.2004.11.032](https://doi.org/10.1016/j.lfs.2004.11.032) PMID: [15894012](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15894012/)
43. Nedergaard J, Bengtsson T, Cannon B (2011) New powers of brown fat: Fighting the metabolic syndrome. *Cell Metab* 13: 238–240. doi: [10.1016/j.cmet.2011.02.009](https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.02.009) PMID: [21356513](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21356513/)
44. Townsend KL, Tseng Y-H (2014) Brown fat fuel utilization and thermogenesis. *Trends Endocrinol Metab* 25: 168–177. doi: [10.1016/j.tem.2013.12.004](https://doi.org/10.1016/j.tem.2013.12.004) PMID: [24389130](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24389130/)
45. Smith RE (1961) Thermogenic activity of the hibernating gland in the cold-acclimated rat. *Physiologist* 4: 113–113.
46. Cannon B, Nedergaard J (2004) Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev* 84: 277–359. doi: [10.1152/physrev.00015.2003](https://doi.org/10.1152/physrev.00015.2003) PMID: [14715917](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14715917/)
47. Shabalina IG, Ost M, Petrovic N, Vrbacky M, Nedergaard J, et al. (2010) Uncoupling protein-1 is not leaky. *Biochim Biophys Acta—Bioenerg* 1797: 773–784. doi: [10.1016/j.bbabi.2010.04.007](https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2010.04.007)
48. Cannon B, Nedergaard J (2004) Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev* 84: 277–359. doi: [10.1152/physrev.00015.2003](https://doi.org/10.1152/physrev.00015.2003) PMID: [14715917](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14715917/)
49. Li Y, Fromme T, Schweizer S, Schöttl T, Klingenspor M (2014) Taking control over intracellular fatty acid levels is essential for the analysis of thermogenic function in cultured primary brown and beige adipocytes. *EMBO Rep* 15: 1069–1076. doi: [10.15252/embr.201438775](https://doi.org/10.15252/embr.201438775) PMID: [25135951](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25135951/)

50. Ji S, You Y, Kerner J, Hoppel CL, Schoeb TR, et al. (2008) Homozygous carnitine palmitoyltransferase 1b (muscle isoform) deficiency is lethal in the mouse. *Mol Genet Metab* 93: 314–322. PMID: [18023382](#)
51. Chondronikola M, Volpi E, Børsheim E, Porter C, Annamalai P, et al. (2014) Brown Adipose Tissue Improves Whole-Body Glucose Homeostasis and Insulin Sensitivity in Humans. *Diabetes* 63: 4089–4099. doi: [10.2337/db14-0746](#) PMID: [25056438](#)
52. Chondronikola M, Volpi E, Børsheim E, Porter C, Saraf MK, et al. (2016) Brown Adipose Tissue Activation Is Linked to Distinct Systemic Effects on Lipid Metabolism in Humans. *Cell Metab* 23: 1200–1206. doi: [10.1016/j.cmet.2016.04.029](#) PMID: [27238638](#)
53. Bukowiecki LJ, Folléa N, Lupien J, Paradis A (1981) Metabolic relationships between lipolysis and respiration in rat brown adipocytes. The role of long chain fatty acids as regulators of mitochondrial respiration and feedback inhibitors of lipolysis. *J Biol Chem* 256: 12840–12848. PMID: [6273408](#)
54. Hill BG, Benavides GA, Lancaster JR, Ballinger S, Dell'Italia L, et al. (2012) Integration of cellular bioenergetics with mitochondrial quality control and autophagy. *Biol Chem* 393: 1485–1512. doi: [10.1515/hsz-2012-0198](#) PMID: [23092819](#)
55. Chacko BK, Kramer P a, Ravi S, Benavides G a, Mitchell T, et al. (2014) The Bioenergetic Health Index: a new concept in mitochondrial translational research. *Clin Sci (Lond)* 127: 367–373. doi: [10.1042/CS20140101](#)
56. Divakaruni AS, Humphrey DM, Brand MD (2012) Fatty acids change the conformation of uncoupling protein 1 (UCP1). *J Biol Chem* 287: 36845–36853. doi: [10.1074/jbc.M112.381780](#) PMID: [22952235](#)
57. Queipo-Ortuño MI, Escoté X, Cepuelo-Mallafre V, Garrido-Sanchez L, Miranda M, et al. (2012) FABP4 dynamics in obesity: discrepancies in adipose tissue and liver expression regarding circulating plasma levels. *PLoS One* 7: e48605. doi: [10.1371/journal.pone.0048605](#) PMID: [23139800](#)
58. Herrero L, Shapiro H, Nayer A, Lee J, Shoelson SE (2010) Inflammation and adipose tissue macrophages in lipodystrophic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 240–245. doi: [10.1073/pnas.0905310107](#) PMID: [20007767](#)